

CARACTERIZAÇÃO METODOLÓGICA DA ANÁLISE *IN VITRO* DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO CÂNCER COLORRETAL

Wlana Lara Moreira Menezes¹;

Núcleo de Estudos em Oncologia Intestinal - NEOI da Universidade de Pernambuco (UPE),
Garanhuns, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/8530648220194417>

Antônio Felix da Silva Filho².

Núcleo de Estudos em Oncologia Intestinal - NEOI da Universidade de Pernambuco (UPE),
Garanhuns, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/1082536271592926>

RESUMO: O câncer colorretal trata-se de um problema de saúde coletiva com alta taxa de incidência no mundo. Uma forma de aprofundar o conhecimento acerca do funcionamento dos quimioterápicos utilizados na clínica de rotina, é com a realização de testes de viabilidade celular, que usam células de câncer colorretal imortalizadas para análise de resistência ao tratamento com os agentes antineoplásicos. A falta de padronização desses protocolos experimentais *in vitro* ainda é um fator que dificulta o avanço no tratamento deste câncer. Desse modo, é necessário que os estudos de quimiorresistência ao uso do 5-Fluorouracil possuam maior controle sobre as possíveis variáveis para obter resultados mais reprodutíveis. Nesse sentido, o entendimento científico organizado oferece condições para a melhoria da saúde da população afetada com o câncer colorretal. Com base nisso, a finalidade deste estudo é apresentar os resultados parciais de uma revisão sistemática, que tem a finalidade de identificar padrões metodológicos críticos na avaliação da proliferação celular *in vitro* de linhagens celulares de câncer colorretal tratadas com 5-Fluorouracil.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura celular. 5-Fluorouracil. Câncer colorretal.

METHODOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE *IN VITRO* ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION IN COLORECTAL CANCER

ABSTRACT: Colorectal cancer is a public health problem with a high incidence rate worldwide. One way of deepening our knowledge of how the chemotherapy drugs used in routine clinical practice work is by carrying out cell viability tests, which use immortalized colorectal cancer cells to analyse resistance to treatment with antineoplastic agents. The lack of standardization of these *in vitro* experimental protocols is still a factor that hinders progress

in the treatment of this cancer. It is therefore necessary for studies of chemoresistance to the use of 5-Fluorouracil to have greater control over possible variables in order to obtain more reproducible results. In this way, organized scientific understanding offers conditions for improving the health of the population affected by colorectal cancer. Based on this, the purpose of this study is to present the partial results of a systematic review, which aims to identify critical methodological standards in the evaluation of cell proliferation *in vitro* of colorectal cancer cell lines treated with 5-Fluorouracil.

KEYWORDS: Cell culture. 5-Fluorouracil. Colorectal cancer.

INTRODUÇÃO

A complexa fisiopatologia do câncer colorretal (CCR) envolve a interação de diversos fatores genéticos e ambientais, como o estilo de vida sedentário, a obesidade, o consumo de álcool, o tabagismo ou as alterações na microbiota intestinal (Ionescu *et al.*, 2023). Esses fatores de risco estão intimamente relacionados às mudanças da atual organização social. Nesse sentido, o CCR é uma doença multifatorial (Caballero-Avendaño *et al.*, 2023), considerada como um problema de saúde pública a nível mundial mediante a sua elevada epidemiologia. No Brasil, 704 mil novos casos de câncer foram estimados para o triênio 2023/2025 (Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2022 *apud* De Oliveira Santos, 2023) e, destes casos, até então, o CCR é a neoplasia mais incidente para ambos os sexos, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (INCA, 2022).

À medida que os casos de CCR aumentam, a busca por quimioterapias citotóxicas mais eficientes se torna uma realidade. Dentre as terapias farmacológicas mais empregadas para tratar o câncer colorretal, destacam-se o FOLFOX – estratégia combinada de 5-Fluorouracil (5-FU), leucovorina e oxaliplatina (OXA) – e o FOLFIRI, que utiliza o 5-FU, a leucovorina e o irinotecano (Zhang *et al.*, 2022). O 5-FU é um agente quimioterápico usado em grande escala no tratamento de vários tipos de câncer. Sua principal função é atuar como um inibidor da timidilato sintase (TS) – uma enzima essencial na síntese de DNA – levando à interrupção da replicação e reparo do DNA nas células cancerígenas. Além disso, os metabólitos do 5-FU podem ser incorporados ao RNA, interferindo na produção de proteínas e na estabilidade do RNA, contribuindo, desse modo, para a célula cancerígena morrer por apoptose (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021). Apesar do tratamento isolado do 5-FU já ser conhecido há mais tempo, a combinação de 5-FU, como principal agente quimioterápico, com outros agentes quimioterápicos ou com compostos bioativos naturais, ganhou atenção recentemente como um meio de atingir diferentes vias de sinalização celular, alcançando-se por consequência, melhores resultados clínicos (Mafi *et al.*, 2023).

