

**A IMPORTÂNCIA DA SEQÜÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO
DO IRINOTECAN E 5-FLUOROURACIL NA INIBIÇÃO DA
PROLIFERAÇÃO DO CARCINOMA DE CÍOLON HUMANO *IN VITRO***

Ivana Grivicich

Porto Alegre, 1999

A IMPORTÂNCIA DA SEQÜÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO

**DO IRINOTECAN E 5-FLUOROURACIL NA INIBIÇÃO DA
PROLIFERAÇÃO DO CARCINOMA DE CÓLON HUMANO *IN VITRO***

Ivana Grivicich

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas - Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Orientador: Dr. Dennis Ricardo August Mans

Co-Orientador: Dr. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre, 1999

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Dennis Mans por sua orientação e dedicação em todas as etapas deste trabalho.
- Ao Dr. Gilberto Schwartzmann por sua participação no desenvolvimento deste estudo.
- À Prof. Adriana Brondani da Rocha por sua amizade e apoio.
- Ao Cleber de Lima, Denise Faria, Michael Barros e Rafael Lopes pelo auxílio nos experimentos.
- Ao Prof. Dr. José Cláudio F. Moreira pela utilização do laboratório e auxílio sempre que necessário.
- Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, representado pela Farm. Maira Burin, pela utilização do espectrofluorímetro.
- Ao Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Prof. Dr. Jarbas Oliveira, pelo auxílio e confiança na utilização dos equipamentos.
- Ao Laboratório de Transplante da Santa Casa, representado pelo Dr. J. M. Newmann e pela Farm. Heloísa Sporleder, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.
- Aos colegas da Fundação SOAD pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

- Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica pela oportunidade de realizar este trabalho.
- Aos meus pais e irmãs pela paciência e carinho em todos os momentos.
- À CAPES e à Fundação SOAD pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia e etiologia.....	11
1.2 Biologia Molecular	14
1.3 Características Clínicas.....	19
1.4 Tratamento	24
1.5 5-Fluorouracil	26
1.6 Irinotecan.....	30
1.7 Combinação CPT-11/5-FU	35
1.8 Objetivos	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Material.....	46
2.2 Métodos.....	48
2.2.1 Cultura de Células.....	48
2.2.1.1 Linhagens Celulares e Manutenção das Culturas	48
2.2.1.2 Determinação do Tempo de Duplicação Celular e Densidade de Inoculação para os Experimentos	49
2.2.2 Tratamentos com Drogas	49
2.2.2.1 Determinação da Quimiossensibilidade	50
2.2.2.2 Análise do Efeito da Combinação das Drogas	51
2.2.3 Determinações Enzimáticas	52
2.2.3.1 Determinação da Atividade da Timidilato Sintase	52
2.2.3.2 Determinação da Atividade da Topoisomerase I.....	54
2.2.3.3 Determinação da Atividade da Carboxil Esterase	56
2.2.3.4 Determinação dos Níveis de Lactato Desidrogenase	57
2.2.4 Estudos do Dano e Reparo do DNA	58
2.2.4.1 Determinação do Dano ao DNA	58
2.2.4.2 Avaliação da Incorporação de [³ H-Metil]Timidina no DNA	60
2.2.4.3 Determinação da Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular ...	62
2.2.4.4 Formação de Complexo DNA-Topoisomerase I	63
2.2.5 Análise Estatística	64

3. RESULTADOS	65
3.1 Efeitos do 5-FU, CPT-11 e Combinações	65
3.1.1 Tempo de Duplicação Celular e Densidade de Inoculação	65
3.1.2 Quimiossensibilidade	66
3.1.3 Efeitos das Combinações dos Agentes	71
3.1.4 Atividades Enzimáticas	74
3.1.4.1 Atividade da Timidilato Sintase	74
3.1.4.2 Atividade da Topoisomerase I	76
3.1.4.3 Atividade da Carboxil Esterase	78
3.1.5 Produção de Danos ao DNA	79
3.2 Ação dos Pré-Tratamentos	83
3.2.1 Incorporação de [³ H-Metil]Timidina no DNA	83
3.2.2 Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular	86
3.2.3 Níveis da Lactato Desidrogenase	88
3.2.4 Complexos DNA-Topoisomerase I	89
4. DISCUSSÃO	91
5. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ABSTRACT	117
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CI	Índice de combinação
CPT-11	Irinotecan
DCC	<i>Deleted colon carcinoma</i>
DP	Desvio padrão da média
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis(β -amino etil éter)- <i>N,N,N',N'</i> , tetra-acético
FA	Fração afetada
FAP	Polipose adenomatosa familiar
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FUTP	Fluorouridina trifosfato
5-FU	5-Fluorouracil
HBSS	Solução salina tamponada de Hank
HNPCC	Câncer colorretal não poliposo
LDH	Lactato desidrogenase
LV	Leucovorin
MTD	Dose máxima tolerada

PBS	Solução salina fosfato tamponada
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TS	Timidilato sintase

RESUMO

O câncer colorretal é um dos tumores humanos mais freqüentes e a terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo. Apesar de importantes progressos terapêuticos, os resultados na doença avançada ainda são muito modestos. Isto deve-se ao fato de que a droga mais utilizada nesta neoplasia, o antimetabólito 5-fluorouracil (5-FU), foi desenvolvido a mais de 40 anos produzindo taxas de respostas de somente 10-15%. Recentemente, o inibidor da topoisomerase I irinotecan (CPT-11) demonstrou, em carcinoma de cólon avançado, respostas comparáveis tanto em pacientes não tratados quanto naqueles que tiveram recaída após terapia com 5-FU. Estes resultados justificam a avaliação da combinação 5-FU/CPT-11 nesta doença. Apesar das respostas dos estudos clínicos serem promissoras, a melhor seqüência de administração destes agentes ainda não foi determinada.

Neste estudo, avaliamos a combinação CPT-11/5-FU quanto ao aumento da inibição do crescimento celular quando comparada com os agentes sozinhos nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4. Para isto, as células foram expostas às drogas sozinhas ou a várias combinações e seqüências de dose baixa e fixa (IC_{20}) de um dos agentes na presença de dose alta e seriada do outro. As células foram avaliadas imediatamente após os tratamentos e/ou cultivadas por mais 2 dias em meio de cultura sem drogas através de coloração com sulforodamina B. As interações entre CPT-11 e 5-FU foram avaliadas por um programa de computador que permite calcular os índices de combinação (CIs) das drogas indicando sinergismo, adição, ou antagonismo ($CI < 1$, $= 1$, ou > 1 , respectivamente). As respostas celulares foram relacionadas com as atividades das enzimas timidilato sintase, topoisomerase I e carboxil esterase, que foram determinadas através de ensaio que mede os sítios de ligação e atividade catalítica da enzima, ensaio de decatenação do DNA e método espectrofotométrico, respectivamente. Estando a toxicidade no DNA envolvida no mecanismo de ação das duas drogas, também relacionamos as respostas celulares com a introdução de danos ao DNA por método fluorescente. Para melhor entendermos as interações entre as drogas, examinamos os efeitos da exposição à IC_{20} , IC_{50} e/ou IC_{80} do CPT-11 ou 5-FU por 2 h ou 24 h em alvos celulares possivelmente relacionados com a citotoxicidade destes agentes. Estes incluem: capacidade de reparo por excisão do

DNA, distribuição das células nas fases do ciclo celular, integridade da membrana plasmática e formação de complexos DNA-topoisomerase I. Para isto, utilizamos método de incorporação de [³H-metil]timidina, citometria de fluxo, liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura e ensaio de precipitação com SDS, respectivamente.

Os estudos de inibição do crescimento celular revelaram valores de IC₅₀ do 5-FU nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4 de aproximadamente 15, 8 e 2 μM, respectivamente, e do CPT-11 próximos a 2, 2 e 4 μM, respectivamente. As diferentes sensibilidades ao 5-FU nas três linhagens foram determinadas principalmente pela diferença na afinidade ao substrato. As respostas comparáveis obtidas pela exposição ao CPT-11 podem ser explicadas pelo equilíbrio entre as diferentes atividades das enzimas topoisomerase I e carboxil esterase, entre as linhagens. O programa de análise da combinação das drogas mostrou adição ou sinergismo após exposição a IC₂₀ do CPT-11 seguido do 5-FU, nas três linhagens celulares. Por outro lado, o pré-tratamento com IC₂₀ do 5-FU antagonizou a inibição do crescimento mediada pelo CPT-11. Nenhum dos tratamentos simultâneos determinou um aumento na inibição do crescimento nas linhagens SW620 e HT-29; mas mostraram adição ou antagonismo na linhagem SNU-C4. Observamos um significativo acréscimo na introdução de danos ao DNA nas linhagens celulares SW620 e HT-29 somente quando a IC₂₀ do CPT-11 precedeu a IC₅₀ do 5-FU. Já na linhagem SNU-C4, não somente este tratamento, mas também a utilização simultânea dos agentes introduziu mais dano ao DNA.

Os tratamentos por 2 h ou 24 h com IC₂₀, IC₅₀, e/ou IC₈₀ do 5-FU ou CPT-11 não causaram mudanças significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular, concentração de LDH no meio de cultura, ou formação de complexos DNA-topoisomerase I. Indicando que alterações nestes processos não estão envolvidas com os efeitos modulatórios dos pré-tratamentos na citotoxicidade das drogas. Entretanto, a incorporação de [³H-metil]timidina no DNA de células tratadas com CPT-11, aumentou em função da dose e tempo de exposição à droga. Este resultado sugere que o dano ao DNA introduzido pelo CPT-11 depende da dose e tempo de exposição podendo ser reparado por mecanismos de excisão. Somente foi observada significativa incorporação de [³H-metil]timidina em células tratadas com IC₂₀ do 5-FU por 2 h, sugerindo que o reparo por excisão só ocorre após exposição por curto período e à doses baixas deste agente.

Juntos, os resultados deste estudo mostraram que tanto os efeitos anti-proliferativos quanto a introdução de danos ao DNA pela combinação CPT-11/5-FU em dose baixa e fixa de um agente junto com dose alta do outro, nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4, dependem da seqüência de administração das drogas. Estes achados podem ter sido determinados pelos diferentes efeitos do tratamento com uma dose baixa agentes nos mecanismos de reparo por excisão do DNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Etiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano o câncer atinge aproximadamente 9 milhões de pessoas e mata cerca de 5 milhões. Na maioria dos países, é a segunda causa de morte por enfermidade, logo depois das doenças cardiovasculares (Ministério da Saúde, 1999). No Brasil, em 1994, as neoplasias malignas foram responsáveis por 10,9% dos óbitos relacionados a doenças, sendo 53,8% em homens e 46% em mulheres. Na região nordeste, diferente do restante do país, o câncer é a terceira causa de morte (6,3% dos óbitos), atrás das doenças infecciosas e parasitárias. Nas outras regiões, permanece como a segunda causa de mortalidade, quando desconsideramos fatores externos, aumentando proporcionalmente na medida em que se desloca para a região sul (15,2%) (Ministério da Saúde, 1999).

Os carcinomas da região colorretal representam o quarto tipo mais comum de neoplasia maligna (aproximadamente 150.000 novos casos por ano) e a terceira causa de mortalidade relacionada ao câncer no mundo (60.000 mortes por ano) (Jessup *et al.*, 1996; Chronic Deases, 1998). A ocorrência deste tumor varia entre

raças e países, demonstrando taxas mais elevadas em países industrializados (35.8 casos em 100.000 habitantes) e menores taxas na Ásia e na África (3.4 casos em 100.000 habitantes) (Wingo *et al.*, 1995). Nas capitais brasileiras com estilo de vida ocidental e rápida urbanização, o tumor de cólon é a quarta causa de câncer em ambos os sexos. Em Porto Alegre, por exemplo, a incidência deste é de 24 por 100.000 habitantes, sendo a segunda causa de morte por câncer em mulheres (Ministério da Saúde, 1999).

O aparecimento da doença aumenta após os 40 anos de idade e atinge sua incidência máxima aos 70 anos, sendo muito raro em crianças. Este fato é determinado por um longo período de latência de 10-35 anos na sua carcinogênese (Cohen *et al.*, 1997). Parece existir uma maior incidência desta neoplasia em homens, quando comparado com a ocorrência em mulheres (Chronic Diseases, 1998; Venook *et al.*, 1996).

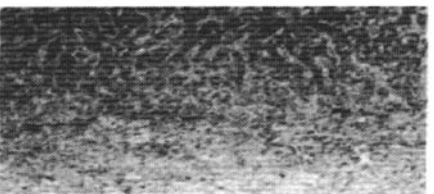
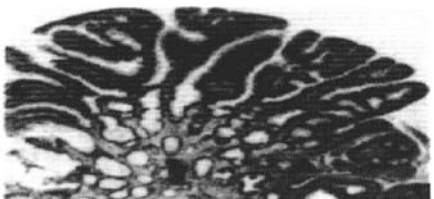
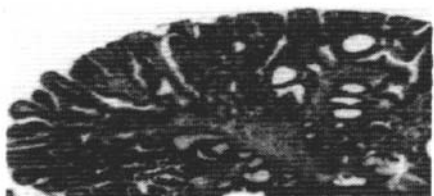
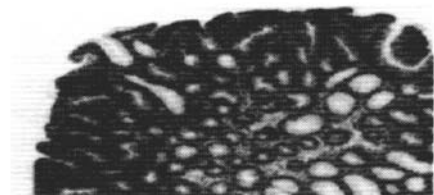
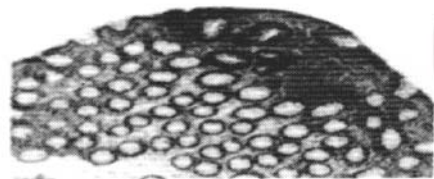
A história natural do câncer de cólon não é bem compreendida, mas provavelmente depende de uma interação entre fatores hereditários e ambientais. Entre estes, salientamos o estilo de vida, a dieta, a exposição ocupacional à carcinógenos e o histórico familiar de câncer e doenças relacionadas a este. Aproximadamente 10 % dos casos de câncer colorretal ocorre, em parte, devido a uma predisposição genética, sendo várias síndromes hereditárias associadas a este fato (Cohen *et al.*, 1997). A mais importante é a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), doença autossômica dominante, caracterizada pela presença de inúmeros pólipos adenomatosos no cólon, que, ao sofrerem transformação, levam ao aparecimento do carcinoma (Fearon, 1995). Menos freqüente, a síndrome de

Gardner (Gardner, 1962), é uma desordem genética semelhante a FAP. A síndrome de Turcot, uma doença autossômica recessiva, na qual também observa-se pólipos no intestino (Turcot *et al.*, 1959). A síndrome de Lynch (Lynch *et al.*, 1983), doença autossômica dominante, sem a presença de pólipos, é caracterizada pelo aparecimento prematuro de adenocarcinomas, incluindo o intestino grosso. E o câncer colorretal familiar não poliposo (HNPCC), uma síndrome hereditária autossômica dominante responsável por 4-13% dos tumores de cólon (Cohen *et al.*, 1997; Fearon, 1995).

Relacionam-se, também, ao desenvolvimento deste tumor, algumas doenças inflamatórias do intestino, como a colite granulomatosa (Doença de Crohn) e a colite ulcerativa crônica, a qual aumenta o risco de aparecimento do câncer de cólon em até 40 vezes (Cohen *et al.*, 1997).

Determinados componentes alimentares apresentam relação com o desenvolvimento do câncer de cólon. Esses incluem os alimentos com níveis altos de agentes carcinogênicos, como os nitritos utilizados em conservantes. Além disso, hábitos nutricionais, ricos em carne e gordura animal, parecem criar um ambiente favorável para o crescimento desta neoplasia. Por outro lado, há evidências de que o consumo de vegetais, fibras, cereais e suplemento de cálcio, bem como a realização de atividades físicas, podem reduzir o risco do câncer intestinal (Ministério da Saúde, 1999). Mais ainda, quando grupos com baixo risco de desenvolver o câncer de cólon se mudam para áreas de alto risco, as taxas de incidência deste tumor aumentam nessa população (Venook *et al.*, 1996). Cohen *et al.* (1997) demonstraram que japoneses, no seu país de origem, apresentam uma incidência muito baixa desse

tipo de câncer (6-8 casos por 100.000 habitantes), enquanto que a primeira geração de imigrantes nos Estados Unidos, em contato com uma dieta rica em colesterol e pobre em fibras, aumentaram em 2.5 vezes o risco de desenvolver o câncer de cólon. Estudos com animais demonstraram que tanto o tipo, quanto a quantidade de gordura agem promovendo a carcinogênese (Cohen *et al.*, 1997). Ou ainda, que a baixa ingestão de fibras desacelera o ritmo intestinal, favorecendo uma exposição



entes cancerígenos na luz do intestino (Ministério tórico familiar (Potter, 1992; Bostick *et al.*, 1993), álcool (Giovannucci *et al.*, 1994) estão associados olvimento do câncer de cólon.

noma de cólon tem sido associado a sucessivas revestimento do intestino, durante vários anos.

um modelo molecular da carcinogênese desta

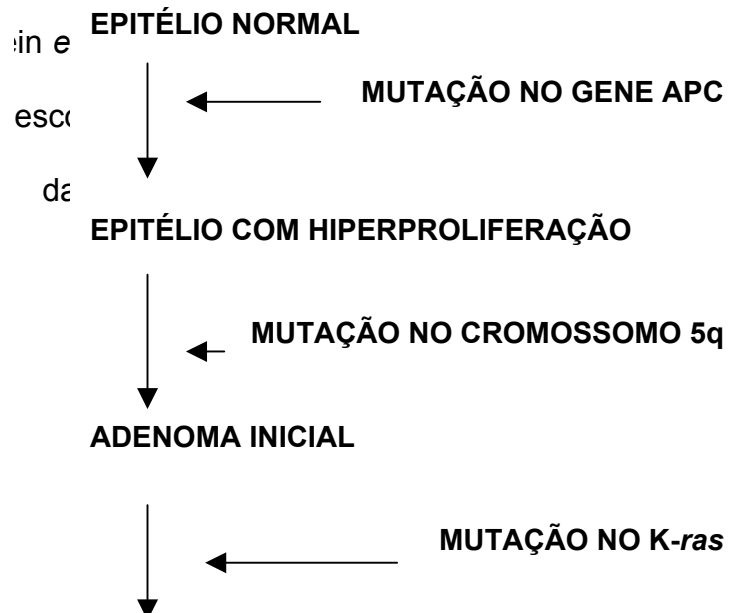


Fig. 1: Modelo genético da tumorigênese do carcinoma de cólon. Reproduzido de Fearon *et al.* (1995).

