

# Combinação de celecoxibe com 5-fluorouracil induz apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29

Erika da Costa Ribeiro<sup>1</sup>, Gabriela Jouglard Vasques Amado<sup>2</sup>, Felipe Umpierre Conter<sup>2</sup>, Laura Bainy Rodrigues de Freitas<sup>4</sup>, Daniel Simon<sup>5</sup>, Ivana Grivicich<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Ensino Médio, Colégio Ulbra São João, Bolsista PIBIC-EM/CNPq, <sup>2</sup>Médica, Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA, <sup>3</sup>Biomédico, Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, <sup>4</sup>Médica, ULBRA, Doutora em Gastroenterologia e Hepatologia, UFRGS, <sup>5</sup>Professor dos Cursos de Biomedicina, Ciências Biológicas, Farmácia e Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, <sup>6</sup>Professora-Orientadora dos Cursos de Biomedicina, Farmácia e Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, grivicich@ulbra.br

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da combinação do 5-fluorouracil (5-FU) e Celecoxibe (CLX) na citotoxicidade, ciclo celular, apoptose e autofagia na linhagem celular de carcinoma colorretal HT-29. Para isto, as células foram expostas ao 5-FU ou CLX por 48h ou combinação de CLX (24h) + 5-FU (24h). O ensaio colorimétrico de Sulforodamina B foi realizado para avaliar a citotoxicidade. Para verificar a distribuição das células no ciclo celular foi realizado citometria de fluxo e para atividade de genes relacionados à apoptose (*BIRC-5*) e à autofagia (*BENC-1*), o ensaio de expressão gênica por RT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que a linhagem HT-29 é sensível ao 5-FU e quando combinado com CLX, este efeito foi potencializado. O tratamento combinado promoveu um bloqueio de células nas fases S e G0/G1, indicando redução na proliferação celular, além de aumento de células em SubG1, mostrando maior morte celular. Também, foi observado alteração na expressão dos genes investigados, sugerindo a participação da apoptose no efeito observado.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil, celecoxibe, câncer colorretal, apoptose

## Abstract

This work aimed to evaluate the effect of the combination of 5-fluorouracil (5-FU) and Celecoxib (CLX) on cytotoxicity, cell cycle, apoptosis and autophagy in the HT-29 colorectal carcinoma cell line. For this, the cells were exposed to 5-FU or CLX for 48h or combination of CLX (24h) + 5-FU (24h). Sulforhodamine B colorimetric assay was performed to assess cytotoxicity. To verify the distribution of cells in the cell cycle, flow cytometry was performed and for activity of genes related to apoptosis (*BIRC-5*) and autophagy (*BENC-1*), gene expression assay by real time RT-PCR. The results demonstrated that the HT-29 cell line is sensitive to 5-FU and when combined with CLX, this effect was potentiated. The combined treatment promoted an arrest in cells in S and G0/G1 phases, indicating a reduction in cell proliferation. In addition to an increase in cells in SubG1, showing greater cell death. Also, alteration in the expression of the investigated genes was observed, suggesting the participation of apoptosis in the observed effect.

**Keywords:** 5-fluorouracil, celecoxib, colorectal cancer, apoptosis

## Introdução

Definido como um tumor que acomete um segmento de intestino grosso e o reto, o câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de câncer mais frequente entre homens e também entre as mulheres, com elevada taxa de mortalidade O

número estimado de casos novos de câncer de cólon e reto para o Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 45.630 casos, correspondendo a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 casos entre os homens e 23.660 casos entre as mulheres (INCA, 2023).

O principal fator de risco para essa neoplasia é a idade avançada, sendo que indivíduos com mais de 50 anos apresentam uma elevação drástica no risco de desenvolverem CCR. Outros fatores de risco observados são: sobrepeso e obesidade, sedentarismo, dieta rica em carne vermelha e embutidos (se estima que o consumo diário de 50 g de carnes processadas eleva em 18% o risco de CCR), consumo de carne vermelha preparada em elevadas temperaturas (fritas, grelhadas), tabagismo, consumo abusivo de bebidas alcoólicas, doenças inflamatórias do intestino (colite inflamatória e doença de Crohn), síndrome de Lynch e polipose adenomatosa familiar, histórico familiar de câncer colorretal em parentes de primeiro grau (American Cancer Society, 2022; INCA, 2023).

