

Michelle Lima¹, Diana Bordin², Alexandre Escargueil³, Daniele Soares³, Annette Larsen³, Guido Lenz², João A. P. Henriques²
(1) Bolsista IT FAPERGS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. (2) PPG Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. (3) Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, França.

INTRODUÇÃO

Tumores sólidos frequentemente apresentam regiões hipóxicas, de baixo pH e baixos níveis de glicose. Em tais condições, ocorre a ativação de uma série de funções celulares as quais permitem que as células tumorais não somente sobrevivam, mas continuem a proliferação metastática. Entre os muitos genes ativados estão os responsáveis pelo transporte e metabolismo da glicose. Além disso, o processo autofágico nas células tumorais leva a obtenção de energia através da degradação de aminoácidos e organelas, o que pode contribuir para a progressão do tumor. Tumores que apresentam tais características, como o colorretal, tendem a mostrar resistência à quimioterapia, o que se torna um sério problema na clínica oncológica. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta celular das linhagens de câncer colorretal HCT116 wt e HCT116 p53^{-/-} tratadas com os quimioterápicos oxaliplatina (OX) e cisplatina (CIS) em meios de cultura contendo diferentes concentrações de glicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células: Foram utilizadas as linhagens de células de câncer colorretal HCT116 wt e HCT116 p53^{-/-}. As células foram cultivadas em meio DMEM com concentração de glicose baixa (LG: 0,5 mM), normal (NG: 5 mM) ou alta (HG: 25 mM). Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Viabilidade celular: As células foram plaqueadas em uma densidade de 1 x 10⁴/poço e incubadas com concentrações de 0 a 50 µM de OX ou CIS durante 120 h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo] ao composto formazan detectado em 540 nm.

Tempo de duplicação da população de células: As células foram plaqueadas em uma densidade de 5 x 10⁴/poço e incubadas nas três diferentes concentrações de glicose durante 96 h. Após este período as células foram contadas e o tempo de duplicação da população foi calculado.

Ciclo Celular: A avaliação do ciclo celular das células expostas as diferentes condições de tratamentos foi determinada por citometria de fluxo através da incorporação nuclear com iodeto de propídio.

Autofagia: A quantificação do processo autofágico das células expostas às diferentes concentrações de glicose e tratadas com OX ou CIS, foi feito através de citometria de fluxo utilizando o corante fluorogênico laranja de acridina, que marca ambientes ácidos emitindo fluorescência vermelha.

