



## MODULAÇÃO DO EFEITO DO 5-FLUOROURACIL PELO CELECOXIBE NA LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA COLORRETAL HUMANO

Gabriela J. V. Amado<sup>1</sup>  
Felipe Umpierre Conter<sup>2</sup>  
Ivana Grivicich<sup>3</sup>

### Resumo

O 5-fluorouracil (5-FU), é um fármaco presente em todos os protocolos quimioterápicos no tratamento do carcinoma colorretal (CCR). Associação do 5-FU com outros medicamentos são utilizados na prática clínica. Apesar disso, uma resistência aos efeitos do 5-FU, pode ser observada. Nesse contexto, o Celecoxibe (CLX), um inibidor de ciclooxigenase-2 (COX-2), pode apresentar efeito promissor, uma vez que tem demonstrado um efeito protetor para paciente com doença inflamatória intestinal. Diante disso, este trabalho se propôs a analisar o efeito da combinação destes dois fármacos na linhagem celular de carcinoma colorretal humano HT-29. Para tanto as células foram expostas a tratamentos com 5-FU isolado e combinado com CLX. Ensaios de MTT e SRB, que determinam viabilidade e citotoxicidade respectivamente, foram realizados. A expressão dos genes relacionados à apoptose (*BIRC-5*) e a autofagia (*BENC-1*) foi determinada por PCR em tempo real. Nossos resultados demonstraram que a linhagem HT-29 é sensível ao 5-FU, quando analisado o tratamento combinado, as células tiveram sua sensibilidade ao quimioterápico aumentada. Foi observada, também, uma maior expressão do gene BENC-1 no tratamento isolado com 5-FU e uma diminuição da expressão do gene da BIRC-5 no tratamento combinado confirmando ativação de processos de morte celular. Dessa forma, conclui-se que pode ser aventada a hipótese se utilizar o Celecoxibe em protocolos de quimioterapia visando melhorar resposta ao tratamento.

**Palavras chaves:** câncer de intestino; quimiorresistência, morte celular

### INTRODUÇÃO

O Câncer Colorretal (CCR) é um dos cânceres que mais acomete a população mundial. Pode ser considerada uma doença de “estilo de vida” devido ao fato de sua incidência estar associada com fatores de risco que envolvem atividades diárias dos indivíduos. História familiar e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças inflamatórias somam-se ao arsenal de situações causadores desta doença (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

A história natural do CCR pode determinar formas de prevenção e detecção precoce, uma vez que esta doença comumente se desenvolve lentamente por muitos anos (KOLLIGS, 2016); morbidade e mortalidade podem ser reduzidas através de programas de rastreamento da doença. O *screening* por meio de pesquisa de sangue oculto e métodos endoscópicos, como colonoscopia e sigmoidoscopia, apresentam evidências de detectar lesões precursoras propiciando o diagnóstico em estágios iniciais da doença (CONNOR; SMITH; WHITLOCK, 2016; INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016; KOLLIGS, 2016).

---

<sup>1</sup> Aluna do curso de graduação de Medicina – bolsista Fapergs – [gabivasques@gmail.com](mailto:gabivasques@gmail.com)

<sup>2</sup> Aluno de doutorado do PPGBIOAUDE – [lipebtbf@gmail.com](mailto:lipebtbf@gmail.com)

<sup>3</sup> Professora do PPGBIOAUDE – [grivicich@terra.com.br](mailto:grivicich@terra.com.br)

Os CCR podem ser classificados como esporádicos e hereditários (5 a 10% dos casos) (CHOONG; TSAFNAT, 2012). Tumores colorretais localizados são passíveis de serem tratados através da ressecção cirúrgica, apresentando um potencial curativo. Já pacientes com doença metastática micro e macroscopicamente, a melhor abordagem terapêutica passa a ser a terapia sistêmica, sendo a quimioterapia o método mais amplamente utilizado em pacientes com CCR (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA et al., 2014). Inicialmente, o único agente utilizado para o tratamento do CCR metastático foi o 5-Fluorouracil, um fármaco representante da família das Fluoropirimidinas. Posteriormente, foram introduzidos em associação dois agentes com potente ação citotóxica: o Irinotecam – um inibidor da topoisomerase I – e a Oxaliplatina - derivada da platina. A partir disso surgiram os protocolos para o tratamento CCR metastático: FOLFOX, utiliza a combinação 5-FU/Leucovorin + Oxaliplatina e FOLFIRI, utiliza a combinação 5-FU/Leucovorin + Irinotecam (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA et al., 2014; TEMRAZ et al., 2014). O grupo de pacientes que apresentam progressão da doença mesmo após a terapêutica inicial com os protocolos não tem outra alternativa de tratamento para ser considerada a não ser tentativa de outro esquema com as mesmas drogas (TEMRAZ et al., 2014), tornando-se em pacientes resistentes à terapêutica proposta.