Para a prevenção do CCR é indicado a redução no consumo de carne vermelha (500 g de carne cozida por semana), de alimentos embutidos e bebidas alcoólicas e cigarros. Além disso, está bem estabelecido que uma alimentação saudável, isto é, baseada em alimentos *in natura* e minimamente processados reduzem o risco de ocorrência do CCR. Estes alimentos, sobretudo os de origem vegetal, têm efeito protetor nas diferentes fases da carcinogênese. Evidências apontam que o consumo de alimentos contendo fibra (25 g a 30 g de fibra por dia) e cereais integrais minimamente processados (arroz, milho, aveia) reduz o risco do CCR. As fibras dos alimentos de origem vegetal estimulam a formação de produtos de fermentação, especialmente os ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, que reduzem a proliferação celular e induzem à apoptose nas células tumorais. Uma alimentação rica em fibras também reduz a resistência à insulina, alteração reconhecida como fator de risco para esse câncer. O consumo de laticínios também é associado a um menor risco para desenvolver o CCR. Também é indicado a prática de atividades físicas regulares, que levam a promoção de um equilíbrio nos níveis hormonais, redução nos marcadores inflamatórios e no tempo de trânsito gastrointestinal, com consequente redução do período de contato das substâncias que favorecem a carcinogênese com a mucosa do intestino (INCA, 2023).

Tumores colorretais localizados são passíveis de serem tratados através da ressecção cirúrgica, apresentado um potencial curativo. Já pacientes com doença metastática micro e macroscópica, a melhor abordagem terapêutica passa a ser a terapia sistêmica, sendo a quimioterapia o método mais amplamente utilizado em pacientes com CCR (DAMATO *et al.*, 2023; LEOWATTANA; LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2023). Por décadas, o único agente utilizado para o tratamento do CCR

metastático foi o 5-fluorouracil (5-FU), um fármaco representante da família das fluoropirimidinas, ao qual foi adicionado leucovorin e, mais recentemente, oxaliplatina e irinotecan estabelecendo os esquemas mais utilizados: FOLFOX e FOLFIRI (KAWAI *et al.*, 2021; MATSUBARA *et al.*, 2023). Pesquisas recentes têm apontado o uso de anticorpos monoclonais associado a tais esquemas demonstrando uma melhora na sobrevida livre de doença em alguns pacientes. Os fármacos mais estudados são bevacuzimabe, cetuximabe e panitumumabe. O grupo de pacientes que apresentam progressão da doença mesmo após a terapêutica inicial com 5-FU, irinotecan, oxaliplatina, cetuximabe e bevacuzimabe somente tem como opção outro esquema terapêutico com os mesmos agentes (ZHAO *et al.*, 2022), tornando estes pacientes, resistentes à terapêutica proposta. Também é verificado que as células tumorais podem se tornar tolerantes a esses medicamentos, determinando uma resistência que pode levar a à recorrência precoce do tumor. Diferentes mecanismos podem explicar essa resistência (BLONDY *et al.*, 2020).

O 5-FU é considerado um pró-fármaco, cuja ação metabólica para nucleosídeos e nucleotídeos fluorados é essencial para a atividade citotóxica. Achados tem apontado para diferenças individuais na resposta terapêutica associadas às alterações gênicas sobre a codificação genética das proteínas que fazer o transporte transmembrana das enzimas metabolizadoras de 5-FU (CARRILLO *et al.*, 2015), Diante de tais circunstâncias, a busca de medicamentos que auxiliem na resposta terapêutica tem se intensificado. A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que tem recebido atenção. Observou-se que em múltiplos ensaios - *in vitro*, *in vivo*, observacionais e clínicos - que a inibição seletiva de COX-2 reduz produção de prostaglandinas e o risco de diversas neoplasias, dentre as quais o CCR (JENDROSSEK, 2013).

O Celecoxibe (CLX) é um anti-inflamatório não esteroide que apresenta potente ação de inibição seletiva da COX-2 (JENDROSSEK, 2013). O aumento da expressão de COX-2 é observado como evento inicial da carcinogênese e, quando ocorre está associado a um ruim prognóstico, pois indica proliferação, angiogênese, invasão e metástase tumoral (HASHEMI GORADEL *et al.*, 2019). 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; HANDRICK; BELKA, 2003).

