



## EFEITO DA GEMCITABINA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO

Gabrielle Cosme Coelho<sup>1</sup>, Maicon Zanandrea<sup>2</sup>, Ivana Grivicich<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluno do colégio Cristo Redentor – Bolsista PIBIC-EM/CNPq ; <sup>2</sup>Acadêmico do PPGBIOSAUDE; <sup>3</sup>Professora do PPGBIOSAUDE e PPGGTA

### INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é a terceira neoplasia maligna mais comum mundialmente. Nos últimos 10 anos, o índice de mortalidade para câncer colorretal caiu cerca de 3%, e grande parte dessa queda ocorreu em adultos com idades de 65 anos e mais velhos. No Brasil, esse tipo de câncer ocupa o terceiro lugar entre outras incidências neoplásicas e é a terceira causa de morte por câncer no país. De uma forma geral, a idade mais afetada permeia dos 40 aos 70 anos. As condições associadas ao risco de desenvolvimento do câncer colorretal inclui histórico pessoal de câncer colorretal ou pólipos adenomatosos, histórico pessoal de doenças intestinais (Colites Ulcerativa ou doença de Crohn), um histórico familiar de câncer colorretal ou pólipos, um histórico familiar de síndrome de câncer colorretal hereditária como polipose adenomatosa familiar (PAF) ou câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). A maior parte dos cânceres colorretais deriva de pólipos adenomatosos, que geralmente são assintomáticos e evoluem em um processo longo e silencioso conhecido como carcinogênese. A terapia de primeira linha consiste na ressecção cirúrgica total do tumor e de linfonodos adjacentes, associado concomitante pré-operatório ou pós-operatória com radioterapia ou com a quimioterapia.

A gemcitabina é um quimioterápico atualmente é indicada como um agente único no tratamento de pacientes com câncer pancreático metastático e na combinação de medicamentos de quimioterapia no câncer de pulmão de não pequenas células, câncer da bexiga, câncer da mama, e sarcoma de tecido mole. Vários estudos tentaram elucidar os mecanismos de ação que estão concentrados na redistribuição do ciclo celular, a indução de apoptose, o papel da p53, a modulação do metabolismo de desoxinucleosídeos.

### OBJETIVO

Investigar o potencial de sensibilização da gemcitabina e redistribuição do ciclo celular em linhas celulares de Câncer de intestino.

### METODOLOGIA

#### CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

As Linhagens de carcinoma colorretal HT 29 e Sw 620 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). A linhagem celular de câncer do cólon humano SNU - C4 foi gentilmente cedida pelo Dr. G.J. Peters (Free University Hospital, Amsterdã e Holanda). As células foram mantidas em meio completo constituído por meio RPMI -1640 (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), contendo 2% (w/v) de L-glutamina (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Invitrogen), mantidos a uma temperatura de 37 °C, umidade relativa mínima de 95%, e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As células (1 x 10<sup>4</sup>) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas no dia seguinte com concentrações variadas de gemcitabina (0 a 100 µM) durante 24 h. A citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaio de sulforodamina B. Três experiências independentes foram efetuadas para cada tratamento. As concentrações de gemcitabina que resultaram na inibição de 50% de crescimento (IC<sub>50</sub>) quando comparada com os controles foram calculadas a partir de uma curva de dose-resposta semi logarítmica por interpolação linear.

#### ANALISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação do ciclo celular, 5 x 10<sup>5</sup> células foram tratadas com gemcitabina (IC<sub>50</sub>; 24 h). Após os tratamentos, as células foram colhidas e fixadas em etanol 70%. As amostras foram lavadas em PBS, ressuspensas em 0,5 ml de PBS e incubaram-se com RNase A 100 µg / mL de iodeto de propídio e 50 µg / ml durante 20 min na obscuridade à temperatura ambiente (Nicoletti et al., 1991). 20.000 células foram analisadas no citometro de fluxo FACS Calibur (Becton - Dickinson, San José, CA, EUA). O conteúdo do DNA foi analisado utilizando um software ModFit 2.0.

### ANALISE ESTATÍSTICA

Todas as experiências foram realizadas em triplicatas. Quando apropriado, foi aplicada pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad InStat (versão 3.05; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas com valores de p < 0.05.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### EFEITO DO TRATAMENTO COM GEMCITABINA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS DO CÓLON HUMANO

A sensibilidade das linhagens celulares de câncer colorretal SW620, HT-29 e SNU - C4 à gemcitabina foi analisada primeiro a fim de determinar quais doses são ideais para estudos posteriores. A Tabela 1 mostra que SW620 e células HT-29 são mais resistentes a gemcitabina (valores de IC<sub>50</sub> de 13 µM e 10 µM, respectivamente), no entanto a linhagem SNU-C4 apresentou maior sensibilidade para este quimioterápico (valores de IC<sub>50</sub> de 3,5 µM) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de IC<sub>50</sub> (µM; média ± desvio padrão, n = 6) em linhagens celulares de câncer colorretal humano SW620, HT-29 and SNU-C4 após 24h de tratamento com gemcitabina

Linhagem Celular	Dose Gemcitabina (µM)	
	IC <sub>50</sub>	
SW-20	13.0 ± 2.4	
HT-29	10.0 ± 1.3	
SNU-C4	3.5 ± 0.9	

#### DISTRIBUIÇÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL HUMANO EM RESPOSTA À TRATAMENTO COM GEMCITABINA

Para determinar se a inibição da proliferação celular em linhagens de células correlacionaram-se com diferenças na resposta do ciclo celular para a gemcitabina, analisou-se a distribuição do ciclo celular após 72 h (Tabela 2). Em geral, as células não tratadas demonstraram diferenças na distribuição do ciclo celular. A linhagem de células SNU-C4 não demonstrou diferença quando comparado com o controle (Tabela 2). Tal como representado na Tabela 2, as células tratadas com gemcitabina isolada induziu uma forte parada do ciclo celular na fase S (p < 0,05) quando comparado com células não tratadas em todas as linhas celulares.

Tabela 2: Efeito da Gemcitabina (IC<sub>50</sub>) na distribuição do ciclo celular de linhagem celular de câncer colorretal humano sw620, SNU-C4 e HT-20. Os dados foram apresentados com média ± desvio padrão do percentual de células em três experimentos independentes.

Tratamento	SW-620			HT-29			SNU-C4		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Controle	7.2 ± 6.5	21.5 ± 3.9	2.9 ± 2.8	83.3 ± 8.9	6.2 ± 1.6	10.5 ± 2.4	60.1 ± 5.2	24.2 ± 2.9	16.3 ± 2.4
Gemcitabina IC <sub>50</sub>	45.5 ± 2.5*	41.0 ± 2.9*	0.6 ± 1.7	56.3 ± 4.1*	31.4 ± 3.5*	13.1 ± 2.3	50.2 ± 4.8	43.0 ± 5.2*	7.6 ± 2.9*

\* Diferente de controle não tratado (p < 0.05).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Descobrimos que, em resposta ao tratamento com gemcitabina, todas as linhagens celulares demonstraram uma inibição dose-dependente na proliferação celular. Além disso a linhagem SNU-C4 foi considerada, após a exposição ao fármaco, a células mais sensível à gemcitabina. Isso se deve a capacidade da gemcitabina em incorporar o DNA e inibir a ação da polimerase, interferindo com a enzima ribonucleotídeo redutase, causando a depleção de desoxinucleotídeos-trifosfatos necessários para a síntese de DNA.