

REPRODUTIBILIDADE DE METODOLOGIAS *IN VITRO* DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DO CÂNCER COLORRETAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Wliana Lara Moreira Menezes¹;

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

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

Diego de Oliveira Valença²;

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

<http://lattes.cnpq.br/8421489853860545>

Antônio Felix da Silva Filho³.

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. Dessa forma, o entendimento científico organizado oferece condições para a melhoria da saúde da população afetada com o câncer colorretal.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde coletiva. Proliferação celular. Neoplasia.

REPRODUCIBILITY OF IN VITRO METHODOLOGIES FOR COLORECTAL CANCER CELL PROLIFERATION: A LITERATURE REVIEW

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 the 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.

KEYWORDS: Collective health. Cell proliferation. Neoplasia.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo e também é o segundo tipo de câncer em mortalidade (Saraiva *et al.*, 2023). A heterogeneidade da sua incidência depende do perfil socioeconômico do país, apontando para a influência de padrões alimentares, obesidade e fatores de estilo de vida como determinantes que aumentam o risco do seu desenvolvimento (Bray *et al.*, 2018).

A presença e a descoberta da doença afetam diretamente a rotina dos pacientes, que apresentam comportamentos característicos dependendo da faixa etária. Enquanto os idosos afetados exibem mais sintomas psíquicos, como a tristeza, os jovens queixam-se mais de dor e outros sintomas físicos (Moura *et al.*, 2020). A modernidade tem mudado o aparecimento de malignidades não transmissíveis, indicando a maior participação da exposição dos fatores de risco do CRC pela população. Nas últimas décadas, a incidência e a mortalidade de pessoas com mais de 50 anos têm diminuído em contraponto com a elevação de casos em jovens de maneira precoce. As estimativas esperam que essa proporção se perpetue e dobre até 2030 (Rebeca; Angela; Ahmedin, 2023).

O avanço na medicina permitiu tratar essa doença com mais dignidade e precisão em cada caso. Nesse contexto, os estudos experimentais são uma modalidade que possibilita testar a resistência das células a agentes quimioterápicos pela simulação de um ambiente semelhante ao do câncer exposto a substâncias únicas ou associadas para estudar seus efeitos na contenção do crescimento celular.

A terapia mais indicada para essa doença é a utilização do 5-Fluorouracil (5-FU), um antineoplásico que altera o metabolismo celular, levando à morte. Inicialmente, a terapia do CCR era constituída unicamente do 5-FU. Com o tempo, outros agentes foram incluídos à terapia, como o ácido fólico, o irinotecano, a oxaliplatina entre outros, visando à melhora

do paciente pelo efeito antiproliferativo potencializado pela ação combinada de mais de um fármaco (Da Silva; Carlotto; Rotta, 2018).

O avanço da biotecnologia permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas e métodos, os quais possibilitam a manipulação de moléculas de DNA, RNA e a manipulação *in vitro* de células e tecidos, com características semelhantes às observadas em estudos *in vivo*. Contudo, os testes *in vivo*, que utilizam animais de laboratório, por vezes são inadequados uma vez que há diferenças entre as espécies e entre outras variáveis determinantes para a confiabilidade dos resultados obtidos para aplicação em tratamentos (Habanjar *et al.*, 2021).

Revisões voltadas à análise dos estudos já existentes auxiliam na identificação de fontes de variação nos resultados, além de orientar as pesquisas futuras para promover o avanço do conhecimento na área em questão. Além da importância para o avanço da padronização das pesquisas posteriores, o conhecimento da quimiorresistência no câncer colorretal aplica-se à saúde coletiva, uma vez que preenche lacunas no enfrentamento dessa doença.

OBJETIVO

Diante da escassez de padronização das metodologias de estudo *in vitro* do câncer colorretal, decorrente da variação dos procedimentos realizados durante estudos de caráter experimental com o quimioterápico 5-FU, percebe-se a necessidade estabelecer a padronização dos estudos com ensaio de proliferação celular com células de câncer colorretal a partir do estabelecimento da repercussão do fenótipo celular, da metodologia de cultivo e do protocolo adotado para obtenção de resistência do modelo ao agente utilizado como quimioterapia.

É nesse sentido que esta pesquisa busca identificar as variáveis que podem comprometer a reprodutibilidade dos estudos com tratamento a partir da resistência celular ao 5-FU, a fim de melhorar a prática dessa técnica e, conseqüentemente, levar à melhoria da qualidade de vida dos indivíduos afetados por esse câncer.

METODOLOGIA

A realização deste trabalho foi baseada em uma revisão da literatura com filtro em estudos realizados nos últimos 5 anos (2019 a 2023). É de natureza crítica e descritiva. Os dados foram obtidos das bases de dados PubMed e Google Acadêmico, o qual se fez uso de estratégias de busca avançadas com palavras-chave como “câncer colorretal”, “proliferação celular”, “saúde coletiva”, “epidemiologia” e “metodologias *in vitro*” para obtenção dos resultados.