Desta forma, o presente avaliou a modulação do CLX no efeito do 5-FU em linhagem celular de carcinoma de cólon humano.

## Materiais e Métodos

### Cultura Celular

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 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; CULTILAB, SP, Brasil), a temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Tratamento com 5-Fluorouracil e Celecoxibe

A células foram tratadas, inicialmente, com concentrações seriadas de 5-FU (2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM) ou CLX (5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 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> do CLX por 24h seguido de IC<sub>50</sub> do 5-FU por 24h, sendo comparadas com células tratadas isoladamente com IC<sub>50</sub> do 5-FU no tempo de 48h.

### Ensaio de Citotoxicidade

As células da linhagem HT-29 foram incubadas, por 24h, em microplacas de 96 poços em uma densidade 4 x 10<sup>4</sup> células/100µL/poço. Cada experimento incluiu um controle contendo células somente com meio de cultura e um controle sem células.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de sulforodamida B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 2015), que envolveu fixação *in situ* com ácido tricloroacético (TCA; 50%) por 60 min a 4 °C; coloração com SRB (0,4% p/v, em ácido acético 1% v/v) por 30min à temperatura ambiente; e solubilização do SRB ligado às proteínas celulares com base trizma (10 mM; pH 10,5). O SRB solubilizado foi acessada colorimetricamente utilizando um leitor de microplacas (Multiskan, Uniscience) em comprimento de onda de 540 nm. O SRB que se liga as células é proporcional à densidade celular e determinado pelas absorbâncias obtidas. A partir deste ensaio determinamos os valores de IC<sub>50</sub> (quantidade de fármaco necessária para inibir 50% do crescimento celular). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de 3 experimentos em triplicata.

### Citometria de Fluxo

A distribuição das células nas fases do ciclo celular após os tratamentos foi determinada nas culturas

através de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Para isto, 5 x 10<sup>5</sup> células foram lavadas, removidas dos frascos com tripsina/EDTA e ressuspensas em meio de cultura. A seguir foram centrifugadas, lavadas em PBS gelado e fixadas em etanol 70%. Então, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS e tratadas com solução contendo citrato de sódio (3,4 mM), iodeto de propídio (20 µg/mL) e RNase (100 µg/mL) por 30 min, na ausência de luz. A análise foi realizada em citômetro de fluxo DB Accuri™ C6. Os resultados estão expressos em percentual de células por fase do ciclo celular, e as células em fase subG1 são consideradas células em apoptose.

### Análise da Expressão Gênica

Para avaliar a expressão genica, foram utilizados os genes das proteínas beclin1 (*BECN1*), survivina (*BIRC5*) e COX-2 (*PTGS2*), as células foram tratadas com CLX (IC<sub>50</sub>), 5-FU (IC<sub>50</sub>), ambos no tempo de 48 h, ou pré-tratamento por 24h com CLX (IC<sub>50</sub>) seguido de 24h de 5-FU (IC<sub>50</sub>). A análise da expressão gênica foi realizada com método de RT-PCR em tempo real. As linhagens foram armazenadas em 1 mL de solução estabilizadora de RNA (*RNAlater*®, *Ambion*, *Austin*, TX, USA). O RNA foi extraído de acordo com um procedimento padrão de base sílica (*BOOM et al.*, 1990) 100 µL de suspensão de celular foram lisadas em 900 µL do buffer tiocianato de Guanina (GuSCN). Após a lise, os ácidos nucleicos estão ligados às partículas de sílica e subsequentemente lavadas com vários solventes em passos consecutivos. Após secagem, os ácidos nucleicos foram liberados das partículas de sílica em 50 µL de buffer de eluição.

O cDNA foi obtido do RNA total por transcrição reversa (RT) e a expressão genica foi quantificada usando o PCR em tempo real no termociclador *StepOnePlus*™ (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). Os genes *BECN1*, *BIRC5* e *PGTS2* foram avaliados usando os ensaios de expressão Hs.PT.51.20133642, Hs.PT.51.3536061, e Hs.PT.58.77266, respectivamente (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, IA, USA). A amplificação do mRNA do gene da β-actina foi realizada como um controle interno do ensaio de expressão gênica (*Applied Biosystems*, *Life Technologies*, Foster City, CA, USA). As condições para o PCR foram 95°C por 3min, 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1min. Três experimentos independentes foram realizados e o algoritmo 2<sup>-ΔΔCt</sup> foi usado para analisar os dados do ensaio de expressão gênica.