Diante de tais circunstâncias, a busca de medicamentos que auxiliem na resposta terapêutica adquire destaque. A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que tem recebido atenção. Observou-se que em múltiplos ensaios – *in vitro*, *in vivo*, observacionais e clínico – que a inibição seletiva de COX-2 reduz produção de prostaglandinas e o risco de diversas neoplasias, dentre as quais o CCR (JENDROSSEK, 2013). Testes pré-clínicos realizados mostram que a inibição da COX-2 pode induzir a apoptose, potencializar citotoxicidade da quimioterapia, antagonizar a angiogênese, e prejudicar a migração celular (JENDROSSEK et al., 2003). Este fármaco foi inicialmente proposto como tratamento para o câncer, uma vez que a enzima ciclooxigenase se apresenta expressa amplamente em diversos tumores, dentre eles o carcinoma colorretal (SANO et al., 1995).

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito dos fármacos 5-FU e CLX sobre a linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29, objetivando detectar uma possível interação entre esses fármacos que promova melhora da resposta ao tratamento ao aumentar a taxa de morte celular.

## **METODOLOGIA**

A linhagem celular de carcinoma colorretal humano HT-29, obtida do American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), foi mantida em meio de cultura DMEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) contendo 2% (p/v) L-glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; CULTILAB, SP, Brasil), em temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> no ar.

A células foram tratadas, inicialmente, com doses seriadas de 5-FU (2, 5, 10, 20, 40, 50, 100 µM) ou CLX (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 µM) por 48 h. Essas concentrações foram obtidas a partir de um estudo piloto. A seguir os dois fármacos foram testados em combinação. No tratamento combinado as células foram pré-tratadas com IC<sub>50</sub> CLX por 24 h seguido de IC<sub>50</sub> do 5-fluorouracil por 24 h, sendo comparadas com células tratadas isoladamente com IC<sub>50</sub> 5-FU no tempo de 48 h.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de Sulforodamida B (SRB) conforme descrito por (BHAGAT et al., 2014). Também foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)) (SCUDIERO DA, SHOEMAKER RH, 1988). A leitura dos ensaios foram executadas em um leitor de microplacas (Multiskan, UNISCIENCE).

Para análise da expressão gênica foram utilizados os genes das proteínas beclin1 (BECN1), survivina (BIRC5) e COX-2 (PTGS2), as células foram tratadas com celecoxibe (IC50), 5-fluorouracil (IC50), ambos no tempo de 48 h, ou pré-tratamento por 24 h com celecoxibe (IC50) seguido de 24 h de 5-fluorouracil (IC50). Para a análise da expressão gênica foi realizada utilizando método de PCR Real-Time (BOOM et al., 1990).

Análise estatística: As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância (one-way ANOVA) seguido de Student-Newman-Keuls). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os testes foram realizados no software Graphpad Prism® (Graphpad Software Inc; versão 5.01).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do 5-FU e CLX Isolados e Combinados nas Células Cultivadas: A partir do ensaio de SRB, que avalia a citotoxicidade dos fármacos para as linhagens celulares, foi possível derivar as doses de IC50 dos dois fármacos, isto é, a dose de fármaco necessária para induzir morte em 50% da população de células. A linhagem HT-29 demonstrou sensibilidade diferente ao 5-FU e ao Celecoxibe. Além disso, foi possível verificar que o pré-tratamento com IC50 do Celecoxibe por 24 h, aumentou a sensibilidade ao 5-Fluorouracil em aproximadamente 1,5 vezes, promovendo aumento da morte celular. Já no ensaio de MTT, que analisa a viabilidade celular, pode-se verificar, em concordância com os resultados do ensaio de SRB, que o tratamento combinado reduz significativamente o percentual de células viáveis quando comparado com o 5-fluorouracil como agente único. Um estudo recente corrobora com tais hipótese, uma vez que observou-se redução maior do crescimento da massa tumoral enxertada no subcutâneo de ratos quando receberam a combinação de 5-FU+CLX quando comparado aos ratos que receberam a terapêutica isolada (ZHANG et al., 2013).