RESULTADOS

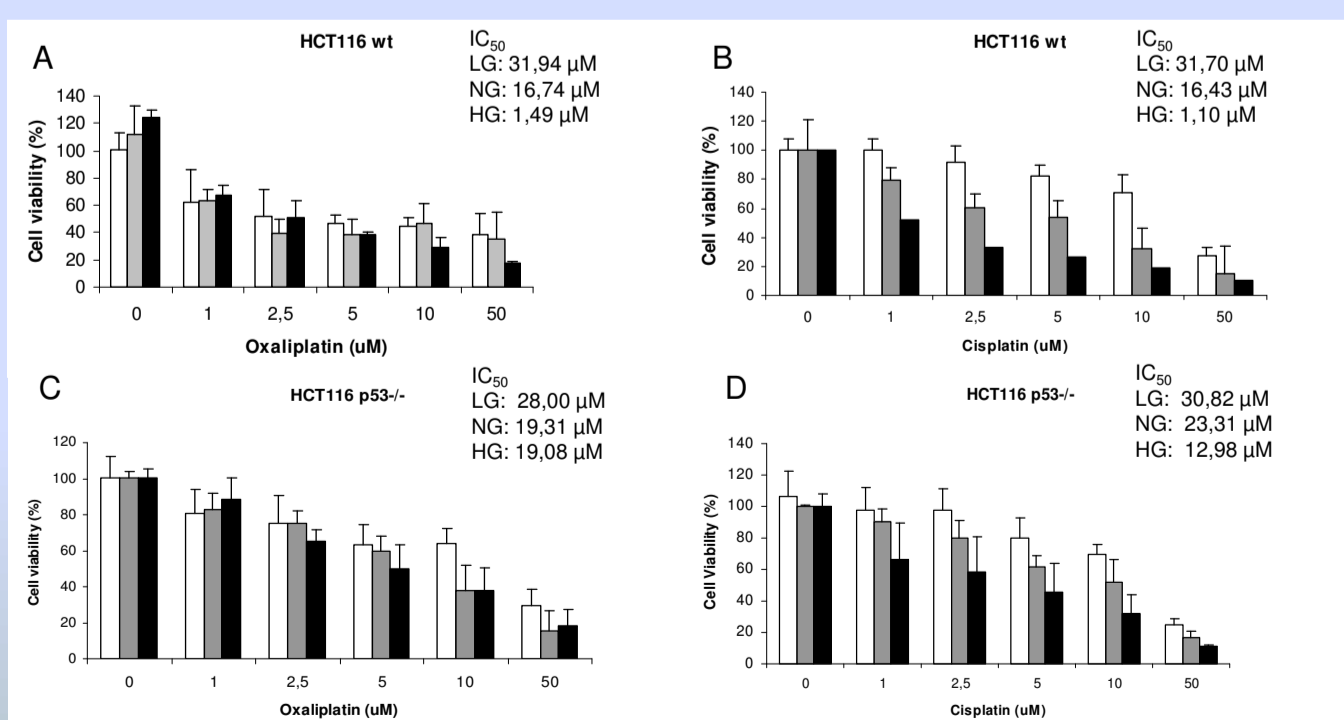


Figura 1. Viabilidade celular das linhagens HCT116 wt (A, B) e p53^{-/-} (C, D) tratadas durante 24 h com OX e CIS nas diferentes concentrações de glicose. □ LG, ■ NG, ■ HG.

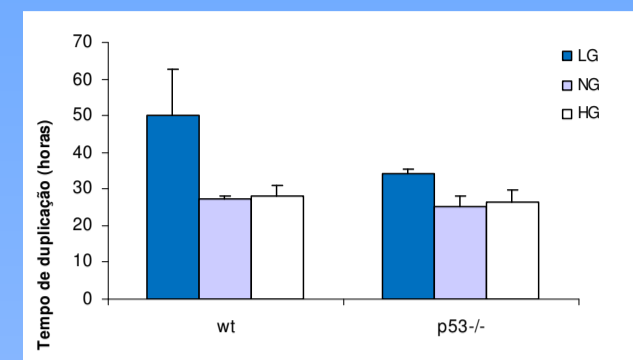


Figura 2. Tempo de duplicação da população das linhagens HCT116 wt e p53^{-/-} cultivadas em diferentes concentrações de glicose.