### 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

Por décadas, o fármaco utilizado para tratamento do CCR metastático foi o 5-FU isoladamente. No entanto, mesmo com a otimização da terapêutica através da padronização de combinações de fármacos, muitos pacientes, principalmente quando diagnosticados com tumores metastáticos, ainda permanecem com sobrevida livre de doença reduzida e prognóstico ruim (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA *et al.*, 2014; TEMRAZ *et al.*, 2014). Assim, a avaliação de outras opções de combinações de fármacos se faz necessária, entre estas, a associação do 5-FU com o CLX tem demonstrado interesse.

A partir do ensaio de SRB, que avalia a citotoxicidade, foi possível determinar as concentrações de IC<sub>50</sub> dos dois fármacos, ou seja, a concentração de fármaco necessária para causar morte em 50% da população de células (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM; média ± DP, n = 3) na linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29 após tratamento por 48h com 5-FU ou CLX e combinação por 24h com CLX (IC<sub>50</sub>) seguido de 24h de 5-FU (IC<sub>50</sub>). As respostas celulares foram avaliadas através da coloração com SRB.

	HT-29
5-FU 48h	8,5 ± 1,3
CLX 48h	15,2 ± 3,0*
CLX IC <sub>50</sub> 24h/5-FU 24h	5,2 ± 0,6*

\*Significativamente diferente de 5-FU isolado (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls; p < 0,001).

A linhagem HT-29 demonstrou sensibilidade diferente ao 5-FU e ao CLX, sendo mais sensível ao 5-FU. Além disso, foi possível verificar que o pré-tratamento com IC<sub>50</sub> do CLX por 24h, aumentou a sensibilidade ao 5-FU em aproximadamente 1,5 vezes.

Tais efeitos corroboram com os achados da literatura, uma vez que o uso de CLX aparentemente melhora a resposta ao quimioterápico 5-FU, pois permite o estabelecimento de um microambiente menos influenciado com citocinas pró-inflamatórias favorecendo processos de morte celular. Um estudo demonstrou uma maior redução 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).

O tratamento combinado promoveu uma parada em fase S, indicando uma redução na proliferação

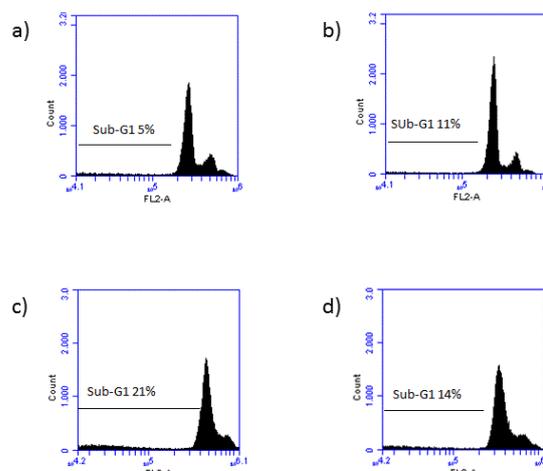
celular (Tabela 2). Dados esses que estão de acordo com nossos resultados com o ensaio SRB. Além disso, o pré-tratamento e o CLX isolado promoveram uma redução de aproximadamente 50% na fase G2/M e consequente aumento em fase G0/G1 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito do tratamento por 48h com 5-FU (IC<sub>50</sub>) ou CLX (IC<sub>50</sub>) e combinação por 24h com CLX (IC<sub>50</sub>) seguido de 24h de 5-FU (IC<sub>50</sub>) sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular na linhagem celular HT-29. Os resultados estão representados como percentual de células nas fases do ciclo celular (média ± desvio padrão, n = 3).

	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)
Controle	39,6 ± 3,5	7,6 ± 0,7	52,2 ± 1,9
CLX	54,1 ± 6,5*	7,7 ± 1,3	27,2 ± 1,7*
5-FU	39,8 ± 4,2	7,6 ± 1,4	40,0 ± 0,5
CLX/5-FU	52,3 ± 3,9**	12,2 ± 1,4***	15,5 ± 2,8***

\*Diferente do controle; \*\*Diferente do 5-FU isolado (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls; p < 0,05).