De acordo com este modelo, um dos primeiros passos na tumorigênese colorretal é a inativação do gene supressor de tumor APC (*adenomatous polyposis coli*), localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q21). Este gene está relacionado com a transformação do epitélio normal em micro adenomas. O APC codifica a proteína β -catenina, que está envolvida com os mecanismos de adesão celular. A inativação do APC se relaciona com a ocorrência da FAP, doença caracterizada pela presença de centenas de pólipos no intestino. Quando estes pólipos não são removidos cirurgicamente, um ou mais destes irá progredir para a formação de um tumor maligno (Fearon, 1995).

Apesar de existirem alterações na família dos oncogenes *ras* (Tabela 1, Fig. 1) nos passos iniciais da carcinogênese (Bos *et al.*, 1987), nem sempre estas mutações ocorrem durante o desenvolvimento do tumor colorretal. Aproximadamente 50% dos carcinomas de cólon não apresentam uma mutação identificável na família dos oncogenes *ras* (Volgstein *et al.*, 1988). Quando ocorrem, 80% destas mutações são no gene *K-ras*, que codificam a oncoproteína $p21^{ras}$. Esta proteína é uma GTPase associada à membrana plasmática, que atua na cascata de transdução de sinais mitogênicos. Quando mutada, ela permanece em seu estado ativo, isto é, ligada ao GTP, estimulando o crescimento celular (Lemoine, 1990). As mutações no oncogene *K-ras* estão relacionadas com o crescimento do tumor e o surgimento da displasia (Fearon, 1995).

Os passos seguintes envolvem a deleção no braço longo do cromossomo 18 (18q21) (Fearon *et al.*, 1990), sendo muito freqüente nos carcinomas (70%) e rara em adenomas iniciais (6%). Tal alteração leva à inativação de um gene supressor

Tabela 1: Mutações freqüentemente observadas em oncogenes e genes supressores de tumores no câncer de cólon.

GENE	FUNÇÃO	% DE CÂNCER COM ALTERAÇÃO
Oncogene		
<i>K-ras</i>	Transdução de sinais mitogênicos	48
<i>N-ras</i>	Transdução de sinais mitogênicos	< 2
<i>HER-2/erb-B2</i>	Receptor de fator de crescimento epidérmico	< 5
<i>c-myc</i>	Fator de transcrição	< 5
<i>c-myb</i>	Fator de transcrição	< 5
Gene Supressor de Tumor		
<i>p53</i>	Controle de <i>checkpoints</i>	75-85
APC	Adesão celular	> 65
DCC	Adesão celular	70-75
MCC	Adesão celular	10-15

Adaptado de Fearon, *et al.* (1995).

de tumor (Tabela 1, Fig. 1) denominado DCC (*deleted in colon cancer*). Este gene tem papel importante no potencial metastático das neoplasias, por estar relacionado aos processos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Fearon, 1995; Volgestein *et al.*, 1988).

A mutação mais tardia é uma deleção no braço curto do cromossomo 17 (17p13). Ela ocorre em aproximadamente 70% dos tumores colorretais e se relaciona com a transição de adenomas para carcinomas (Volgestein *et al.*, 1988). A região mutada do cromossomo 17p inclui o gene supressor de tumor *p53* (Tabela 1, Fig. 1), uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para tumorigênese e agressividade do tumor (Fearon, 1995). A proteína *p53* participa da modulação da atividade dos genes relacionados à parada do ciclo celular nas fases G1 e G2, em resposta aos danos no DNA. Os mecanismos de *checkpoints* são de fundamental importância para a manutenção da integridade do genoma, pois permitem a ação dos mecanismos de reparo do DNA antes da replicação ou a remoção de células danificadas através da indução da apoptose. A *p53* modula também, a atividade de genes envolvidos com o controle da proliferação celular (Levine, 1995).

Embora a maioria dos tumores colorretais apresentem as alterações descritas na Fig. 1, esta seqüência não é necessariamente rígida. Muitos casos não apresentam tais mutações e alguns demonstram alterações em outros genes (Tabela 1). O fato mais importante é a acumulação destes diversos defeitos. Parece que a interação destas mutações determina o fenótipo das células tumorais, sendo responsável pela heterogeneidade observada no câncer de cólon (Fearon, 1995).

1.3 Características Clínicas

Do ponto de vista etiológico, podemos identificar três sub-tipos de tumores colorretais: o associado a FAP; o HNPCC; e o câncer colorretal esporádico (Bevilacqua *et al.*, 1997). Aproximadamente 1% dos casos de câncer de cólon provém da polipose familiar, que tem sua origem associada a mutações no gene APC (Bevilacqua *et al.*, 1997). O HNPCC está relacionado com a síndrome de Lynch e é provocado por mutações em genes ligados ao reparo recombinacional do DNA. Em 90% das famílias ocorre mutação no gene hMLH1 (cromossomo 3p) e nas outras famílias, no gene hMSH2 (cromossomo 2p) (Volgstein *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1995). Aproximadamente 70% dos casos de carcinomas colorretais são classificados como esporádicos, e se caracterizam por não apresentarem alteração genética inicial herdada. Em aproximadamente 60% dos casos de câncer colorretal esporádicos foi identificada mutação no *locus* do gene APC (Bevilacqua *et al.*, 1997).

O câncer colorretal pode, também, ser classificado quanto a sua histologia em: carcinoma, adenocarcinoma e sarcoma. O adenocarcinoma é o tipo histológico mais freqüente, sendo responsável por 90% a 95% dos casos (Cohen *et al.*, 1997). Os tumores malignos do intestino grosso apresentam-se com padrões proliferativo e infiltrativo. O padrão proliferativo cresce para a luz do intestino e, quando necrosado, exhibe úlceras de bordas salientes e irregulares. Os tumores infiltrativos invadem a parede no sentido circular ou anular (Ramos, 1984).

Tabela 2: Classificação de Dukes modificada para estadiamento do câncer de cólon.

ESTÁDIO	CARACTERÍSTICAS
A	Tumor limitado à mucosa.
B1	Tumor invade a muscular própria, mas não a ultrapassa. Sem envolvimento de linfonodos.
B2	Tumor através de toda a parede. Sem envolvimento de linfonodos.
C1	Tumor limitado à parede. Com envolvimento de linfonodos regionais.
C2	Tumor ultrapassa a parede. Com envolvimento de linfonodos regionais.
D	Metástases à distância.

Adaptado de *Gastrointestinal Tumor Study Group (1975)*.

A evolução e prognóstico do câncer de cólon dependem principalmente do estágio clínico do tumor, que se baseia no grau de penetração das células neoplásicas na parede intestinal e no número de linfonodos envolvidos (Cohen *et al.*, 1997). O adenocarcinoma de cólon foi estadiado pelo sistema de Dukes (Dukes *et al.*, 1954), recebendo posteriormente diversas modificações. A mais importante foi proposta por Astler & Coller (1958) sendo incorporada ao sistema, ficando conhecido como sistema de Dukes modificado (Tabela 2).

Pela classificação de Dukes (Tabela 2, Fig. 2), o arranjo das células é mais importante que o percentual de células diferenciadas (Sistema de Broders). Este sistema também divide os adenocarcinomas em 3 graus: Grau 1 = células mais

diferenciadas, com túbulos bem formados, baixo polimorfismo nuclear e baixa taxa de mitoses; Grau 2 = intermediário entre 1 e 3; Grau 3 = apresenta células menos diferenciadas, células pleomórficas e alta taxa de mitoses (Cohen *et al.*, 1997).

Outro sistema utilizado é a classificação TNM (Tabela 3, Fig. 2), proposta pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela *Union Internationale Contra le Cancer* (UICC). O sistema TNM se baseia na combinação de três características: T - tamanho do tumor primário e/ou grau de extensão local; N - presença ou não de metástases nos linfonodos regionais; M - presença ou não de metástases a distância. Além das letras acrescenta-se números indicando a progressão da doença. TX - tumor primário não pode ser determinado; T0 - sem evidência de tumor primário; Tis - carcinoma *in situ*; T1 - tumor invade submucosa; T2 - tumor invade muscular própria; T3 - tumor invade até a subserosa; T4 - tumor invade outros órgãos ou estruturas. NX - linfonodos regionais não podem ser determinados; N0 - sem metástases em linfonodo regional; N1 - metástases em 1-3 linfonodos pericólicos ou perirretais; N2 - metástases em 4 ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais; N3 - metástases em qualquer linfonodo. MX - metástases a distância não pode ser determinada; M0 - sem metástases a distância; M1 - metástases a distância (*American Joint Committee of Colon and Rectum Cancer*, 1988).

Tabela 3: Sistema TNM para estadiamento do câncer de cólon.

ESTÁDIO	CARACTERÍSTICAS		
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
III	Qualquer T	N1	M0
	Qualquer T	N2, N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Adaptado do *American Joint Committee of Colon and Rectum Cancer* (1988)

Os tumores classificados como T1 e T2 (Dukes A e B), N0 e M0 apresentam sobrevida pós-operatória por mais de 5 anos em 75% dos casos. Os classificados como T3, N1, N2, N3 a sobrevida cai para 20 a 35% dos casos e os M1 somente 5 a 10% dos casos apresentam sobrevida de 5 anos (Ramos, 1984).

A disseminação do tumor de cólon pode ocorrer por invasão direta para os órgãos vizinhos ou através de metástases venosa e linfática. As metástases são mais frequentes nos nódulos linfáticos regionais, seguidos do fígado, pulmão, ossos, peritônio, bexiga e cérebro. Os riscos de metástases nos nódulos linfáticos, bem como o número de linfonodos aumenta proporcionalmente com o aumento do grau

do tumor (Ramos, 1984). De fato, linfonodos positivos estão associados a 30% dos tumores de baixo grau e com 81% dos tumores de alto grau (Dukes *et al.*, 1954).

O câncer de cólon, na sua fase inicial, não apresenta sintomas específicos, sendo necessários esforços para identificar esta doença através de *screening* nas populações de risco (Cohen *et al.*, 1997). Considera-se sinais de alerta o sangue nas fezes, alterações nos hábitos intestinais, desconforto estomacal, perda de peso inexplicável e histórico familiar ou pessoal de câncer e/ou doenças intestinais. Após

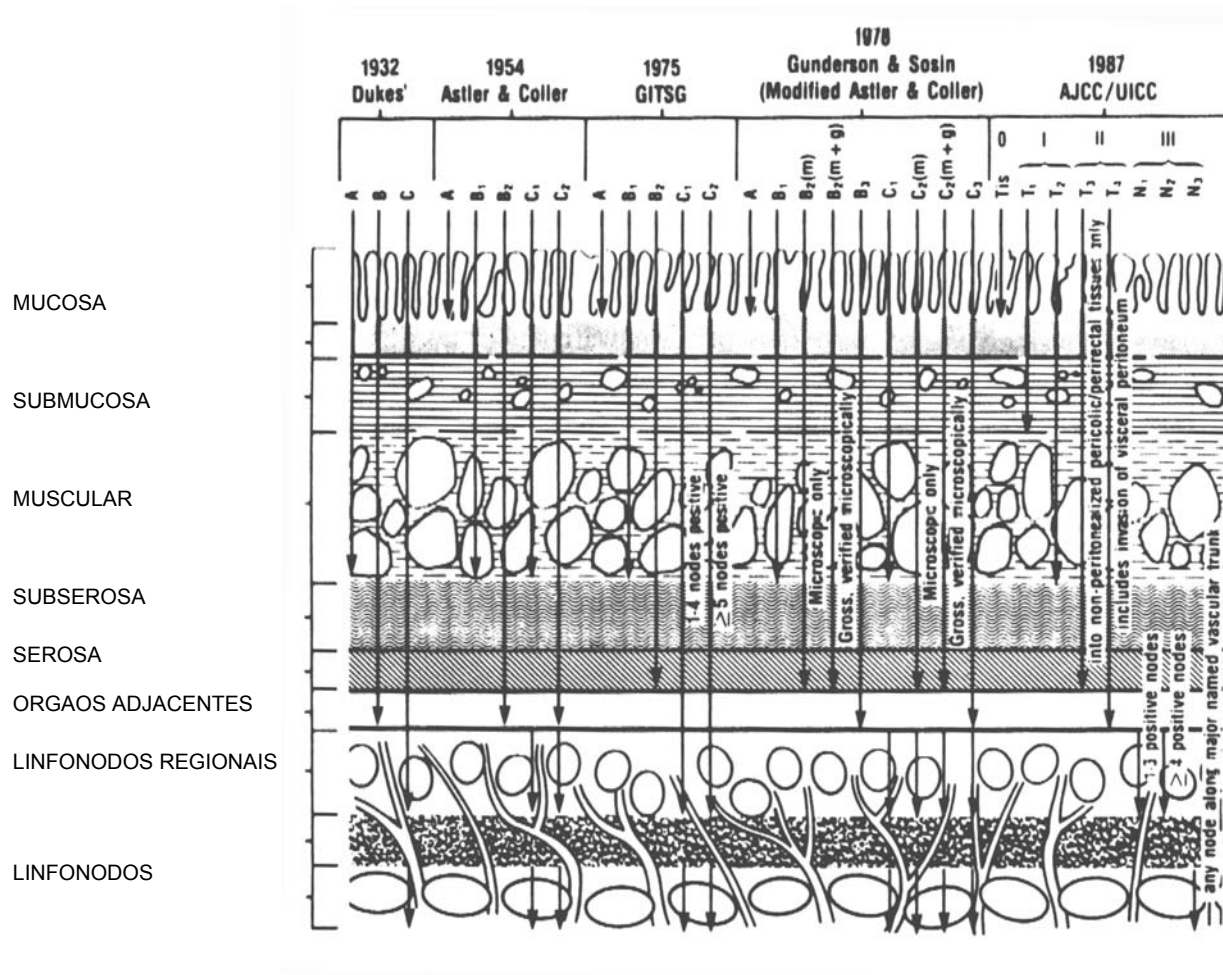


Fig. 2: Comparação de diversos sistemas de estadiamento patológico do câncer de cólon. Reproduzido de Cohen *et al.* (1997).

os 40 anos é recomendado a realização de sigmoidoscopia anual e identificação de sangue nas fezes. (Murphy *et al.*, 1995). A diminuição nas taxas de mortalidade relacionada a esta neoplasia observada na última década, possivelmente foram resultantes da detecção precoce do câncer colorretal (Venook *et al.*, 1996).

1.4 Tratamento

O câncer de cólon, quando diagnosticado precocemente, apresenta taxas de cura relativamente altas (aproximadamente 50% dos pacientes) (Cohen *et al.*, 1997; Carter, 1976; Haller, 1988). A cirurgia é a única modalidade de terapia com fins curativos neste tipo de câncer, sendo o tratamento de primeira linha na doença localizada. O prognóstico para pacientes após a cirurgia depende do grau do tumor (Cohen *et al.*, 1997). Sendo uma neoplasia de difícil diagnóstico inicial, a maioria dos pacientes se apresenta com a doença em fase muito avançada, já com metástases nos linfonodos ou em outros órgãos. Nestes casos, a cirurgia curativa não é possível e a quimioterapia apresenta respostas muito modestas com baixas taxas de sobrevida. Portanto, o tratamento quimioterápico em pacientes com carcinoma colorretal avançado, é apenas paliativo. Além disso o risco de recaída de pacientes com a doença avançada é muito alto (Carter, 1976; Haller, 1988).

Desde 1957, quando foi desenvolvido, o 5-fluorouracil (5-FU) (Heidelberg *et al.*, 1957) é o único quimioterápico que apresenta significativa atividade contra o câncer de cólon avançado (Benson III, 1998). Durante os anos 70 e 80 pesquisas se

concentraram em melhorar as respostas com o 5-FU através de mudanças no esquema de administração, por exemplo, infusão contínua *versus* administração em bolo objetivando o aumento de intensidade da dose (Pinedo & Peters, 1988). Além disto, vários estudos tem sido desenvolvidos no sentido de modular bioquimicamente a atividade do 5-FU, para melhorar os índices terapêuticos. Tais estudos envolvem manipulação de rotas metabólicas da droga (Peters & Van Groeningen, 1991) pela combinação deste agente com diversos moduladores, tais como leucovorin (ácido folínico), interferon- α , N-fosfo-acetil-L-aspartato (PALA), ou levamisole (Benson III, 1998; Peters & Van Groeningen, 1991).