O processo de seleção dos artigos envolveu o estabelecimento de motivos de exclusão, que nortearam a escolha dos estudos. Os critérios de exclusão estabelecidos determinavam o descarte de obras que não traziam resultados originais, que não mencionavam o câncer colorretal e que não elucidavam os passos para a realização dos experimentos. Por outro lado, a inclusão se baseou nos estudos que fizeram menção à proliferação celular no câncer colorretal, à aplicação de quimioterápicos na avaliação *in vitro* de CCR e que exploraram o processo de realização das metodologias *in vitro* de forma clara.

Devido à diversidade e à quantidade de publicações com abordagens voltadas ao câncer colorretal de modo mais específico, optou-se pelos estudos com maior nível de semelhança com o propósito desta revisão. Assim, após a seleção dos estudos enquadrados nos critérios estabelecidos, foi realizado um processo de leitura atencioso e crítico, que consistiu em identificar as contribuições mais importantes para fundamentar a problemática deste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

São várias as vias que regulam a expressão do CCR no corpo. Elas são responsáveis pela quebra da homeostase da regulação celular e das vias de sinalização, comprometendo o funcionamento normal do intestino. A via Wnt é uma das mais afetadas no câncer colorretal. No estado fisiopatológico, a partir da hiperativação de cascatas que promovem a carcinogênese devido a mutações em genes como APC e CTNNB1. Além dela, a sinalização do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) apresenta-se frequentemente desbalanceada mediante ação do câncer colorretal. Isso se deve também a mutações que ocorrem em genes que regulam esse receptor: os genes EGFR ou genes relacionados a essa via, como o BRAF, que pode resultar em ativação do EGFR, promovendo a proliferação celular, a angiogênese e a resistência à apoptose (Shah; Itzkowitz, 2022). Desse modo, o tratamento tem o objetivo de atingir essas vias, utilizando mecanismos que bloqueiam ou tentam bloquear a proliferação dessas cascatas descontroladas.

O 5-fluorouracil é um composto orgânico aromático, análogo de nucleotídeo, sintetizado em 1957 pela primeira vez, atua como um antimetabolito, visto que interfere no processo de formação de DNA e RNA nas células cancerígenas, por meio da inibição da timidilato sintase, uma enzima vital para a replicação do DNA, e sua integração na estrutura de moléculas de RNA (Blondy *et al.*, 2020). Essa interferência leva à morte celular e impede a proliferação do câncer. Devido à sua eficácia, ele é amplamente empregado no tratamento de tumores colorretais, gástricos, pancreáticos, esofágicos, de mama e de cabeça e pescoço em todo o mundo (Alves, 2023).

A quimioterapia do câncer colorretal conta com um tratamento clássico que faz uso do 5-FU como agente antiproliferativo no ambiente cancerígeno, contudo, estudos mostram que o seu uso isolado não melhora a sobrevivência, sendo necessária a adoção de estratégias combinadas para superar a resistência terapêutica. A utilização deste medicamento

biológico em combinação é baseada nos protocolos mais usuais e indicados como primeira linha para o tratamento do câncer colorretal metastático, sendo eles, FOLFOX e o FOLFIRI. O FOLFOX consiste em uma estratégia combinada de 5-Fluorouracil (5-FU), leucovorina e oxaliplatina (OXA), enquanto o FOLFIRI utiliza 5-FU, leucovorina e irinotecano (Neugut *et al.*, 2019).

O uso do 5-FU isolado ou combinado a outro quimioterápico que se dá em experimentos *in vitro* permite a análise do mecanismo de resistência celular a partir de culturas celulares estabelecidas em linhagens imortalizadas, que fornece um estudo mais controlado. A etapa de avaliação da citotoxicidade em ensaios de proliferação ou migração celular pode se dar de forma direta ou indireta. O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio), por exemplo, é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular pela formação de um produto solubilizado (formazan), que ao ser quantificado determina proporcionalmente o número de células viáveis (Duarte, 2021).

Os modelos *in vitro* são produzidos com o intuito de mimetizar o comportamento e as alterações encontradas nas neoplasias humanas. Estes modelos apresentam várias vantagens, como a reprodutibilidade de mutações genéticas encontradas nos humanos, a possibilidade de acompanhar a progressão das neoplasias e do efeito de diversas abordagens terapêuticas; ao contrário desta situação, em estudos *in vivo*, realizados em animais, não é possível obter uma fidelidade tão próxima quanto a dos modelos com células humanas, pois possuem elevada complexidade, apresentam um número limitado de genes, não apresentam situações de origem humana e apresentam desenvolvimento neoplásico mais lento (Silva *et al.*, 2022). Isso mostra que o teste *in vivo* permite apenas uma previsão do que pode acontecer em uma neoplasia humana, mas não, de fato, o que acontece. Desse modo, o teste *in vivo* torna-se menos reprodutível se comparado aos experimentos *in vitro*. (Costa *et al.*, 2023).