Também foi possível verificar que o pré-tratamento com CLX levou a um maior percentual de células a morte, o que pode ser observado pelo aumento da fração SubG1 (Figura 1). De fato, quando comparado com os tratamentos isolados a combinação elevou o percentual de morte celular a quase o dobro quando comparado com os tratamentos isolados.



**Figura 1.** Distribuição das células nas fases do ciclo celular. a) Controle não tratado; b) CLX IC<sub>50</sub> por 48 h; c) IC<sub>50</sub> CLX por 24 h seguido de IC<sub>50</sub> do 5-FU por 24 h; d) 5-FU IC<sub>50</sub> por 48. Os resultados são expressos como percentual de células na fase Sub-G1.

O estudo do ciclo celular permitiu analisar, dentre outras características, o comportamento proliferativo das células. Os nossos resultados demonstram um acúmulo de células em fase G0/G1 quando tratadas com CLX. Quando analisada em terapia combinada, a resposta celular determinou acúmulo em fase G0/G1 e um aumento significativo das células em fase S quando comparado com controle. Diferentes concentrações de CLX resultam em diferentes mudanças no ciclo celular em

linhagens celulares e são concentração-dependentes: baixas concentrações induzem permanência em G0/G1, enquanto que altas concentrações induzem permanência em G2/M, independente dos níveis de expressão gênica nas diferentes células testadas; indicando, dessa forma, que a regulação do ciclo celular pelo CLX é concentração-dependente (KIM; PYO, 2013; TAMURA *et al.*, 2015). Além disso, quando observada a população celular em fase SubG1, observou-se um aumento de 4x no percentual de célula, demonstrando que o CLX, em combinação com 5-FU, determina um sinergismo ao aumentar o percentual de morte celular quando comparado com os tratamentos isolados.

No tratamento isolado com IC<sub>50</sub> do CLX não foi possível detectar o gene da COX-2 (*PTGS2*). Isto era esperado, visto que este fármaco pode inibir a expressão desta enzima (SUN; WU; WENG, 2015). Também foi evidenciado que a expressão desse gene reduziu significativamente em relação ao controle não tratado, após o tratamento combinado com CLX e 5-FU (Tabela 3). Este achado permite sugerir a hipótese de ativação do processo de apoptose, uma vez que outros estudos têm documentado que a COX-2 pode estar associada com aumento dos níveis do gene supressor de apoptose *bcl-2* através da ativação de MAP quinase, sendo que o *bcl-2* poderia diminuir drasticamente a ativação do citocromo C (WANG *et al.*, 2011; ABDELHALEEM *et al.*, 2022).

**Tabela 3.** Expressão dos genes *PTGS2*, *BIRC5* e *BECN1* após tratamento com CLX (IC<sub>50</sub>), 5-FU (IC<sub>50</sub>), ou pré-tratamento por 24 h com CLX (IC<sub>50</sub>) seguido de 24 h de 5-FU (IC<sub>50</sub>).

Gene	Tratamento	Concentração Relativa <sup>#</sup>
<i>PTGS2</i>	CLX	Não detectável
	5-FU	3,66 ± 2,13
	CLX/5-FU	1,49 ± 0,48*
<i>BIRC5</i>	CLX	0,94 ± 0,96
	5-FU	2,40 ± 0,29*
	CLX/5-FU	1,18 ± 0,13
<i>BECN1</i>	CLX	0,70 ± 0,07
	5-FU	1,70 ± 0,29*
	CLX/5-FU	0,42 ± 0,18*

\*Diferente do controle (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ). <sup>#</sup>Concentração relativa foi determinada pela relação da expressão do gene alvo no grupo tratado com o grupo controle e com o gene constitutivo ( $\beta$ -actina).