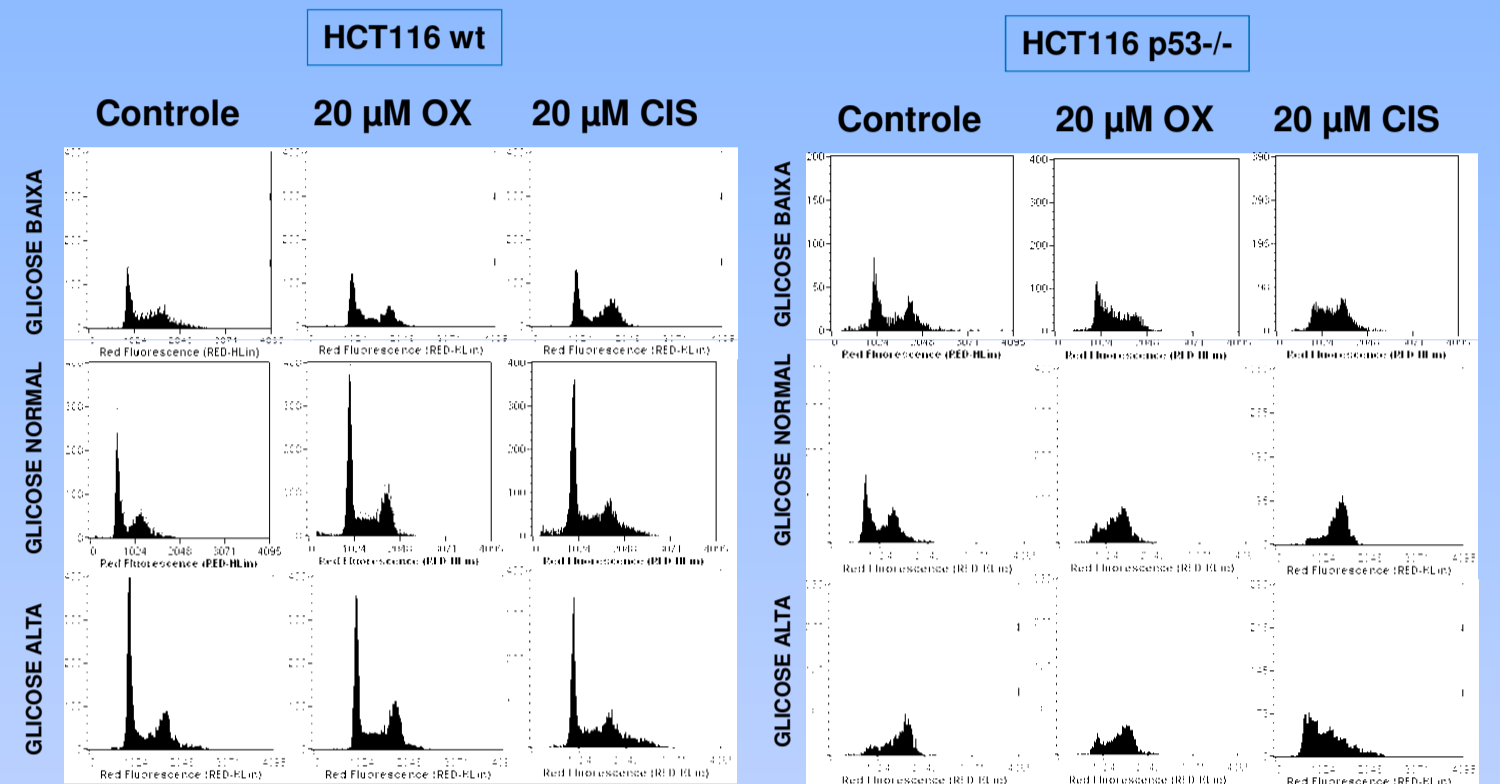


Figura 3. Análise do ciclo celular das linhagens HCT116 wt e p53^{-/-} tratadas com OX ou CIS por 24h + 24h sem droga, em meios de cultura contendo baixa, normal ou alta concentrações de glicose.