Meta-análise destes estudos, revelou que a combinação do 5-FU com leucovorin, aumenta as respostas em aproximadamente 2 vezes com uma toxicidade aceitável, quando comparada com outras estratégias (Peters & Van Groeningen, 1991; Advanced Colorectal Cancer Meta-analysis Project, 1992). O ácido folínico tem a capacidade de aumentar a ligação do 5-FU com a enzima Timidilato Sintase (TS), levando a uma maior inibição da síntese do DNA (Pinedo & Peters, 1988; Peters & Van Groeningen, 1991). Estes achados justificam a utilização do 5-FU junto com leucovorin no tratamento de primeira linha no carcinoma de cólon avançado (Cohen *et al.*, 1997; Peters & Kohne, 1997). A utilização do anti-helmíntico levamisole junto com o 5-FU, como terapia adjuvante, tende a diminuir em 41% a chance de recorrência do câncer de cólon em pacientes com estágio C da doença de Duke. Apesar de agir como um imunomodulador, o mecanismo de ação do levamisole permanece ainda desconhecido (Peters & Kohne, 1997).

Nos anos 80 outros agentes antineoplásicos que se tornaram disponíveis, demonstraram respostas promissoras tanto em pacientes não tratados, como

naqueles que tiveram recaída após terapia com 5-FU. Entre eles, um análogo da camptotecina, o irinotecan (CPT-11), que demonstrou taxas de respostas semelhantes as obtidas com o 5-FU (Shimada *et al.*, 1993); o Tomudex (Jackman *et al.*, 1995), um novo inibidor da TS; e a Oxaliplatina (Machover *et al.*, 1996), um análogo dos compostos platinos. Estudos clínicos combinando 5-FU ou 5-FU/leucovorin com Oxaliplatina ou CPT-11 estão em andamento (Benson III, 1998).

1.5 5-Fluorouracil

O 5-FU, um agente antimetabólito de peso molecular 130.1 D, se caracteriza por apresentar semelhanças estruturais com intermediários da síntese dos ácidos nucléicos, podendo substituí-los e causar alterações na duplicação celular (Grem, 1996). Os agentes antimetabólitos são particularmente ativos em células que se encontram na fase de síntese (fase S) do ciclo celular (Peters, 1995). O 5-FU é um análogo estrutural do Uracil que apresenta um flúor substituindo o hidrogênio no carbono 6. Devido a esta semelhança na estrutura o 5-FU utiliza as mesmas rotas metabólicas que o Uracil e a Timina (Fig. 3).

O 5-FU é uma pró-droga que para se tornar ativa necessita ser convertido ao nucleotídeo fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) pela ação da enzima Timidina Quinase. A utilização clínica do 5-FU ocorre no lugar do FdUMP, porque o 5-FU é solúvel em água enquanto que o FdUMP não apresenta esta propriedade. O FdUMP, um nucleotídeo de peso molecular 326.2 D, interfere com a síntese do DNA

através da inibição da TS (Grem, 1996). A TS transfere o grupo metil do N^5, N^{10} -metileno tetraidrofolato (CH₂-THF) para a deoxiuridina monofosfato (dUMP) formando a deoxitimidina monofosfato (dTMP), que será convertida em deoxitimidina trifosfato (dTTP) um dos quatro deoxirribonucleotídeos essenciais para a síntese do DNA. O FdUMP compete com o dUMP ao ligar-se a TS e ao folato, formando um complexo ternário estável e de lenta dissociação, impedindo a formação do dTTP (Fig. 4) (Grem, 1996).

O 5-FU também age (Fig. 5) através da incorporação do falso nucleotídeo fluorouridina trifosfato (FUTP) ao RNA, interferindo com o processamento das várias

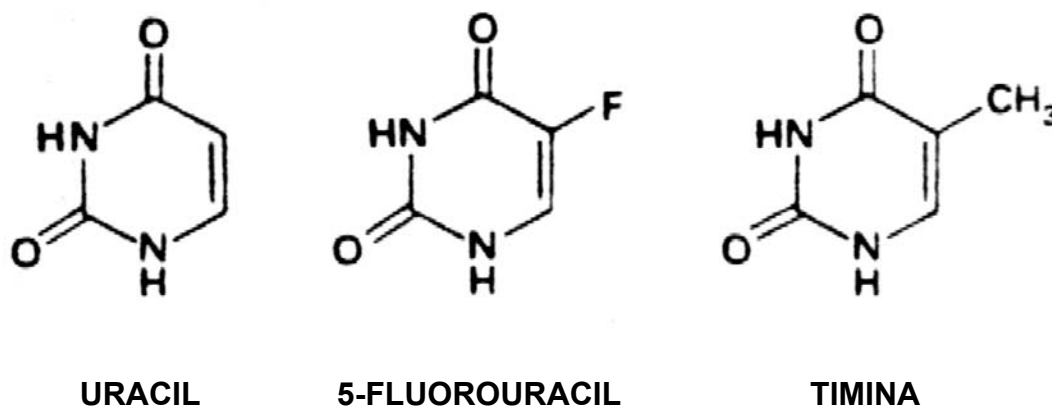


Fig. 3: Fórmula estrutural do 5-FU e seus análogos normais Timina e Uracil. Reproduzido de Peters (1995).

espécies do RNA (Mandel, 1981; Peters & Jansen, 1996). Ou, ainda pela incorporação da fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) ao DNA, impedindo a replicação celular (Grem, 1996). Shuetz & Diasio (1985) demonstraram que a formação de quebras nas cadeias de DNA, ocorre através da incorporação do

FdUTP ao ácido nucléico, ou devido a ineficiência do reparo causada por defeitos nos resíduos das bases nitrogenadas.

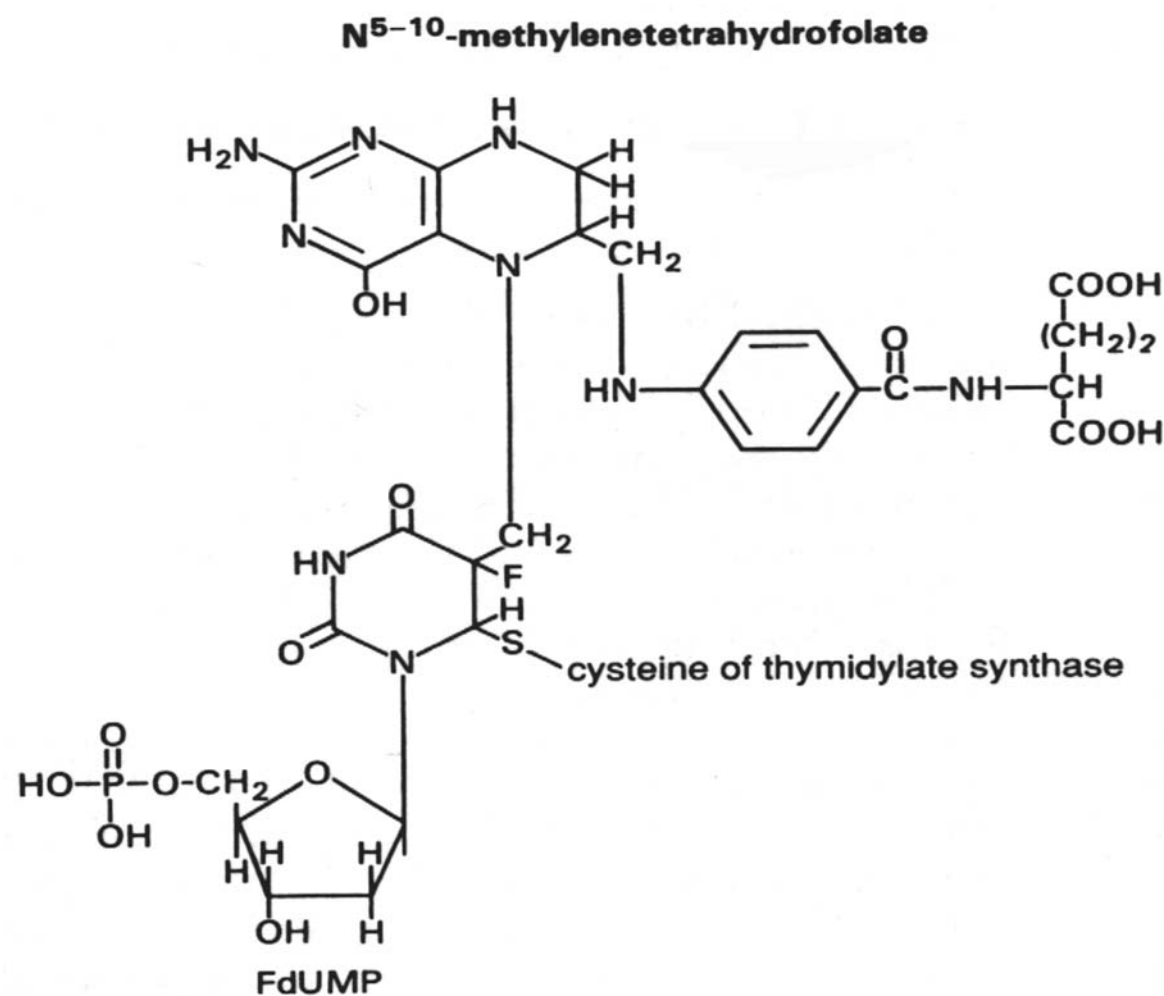


Fig. 4: Formação do complexo ternário entre N⁵, N¹⁰ - metileno tetraidrofolato, FdUMP e TS .Reproduzido de Grem (1996).

O 5-FU é clinicamente utilizado no tratamento de adenocarcinomas de diversas etiologias como cólon, reto, estômago, pâncreas, mama, e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Entretanto, não demonstra atividade em tumores sensíveis a quimioterapia, como leucemias (Grem, 1996). Nos carcinomas

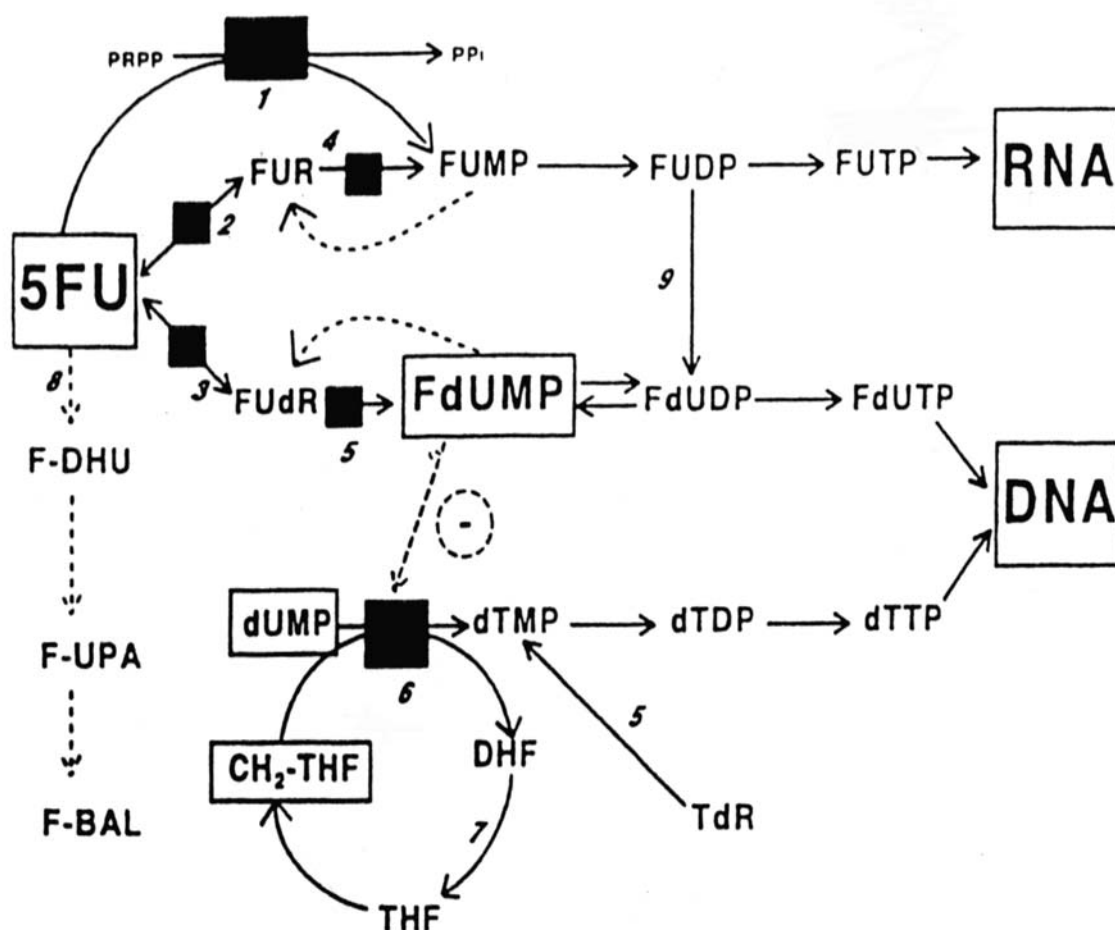


Fig. 5: Metabolismo do 5-FU demonstrando possíveis sítios de resistência. As enzimas envolvidas neste processo são: 1 - orotato fosforibosil transferase; 2 - uridina fosforilase; 3 - timidina fosforilase; 4 - uridina quinase; 5 - timidina quinase; 6 - timidilato sintase; 7 - diidrofolato redutase; 8 - diidropirimidina deidrogenase; 9 - ribonucleotideo redutase. Reproduzido de Peters & Jansen (1996).

de cólon este antimetabólito, quando utilizado sozinho apresenta taxas de respostas entre 10%-15%, quando administrado junto com leucovorin estas respostas podem chegar a 25%, sem significativa melhora na sobrevida (Benson III, 1998). A

toxicidade dose limitante do 5-FU depende do esquema de administração. A administração em bolo produz maior toxicidade hematológica (graus 3 e 4), enquanto que a infusão contínua se caracteriza por mucosite gastrointestinal. Em ambos esquemas observa-se anorexia, náuseas e vômitos (Haller, 1988; Benson III, 1998).

1.6 Irinotecan

O CPT-11 (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin) é um análogo semi-sintético da camptotecina, um alcalóide isolado da casca da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (Fig. 6). O CPT-11 tem peso molecular de 677 D e apresenta melhor solubilidade em soluções aquosas e toxicidade mais baixa quando comparado com a camptotecina (Kaneda *et al.*, 1990; Takimoto & Ar buck, 1996, Burris III & Fields, 1994).

Por ser uma pró-droga, o CPT-11 deve ser convertido em SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) um metabólito de peso molecular de 410 D, que demonstrou ser 100-1000 vezes mais potente que o CPT-11 *in vitro* (Champoux, 1976; Kawato *et al.*, 1991). Esta conversão ocorre por um processo de deesterificação (Fig. 7) na presença da enzima carboxil esterase, presente em todos os tecidos, inclusive os tumorais (Takimoto & Ar buck, 1996; Jansen *et al.*, 1997). Carboxil esterases são hidrolases que apresentam maior atividade na fração microssomal de diversas células, entre estas: hepáticas, adiposas e renais (Mukherjee *et al.*, 1993). O seu

papel fisiológico permanece desconhecido, embora a maioria delas seja capaz de clivar monoglicérides de ácidos graxos de cadeias longas, podendo ser classificadas como lipases (Heymann & Mentlein, 1981). Duas isoformas desta enzima estão provavelmente envolvidas na conversão do CPT-11 em SN-38 (Slatter *et al.*, 1997).

