

Inibição do crescimento celular induzido pela oxaliplatina em esferóides derivados da linhagem celular HT-29

ANA PAOLA BASEGGIO¹
PAULA MADEIRA FORTES²
LARISSA PROCÓPIO CORRÊA¹
CAROLINE ZANONI¹
FRANCIELLI DA COSTA
LUCIANA BROSINA DE LEON³
TATIANE VON WERNE BAES³
ANDRÉA PEREIRA REGNER⁴
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA⁴
IVANA GRIVICICH⁵

RESUMO

O modelo de cultivo em esferóides foi utilizado na avaliação do comportamento do tumor frente à resposta ao tratamento quimioterápico. Para isto, a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 foi exposta a oxaliplatina em doses de 3,7 μM e 37 μM . Os esferóides foram fotografados para medir o crescimento da zona proliferativa e analisados quanto ao volume. Nossos resultados mostraram que

¹Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

²Acadêmica do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

³Acadêmica do Curso de Medicina/ULBRA

⁴ Professora do Curso de Medicina e do Programa de Pós-

Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁵ Professora - Orientadora do Curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (grivicich@terra.com.br)

com a dose de 3,7 μ M de oxaliplatina já ocorreu inibição do crescimento quando comparado com os esferóides não tratados. Portanto o cultivo em esferóides é um bom modelo para avaliarmos a resposta do tumor frente ao tratamento com oxilaplatina.

Palavras-chave: linhagem celular HT-29; oxaliplatina; esferóides.

ABSTRACT

In this study, we examined whether the three-dimensional culture model (spheroid) can be used to investigate the response to chemotherapy. For this purpose spheroids derived from the HT-29 colon adenocarcinoma cell lines were exposed to 3,7 μ M and 37 μ M of oxaliplatin and verified the growth rate. Our results demonstrated a decreased in growth of spheroids with 3,7 μ M of oxaliplatin when compared to untreated control. Thus, our results suggest that spheroids culture is a good model for evaluates the response of oxaliplatin in HT-29 cell line.

Key-words: HT-29 cell line; oxaliplatin; spheroids.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas da região colorretal representam o terceiro tipo mais comum de neoplasia maligna e a terceira causa de mortalidade relacionada ao câncer no mundo. As taxas de incidência variam aproximadamente 20 vezes em todo o mundo. Sendo, portanto uma neoplasia importante clinicamente (JEMAL et al., 2006). A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, fatores hereditários, hábitos alimentares e estilo de vida estão associados ao risco de desenvolver o câncer de cólon (FEARON & GRUBER, 2001; JEMAL et al., 2006).

Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer de cólon se apresentam com doença aparentemente localizada no momento do diagnóstico. Uma vez confirmada a ausência de envolvimento metastático através de exame clínico, laboratorial e de imagem, estes pacientes

são submetidos à ressecção cirúrgica com finalidade curativa (ANDRE et al., 2004; GRIVICICH et al., 2004). Entretanto, a curabilidade destes pacientes depende da presença ou não de células tumorais ocultas, não detectadas no momento do diagnóstico (SKIBBER, MINSKY & HOFF, 2001).

Nos tumores avançados o 5-Fluorouracil (5-FU) combinado com o Leucovorin (LV) apresenta respostas entre 20-30% (PLATE, 2001). Nos tumores que apresentam resistência ao 5-FU utiliza-se o Tomudex, o Irinotecan ou a oxaliplatina (GRIVICICH et al., 2004).

Dentre os agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento desta neoplasia encontramos a oxaliplatina, que tem demonstrado um importante efeito em tumores colorretais. A Oxaliplatina (Eloxatin®; trans-1-diaminocyclohexane oxaloplatinum) é um composto platino de terceira geração e ativo em tu-

mores colorretais (GIACCHETTI et al., 2000). A oxaliplatina age através de conversão enzimática, se liga ao DNA resultando na inibição da replicação e transcrição (RAYMOND et al., 1998). A oxaliplatina demonstrou ser eficaz no tratamento de primeira linha bem como de segunda linha em pacientes com câncer de cólon refratários a terapia com 5-FU (MACHOVER et al., 1996). A associação da oxaliplatina com 5-FU/LV demonstrou importante atividade na terapia de primeira linha no câncer colorretal (GIACCHETTI et al., 2000).