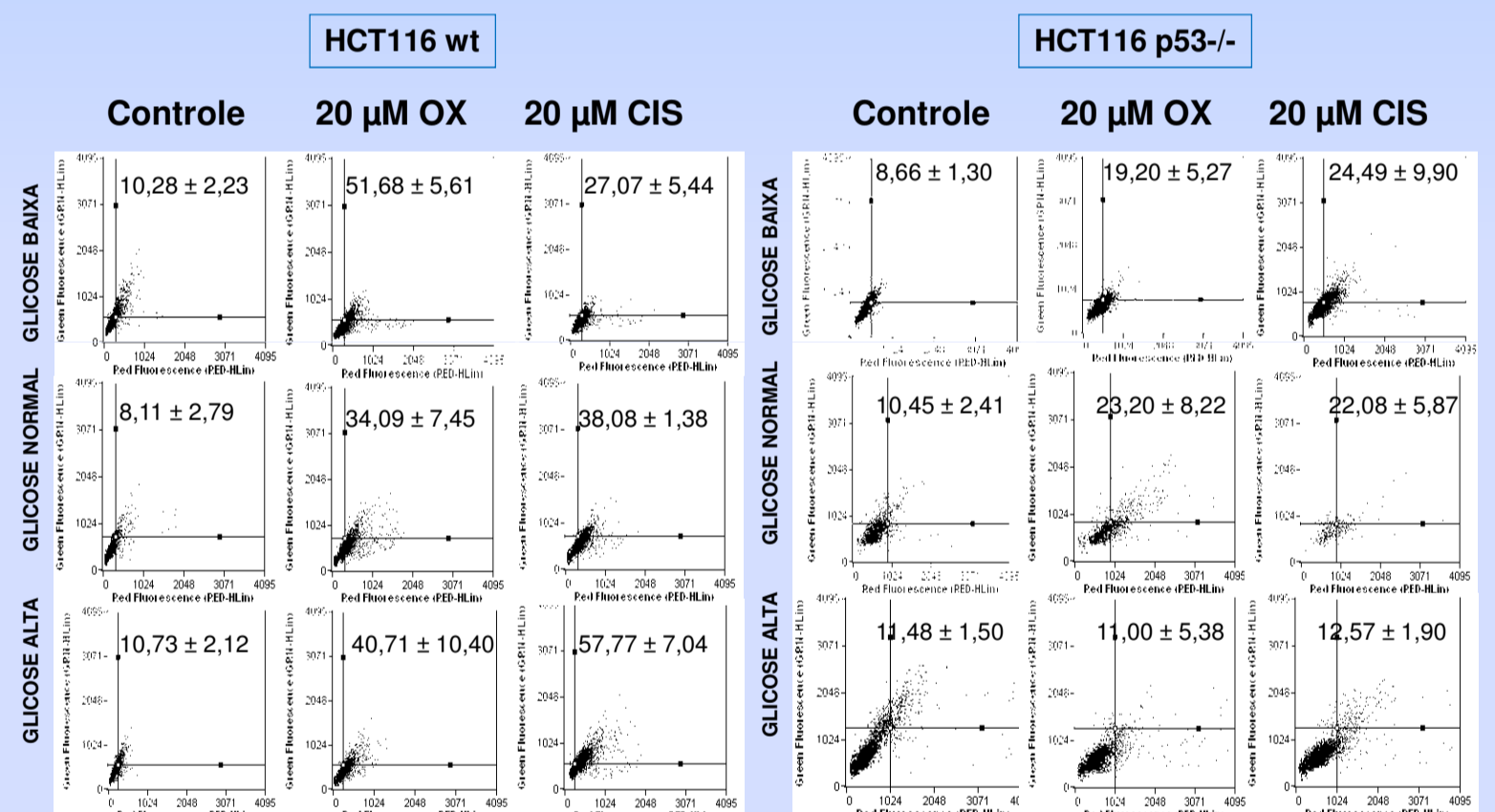


Figura 4. Análise da autofagia nas linhagens HCT116 wt e p53^{-/-} tratadas com OX ou CIS em meios de cultura contendo diferentes concentrações de glicose.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Através do ensaio MTT pode-se observar que ambas linhagens apresentaram sobrevivência e valores de IC₅₀ aumentados nos tratamentos com OX e CIS, quando as células foram expostas à baixa concentração de glicose. Esse resultado sugere um metabolismo diferenciado das células de câncer expostas a essa condição. O cálculo do tempo de duplicação da população mostrou que as células cultivadas em meio contendo baixa concentração de glicose levam mais tempo para duplicar a população, provavelmente devido a diminuição dos níveis de ATP nas células. A avaliação do ciclo celular mostrou um maior número de células em fase G1 em condições de baixa glicose, o que pode explicar o aumento da sobrevivência em condições de privação da glicose. Já em concentrações mais altas de glicose, observou-se um maior número de células em fase S/G2. A indução de autofagia foi maior na linhagem HCT116 wt em relação à linhagem p53^{-/-}, mostrando que a proteína p53 tem um papel importante na indução de autofagia. Os dados obtidos demonstram que células de câncer colorretal apresentam diferentes respostas aos agentes platinados dependendo da disponibilidade de glicose no meio. Embora estudos adicionais sejam necessários, estes resultados podem contribuir para a elucidação do comportamento das células tumorais no seu microambiente, além do desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas contra o câncer colorretal.