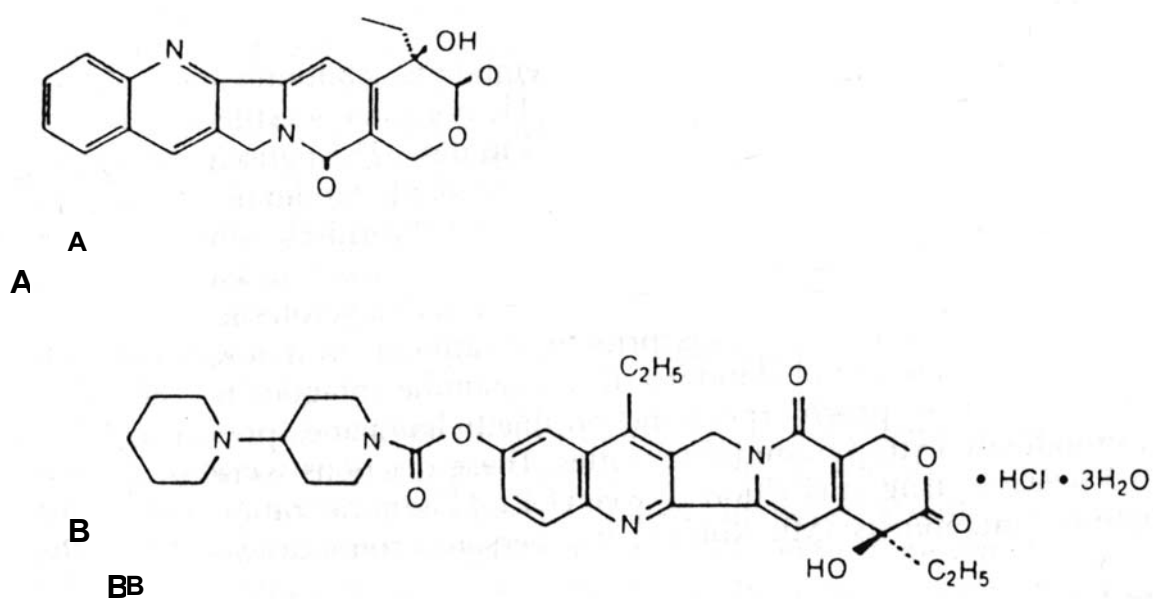
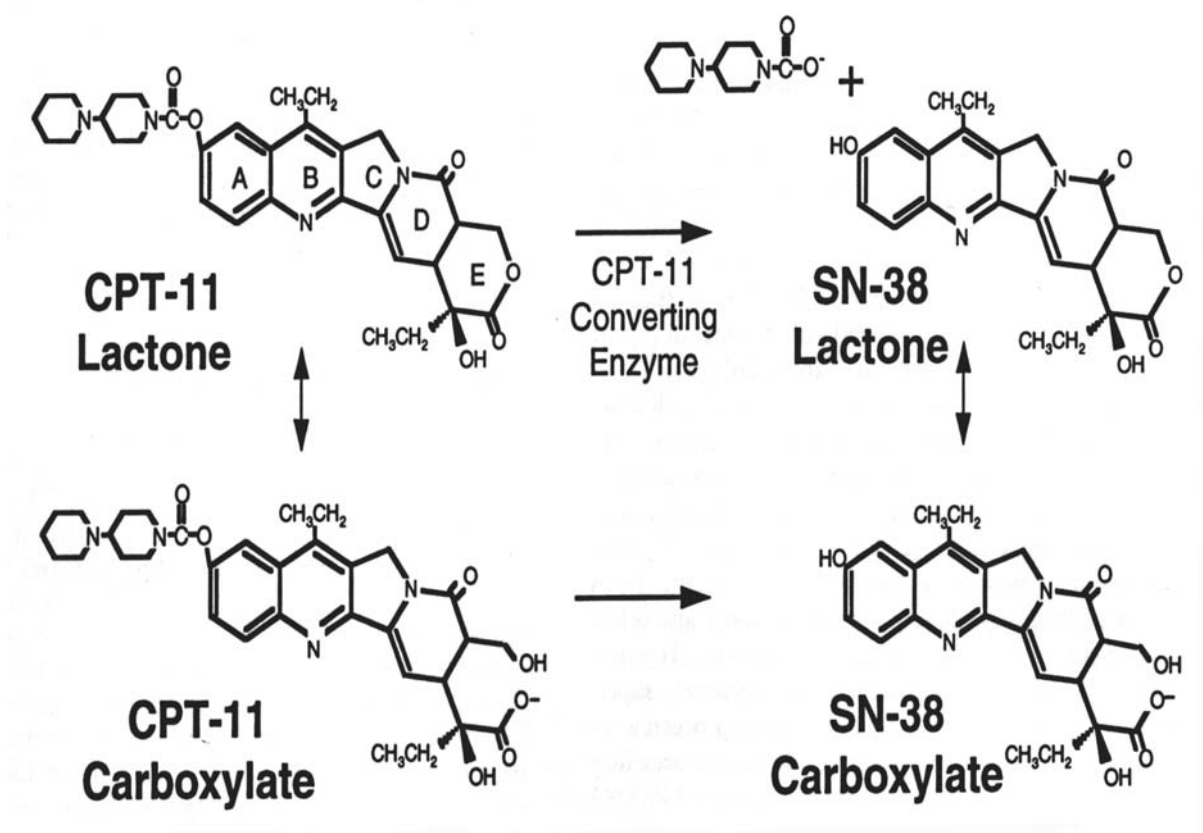


Fig. 6: Fórmula estrutural do CPT-11 (B) e seu composto líder camptotecina (A). Reproduzido de Burris III & Fields (1994).

Além do SN-38 o metabolismo do CPT-11 forma o APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido amino pentanóico)-1-piperidino] carboniloxicamptotecina) (Rivory *et al.*, 1996) e o NPC (7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina) (Haaz *et al.*, 1998). O APC é um produto da oxidação do CPT-11 mediada pela CYP3A4, e demonstra pouco efeito na inibição da topoisomerase I e da proliferação celular (100 x menos potente que o SN-38) (Rivory *et al.*, 1996). O APC pode ser convertido em SN-38, porém esta conversão não parece estar relacionada com nenhuma enzima humana conhecida (Guichard *et al.*, 1998a). O NPC é formado pela ação do citocromo P450. Não ocorre formação do NPC a partir do APC (Haaz *et al.*, 1998).

Fig. 7: Metabolismo do CPT-11 em sua forma ativa SN-38. Reproduzido de



Takimoto & Arbusk (1996).

Sendo um análogo da camptotecina, o CPT-11 tem como alvo a topoisomerase I, uma enzima nuclear de 100 kDa essencial para a replicação do DNA (Takimoto *et al.*, 1997; Kunimoto *et al.*, 1987). Esta enzima está diretamente envolvida com a manutenção da estrutura topográfica do DNA durante os processos de tradução, transcrição e divisão celular (Stewart & Schutz, 1987; Vosberg, 1985), promovendo a conversão do DNA superenrolado em DNA relaxado (Takimoto *et al.*, 1997; Stewart & Schutz, 1987). Para isto a topoisomerase I introduz no sítio de replicação de uma das cadeias do DNA uma quebra reversível, formando um complexo covalente entre a enzima e o DNA, chamado de complexo clivável (Kawato *et al.*, 1991; Takimoto *et al.*, 1997). Depois ocorre a religação da fita e dissociação da enzima, regenerando a dupla fita de DNA intacta (Fig. 8) (Takimoto *et al.*, 1997; Avgeropoulos & Batchelor, 1999).

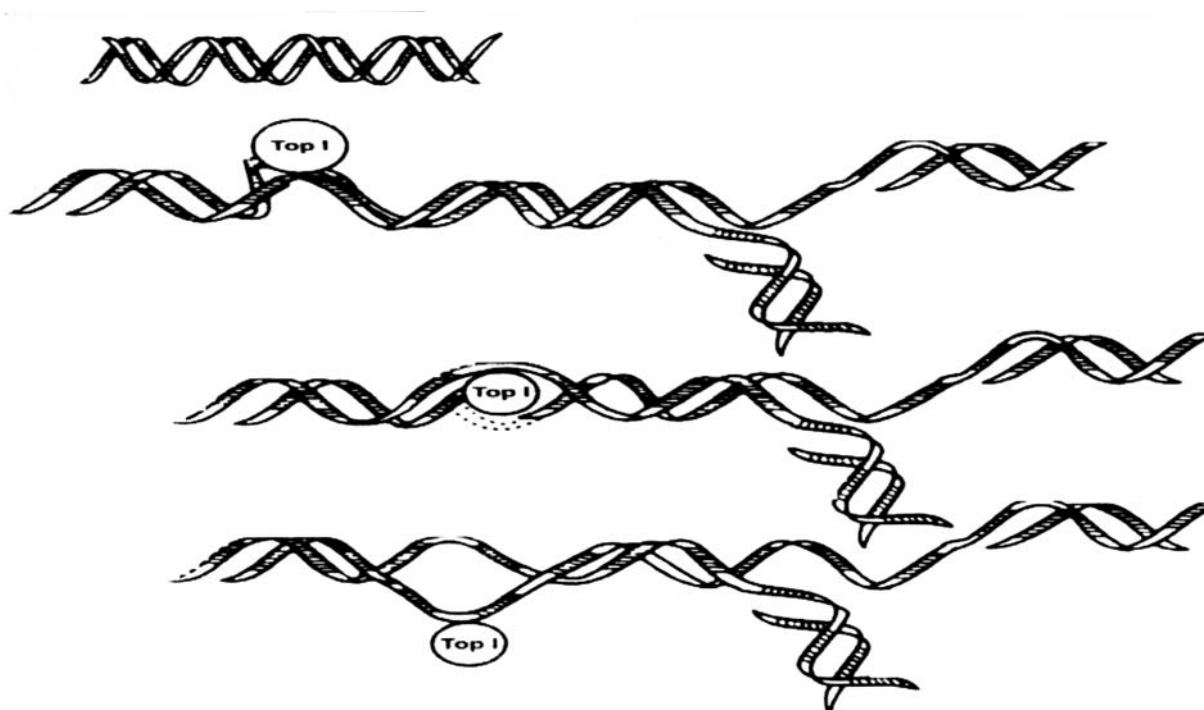


Fig. 8: Mecanismo de ação da topoisomerase I (Top I). Reproduzido de Avgeropoulos & Batchelor (1999).

A citotoxicidade do CPT-11 se baseia em manter estável este complexo, formando um complexo ternário (droga + enzima + DNA). Este complexo impede a religação da fita de DNA feita pela topoisomerase I (Fig. 9), resultando na formação de quebras no DNA (Takimoto *et al.*, 1997; Kunimoto *et al.*, 1987; Stewart & Schutz, 1987; Avgeropoulos & Batchelor, 1999). Este processo induz a parada do ciclo celular em S/G2, causando a morte das células. Para que o CPT-11 exerça sua toxicidade é necessário que a síntese do DNA esteja em andamento, indicando que a citotoxicidade do CPT-11 é dependente da fase S do ciclo celular (Takimoto *et al.*, 1997).

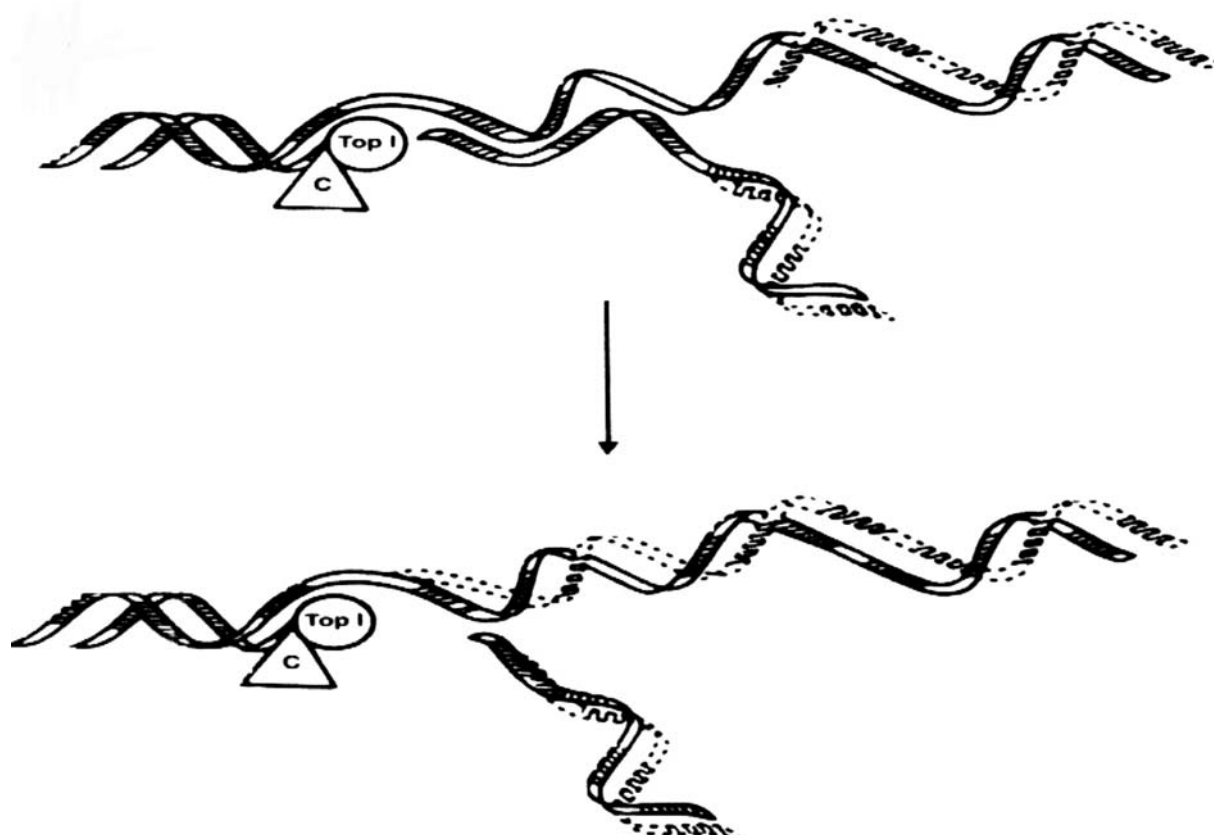


Fig. 9: Estabilização do complexo clivável DNA-Topoisomerase I (Top I) pela ação da camptotecina (C). Reproduzido de Avgeropoulos & Batchelor (1999).

Em estudos pré-clínicos, o CPT-11 demonstrou atividade em vários tipos de tumores, incluindo os do trato gastrointestinal (Bissery *et al.*, 1991). Em subsequentes estudos de fase I e fase II observou-se ampla ação antitumoral em vários tumores sólidos, incluindo os do trato gastrointestinal, além de leucemias e linfomas (Tanizawa *et al.*, 1994). Em carcinomas de cólon este agente apresentou taxas de respostas entre 15%-32% e 17-25% em pacientes não tratados e pacientes pré-tratados, respectivamente (Jackman *et al.*, 1995; Pito *et al.*, 1997; Rougier *et al.*, 1997; Rothenberg *et al.*, 1996; Arbuck & Takimoto, 1998) e toxicidade que engloba leucopenia, diarreia e náusea e vômito (Takimoto *et al.*, 1997; Tanizawa *et al.*, 1994). A principal toxicidade limitante relacionada a terapia com CPT-11 é diarreia em graus 3 ou 4; a qual pode ser controlada com a administração de Loperamide, reduzindo em aproximadamente 50% estes efeitos (Arbuck & Takimoto, 1998). Devido a sua eficácia no câncer colorretal o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização do CPT-11 como tratamento de segunda linha nesta doença (Sasaki *et al.*, 1994).

1.7 Combinação CPT-11/5-FU

As limitadas respostas dos tumores avançados do cólon à quimioterapia com 5-FU, bem como o sucesso limitado da cirurgia indicam claramente a necessidade de novas drogas e/ou modalidades terapêuticas.

Como já foi mencionado, o CPT-11 tem demonstrado respostas comparáveis as obtidas com o 5-FU neste tipo de câncer, incluindo os resistentes a terapias anteriores, o que sugere a ausência de resistência cruzada entre estes agentes (Rothenberg *et al.*, 1996). Considerando que o 5-FU, é a droga mais ativa no carcinoma colorretal, a sua utilização junto com o CPT-11 parece ser uma estratégia promissora. De fato, a utilização dos agentes combinados (Sasaki *et al.*, 1994; Saltz *et al.*, 1996; Ducreux *et al.*, 1997) ou em determinadas seqüências (Rothenberg *et al.*, 1997; Van Cutsem *et al.*, 1997; Barone *et al.*, 1997) demonstraram melhores resultados quando comparado com outras estratégias (Peters & Van Groeningen, 1991; Advanced Colorectal Cancer Meta-analysis Project, 1992).

Em estudos pré-clínicos (Tabela 4) a utilização do 5-FU junto com o CPT-11 ou o SN-38 demonstrou adição na citotoxicidade do primeiro em linhagens celulares de cólon (Guichard *et al.*, 1998b), leucemia (Kano *et al.*, 1992) e pâncreas (Matsuoka *et al.*, 1995). Outro estudo demonstrou sinergismo em seis linhagens celulares de cólon quando o SN-38 foi administrado antes do 5-FU (Pavillard *et al.*, 1998). Também foi observado um sinergismo quando 5-FU foi utilizado antes do CPT-11 ou do SN-38 em linhagem de cólon (Guichard *et al.*, 1998b), enquanto que em outros estudos a mesma seqüência demonstrou ser antagônica (Schleucher *et al.*, 1996; Mans *et al.*, 1996a; Grivicich *et al.*, 1997; Mans *et al.*, 1999).

A partir do observado em estudos pré-clínicos, foram iniciados estudos clínicos (Tabela 5) que demonstraram resultados encorajadores. Em um estudo de fase II, pacientes tratados inicialmente com 5-FU e a seguir com CPT-11 não apresentaram resistência cruzada entre estas drogas. Além disso, a toxicidade

observada foi possível de ser controlada (Shimada *et al.*, 1993). Já em um estudo de fase I com o CPT-11 precedendo o 5-FU, foi demonstrado um aumento na acumulação intracelular de CPT-11 mas um decréscimo de SN-38, sem toxicidade severa (Sasaki *et al.*, 1994).

Com base nos promissores resultados pré-clínicos e clínicos combinando 5-FU/CPT-11, e a divergência existente entre qual a melhor seqüência de administração, este estudo se propôs a investigar a influência das diferentes seqüências e combinações na citotoxicidade destes agentes.

Tabela 4: Estudos pré-clínicos com a combinação 5-FU/CPT-11 (SN-38) *versus* CPT-11 ou 5-FU como agentes únicos.