As linhagens de células de câncer colorretal imortalizadas em placas de proliferação específicas para este fim passam por uma triagem com métodos de avaliação da atividade antitumoral *in vitro* pela exposição inicial a um tratamento quimioterápico proposto que irá mostrar a sensibilidade da linhagem celular à ação desses compostos em comparação a linhagens com células controle (normais). Esse índice de seletividade à linhagem, estimado e obtido por meio da razão entre a concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI50) da célula não tumoral pela CI50 da célula tumoral (Pilon *et al.*, 2020), determina o potencial do agente ter efeito citotóxico contra a linhagem em questão. Cada variável mencionada produz resultados diferentes, impossibilitando a real clareza do seu efeito se aplicado em pacientes.

Dessa forma, o presente estudo buscou analisar os procedimentos realizados nos estudos da quimiorresistência tumoral frente ao uso de agentes quimioterápicos conhecidos através da realização de uma revisão integrativa da literatura a fim de mostrar a importância

do controle da execução desses experimentos para a promoção da saúde coletiva.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa revisão mostra que o controle das etapas de realização de experimentos de viabilidade celular *in vitro* torna possível a elaboração de tratamentos cada vez mais focados na maior qualidade de vida dos pacientes afetados.

Desse modo, essa revisão da bibliografia sucinta a necessidade de mais revisões sistemáticas sobre os procedimentos de experimentos no que tange ao fenótipo celular, ao método de proliferação celular *in vitro*, à quimioterapia aplicada para obter modelos de células resistentes ao tratamento com heterogeneidades cada vez menores. Espera-se, assim, que futuras pesquisas de tratamento do câncer colorretal tenham a preocupação de seguir padrões que levem a resultados mais fiéis e que contribuam de modo mais aplicável à realidade, visando aprimorar os tratamentos já existentes contra o CCR.

Ademais, espera-se que este trabalho contribua positivamente para a compreensão das variantes que levam ao sucesso do estabelecimento de metodologias *in vitro* para testar a resistência a quimioterápicos na ação proliferativa de fenótipos celulares. O entendimento acerca do manejo das diferentes metodologias aplicadas ao estudo antineoplásico é fundamental para a construção de um protocolo que padronize a realização de estudos futuros, permitindo maior reprodutibilidade e aplicação dos resultados aos avanços na terapia de um problema de saúde pública, que afeta sobretudo os países mais negligenciados do mundo.

REFERÊNCIAS

ALVES, G. C. R. **Farmacoterapia do cancro colorretal**. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2023.

BLONDY, Sabrina, *et al.* Mecanismos de resistência ao 5-Fluorouracil no câncer colorretal: das vias clássicas aos processos promissores. **Cancer Science**, Wiley, 2020.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2024.

COSTA, I. R. *et al.* **Produção de filmes para cultura celular 3D**: método alternativo para substituição de ensaios *in vivo*. *Disciplinarum Scientia | Naturais E Tecnológicas*, v. 23, n. 3, p. 159–172, 2023.

DA SILVA, A. A.; CARLOTTO, J.; ROTTA, I. Standardization of the infusion sequence of antineoplastic drugs used in the treatment of breast and colorectal cancers. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 1-9, 2018.

DUARTE, Sâmia Souza. **Toxicidade e potencial antitumoral do derivado espiro-acridínico (E)-1'-((4clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]4'-carbonitrila (AMTAC-06)**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

HABANJAR, O. *et al.* 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12200, 2021.

NEUGUT, A. I. *et al.* Uso de FOLFOX e FOLFIRI no câncer de cólon em estágio IV: análise de dados do SEER-Medicare. **Clin Colorectal Cancer**, 2019.

MOURA, S. F. *et al.* Padrão Sintomatológico em Pacientes do Câncer Colorretal de acordo com a idade. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n.1, 2020.

PILON, A. *et al.* A new family of iron(II)-cyclopentadienyl compounds shows strong activity against colorectal and triple negative breast cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020.

REBECA, L. S.; ANGELA, N. G.; AHMEDIN, J. Estatísticas do câncer, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, ed. 3, p. 233-254, 2023.

SILVA *et al.* Modelos de cancro da mama: do in vitro para o in vivo. **História da Ciência e Ensino: Construindo Interfaces**, v. 25, 2022.

SARAIVA, M. R.; ROSA, I.; CLARO, I. Early-onset colorectal cancer: A review of current knowledge. **World journal of gastroenterology**, v. 29, n. 8, p. 1289, 2023.

SHAH, S. C.; ITZKOWITZ, S. H. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. **Gastroenterology**, v. 162, n. 3, p. 715-730, 2022.