A tabela 3 mostra um aumento significativo na expressão de *BECN1* quando contemplamos o 5-FU, sugerindo um aumento na atividade autofágica. Também pode ser observado um aumento

significativo na expressão de *BIRC5* com o 5-FU isolado. Apesar de não ter significância estatística, podemos observar uma tendência de redução da expressão do *BIRC5* no tratamento combinado. Durante o desenvolvimento do CCR, a morte celular atua com papel fundamental neste cenário que necessita de um equilíbrio entre as proteínas que atuam nos processos de autofagia e apoptose (KOEHLER; JÄGER; SCHULZE-BERGGAMEN, 2014). Ao realizar a análise da expressão gênica de proteína envolvidas nestes processos observamos que: 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. Defeitos na sinalização da apoptose são comuns no CCR, sendo que uma resistência adquirida ao mecanismo de morte celular pode ser característica chave tanto da carcinogênese como da resistência à terapêutica (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A apoptose caracteriza-se como uma morte celular programada clássica que decorre da ativação de genes como *BCL-2* e *BIRC5*. Este último, *BIRC5*, é responsável por codificar a survivina, uma proteína que apresenta um papel anti-apoptótico que regula a síntese das caspases (SIFROI-FERNANDEZ *et al.*, 2014). Quando ocorre a superexpressão, a linhagem celular maligna tende a ser perpetuada, favorecendo a tumorigênese. Consequentemente, está associada com a diminuição da sobrevivência global de pacientes com CCR metastático (NING *et al.*, 2020). No presente estudo, um aumento da expressão do gene *BIRC5* pode ser observada principalmente com o tratamento com 5-FU quando comparado ao controle não tratado. No entanto, observa-se uma diminuição da sua expressão quando realizado o pré-tratamento com CLX ao comparar-se essas duas modalidades de tratamento. Inferimos, assim, que o CLX propicia a inibição da survivina, favorecendo maiores taxas de morte celular através do mecanismo de apoptose, confirmando os achados de aumento de células na fase SubG1. Estudos têm demonstrado a relação entre a combinação de CLX com a melhora terapêutica, tanto quimioterápica como radioterápica, através da ativação da via de apoptose. Kim e Pyo (2013), demonstraram um aumento de indução de apoptose dependente da expressão de COX-2 em linhagem de células de carcinoma de cólon HTC-116, promovendo melhor resposta ao tratamento com radiação. Também, Zhang *et al* (2013) apresentaram em sua pesquisa resultados que comprovam o aumento da apoptose

no uso da terapia combinada 5-FU + CLX em massa tumoral de carcinoma colorretal enxertada em ratos derivada da linhagem HT-29.

Semelhante ao observado com a apoptose, a desregulação e disfunção da autofagia pode contribuir para o desenvolvimento do câncer uma vez que apresenta papel importante na resposta pró-sobrevivência do tumor durante a privação de nutrientes, bem como para remover organelas, partículas indesejadas e microrganismos, dessa forma determinando um ambiente tecidual favorável (JAIN *et al.*, 2013). Além disso, a expressão do gene *BECN1*, responsável pela síntese da proteína pro-autofágica Beclin-1, está aumentada nas células das criptas intestinais (BURADA *et al.*, 2015). Este estudo demonstrou que a autofagia também é favorecida quando ocorre associação de tratamento com 5-FU e CLX. Esses resultados podem ser explicados pelo desequilíbrio dos mecanismos de morte celular programada associado com a patogênese das doenças intestinais, desde os processos inflamatórios crônicos até o desenvolvimento do CCR (KOEHLER; JÄGER; SCHULZE-BERGMEN, 2014).

### Conclusões

Os achados do presente estudo mostraram que existe um sinergismo entre CLX e 5-FU no tratamento do carcinoma colorretal humano, uma vez que, quando realizado tratamento combinado com esses dois fármacos, os resultados *in vitro* apontam para uma melhor resposta. Observou-se aumento da morte celular decorrente de uma maior citotoxicidade dessas substâncias. Além disso, avaliar as vias de morte e ciclo celular para identificar os processos que justificassem a melhor resposta ao tratamento, foi possível detectar alterações na expressão de genes associados com apoptose e autofagia e mudanças no padrão de distribuição do ciclo celular que promovem morte celular.

### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro recebido, Código de Financiamento 001.

### Referências

BLONDY, Sabrina; DAVID, Valentin; VERDIER, Mireille; MATHONNET, Muriel; PERRAUD, Aurélie; CHRISTOU, Niki. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: from classical

pathways to promising processes. **Cancer Science**, v. 111, p. 3142-3154, 2020.