MODELO	ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO	RESULTADOS	REF.
Linhagem celular de linfoma de Burkitt	<ul style="list-style-type: none"> • SN-38 + 5-FU 72 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Adição 	Akutsu <i>et al.</i> , 1994
Linhagem celular de pâncreas Suit-2	<ul style="list-style-type: none"> • SN-38 + 5-FU 	<ul style="list-style-type: none"> • Adição 	Matsuoka <i>et al.</i> , 1995
Linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, WiDr, LoVo, HT-29	<ul style="list-style-type: none"> • 10 μM 5-FU/CPT-11 12 h, 24 h \rightarrow diluições seriadas CPT-11/5-FU • 10 μM 5-FU \rightarrow diluições seriadas CPT-11 • 10 μM CPT-11 \rightarrow diluições seriadas 5-FU 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem efeito • Sem efeito • Sinergismo 	Mans <i>et al.</i> , 1996b
Linhagem celular de carcinoma de cólon humano HCT-8	<ul style="list-style-type: none"> • SN-38 24 h \rightarrow 5-FU+2 μM LV 24 h • 5-FU+2 μM LV 24 h \rightarrow SN-38 24 h • SN-38 + 5-FU+2 μM LV 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Sinergismo • Antagonismo • Antagonismo 	Erlichman <i>et al.</i> , 1996
Linhagens celulares de carcinoma de cólon humano HT-29 e HCT-8	<ul style="list-style-type: none"> • 1h 5-FU \rightarrow SN-38 	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo 	Schleucher <i>et al.</i> , 1996
Linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29, WiDr	<ul style="list-style-type: none"> • 5-FU \rightarrow CPT-11 • CPT-11 \rightarrow 5-FU 	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo • Sinergismo 	Mans <i>et al.</i> , 1996a

Tumor xenográfico de adenocarcinoma de cólon humano	<ul style="list-style-type: none"> • CPT-11 dias 1-5 e 8-12; 5-FU dias 1,7,14 com ou sem LV 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem efeito 	Houghton <i>et al.</i> , 1996
Linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29 e HCT-8	<ul style="list-style-type: none"> • 5-FU + SN-38 24h • 5-FU 1 h → SN-38 24 h • SN-38 1 h → 5-FU 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo • Antagonismo • Adição 	Zeghari-Squalli <i>et al.</i> , 1997
Linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29	<ul style="list-style-type: none"> • CPT-11 + 5-FU 96 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonismo 	Harstrick <i>et al.</i> , 1997
Linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29, SNU-C4	<ul style="list-style-type: none"> • CPT-11 + 5-FU 24h • 5-FU 2h → CPT-11 • CPT-11 → 5-FU 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem efeito • Sem efeito • Mais tóxico 	Mans <i>et al.</i> , 1999
Linhagem celular e tumor xenográfico de carcinoma de cólon humano HT-29	<ul style="list-style-type: none"> • CPT-11 + 5-FU 24 h • CPT-11 → 5-FU 24 h • 5-FU → CPT-11 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Adição • Sinergismo • Sinergismo 	Guichard <i>et al.</i> , 1997
Linhagem celular de carcinoma de cólon humano HT-29	<ul style="list-style-type: none"> • CPT-11 + 5-FU 24 h • CPT-11 → 5-FU 24 h • 5-FU → CPT-11 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> • Adição • Sinergismo • Sinergismo 	Guichard <i>et al.</i> , 1998b
Linhagens celulares de carcinoma de cólon humano	<ul style="list-style-type: none"> • SN38 + 5-FU + LV 72 h • SN38 → 5-FU + LV 72 h • 5-FU + LV 72 h → SN38 	<ul style="list-style-type: none"> • Sinergismo • Adição • Adição 	Pavillard <i>et al.</i> , 1998

Linhagem celular de adenocarcinoma de
cólón humano HCT-8

- 5-FU + LV 24 h → SN38
- SN38 → 5-FU + LV 24 h
- 5-FU + LV 24 h + SN38

- Sem efeito
- Adição
- Adição

Mullany *et al.*,
1998

Linhagens xenográfica resistente ao 5-FU
HT29R1

- CPT-11 → 5-FU 24 h
- 5-FU → CPT-11 24 h

- Adição
- Sem efeito

Vanhoefer *et al.*,
1999a

LV = leucovorin
→ = sequencial
+ = concomitante

Tabela 5: Estudos clínicos com a combinação 5-FU/CPT-11 (SN-38) *versus* CPT-11 ou 5-FU como agentes únicos.

ESTUDO CLÍNICO	ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO	RESULTADOS	REF.
Fase I	CPT-11 90 min i.v. dia 1 e 15 (100, 125, 150, 175 mg/m ²) 5-FU i.v. (600 mg/m ² /dia) dias 3-8.	Não observado interação entre as drogas. Respostas parciais.	Shirao <i>et al.</i> , 1996
Fase I	CPT-11 30 min i.v. (200 mg/m ²) + 5-FU bolo (375 mg/m ²) dias 1-5	Não apresentou diferença.	Grossin <i>et al.</i> , 1996
Fase I	CPT-11 90 min dia 1 i.v. → 5-FU/LV 90 min dias 2-5 i.v.	Escalonamento de dose em investigação. Toxicidade tolerável.	Fonseca <i>et al.</i> , 1997
Fase I	CPT-11 90 min → LV 2 h i.v. → 5-FU 24 h i.v. 4 semanas + 1 semana sem tratamento	Toxicidade tolerável.	Zeghari-Squalli <i>et al.</i> , 1997
Fase I	CPT-11 (diversas doses) 30 min i.v. dia 0 → 5-FU (diversas doses) bolo dias 1-5 ; 2 ciclos	Toxicidade hematológica limitante. Dose recomendada: CPT-11 300 mg/m ² ; 5-FU 375 mg/m ²	Benhammouda <i>et al.</i> , 1997
Fase I em pacientes pré tratados com 5-FU+LV	CPT-11 (75-200 mg/m ²) dia 1 → 5-FU (250-350 mg/m ²) + LV (20 mg/m ²) dias 2-5	Ação antitumoral observada. MTD não atingida.	Fonseca <i>et al.</i> , 1998

Fase I em pacientes pré tratados com 5-FU+LV	CPT-11 (180 mg/m ²) 2 h i.v. → LV (400 mg/m ²) 2 h i.v. → 5-FU (400 mg/m ²) dia 1 bolo → 5-FU (2.4 a 3 g/m ²) 48 h i.v. a cada 2 semanas	Ação antitumoral observada, sem severa toxicidade	André <i>et al.</i> , 1998
Fase I em pacientes não tratados	CPT-11 (200-350 mg/m ²) 90 min i.v. dia 1 → 5-FU (400-650 mg/m ²) 24 h i.v. dia 2 a cada 3 semanas	Dose limitante: CPT-11 350 mg/m ² ; 5-FU 650 mg/m ² . Dose recomendada: CPT-11 350 mg/m ² ; 5-FU 600 mg/m ²	Kakolyris <i>et al.</i> , 1998
Fase I em pacientes não tratados	CPT-11(150 mg/m ² , 200 mg/m ² , 250 mg/m ²) antes ou depois de LV (250 mg/m ²) 2 h infusão → 5-FU (3500 mg/m ²) 48 h infusão contínua a cada 21 dias	Não atingida MTD do CPT-11. 20% dos pacientes com respostas parciais.	Falcone <i>et al.</i> , 1998
Fase I	CPT-11(80 mg/m ²) i.v. dia 1 LV (500 mg/m ²) 2 h i.v. + 5-FU (1.8-2.6 g/m ²) i.v. 24 h	Ativo, bem tolerado	Van Cutsem <i>et al.</i> , 1998
Fase I e II em pacientes resistentes ao tratamento com 5-FU	CPT-11 (diversas doses) 90 min i.v. dia 1 → LV (200 mg/m ²) i.v. → 5-FU (400 mg/m ²) bolo → 5-FU (600 mg/m ²) 22 h i.v. dias 1 e 2; a cada 2 semanas	MTD não atingida. 35% dos paciente com respostas parciais.	Ducreux <i>et al.</i> , 1997
Fase II em pacientes não tratados	CPT-11 (100 mg/m ²) 4 semanas, 2 semanas sem tratamento; 5-FU (425 mg/m ²) + LV (20 mg/m ²) 4 semanas	Toxicidade e taxas de respostas semelhante as obtidas com os agentes sozinhos	Rothenberg <i>et al.</i> , 1997

Fase II em pacientes não tratados	CPT-11 (350 mg/m ²) 90 min i.v. dia 1 → LV (20 mg/m ²) i.v. → 5-FU (425 mg/m ²) 15 min i.v. dias 22-26	Quando comparado com CPT-11 apresentou 50% de respostas objetivas.	Barone <i>et al.</i> , 1997
Fase II	CPT-11(350 mg/m ²) i.v. dia 1 LV (20 mg/m ²) 2 h i.v. + 5-FU (425 mg/m ²) i.v. diariamente dias 22-26	Ativo, bem tolerado promissor	Vanhoefler <i>et al.</i> , 199b

MTD = dose máxima tolerada
i.v. = intra venosa
→ = sequencial
+ = concomitante

1.8 Objetivos

As semelhantes taxas de respostas clínicas apresentadas pelo 5-FU e CPT-11, a ausência de resistência cruzada entre as drogas, as diferenças nos seus alvos celulares; e a toxicidade potencial aceitável, justifica uma avaliação da combinação destes agentes em tumores colorretais. Além disso, a melhor maneira de usar estas drogas juntas (Tabelas 4 e 5) permanece não determinada. Este estudo se propôs a investigar a combinação 5-FU/CPT-11 quanto ao seus efeitos sobre a inibição do crescimento celular. Para isto avaliamos:

A) A dependência de seqüência de administração do 5-FU e CPT-11 e seus efeitos citotóxicos em um painel de linhagens celulares de carcinoma de cólon humano, através dos seguintes experimentos:

- Estudos de quimiossensibilidade para determinar a seqüência de administração da combinação responsável pela maior inibição do crescimento celular.
- Avaliação das atividades das enzimas alvo timidilato sintase, topoisomerase I, e da carboxil esterase com o objetivo de explicar a sensibilidade das linhagens ao 5-FU e CPT-11.
- Estudos de dano ao DNA para verificar se os tratamentos induzem quebras no DNA.

B) Os efeitos modulatórios dos pré-tratamentos nas respostas celulares obtidas, através da:

- Avaliação do reparo de excisão para determinar se os diferentes danos ao DNA envolvem mecanismos de reparo.
- Alteração da distribuição das células nas fases do ciclo celular, interferindo com a citotoxicidade das drogas.
- Verificação da integridade da membrana plasmática das células, medindo os níveis extracelulares de lactato desidrogenase.
- Identificação do aumento no número ou maior tempo de estabilidade do complexo covalente DNA-topoisomerase I.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O 5-FU foi obtido de Hoffmann-La Roche Inc. (Nutley, NJ, EUA). A Pharmacia & Upjohn Ltda. (São Paulo, SP, Brasil) cedeu gentilmente o CPT-11. Todos os demais reagentes utilizados foram do mais alto grau disponível.

Soluções estoque de 1 mM de cada droga foram preparadas em Solução Salina Tamponada de Hank (HBSS; Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e armazenadas a -20 °C, para posterior diluição em meio de cultura.

A lavagem e homogeneização das células foram realizadas com Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS) composta por NaCl 0.9% (p/v), Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM pH 7.4.

O material utilizado nas culturas foi lavado com Extran alcalino (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enxaguado com água da torneira (6 vezes) seguido de água destilada (5 vezes). Posteriormente, foi autoclavado a 120 °C, 1 atm por 40 min (vidraria), 30 min (material plástico), ou 20 min (filtro com membrana de 0.2 µm).

Após serem lavados e esterilizados, o material foi mantido em estufa a 120 °C (vidraria) ou 50 °C (plástico) até o momento de serem utilizados.

Os meios de cultura, salinas e demais soluções foram preparadas com água obtida de sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) imediatamente antes do preparo. As soluções utilizadas nas culturas de células foram esterilizadas através de filtração em membrana de 0.2 µm. A esterilidade destas soluções foi testada, 24 h antes do uso, em caldo triptona de soja (Unipath Ltd., Hampshire, Reino Unido) à 37 °C.

A autoclave foi periodicamente monitorada para identificação de microorganismos com *Kit* para teste de autoclave ATTEST 1262 (3M Healthcare, St. Paul, MN, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Cultura de Células

2.2.1.1 Linhagens Celulares e Manutenção das Culturas

As linhagens celulares de carcinoma de cólon humano HT-29 e SW620 foram adquiridas do American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA) (ATCC Catalogue, 1992). A linhagem celular SNU-C4 foi gentilmente cedida pelo Dr. G.J. Peters (Free University Hospital, Amsterdam, Holanda).

As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² ou 75 cm² com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) contendo L-glutamina 2% (p/v) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino 10% (v/v) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), à 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 sem antibióticos.

2.2.1.2 Determinação do Tempo de Duplicação Celular e Densidade de Inoculação para os Experimentos

As densidades de inoculação necessárias para garantir culturas de células em subconfluência no final dos experimentos, foram derivadas dos tempos de duplicação celular (Griffiths, 1992). Estes foram determinados através da inoculação das células em densidades crescentes e avaliados em vários períodos após inoculação como descrito em detalhes nas seções seguintes.

2.2.2 Tratamentos com Drogas

Culturas em triplicatas foram expostas durante vários períodos de tempo ao 5-FU, CPT-11, ou a ambos em diversas seqüências. As combinações das drogas foram realizadas com uma dose fixa de um dos agentes na presença de diluições seriadas do outro. As repostas celulares foram avaliadas imediatamente após os tratamentos e/ou depois de cultivadas por mais 2 dias em meio sem droga.

Somente células em crescimento exponencial e com viabilidade > 95%, confirmada pela exclusão com azul de tripan (Freshney, 1987), foram utilizadas nos experimentos.

2.2.2.1 Determinação da Quimiossensibilidade

As células foram retiradas dos frascos de cultura com tripsina 0,25%/ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 1 mM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e ressuspensas em meio de cultura contendo 50 µg/mL de gentamicina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e 0,25 µg/mL de fungizone (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA). Vinte e quatro horas antes do tratamento as células foram inoculadas em microplacas de 96 *wells*, em uma densidade de 5×10^3 células/100 µL/*wells*. As células foram tratadas em um volume final de 200 µL/*wells*.

Cada experimento incluiu um controle contendo meio ou meio com droga sem células, que foi utilizado para determinar o *background*. Além disso, cada microplaca tinha culturas de células que não receberam drogas e serviram para o controle do crescimento celular.

As respostas celulares foram avaliadas através da coloração com sulforodamina B (SRB) (Monks *et al.*, 1991), que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas celulares. Imediatamente após o tratamento, as células foram fixadas *in situ*, por 60 min a 4 °C, com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) em uma concentração final de 10% (p/v). O TCA foi removido com água destilada, e após serem secas, as células foram coradas por 10 min com 100 µL de solução de SRB (0,4% p/v, em ácido acético 1% v/v). O excesso de SRB foi removido com ácido acético (1%; v/v). O SRB ligado às proteínas foi solubilizado com 200 µL de base Trizma 10 mM pH 10.5.

O SRB ligado é proporcional a densidade celular e foi determinado através das absorvâncias medidas em um comprimento de onda de 515 nm usando um

leitor de microplacas (Modelo 750, Cambridge Technology, Inc., Watertow, MA, EUA). Os resultados foram corrigidos pelas absorvâncias dos *background*. O perfil de dose-resposta foi plotado, e deste, derivado os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, isto é, a concentração de droga necessária para inibir 20%, 50% e 80% do crescimento celular, respectivamente, quando comparada aos controles sem droga.

2.2.2.2 Análise do Efeito da Combinação das Drogas

Os efeitos das combinações entre CPT-11 e 5-FU foram analisados através de um programa de computador que avalia as interações de múltiplas drogas (Chou & Talahay, 1983; Elsevier-Biosoft; Cambridge, Reino Unido). Este programa permite calcular os índices de combinações (**CI**s), o qual indica sinergismo, adição, ou antagonismo entre duas drogas, quando os valores são menores que 1, iguais a 1, ou maiores que 1, respectivamente.

Os valores de **CI**s foram calculados através da seguinte fórmula:

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2$$

Onde $(D_x)_1$ e $(D_x)_2$ são as concentrações de CPT-11 ou 5-FU como droga única, que induz a x% de inibição do crescimento celular. $(D)_1$ e $(D)_2$ indicam a concentração das drogas combinadas que inibe x% do crescimento celular. $(D_x)_1$ e

$(D_x)_2$ foram calculados pelo equação de Chou (Chou & Talahay, 1983), que determina a inibição de 50% do crescimento celular causada pela combinação:

$$D_x = D_m[FA/(1-FA)]^{1/m}$$

Onde, D_m é a dose da combinação necessária para inibir 50% do crescimento celular, FA é a fração celular afetada, e m a inclinação da curva obtida. Os resultados foram avaliados através das médias dos **CIs** atingidos com as **FAs** de 0,50, 0,75, 0,90 e 0,95.

2.2.3 Determinações Enzimáticas

2.2.3.1 Determinação da Atividade da Timidilato Sintase

As atividades da enzima TS nas linhagens celulares, foram avaliadas através de dois métodos: a) um ensaio para determinar sítios de ligação da TS (Van de Wilt *et al.*, 1992); b) um ensaio para determinar a ação catalítica da TS (Peters *et al.*, 1991).

Células (5×10^7) não tratadas foram raspadas dos frascos de cultura, suspensas em Tris-HCl 0,2 M pH 7.4, β -mercaptoetanol 20 mM, NaF 100 mM e citidina monofosfato 15 mM, e sonicadas (3 pulso, 5 s com intervalo de 10 s, 40 mA) no gelo. As amostras foram centrifugadas a 14000 x g, 4 °C por 15 min e o

sobrenadante contendo a enzima coletado. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para determinar a quantidade de proteína pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Para determinar o número de sítios de ligação da TS disponíveis para o dUMP e FdUMP, 50 µL da suspensão contendo a enzima foram incubados por 1 h a 37 °C com 50 µL de 5,10-metileno tetraidrofolato 6,5 mM, 135 µL de Tris-HCl 200 mM pH 7.4 e 10 µL de [6-³H]FdUMP 0,57 µM (atividade específica 19 Ci/mmol; Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido). A reação foi interrompida com a adição de 500 µL de carvão ativado (10%, p/v). Em seguida as amostras foram centrifugadas e 250 µL dos sobrenadantes foram misturados com líquido de cintilação a base de di-isopropil naftaleno (Optiphase-Hisafe 3; EG & G Wallac, Turku, Finlândia) e contados em espectrômetro de cintilação líquida (Wallac, Turku, Finlândia). Os valores foram expressos como fmoles de FdUMP ligado/mg proteína.