A investigação da resposta ao tratamento quimioterápico utiliza como principal ferramenta a avaliação *in vitro*, através do cultivo de células (FRESHNEY, 1994). Entre os métodos de cultivo celular mais utilizados está o modelo de crescimento em monocamada. Este modelo de cultivo *in vitro* é representado por células com capacidade de adesão e proliferação a um substrato plástico. Além do substrato de adesão é necessário adicionar um meio de cultura contendo nutrientes, que incluem: aminoácidos, vitaminas, sais e glicose. Também são acrescentados soros fetais que possuem proteínas, hormônios, fatores de crescimento e minerais (FRESHNEY, 1994; HARRISON, RAE & HARRIS, 1997; FEDOROFF & RICHARDSON, 2001; LANGDON, 2003).

Ainda que a modalidade de cultivo na forma de monocamada forneça diversas informações a respeito da proliferação e comportamento celular, a avaliação bidimensional apresenta nítidas limitações quando comparada à invasão das células malignas *in vivo*. A principal limitação das culturas bidimensionais relaciona-se a impossibilidade da análise das interações intercelulares e das células com a matriz extracelular (FRESHNEY, 1994; BA-

TES, EDWARDS & YATES, 2000). Desta forma, os modelos tridimensionais de agregados celulares (esferóides) são bastante adequados e viáveis sob ponto de vista experimental. Tais modelos proporcionam melhor compreensão do comportamento tumoral (BATES, EDWARDS & YATES, 2000; DE RIDDER, CORNELISSEN & RIDDER, 2000; DESOIZE, 2000; DEL DUCA, WERBOWETSKI & DEL MAESTRO, 2004). Os esferóides mimetizam a estrutura do tumor e algumas das suas propriedades, exibindo gradientes de oxigênio, pH e nutrientes e, além disso, podem apresentar áreas centrais de necrose (DESOIZE, 2000; GÜNTHER et al., 2003). Neste aspecto, os agregados tridimensionais proporcionam um ambiente equivalente à neoplasia *in vivo* podendo ser utilizados na avaliação de quimioterápicos e no estudo da resistência à radiação ionizante (FRESHNEY, 1994; BAUMAN et al., 1999; DESOIZE, 2000).

Neste estudo, utilizamos o modelo em cultivo em esferóides para avaliar o comportamento do tumor frente à resposta ao tratamento quimioterápico.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos Cultivos Celulares

A linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29 foi adquirida do *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² ou 75 cm² com meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de no mínimo 95%.

As culturas foram mantidas em crescimento exponencial através do subcultivo das células a cada dois dias em meio de cultura completo. Os frascos com células em semiconfluência foram utilizados nos experimentos.

Produção dos Esferóides

A linhagem celular HT-29 foi cultivada em monocamada, dissociadas enzimaticamente e esta solução celular foi transferida para uma placa de Petry coberta com 0,15 % de Agar em meio de cultivo DMEM. As células ficaram encubadas durante cinco dias, tempo necessário para os agregados celulares (esferóides) atingirem o tamanho de 200 mm³ (GÜNTHER et al., 2003). Os esferóides foram observados diariamente em microscópio invertido *Leica DMIL*.

Tratamento com Oxaliplatina

Os esferóides foram tratados durante 15 dias com doses de 3,7 μM e 37 μM de oxaliplatina. A dose de 3,7 μM corresponde ao valor de IC₅₀ (concentração da droga que inibe 50% do crescimento celular) obtido com o cultivo da linha-

gem HT-29 em monocamada. A dose de 37 μM é equivalente a dez vezes o valor do IC₅₀.