BURADA, Florin *et al.* Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, p. 271-284, 2015.

ABDELHALEEM, Eman; KASSAB, Asmaa; EL-NASSAN, Hala; KHALIL, Omneya. Design, synthesis, and biological evaluation of new celecoxib analogs as apoptosis inducers and cyclooxygenase-2 inhibitors. **Archive der Pharmazie (Weinheim)**, v. 355, p.e2200190, 2022.

American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. Atlanta: American Cancer Society; 2022. Disponível em <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2020-2022.pdf>. Acesso em 21 mai 2023

BOOM, René *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Aids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

CARRILLO, Eemeralda *et al.* 5-Fluorouracil derivatives : a patent review (2012-2014). **Expert Opinion on Therapeutics Patents**, v. 25, p. 1-14, 2015.

DAMATO, Angela *et al.* Chemotherapy Duration for Various Indications in Colorectal Cancer: a Review. **Current Oncology Reports**, v. 25, p. 341-352, 2023.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HASHEMI GORADEL, Nasser; NAJAFI, Masoud; SALEHI, Eniseh; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEI Keyman. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 5683-5699, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023**: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em 21 mai. 2023.

JAIN, Mayur *et al.* Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, p. 12-29, 2013.

JENDROSSEK, Verena. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. **Cancer Letters**, v. 332, p. 313-324, 2013.

JENDROSSEK, Verena; HANDRICK, René; BELKA Claus. Celecoxib activates a novel mitochondrial

- apoptosis signaling pathway. **FASEB Journal**, v. 17, p. 1547-1549, 2003.
- KAWAI, Sadaiuki *et al.* Comparison of irinotecan and oxaliplatin as the first-line therapies for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 21, p. 1-11, 2021.
- KIM, Young-Mee; PYO, Hongryull. Different cell cycle modulation by celecoxib at different concentrations. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 28, p.138-145, 2013.
- KOEHLER, Bruno; JÄGER, Dirk; SCHULZBERGKAMEN, Henning. Targeting cell death signaling in colorectal cancer: Current strategies and future perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 1923-1934, 2014.
- LEOWATTANA, Wattana; LEOWATTANA, Pathomthep; LEOWATTANA, Tawitthep. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, p. 1569-1588, 2023
- MATSUBARA, Yuki *et al.* Impact of omitting fluorouracil from FOLFIRI plus bevacizumab as second-line chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, p. 1123-1129, 2023.
- MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice; MELICHAR, Bouslav; SOUCEK, Pavel. FOLFOX / FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p.10316-10330, 2014.
- NING, Yan *et al.* Cytokeratin-20 and Survivin-Expressing Circulating Tumor Cells Predict Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients by a Combined Immunomagnetic qRT-PCR Approach. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, p. 2401-2408, 2015.
- RICCARDI, Carlo; NICOLETTI, Ido. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1458-1461, 2006.
- SIFFROI-FERNANDEZ, Sandrine *et al.* 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.
- SKEHAN, Philip *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 11, p. 1107-1112, 1990
- SUN, Tian-Wen; WU, Zhi-Hong; WENG, Xi-Sheng. Celecoxib can suppress expression of genes associated with PGE2 pathway in chondrocytes under inflammatory conditions. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 10902-10910, 2015.
- TAMURA, Dai; SAITO, Teruyoshi; MURATA, Kanae; KAWASHIMA, Masafumi; ASANO Ryuji. Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms. **International Journal of Oncology**, v. 46, p. 1393-1404, 2015.
- TEMRAZ, Sally; MUKHERJI, Deborah; ALAMEDDINE, Raafat; SHAMSEDDINE, Ali. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, p.217-230, 2014.
- WANG, Fang *et al.* Expression of COX-2 and Bcl-2 in primary fallopian tube carcinoma: correlations with clinicopathologic features. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 49, p. 389-397, 2011.
- ZHANG, De-Qing; GUO, Qiang; ZHU, Jian-Hong; CHEN, Wei-Chang. 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, p. 1-8, 2013.
- ZHAO, Wen; JIN, Lujia; CHEN, Peng; LI, Dingchang; GAO, Wenxing; DONG, Guanglong. Colorectal cancer immunotherapy-Recent progress and future directions. **Cancer Letters**, v. 545, p. 215816, 2022.