A atividade catalítica da TS foi medida através da liberação de ³H durante a conversão do [5-³H]dUMP em dTMP. A atividade da enzima foi determinada em condições de saturação (10 µM dUMP) e não saturação (1 µM dUMP) do substrato. Para isto, 25 µL de suspensão enzimática (diversas diluições) foram incubados por 30 min a 37 °C com 5 µL de 5,10 metileno tetraidrofolato 6,5 mM, 10 µL de Tris-HCl 200 mM pH 7.4 e 10 µL de [5-³H]dUMP (atividade específica 19 Ci/mmol; Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido). A inibição potencial da atividade da TS, também, foi determinada pela substituição do Tris-HCl por 10 µL de FdUMP 0,05 µM. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de TCA gelado (35%, p/v) e 250 µL de carvão neutro (10%, p/v). Após centrifugação 250 µL dos sobrenadantes

foram misturados com líquido de cintilação a base de di-isopropil naftaleno (Optiphase-Hisafe 3; EG & G Wallac, Turku, Finlândia) e contados em espectrômetro de cintilação líquida (Wallac, Turku, Finlândia). As atividades da TS foram expressas como pmoles de dUMP convertidos/h/mg proteína.

2.2.3.2 Determinação da Atividade da Topoisomerase I

A atividade catalítica da topoisomerase I foi determinada através da capacidade da enzima, presente nos extratos nucleares, converter o DNA superenrolado em DNA relaxado (Liu & Miller, 1981).

Para preparar os extratos nucleares (Filipski & Kohn, 1982) culturas de 10^7 células não tratadas foram lavadas, raspadas dos frascos de cultura e centrifugadas a 150 x g por 10 min. A seguir, foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução contendo NaCl 150 mM, KH_2PO_4 1 mM pH 6.4, MgCl_2 5 mM, ácido etilenoglicol bis(β -amino etil éter)-*N,N,N',N'*, tetra-acético (EGTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM e fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM e misturados com 4,5 mL da mesma solução contendo Triton X-100 0,3% (v/v). Os núcleos foram extraídos misturando as amostras por inversão durante 10 min e coletados por centrifugação a 150 x g por 10 min a 4 °C. Após, foram lavados com a mesma solução sem Triton X-100. Os núcleos foram ressuspensas em 200 μL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.5 contendo KCl 25 mM,

MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM e lisados por 15 min a 0 °C. Após as amostras serem sonicadas no gelo (2 pulsos, 20 s, 15 mA), foram adicionados 200 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5 contendo EDTA 1 mM, NaCl 1 M, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. (Crepsi *et al.*, 1986). A topoisomerase I foi extraída por 30 min a 4 °C, coletada por centrifugação a 16000 x g por 20 min a 4 °C, e a concentração de proteína determinada (Lowry *et al.*, 1951).

A conversão do DNA superenrolado em DNA relaxado pela topoisomerase I (Liu & Miller, 1981) foi realizada usando um *Kit* para determinação de Topoisomerase I (Topoisomerase I Assay Kit; TopoGEN, Columbus, OH, EUA). As amostras em diferentes diluições (10 µL) foram incubadas por 30 min a 37 °C na presença de 1 µL de pHOT1 DNA de plasmídeo (concentração final 0,2 µg) e 2 µL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7.9) contendo EDTA 10 mM, NaCl 1,5 M, albumina de soro bovino 1% (v/v) espermidina 1 mM e glicerol 50% (v/v). A seguir a reação foi interrompida, no gelo, com 5 µL de sarcosil 5% (v/v), azul de bromofenol (v/v) e glicerol 25% (v/v). As amostras foram incubadas por 60 min a 37 °C na presença de 1,2 µL de proteinase K (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EUA) em concentração final de 50 µg/mL, para degradar o excesso da enzima. As enzimas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A separação do DNA superenrolado e DNA relaxado ocorreu em tampão de corrida composto por Tris 40 mM, EDTA 2 mM e ácido acético 1% (v/v), a 25 V por 3 h, e fotografadas imediatamente em filme *polaroid* 667. Foi utilizado como marcador um DNA relaxado de plasmídeo.

Os níveis da enzima são proporcionais a intensidade das bandas encontradas

no gel. Os negativos foram usados para quantificar a intensidade das bandas em programa de computador Optiquant (Versão 02.00, Packard Instrument Co, 1997) e expressas em unidades arbitrárias.

2.2.3.3 Determinação da Atividade da Carboxil Esterase

As atividades da enzima carboxil esterase foram determinadas na fração microsomal das células através da conversão do acetato de para-nitrofenil no seu metabólito para-nitrofenol (Heymann & Mentlein, 1981).

Células (5×10^8) não tratadas, foram lavadas e raspadas dos frascos de cultura e centrifugadas por 10 min a $150 \times g$. Os *pellets* foram suspensos em 3 mL de sacarose 0,24 M, sonicados (1 pulso, 20 s, 40 mA) e centrifugados por 30 min, a $16000 \times g$, a 4°C . Os sobrenadantes foram coletados e centrifugados por 60 min, a $105000 \times g$, a 4°C , para sedimentar a fração microsomal. Os microsomos foram ressuspendidos em 1 mL de Tris-HCl 0,1M pH 8,5, e sonicados no gelo (5 pulsos, 30 s, 40 mA, pausa de 90 s entre cada pulso). A seguir foi adicionado 300 μL de digitonina (concentração final 15 mg/mL) e misturado por 60 min para solubilizar a enzima. Após ultra-centrifugação por 2 h a $105000 \times g$, a 4°C , os sobrenadantes foram aliquotados e utilizados para determinação da atividade da enzima e quantificação de proteína (Lowry *et al.*, 1951).

Aproximadamente 12,5 μg do extrato microsomal foi misturado com acetato de para-nitrofenil 1 mM e Tris-HCl 100 mM pH 8,2, em volume final de 1 mL. A

leitura foi feita em espectrofotômetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EUA) em comprimento de onda de 405 nm, durante 2 min para detectar a formação do para-nitrofenol (Heymann & Mentlein, 1981). As atividades da enzima foram expressas em mU/mg proteína.

2.2.3.4 Determinação dos Níveis da Lactato Desidrogenase

Os níveis de lactato desidrogenase (LDH) foram determinados no meio de cultura através da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADH) durante a conversão do piruvato em lactato (Howell *et al.*, 1979).

Após 2 h de tratamento os meios de cultura de 10^6 células foram coletados e utilizados para medir os níveis de LDH. A reação foi iniciada pela adição de 200 μ L da amostra à solução de NADH 0,2 mM, piruvato 0,5 mM em tampão de trietanolamina 50 mM pH 7.4, em um volume final de 2 mL à 30 °C. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EUA) em comprimento de onda de 340 nm durante 2 min, para detectar a conversão do NADH em NAD.

As células aderidas foram lavadas e raspadas em PBS gelado e utilizadas para quantificar a concentração de proteína (Lowry *et al.*, 1951). Os resultados foram expressos em mU LDH/mg proteína.

2.2.4 Estudos do Dano e Reparo do DNA

2.2.4.1 Determinação do Dano ao DNA

O dano causado ao DNA pelos tratamentos foi determinado através de método fluorescente que detecta formação de quebras no DNA e/ou lesões no DNA induzidas após tratamento com alcali (FADU) (Kanter & Schwartz, 1982). Este ensaio se baseia: a) no tempo que a dupla-hélice de DNA leva para ser convertida em fita simples em condições alcalinas; b) na aceleração deste processo após a introdução de dano ao DNA por agentes citotóxicos; e c) na diferença entre as fluorescências do DNA em dupla-hélice *versus* fita simples na presença do corante cromossômico bisbenzamida (Hoechst H33258; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA).

Culturas de 5×10^6 células foram tratadas por 24 h e após a remoção do meio com drogas, as culturas foram imediatamente avaliadas quanto ao dano ao DNA (dia 1), ou cultivadas por mais 2 dias em meio sem drogas e a seguir foi avaliado o dano ao DNA (dia 3). Para isto, células aderidas foram lavadas, coletadas por centrifugação e ressuspensas em PBS em densidades de 10^6 células/mL. Cada suspensão foi dividida em 3 alíquotas para medir a fluorescência do DNA não desnaturado (**A**), DNA parcialmente desnaturado (**B**) e DNA completamente desnaturado (**C**).

Para isto, nos três primeiros tubos, 1-3 **(A)** foram adicionados 500 µL de NaOH (0,1 N) e 500 µL de HCl (0,1 N), previamente misturados. A seguir foram acrescentados 500 µL de solução fluorocrômica (solução fosfato tamponada de potássio pH 7.4 contendo SDS 0,16% (p/v), EDTA 0,04 M, bisbenzamide 1 µL/mL) e as amostras foram sonicadas (1 pulso, 15 s, 15 mA).

Aos tubos 4-6 **(B)** foram adicionados 500 µL de NaOH (0,1 N) e incubados por 30 min. O tratamento foi interrompido pela adição de 500 µL de HCl (0,1 N), e 500 µL de solução fluorocrômica seguida de sonicação (1 pulso, 15 s, 15 mA).

Os tubos 7-9 **(C)** receberam 500 µL de NaOH (0,1 N), foram sonicados (1 pulso, 5 s, 15 mA) e incubados por 30 min. A seguir foram adicionados 500 µL de HCl (0,1 N) e 500 µL de solução fluorocrômica e em seguida foram sonicados (1 pulso, 15 s, 15 mA).

Os tratamentos **B** e **C** foram realizados em local livre de vibração, luminosidade e à temperatura ambiente, para evitar a introdução de danos durante o processo.

O percentual do DNA na forma de dupla-hélice que permaneceu nas células sobreviventes **(F)**, foi calculado pela fórmula:

$$F = (B-C)/(A-C) \times 100\%$$

A fluorescência foi medida com espectrofluorímetro (F-2000, HITACHI, Tóquio, Japão) em ondas de excitação e emissão de 353 nm e 451 nm,

respectivamente. Os resultados foram corrigidos pelos valores de *background* determinado em amostras sem células.

Células não tratadas foram usadas como controles e amostras sem células foram consideradas como brancos, sendo utilizadas para descartar o dano ao DNA introduzido durante o processo.

2.2.4.2 Avaliação da Incorporação de [³H Metil]Timidina ao DNA

A incorporação de [³H-metil]timidina ao DNA na presença de hidroxiuréia é um indicativo de reparo por excisão do dano ao DNA (Adams *et al.*, 1971). Para verificar se estes mecanismos de reparo estavam funcionando após os vários tratamentos utilizamos método descrito previamente (Sandoval *et al.*, 1996).

Culturas de 10⁶ células tratadas por 2 h ou 24 h com IC₂₀ ou IC₅₀ das drogas, foram lavadas com 5 mL de HBSS, e incubadas por 30 min a 37 °C na presença de 3 mM de hidroxiuréia. A seguir foi adicionado ao meio de cultura 5 µCi [³H-metil]timidina (atividade específica 76 Ci/mmol; Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido), e as amostras foram incubadas por 2 h a 37 °C. A reação foi parada no gelo, e as células lavadas e raspadas dos frascos de cultura na presença de PBS gelado (3 vezes) e centrifugadas a 150 x g por 5 min.

Os *pellets* foram ressuspensos em 500 µL de ácido perclórico 0,4 N, misturados vigorosamente com vórtex e incubados em gelo por 20 min. A seguir

foram centrifugados a 12000 x g, 4 °C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA extraído pela adição de 500 µL de ácido perclórico 0,4 N. Novamente as amostras foram misturadas vigorosamente com vórtex e centrifugadas a 12000 x g, 4° C, 5 min e os *pellets* ressuspensos em 1 mL de PBS. A seguir foram adicionados 50 µL KOH 10 N e as amostras deixadas *overnight* a 45 °C para solubilizar. Uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada amostra para determinar a quantidade de DNA através de espectrofotômetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EUA) em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 200 µL das amostras foram misturados com líquido de cintilação a base de di-isopropil naftaleno (Optiphase-Hisafe 3; EG & G Wallac, Turku, Finlândia) e contados em espectrômetro de cintilação líquida (Wallac, Turku, Finlândia). Os valores foram expressos em dpm/µg DNA.

2.2.4.3 Determinação da Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular

A distribuição das células nas fases do ciclo celular após 2 h de tratamento foi determinada nas culturas através da citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio (Vindelov *et al.*, 1983). Para isto, 5×10^5 células foram lavadas com HBSS, removidas dos frascos com tripsina/EDTA e ressuspensas em meio de cultura. A

seguir foram centrifugadas a 150 x g por 5 min, lavadas 2 vezes em PBS gelado e fixadas em 1 mL de etanol 70% à 4°C.

No dia da análise as amostras foram descongeladas, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. A seguir foram tratadas com 1 mL de solução contendo citrato de sódio 3,4 mM, iodeto de propídio 20 µg/mL e RNase A (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EUA) 100 µg/mL por 30 min, na ausência de luz.

A análise foi realizada em *software* LYSIS II (Becton Dickinson, CA, EUA) de acordo com *kit* para análise fluorescente de DNA (Cycle Test DNA Reagent Kit, Becton Dickinson, CA, EUA) em citômetro de fluxo (Becton Dickinson, CA, EUA). Como padrão para calibração do citômetro de fluxo foi utilizado *kit DNA Quality Control Pratic* (Becton Dickinson, CA, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de células por fase do ciclo celular.

2.2.4.4 Formação de Complexo DNA-Topoisomerase I

A formação dos complexos DNA-proteína, essenciais intermediários da reação entre topoisomerase I e DNA, foi avaliada por método descrito previamente (Zwelling *et al.*, 1989). Em resumo, 2×10^5 células/mL foram inoculadas em placas de cultura de 6 *wells*. Vinte e quatro horas depois, o meio de cultura foi retirado e substituído por meio contendo [U-¹⁴C]leucina (0,2 µCi/mL; atividade específica 308

mCi/mmol; Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido) e [metil-³H]timidina (0,6 µCi/ml; atividade específica 76 Ci/mmol; Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido) e as culturas foram incubadas por 18 h a 37 °C.

Após o período de incubação o meio foi substituído por meio sem radioativo, e deixado 1 h a 37 °C. A seguir as células foram tratadas por 2 h a 37 °C, lavadas e raspadas em PBS gelado (2 vezes) e centrifugadas a 150 x g por 5 min. Os *pellets* foram ressuspensos em 0,5 mL de solução contendo EDTA 5 mM (pH 8.0), SDS 1,25%, e DNA de esperma de salmão (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 0,4 mg/mL à 65 °C.

Os *pellets* foram lisados através da passagem por uma seringa de 22-G, 20 vezes. A seguir foram incubados a 65 °C por 10 min e depois 250 µL KCl (concentração final 100 mM) foram adicionados. As amostras foram misturadas em vórtex por 10 s, e deixadas no gelo por 10 min, sendo em seguida centrifugadas por 10 min a 10000 x g, 4 °C. Os *pellets* foram lavados 2 vezes com 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.0 contendo EDTA 1 mM, KCl 100 mM e DNA de esperma de salmão 0,1 mg/mL à 65 °C.

Os *pellets* foram dissolvidos em 0,2 mL água pré-aquecida (65 °C), incubados a 65 °C por 15 min, e centrifugados por 10 s a 10000 x g. As amostras foram misturados com líquido de cintilação a base de di-isopropil naftaleno (Optiphase-Hisafe 3; EG & G Wallac, Turku, Finlândia) e contados em espectrômetro de cintilação líquida (Wallac, Turku, Finlândia). Os valores foram normalizados pela incorporação de [U-¹⁴C]leucina e expressos pela razão cpm [metil-³H]timidina/cpm [U-¹⁴C]leucina.

2.2.5 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada, de acordo com a situação apresentada, através de coeficiente de correlação de Pearson, teste t de Student, análise de variância e teste de comparações múltiplas de Turkey. Foram utilizados níveis de significância (α) de 1% ou 5%.

As análises foram realizadas através de programa estatístico *Analyse-it* para Excel (Analyse-It Software Ltd.).

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos do 5-FU, CPT-11 e Combinações

3.1.1 Tempo de Duplicação Celular e Densidade de Inoculação

O tempo de duplicação celular foi determinado através da avaliação das densidades celulares durante vários períodos de tempo após a inoculação. Estes experimentos indicaram taxas de proliferação celular de aproximadamente 22, 23 e 26 h para as linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Com base nestes resultados calculamos a densidade de inoculação das células necessária para garantir sub-confluência e assim, o crescimento exponencial ao final dos 3 dias de experimento.

3.1.2 Quimiossensibilidade

Os efeitos anti-proliferativos do 5-FU e do CPT-11 nas linhagens celulares foram avaliados após 24 h de exposição às drogas, seguido de 2 dias em meio de cultura sem drogas.

Os valores de IC_{50} (Tabela 6) demonstraram que as linhagens SW620 e HT-29 são resistentes ao 5-FU (valores de IC_{50} próximos a 15 e 8 μ M, respectivamente), enquanto que a linhagem SNU-C4 apresentou uma maior sensibilidade a esta droga (valor de IC_{50} de aproximadamente 2 μ M). As três linhagens apresentaram pequenas diferenças na sua sensibilidade ao CPT-11, com valores de IC_{50} próximos a 2, 2 e 4 μ M, respectivamente.