A falta de padronização nos ensaios de proliferação celular utilizando o 5-FU gera uma variação nos resultados, desencadeada por diversos fatores, como o tipo de linhagem celular utilizada ou a forma de cultivo, dificultando a obtenção de uma conclusão confiável sobre a influência do medicamento (Jin *et al.*, 2016). Nesse contexto, revisões sistemáticas

são fundamentais para a síntese e organização de informações a partir de diversos estudos independentes (Sampaio; Mancini, 2007).

OBJETIVO

Este trabalho tem o objetivo de apresentar os resultados parciais de uma revisão sistemática, que tem a finalidade de identificar padrões metodológicos críticos para a avaliação da proliferação celular *in vitro* de linhagens celulares de CCR tratadas com 5-FU.

METODOLOGIA

A execução desta revisão sistemática seguiu as diretrizes do *Statement of Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses* (PRISMA). Foi desenvolvida uma estratégia de pesquisa abrangente e alinhada à questão de investigação para a seleção dos artigos. Para tal, foram consultadas as bases Mesh do NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/) e DeCS (decs.bvsalud.org/) para identificar sinônimos de cada termo utilizado. A pesquisa foi realizada nas bases de dados PubMed, Embase e Web of Science, abrangendo um período de 10 anos, de 2013 a 2023.

A seleção dos estudos com base em seus resumos foi realizada por meio da inserção destes na plataforma Rayyan (www.rayyan.ai/). Foi criado um protocolo minucioso no qual foram estabelecidos os seguintes critérios de exclusão: I. Artigos redigidos em língua não inglesa; II. Artigos com formato ou tipo inadequados para esta pesquisa; III. Artigos que não abordaram células de CRC; IV. Artigos sem administração *in vitro* de 5-FU e VI. Artigos sem ensaios de proliferação celular. A análise foi conduzida de forma duplo cego e os conflitos foram avaliados e resolvidos por um terceiro avaliador independente. Os artigos que não apresentaram nenhum dos critérios de exclusão foram adicionados.

Toda a análise estatística foi realizada com R studio (versão 4.3.1 16/06/2023). A análise de concordância e confiabilidade foi realizada utilizando-se o pacote pacman (Rinker & Kurkiewicz, 2017). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o pacote ggplot2 (Wickham, 2016) e o valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 48 artigos analisados, 29 (60,4%) estudos foram incluídos e 19 (39,6%) foram excluídos. Todos os artigos eliminados do estudo foram excluídos por corresponderem a estudos com dados não originais, duplamente verificados ou com enfoque exclusivamente clínico; já a distribuição dos estudos incluídos ao longo de cada ano analisado até então (2012 à 2016) deu-se da seguinte forma: apenas um estudo (3,4%) foi publicado em 2012; doze estudos (41,4%) foram publicados em 2013; dez (34,4%), em 2014; cinco (17,2%),

em 2015 e um (3,4%) em 2016, mostrando o ano de 2013 como o de maior quantidade de estudos na área.

Foram encontradas vinte linhagens celulares, sendo as mais utilizadas: HCT-116 (14 estudos - 29,2%), SW480 (13 - 27,1%), HT-29 (8 - 16,7%), LoVo (5 - 10,4%), SW620 (4 - 8,3%), DLD-1 (4 - 8,3%), HCT-15 (2 - 4,2%), SW837 (2 - 4,2%), HCT116 p53 -/- (2 - 4,2%) e Caco-2 (1 - 2,1%). Dentre as linhagens encontradas, a HCT-116, a SW480, a HT-29, a LoVo seguida pela SW620 foram as que mais se destacaram nos estudos, respectivamente. De todos esses estudos, apenas um estudo apresentou células resistentes a fármacos, a qual o fármaco foi o 5-FU.