Avaliação do Crescimento Celular e Resposta ao Tratamento

Para avaliar o crescimento dos esferóides ao longo do tempo, os esferóides com volume de 200 mm³ foram coletados e transferidos individualmente para placas de cultivo de 24 wells com 0,15 % de Agar em DMEM. Os esferóides foram fotografados para medir o seu volume durante 20 dias e as imagens foram analisadas com o software *Image J* (versão 1.32).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de caracterizar o comportamento dos esferóides da linhagem HT-29 frente ao tratamento com oxaliplatina, foram realizados experimentos avaliando o padrão de crescimento dos mesmos. Os esferóides que apresentaram 200 mm³ (Figura 1) foram acompanhados durante 20 dias e mesurados diariamente.

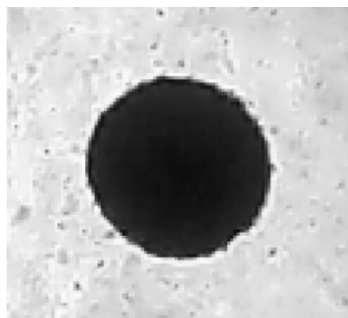


Figura 1 - Esferóide obtido da linhagem de carcinoma de cólon humano HT-29.

Os esferóides da linhagem de carcinoma de cólon humano HT-29 cresceram até o décimo quinto dia de cultivo. A partir do décimo sexto dia os esferóides entram em processo de desagregação (Figura 2). Estas características estão de acordo com as apresentadas por Nirmala (2001), segundo o qual o volume de crescimento dos esferóides torna-se saturado ao longo do tempo.

Os esferóides da linhagem de carcinoma de cólon humano HT-29 cresceram até o décimo quinto dia de cultivo. A partir do décimo sexto dia os esferóides entram em processo de desagregação (Figura 2). Estas características estão de acordo com as apresentadas por Nirmala (2001), segundo o qual o volume de crescimento dos esferóides torna-se saturado ao longo do tempo.

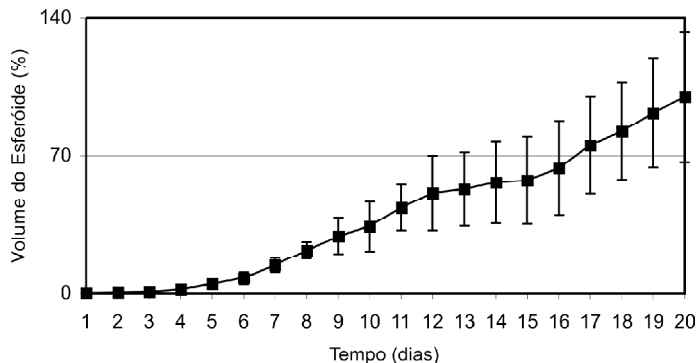


Figura 2 - Curva de Crescimento dos esferóides da linhagem de carcinoma de cólon humano HT-29. Os resultados expressam as médias \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

O efeito anti-proliferativo da oxaliplatina na linhagem celular HT-29 foi avaliado durante 15 dias de cultivo com a droga. Os valores obtidos na placa de controle foram comparados aos encontrados nas placas tratadas com a oxaliplatina (Figura 3). A análise do volume dos esferóides demonstrou que a dose de 3,7 μ M levou a morte significativa dos esferóides a partir do sexto

dia de tratamento com a oxaliplatina. Já a dose de 37 μ M impediu o crescimento dos esferóides durante os 15 dias de tratamento. Podemos sugerir que o cultivo em esferóides é um bom modelo para avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico. Nossos resultados vão de encontro com o demonstrado por NICHOLSON et al. (1997) com tumor de mama.