A seguir, nós examinamos os efeitos de um dos agentes em uma concentração fixa e de baixa toxicidade na inibição do crescimento celular induzido pelo outro, em diferentes combinações e seqüências. Para isto, as células foram incubadas por 24 h com 5-FU ou CPT-11 junto com CPT-11 ou 5-FU, respectivamente, em uma concentração de IC_{20} . Ou então, as culturas foram expostas por 22 h a diluições seriadas do 5-FU ou CPT-11, após 2 h de pré-tratamento com IC_{20} do CPT-11 ou 5-FU, respectivamente.

Tabela 6: Valores de IC_{50} (μ M; média \pm DP, $n \geq 3$) em linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4 após tratamento por 24 h com 5-FU ou CPT-11, ou nas combinações e seqüências indicadas. As respostas

celulares foram avaliadas após cultivo por 2 dias adicionais em meio sem droga através da coloração com SRB.

	SW620	HT-29	SNU-C4
5-FU, 24 h	15,3 ± 0,8	8,2 ± 1,3	2,2 ± 0,7
CPT-11 IC ₂₀ + 5-FU, 24 h simultâneo	13,9 ± 5,0	10,9 ± 1,2	5,4 ± 0,9 ^a
CPT-11 IC ₂₀ 2 h, seguido de 5-FU 22 h	9,3 ± 0,6 ^a	1,5 ± 0,5 ^a	1,1 ± 0,2 ^a
CPT-11, 24 h	2,0 ± 0,9	2,5 ± 0,5	3,8 ± 0,3
5-FU IC ₂₀ + CPT-11, 24 h simultâneo	2,1 ± 0,9	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2 ^b
5-FU IC ₂₀ 2 h, seguido de CPT-11 22 h	5,3 ± 0,3 ^b	5,5 ± 0,7 ^b	18,2 ± 0,6 ^b

^aSignificativamente diferente do 5-FU ($p < 0,01$)

^bSignificativamente diferente do CPT-11 ($p < 0,01$)

Como demonstrado na Tabela 6 e Fig. 9, o pré-tratamento com CPT-11 aumenta a inibição do crescimento causada pelo 5-FU em cerca de 2, 4 e 2 vezes nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento com IC₂₀ do 5-FU diminui a inibição do crescimento induzida pelo CPT-11 em 2, 2 e 4 vezes nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente (Tabela 6, Fig. 10).

Nenhum dos tratamentos com os agentes simultaneamente por 24 h, alterou significativamente a inibição do crescimento celular causada pelas drogas sozinhas nas linhagens SW620 e HT-29 (Tabela 6, Fig. 9 e 10).

Por outro lado, na linhagem SNU-C4, a exposição simultânea a IC₂₀ do CPT-11 e 5-FU diminui o efeito deste último em cerca de 2 vezes (Tabela 6, Fig. 9), enquanto que o tratamento concomitante com IC₂₀ 5-FU levou a um aumento da citotoxicidade do CPT-11 também em 2 vezes (Tabela 6, Fig. 10).

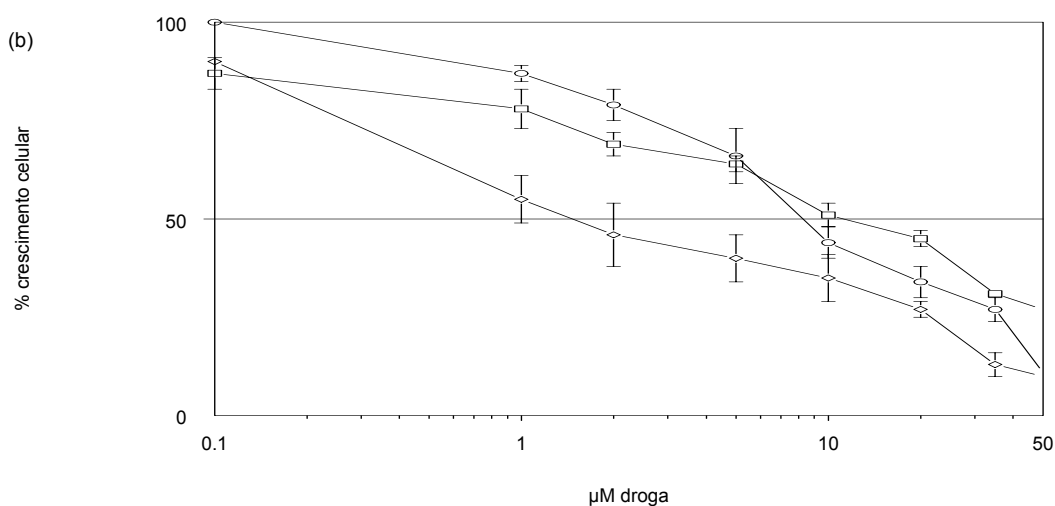
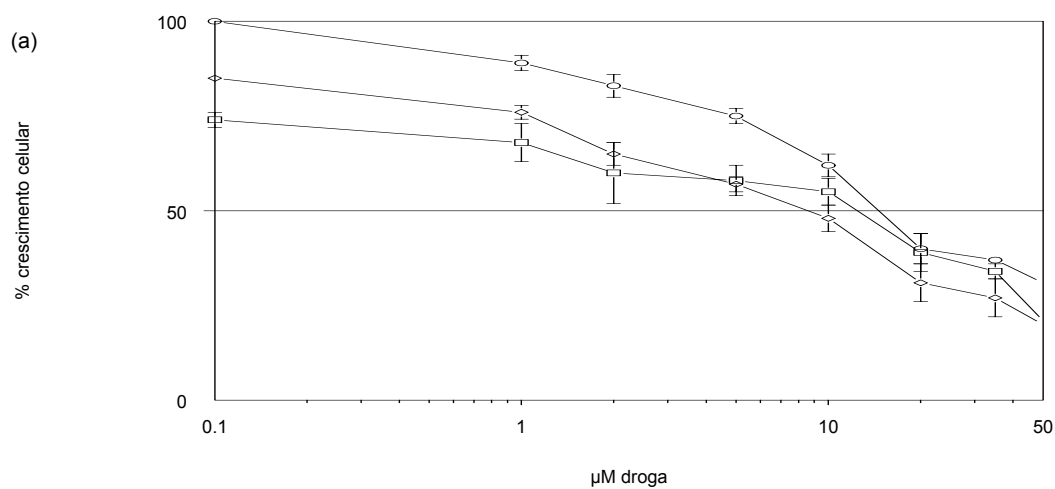


Fig. 9: Inibição do crescimento celular nas linhagens celulares de carcinoma de

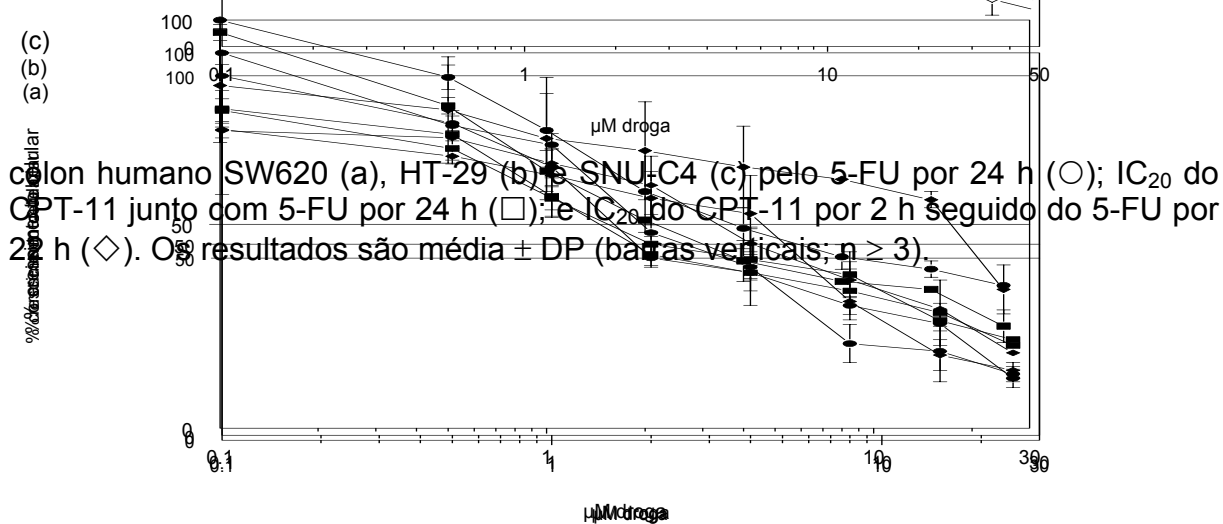
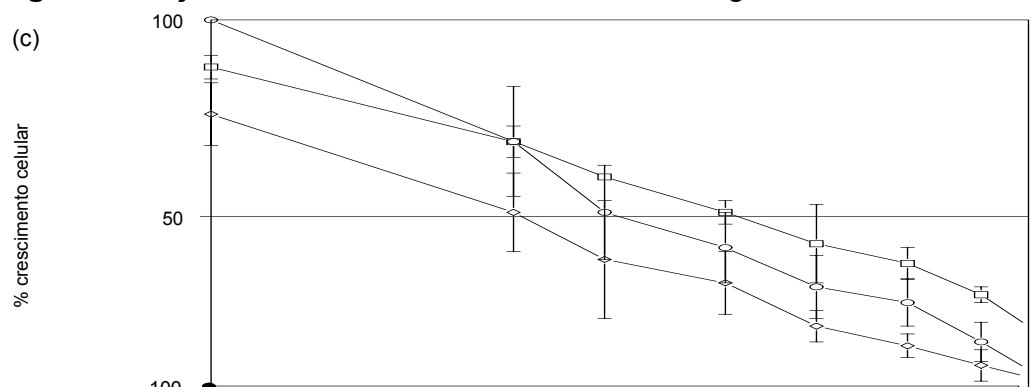


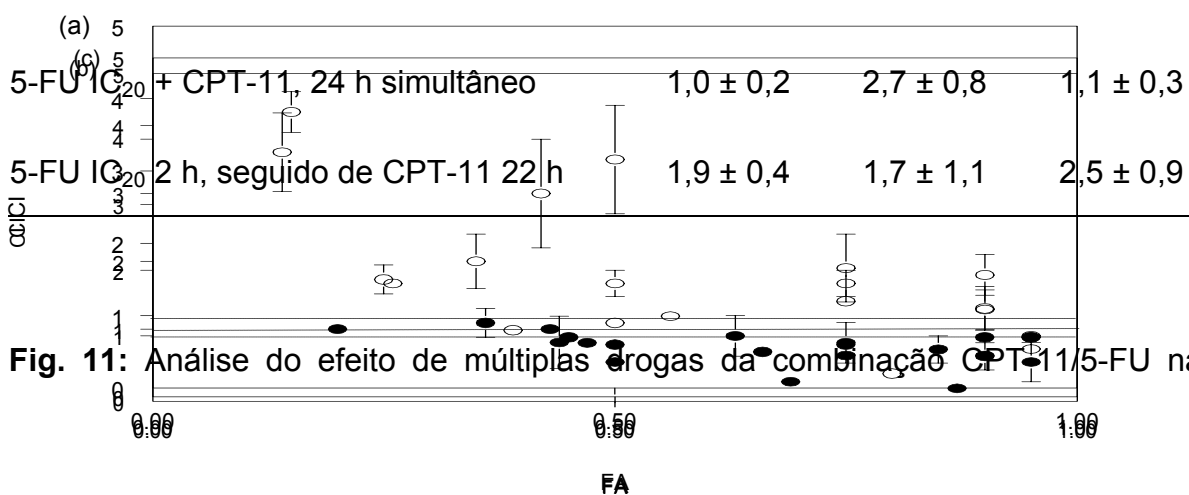
Fig. 10: Inibição do crescimento celular nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (a), HT-29 (b) e SNU-C4 (c) pelo CPT-11 por 24 h (●); IC₂₀ do 5-FU junto com CPT-11 por 24 h (■); IC₂₀ do 5-FU por 2 h seguido do CPT-11 por 22 h (◆). Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 3).

3.1.3 Efeitos das Combinações dos Agentes

Os resultados da análise do efeito de múltiplas drogas estão resumidos na Tabela 7 e Fig. 11 e 12. A exposição das células a IC₂₀ do CPT-11 por 2 h seguido de 22 h do 5-FU revelou CIs de aproximadamente 0,7 nas três linhagens, sugerindo que esta seqüência age aditiva ou sinergisticamente. Por outro lado, o pré-tratamento com IC₂₀ do 5-FU seguido pelo CPT-11 diminuiu a inibição do crescimento nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4 com CIs de aproximadamente 1,9, 2,7 e 2,5, respectivamente, sugerindo antagonismo.

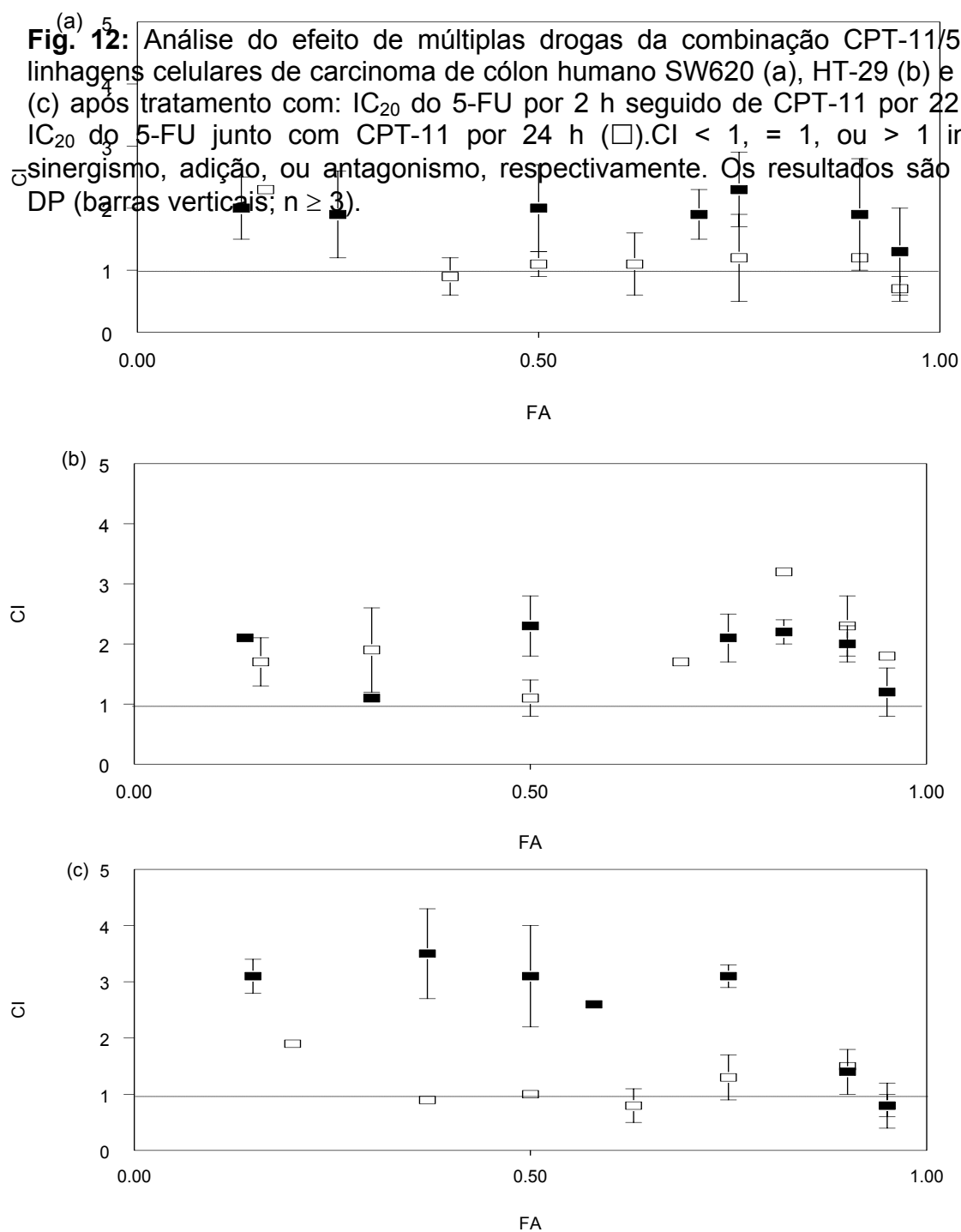
Tabela 7: Índices de combinações (CIs; médias \pm DP, $n \geq 3$) das análises dos efeitos das combinações do CPT-11 e 5-FU nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4. As análises foram realizadas após cultivo por 2 dias adicionais em meio sem droga. Em cada experimento foram calculadas as médias dos CIs atingidos com as frações afetadas (FA) de 0,50, 0,75, 0,90 e 0,95, e estes valores foram usados para calcular os resultados apresentados. $CI < 1$, $= 1$, ou > 1 indicam sinergismo, adição ou antagonismo, respectivamente.

Combinação	SW620	HT-29	SNU-C4
CPT-11 IC ₂₀ + 5-FU, 24 h simultâneo	1,0 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	2,2 \pm 1,4
CPT-11 IC ₂₀ 2 h, seguido de 5-FU 22 h	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1



linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (a), HT-29 (b) e SNU-C4 (c) após tratamento com: IC₂₀ do CPT-11 por 2 h seguido de 5-FU por 22 h (●) ou IC₂₀ do CPT-11 e 5-FU por 24 h (○). CI < 1, = 1, ou > 1 indicam sinergismo, adição, ou antagonismo, respectivamente. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 3).