Efeito do 5-FU e CLX, isolados em combinados sobre a expressão gênica: No tratamento isolado com IC<sub>50</sub> do Celecoxibe não foi possível detectar o gene da Ciclooxygenase-2 (PTGS2). Isto era esperado, visto que este fármaco pode inibir a expressão da ciclooxygenase-2 (SUN et al., 2015). Também foi evidenciado que a expressão desse gene reduziu significativamente em relação ao controle não tratado, após o tratamento combinado com Celecoxibe e 5-Fluorouracil. Esses dados estão de acordo com outros estudos combinando esses dois fármacos (ZHANG et al., 2013). Além disso, observou-se 1) aumento significativo da expressão do gene BIRC5 no tratamento isolado com 5-FU; 2) redução significativa na expressão do mesmo gene no tratamento combinado CLX + 5-FU, quando comparado ao tratamento isolado com 5-FU; 3) aumento significativo na expressão do BECN1, gene associado com atividade autofágica, no tratamento isolado com 5-FU. O gene *BIRC5* codifica a proteína survivina, uma proteína anti-apoptótica que regula as caspases (SIFROI-FERNANDEZ et al., 2014). Quando superexpressa, a survivina pode induzir a tumorigênese, além de estar associada com a diminuição da sobrevida global em vários tumores (SEMPREBON et al., 2014; WANG et al., 2014).

## CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo mostraram que existe um sinergismo entre Celecoxibe e 5-Fluorouracil no tratamento do carcinoma colorretal humano, uma vez que, quando realizado tratamento combinado entre essas duas drogas, os resultados *in vitro* apontam para uma melhor resposta. Observou-se aumento da morte celular decorrente de uma maior citotoxicidade induzidas por essas substâncias. Além disso, foi possível detectar alterações na expressão de genes associados com apoptose e autofagia. Cabe ressaltar, que os dados obtidos destacam mais o papel na autofagia na promoção da morte celular após os tratamentos obtidos; portanto, determinou-se como perspectiva realizar um estudo da morfologia celular

para observar os acontecimentos que estão envolvidos nesse processo de auto-renovação celular.

## REFERÊNCIAS

- BHAGAT, J. et al. Cytotoxic potential of *Anisochilus carnosus* ( L . f .) wall and estimation of luteolin content by HPLC. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 421–429, 2014.
- BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Aids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.
- CHOONG, M. K.; TSAFNAT, G. Genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 9–15, 2012.
- CONNOR, E. O.; SMITH, N.; WHITLOCK, E. P. Screening for Colorectal Cancer. **JAMA**, v. 315, n. 23, p. 2576–2594, 2016.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic Changes in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 229–249, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. [s.l: s.n.].
- JENDROSSEK, V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. **Cancer Letters**, v. 332, p. 313–324, 2013.
- JENDROSSEK, V.; HANDRICK, R.; BELKA, C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. **The FASEB journal** : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 17, n. 11, p. 1547–1549, 2003.
- KOLLIGS, F. T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. **Visceral Medicine**, v. 32, p. 158–164, 2016.
- MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B. et al. FOLFOX / FOLFIRI pharmacogenetics : The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10316–10330, 2014.
- NICOLETTI I, MIGLIORATI G, P. M. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, p. 271–279, 1991.
- SANO, H., KAWAHITO, Y., WILDER, R. L., HASHIRAMOTO, A., MUKAI, S., ASAI, K., KIMURA, S., KATO, H., KONDO, M., HLA, T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 55, p. 3785–3789, 1995.
- SCUDIERO DA, SHOEMAKER RH, P. K. Evaluation of asoluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 48, p. 4827–4833, 1988.

SEMPREBON, S.C.; DE FÁTIMA, Â.; LEPRI, S.R.; et al. (S)-Goniothalamine induces DNA damage, apoptosis, and decrease in BIRC5 messenger RNA levels in NCI-H460 cells. **Human Experimental Toxicology**, v. 33, p. 3-13, 2014.

SIFFROI-FERNANDEZ, S.; DULONG, S.; LI, X.M.; FILIPSKI, E.; GRÉCHEZ-CASSIAU, A.; PETERI-BRÜNBACK, B.; MEIJER, L.; LÉVI, F.; TEBOUL, M.; DELAUNAY, F. Functional genomics identify Birc5/survivin as a candidate gene involved in the chronotoxicity of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Cell Cycle**, v. 13, p. 984-991, 2014.

SUN, T.W.; WU, Z.H.; WENG, X.S. Celecoxib can suppress expression of genes associated with PGE2 pathway in chondrocytes under inflammatory conditions. **International Journal of Clinical Experimental Medicine**, v. 8, p. 10902-10, 2015.

TEMRAZ, S. et al. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 89, n. 2, p. 217-230, 2014.

WANG, H.Q.; JIN, J.J.; WANG, J. Arctigenin enhances chemosensitivity to cisplatin in human nonsmall lung cancer H460 cells through downregulation of survivin expression. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, v. 28, p. 39-45, 2014.

ZHANG, D.-Q. et al. Increase of cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib combined with 5-FU enhances tumor cell apoptosis and antitumor efficacy in a subcutaneous implantation tumor model of human colon cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 1, p. 16, 2013.