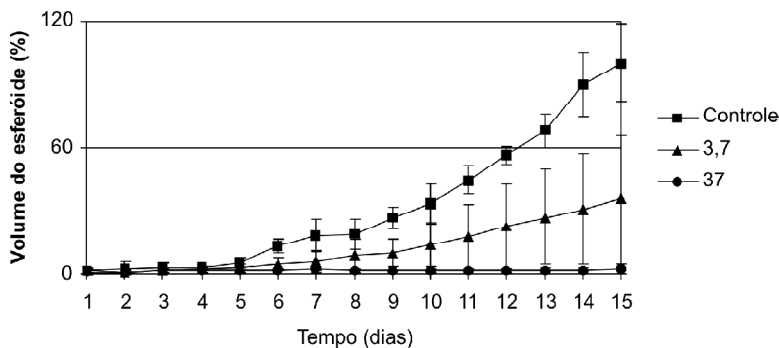


Figura 3 - Efeito do tratamento com oxaliplatina no Crescimento de esferóide de HT-29 durante 15 dias. Os resultados expressam as médias \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que é possível desenvolver esferóides a partir da linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29. Além disso, observamos que a oxaliplatina possui um potente efeito inibitório no tratamento do câncer de cólon. Mais ainda, nossos resultados demonstram que não existe diferença entre os métodos de cultivo de monocamada e esferóides no que se refere à resposta ao tratamento com oxaliplatina.

Com base nos resultados obtidos com a oxaliplatina começamos a desenvolver novos experimentos testando outros agentes antineoplásicos como o Irinotecan e 5-Fluorouracil a fim de avaliarmos e compararmos os resultados obtidos no primeiro experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRE, T.; DE GRAMONT A.; THE ONCOLOGY MULTIDISCIPLINARY RESEARCH GROUP (GERCOR). An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v.4, p.S22-S28, 2004.

BATES, R.C.; EDWARDS, N.S.; YATES, J.D. Spheroids and cells survival. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v. 36, p. 61-74, 2000.

BAUMAN, G.S. et al. Effects of radiation on a three-dimensional model of malignant glioma invasion. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, p. 643-651, 1999.

DE RIDDER, L.; CORNELISSEN, M.; DE RIDDER, D. Autologous spheroid culture: a screening tool for human brain tumour invasion. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v. 36, p. 107-122, 2000.

DEL DUCA, D.; WERBOWETSKI, T.; DEL MAESTRO, R.F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. **Journal of NeuroOncology**, v. 67, p. 295-303, 2004.

DESOIZE, B. Contribution of three-dimensional culture to cancer research. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v. 36, p. 59-60, 2000.

FEARON, E.R.; GRUBER, S.B. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In: MENDELSON, J. et al. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. p. 289-312.

FEDOROFF, S.; RICHARDSON A. **Protocols for neural cell culture**. 3.ed. Totowa: Humana Press, 2001. 384 p.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

FUJIE, Y. Oxaliplatin a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, p. 453-463, 2005.

GIACCHETTI, S. et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **Journal of**

Clinical Oncology, v. 18, p. 136-147, 2000.

GRIVICICH, I. et al. Irinotecan and Oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1087-1103, 2001.

GÜNTHER, W. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 463-469, 2003.

HARRISON, M.A.; ERA, I.F.; HARRIS, A. General techniques of cell culture. In: **HANDBOOKS in practical animal cell biology**. 1.ed. Cambridge: Cambridge University, 1997. 172 p.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **Cancer Journal of Clinician**, v. 56, p. 106-130, 2006.

LANGDON, S. P. **Cancer Cell Culture: method and protocols**. 1.ed. Totowa: Humana Press, 2003. 368 p.

MACHOVER, D. et al. Two consecutive phase

II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. **Annals of Oncology**, v.7, p. 95-98, 1996.

NICHOLSON, K.M.; BIBBY, M.C.; PHILIPS, R.M. Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. **European Journal of Cancer**, v.33, p. 1291-1298, 1997.

PLATE, S. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. **Annals of Oncology**, v.12, p. 1053-1054, 2001.

RAYMOND, E. et al. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. **Seminars in Oncology**, v. 25, p. 4-12, 1998.

SKIBBER, J.M.; MINSKY, B.D.; HOFF P. Cancer of the colon. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, A.S. **Cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1216-1270.