Acerca do modo de aquisição das linhagens celulares, doze células foram adquiridas por compra, enquanto quatro foram por doação, e treze não foram informadas quanto à aquisição, demonstrando que a maioria foi adquirida por compra ou por outro motivo não esclarecido no estudo.

Quanto ao método de avaliação da proliferação celular, onze estudos (22,9%) fizeram por ensaio clonogênico, dez fizeram por ensaio clonogênico acompanhado de ensaio de viabilidade celular e oito foram analisados somente por meio da viabilidade celular. Ainda, dois foram feitos com ensaio de viabilidade celular mais formação de esferóides e três foram feitos pela associação desses três métodos.

Especificamente nos estudos em que se foi feito ensaio clonogênico, dezoito estudos não fizeram uso de kit e um não foi informado quanto a essa informação. Dos tipos de placa utilizados, a maior parte dos estudos (13 - 27,1%) usaram placas de 6 de poço e onze (22,9%) não trouxeram essa informação. O tempo de incubação com tratamento teve mínima de 1 hora e máxima de 336 horas e sem tratamento teve mínima de duas horas e máxima de 504 horas. A maior parte dos estudos não informou o tempo de adesão celular, o volume de meio dos poços, a frequência de renovação do meio, o fixador e o corante utilizado nem a forma de contagem das células. O número de repetições independentes do experimento variou de duas a três vezes.

Acerca dos estudos que realizaram ensaio de viabilidade celular, em sete estudos, foi utilizado kit; seis não utilizaram e outros seis não informaram. Em relação à distribuição das placas, dois estudos fizeram uso da placa de 24 poços; dois fizeram uso de placas de 6 poços; nove estudos usaram placa de 96 poços e dois estudos não informaram. No que diz respeito ao tempo de incubação com tratamento, a mínima foi de 3 dias e a máxima foi de 7 dias. Dentre os cinco compostos utilizados (Azul de Tripam, CCK8, MTS, MTT e WST) entre os experimentos, o mais utilizado foi o MTT, presente em sete estudos. Assim como nos ensaios clonogênicos, os ensaios de viabilidade celular apresentaram carência de informações sobre o tempo de adesão celular, o volume de meio dos poços, a frequência de renovação do meio, o fixador e o corante utilizado, nem a forma de quantificação da viabilidade celular. O número de repetições independentes do experimento variou de três a quatro vezes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, foram identificadas discrepâncias nos estudos analisados, sugerindo que as variações na replicação desses estudos, em experimentos, podem ter exercido um impacto considerável em seus resultados. Este trabalho tem o objetivo de apresentar os resultados parciais de uma revisão sistemática, que tem a finalidade de identificar métricas metodológicas essenciais para a avaliação da proliferação celular *in vitro* de linhagens celulares de CCR tratadas com 5-FU.

REFERÊNCIAS

- CABALLERO-AVENDAÑO, A. *et al.* Epidemiology of environmental factors related to beta-catenin pathway and its impact on the development and progression of colorectal cancer. **Gaceta médica de México**, v. 159, n. 3, p. 245-252, 2023.
- DE OLIVEIRA SANTOS, M. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.
- GHAFOURI-FARD, S. *et al.* 5-Fluorouracil: a narrative review on the role of regulatory mechanisms in driving resistance to this chemotherapeutic agent. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 658636, 2021.
- INSTITUTO Nacional de Câncer. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022.
- IONESCU, V. A. *et al.* Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis. **Medicina**, v. 59, n. 9, p. 1646, 2023.
- JIN, W. *et al.* Reproducibility of scratch assays is affected by the initial degree of confluence: experiments, modelling and model selection. **Journal of theoretical biology**, v. 390, p. 136-145, 2016.
- MAFI, A. *et al.* Melatonin and 5-fluorouracil combination chemotherapy: opportunities and efficacy in cancer therapy. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 33, 2023.
- RINKER, T. W.; KURKIEWICZ, D. **Pacman**: Package Management for R. version 0.5.0. Buffalo, New York, 2017.
- SAMPAIO, R. F.; MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, n. 11, p. 83–89, 2007.
- ZHANG, X. *et al.* FOLFIRI (folinic acid, fluorouracil, and irinotecan) increases not efficacy but toxicity compared with single-agent irinotecan as a second-line treatment in metastatic colorectal cancer patients: a randomized clinical trial. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 14, p. 17588359211068737, 2022.