Fig. 12: Análise do efeito de múltiplas drogas da combinação CPT-11/5-FU nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (a), HT-29 (b) e SNU-C4 (c) após tratamento com: IC₂₀ do 5-FU por 2 h seguido de CPT-11 por 22 h (■) e IC₂₀ do 5-FU junto com CPT-11 por 24 h (□). CI < 1, = 1, ou > 1 indicando sinergismo, adição, ou antagonismo, respectivamente. Os resultados são média ± DP (barras verticais; n ≥ 3).



A utilização das drogas conjuntamente resultou em CIs próximos a 1,0 nas linhagens SW620 e HT-29. Por outro lado, na linhagem SNU-C4, a simultânea exposição de IC₂₀ do CPT-11 antagonizou o efeito do 5-FU (CI de 2,2), enquanto que o tratamento concomitante com IC₂₀ do 5-FU adicionou a citotoxicidade do CPT-11 (CI de 1,1).

Junto com os dados da seção anterior estes resultados indicam que o pré-tratamento com uma baixa concentração do CPT-11 potencializa o efeito da inibição do crescimento celular do 5-FU, enquanto que o tratamento prévio com uma baixa concentração de 5-FU antagoniza a atividade do CPT-11 nas três linhagens. Dependendo da razão das concentrações das drogas, o tratamento simultâneo com 5-FU/CPT-11 leva a potencialização ou antagonismo somente na linhagem SNU-C4.

3.1.4 Atividades Enzimáticas

3.1.4.1 Atividade da Timidilato Sintase

Para examinar se a diversidade na sensibilidade ao 5-FU apresentada pelas três linhagens foi determinada por diferenças na atividade da TS, vários aspectos da cinética enzimática foram determinados.

Tabela 8: Atividade da enzima timidilato sintase (média \pm DP, $n \geq 3$) em culturas não tratadas das linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4.

	SW620	HT-29	SNU-C4
Sítios de ligação da TS para FdUMP (fmoles/mg)	1170 \pm 645	206 \pm 61	1374 \pm 237
Atividade catalítica (pmoles/h/mg)			
com 1 μ M dUMP	764 \pm 320	187 \pm 120	1775 \pm 816
com 10 μ M dUMP	3428 \pm 2286	700 \pm 281	4718 \pm 1433

Com base nos resultados obtidos com a atividade catalítica e os sítios de ligação da enzima (Tabela 8), derivamos a afinidade ao substrato (K_m), velocidade de saturação do substrato (V_{max}), taxa de conversão inicial do substrato (V_{max}/K_m), bem como a inibição da TS mediada pelo substrato (K_i).

O número de sítios de ligação para o substrato e a atividade catalítica em condições de não saturação (1 μ M) e de saturação (10 μ M) do dUMP não apresentaram diferenças significativas entre as linhagens SW620 e SNU-C4, mas foram aproximadamente 6 vezes mais baixos na linhagem HT-29. A mesma observação foi feita para os valores de V_{max} , que foram próximos a 5900, 5900 e 1000 pmol/h/mg, respectivamente. O K_m foi de aproximadamente 2,5, 5,0 e 7,5 μ M nas linhagens SNU-C4, HT-29 e SW620, respectivamente. A eficiência catalítica da TS (V_{max}/K_m) na linhagem HT-29 foi aproximadamente 11 e 3 vezes mais baixa do que nas linhagens SNU-C4 e SW620 (valores próximos a 200, 2300 e 800 mg/h, respectivamente). A inibição da enzima pelo FdUMP não foi significativamente

diferente (K_i para FdUMP de aproximadamente 1,9, 1,7 e 1,3 nM nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente).

Os diferentes aspectos da TS foram relacionados com os valores de IC_{50} do 5-FU obtidos para as três linhagens celulares, utilizando coeficiente de correlação de Pearson. As diferenças nos sítios de ligação disponíveis para o (F)dUMP, a atividade catalítica em condições de saturação e não saturação, V_{max} , e V_{max}/K_m , da TS não demonstraram correlação com os valores de IC_{50} do 5-FU em nenhuma das três linhagens ($r = -0,12, -0,27, -0,59, 0,06$ e $-0,6, p < 0,01$, respectivamente). Por outro lado, as diferenças no K_m ou K_i da TS demonstrou uma alta correlação com os diferentes valores de IC_{50} para o 5-FU apresentados pelas linhagens ($r = 0,99$ e $0,98, p < 0,01$, respectivamente).

Uma vez que o substrato e o inibidor são análogos estruturais, estes resultados sugerem que a sensibilidade das linhagens ao 5-FU foi determinada, principalmente, pela afinidade com o substrato (K_m) e não pela atividade catalítica da enzima.

3.1.4.2 Atividade da Topoisomerase I

Para verificar o quanto a topoisomerase I estava envolvida nas diferentes respostas celulares ao CPT-11, a sua atividade catalítica foi determinada em extratos nucleares através da conversão do DNA superenrolado em DNA relaxado.

Os DNAs foram separados em gel de agarose, e as intensidades das bandas foram quantificadas. Esta análise revelou valores de 1, 1 e 1,5 unidades arbitrárias, para as linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente (Fig. 13). Estes resultados indicam que não existe diferença significativa entre as atividades catalíticas da topoisomerase I nas linhagens SW620 e HT-29. Porém a linhagem SNU-C4 apresenta 50% mais atividade desta enzima quando comparada com as duas primeiras linhagens celulares.

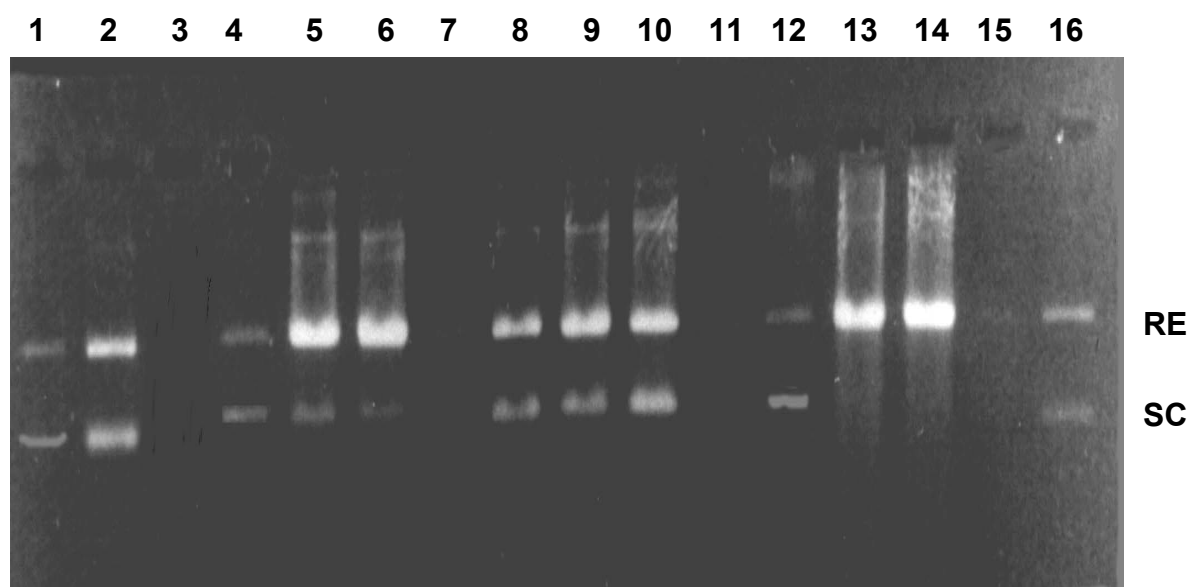


Fig. 13: Conversão do DNA superenrolado (SC) de plasmídeo pHOT1 em DNA relaxado (RE) por diferentes diluições (1:5; 1:2; 1:1) de extratos nucleares de culturas não tratadas das linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (linhas 4-6), HT-29 (linhas 8-10) e SNU-C4 (linhas 12-14). Marcadores para DNA relaxado e superenrolado estão nas linhas 1 e 2, e a linha 16 mostra o relaxamento do DNA pHOT1 pela topoisomerase I purificada.

3.1.4.3 Atividade da Carboxil Esterase

Como a atividade da topoisomerase I não esclareceu completamente as respostas celulares ao CPT-11, avaliamos o envolvimento da ativação intracelular deste agente medindo a atividade da carboxil esterase em extratos microssomais. A atividade da carboxil esterase na linhagem SNU-C4 foi cerca de 2,5 vezes menor do que nas linhagens HT-29 e SW620 (Tabela 9). Ou seja, as linhagens celulares SW620 e HT-29 apresentam uma maior capacidade de conversão do CPT-11 em SN-38, quando comparadas com a linhagem SNU-C4.

Tabela 9: Atividade da enzima carboxil esterase (mU/mg proteína; média \pm DP, $n \geq 3$) em microssomas de culturas não tratadas das linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4, através de método espectrofotométrico.

	SW620	HT-29	SNU-C4
Atividade da carboxil esterase	5055 \pm 1789 ^a	4080 \pm 752 ^a	1713 \pm 522

^a Significativamente diferente da linhagem SNU-C4 ($p < 0,05$)

Estes resultados, junto com os apresentados na seção 4.1.4.2 sugerem que existe uma compensação entre as atividades das enzimas carboxil esterase e topoisomerase I, explicando os valores comparáveis de IC₅₀ obtidos com o CPT-11 nas três linhagens avaliadas.

3.1.5 Produção de Danos ao DNA

Avaliamos a indução de danos ao DNA com as combinações das drogas através do FADU, que quantifica quebras diretas no DNA e/ou lesões que se tornam visíveis após tratamento com alcali. O dano ao DNA foi examinado após exposição a IC_{20} de uma droga com IC_{50} da outra em diferentes seqüências. Com o objetivo de obter informações sobre as lesões introduzidas imediatamente após os tratamentos, e as que permaneceram depois de 2 dias de incubação com meio sem droga, avaliamos os danos nos dias 1 e 3. O dano ao DNA foi avaliado nas células aderidas, uma vez que em todas as condições experimentais, e durante todo o período do tratamento, foi observado que no máximo 10% das células soltaram-se dos frascos de cultura. A Tabela 10 resume os resultados destes estudos.

Tabela 10: Dano ao DNA (% DNA em dupla-hélice; média \pm DP, $n \geq 3$) em linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4 após tratamento por 24 h com 5-FU ou CPT-11, ou nas combinações e seqüências indicadas. As lesões no DNA foram avaliadas usando um ensaio de fluorescência (FADU) após tratamento com as drogas (dia 1), ou após cultivo por mais 2 dias em meio sem drogas (dia 3). A quantidade de DNA em dupla-hélice foi expressa em relação a encontrada nos controles não tratados. De acordo com Crepsi *et al.*, 1986, típicos valores de *background*, de aproximadamente 30%, são provavelmente introduzidos durante o processamento das amostras.

	SW620		HT-29		SNU-C4	
	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia 3
5-FU IC ₅₀ 24 h	105 \pm 19	93 \pm 16	114 \pm 30	127 \pm 27	71 \pm 14	94 \pm 25
CPT-11 IC ₂₀ + 5-FU IC ₅₀ , 24 h simultâneo	109 \pm 17	82 \pm 39	94 \pm 18	102 \pm 33	46 \pm 15 ^a	54 \pm 10 ^a
CPT-11 IC ₂₀ 2 h, seguido de 5-FU IC ₅₀ 22 h	116 \pm 16	58 \pm 17 ^a	120 \pm 20	71 \pm 14 ^a	46 \pm 15 ^a	50 \pm 13 ^a
CPT-11 IC ₅₀ 24 h	115 \pm 17	87 \pm 18	116 \pm 30	106 \pm 16	87 \pm 14	94 \pm 10
5-FU IC ₂₀ + CPT-11 IC ₅₀ , 24 h simultâneo	105 \pm 19	86 \pm 18	86 \pm 29	117 \pm 29	52 \pm 13 ^b	73 \pm 13
5-FU IC ₂₀ 2 h, seguido de CPT-11 22 h	108 \pm 12	93 \pm 31	104 \pm 22	108 \pm 19	59 \pm 14 ^b	101 \pm 10

^aSignificativamente diferente do 5-FU sozinho ($p < 0.01$).

^bSignificativamente diferente do CPT-11 sozinho ($p < 0.01$).

As linhagens SW620 e HT-29 não apresentaram lesões no dia 1 com nenhum dos tratamentos. Na linhagem SNU-C4, todos os tratamentos contendo 5-FU causaram significativo dano ao DNA. Além disso, a adição da IC₂₀ do CPT-11 a IC₅₀ do 5-FU, tanto seqüencial ou concomitantemente, causou aproximadamente 20% mais lesões nesta linhagem. A IC₅₀ do CPT-11 não induziu dano ao DNA possível de ser detectado na linhagem SNU-C4. Porém, quando foi combinado com IC₂₀ do 5-FU aproximadamente 40% a 50% de dano foi introduzido, independente do esquema de administração.

No dia 3, nas linhagens SW620 e HT-29, somente o pré-tratamento com CPT-11 seguido pela IC₅₀ do 5-FU levou a um significativo dano ao DNA (30% a 40%). Na linhagem SNU-C4, o dano introduzido no dia 1 pela IC₂₀ do CPT-11 simultânea ou seqüencialmente com IC₅₀ do 5-FU foi conservado até o dia 3. Entretanto, o dano gerado ao DNA pela exposição a IC₅₀ do 5-FU e o causado com a IC₂₀ do 5-FU antes ou junto com a IC₅₀ do CPT-11 no dia 1, não foi mais detectado no dia 3.

Em conjunto, estes resultados sugerem que um dano significativo e persistente foi introduzido no DNA nas 3 linhagens somente quando a IC₂₀ do CPT-11 precede a IC₅₀ do 5-FU. Além disso demonstramos que este dano é causado principalmente pelo 5-FU, uma vez que este aparece em todos os tratamentos contendo 5-FU na linhagem mais sensível a este, SNU-C4. Ainda mais, foi demonstrado que o dano ao DNA e a citotoxicidade dependem da seqüência de administração das drogas.

3.2 Ação dos Pré-Tratamentos

Os resultados mencionados anteriormente indicam que a exposição a doses baixas das drogas em curtos períodos de tempo afetaram de diferentes formas as respostas celulares aos tratamentos subsequentes.

Para determinar quais mecanismos poderiam explicar estas alterações, nós avaliamos os efeitos dos pré-tratamentos com 5-FU ou CPT-11 em vários alvos celulares. Com base nos mecanismos de ação dos agentes e nas respostas obtidas optamos por investigar o efeito dos pré-tratamentos no reparo por excisão do DNA, alterações na distribuição das células nas fases do ciclo celular, integridade da membrana plasmática e formação de complexos DNA-topoisomerase I. Para isto utilizamos a incorporação de [³H-Metil]timidina no DNA, citometria de fluxo, a liberação de LDH no meio de cultura e precipitação do complexo DNA-proteína com SDS. Células não tratadas foram usadas como controles.

3.2.1 Incorporação de [³H-Metil]Timidina no DNA

Para verificar se o tratamento por 2 h ou 24 h com IC₂₀ ou IC₅₀ do 5-FU e CPT-11 interferem com os mecanismos de reparo por excisão do DNA, utilizamos método de incorporação da [³H-metil]timidina no DNA, na presença de hidroxiuréia (Tabela 11). A hidroxiuréia inibe a atividade da enzima ribonucleotídeo reductase, responsável pela conversão dos ribonucleotídios em deoxirribonucleotídeos. A inibição desta enzima impede a síntese replicativa do DNA, permitindo a

incorporação de [³H-metil]timidina somente durante o processo do reparo por excisão (Adams et al., 1971).

Tanto a exposição ao 5-FU quanto ao CPT-11 induziu uma incorporação de [³H-metil]timidinanas três linhagens, demonstrando uma tendência que sugere o envolvimento de mecanismos de reparo por excisão nas respostas celulares.

No caso do 5-FU as linhagens SW620 e HT-29 apresentaram menor incorporação de [³H-metil]timidina do que a demonstrada pela linhagem SNU-C4, quando tratadas com IC₅₀ por 24 h ou IC₂₀ por 2 h. Já com o CPT-11 a incorporação de [³H-metil]timidina nas três linhagens aumentou com o tempo de exposição mais prolongado e com maior concentração da droga.

Estes resultados sugerem que o reparo por excisão ocorreu principalmente na linhagem mais sensível ao 5-FU. Por outro lado o dano introduzido ao DNA pelo CPT-11 parece depender do tempo de exposição e concentração da droga, e é possível de ser reparado por este mecanismo.

Tabela 11: Incorporação de [³H-metil]timidina (% dpm; média ± DP, n ≥ 3) no DNA das linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4 imediatamente após 2 h ou 24 h de tratamento com IC₂₀ ou IC₅₀ do 5-FU ou CPT-11. A avaliação da incorporação de [³H-metil]timidina foi realizada na presença de 3 mM de hidróxiuréia.

	SW620	HT-29	SNU-C4
Controles não tratados	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
5-FU IC ₂₀ , 2 h	108 ± 49	103 ± 14	157 ± 37 ^a
5-FU, IC ₅₀ , 24 h	140 ± 38	124 ± 53	252 ± 86 ^a
CPT-11 IC ₂₀ , 2 h	130 ± 39	156 ± 27 ^a	199 ± 71 ^a
CPT-11 IC ₅₀ , 24 h	396 ± 102 ^a	171 ± 31 ^a	458 ± 102 ^a

^a Significativamente diferente dos controles não tratados ($p < 0,05$)

3.2.2 Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular

O CPT-11 e o 5-FU agem especificamente na fase S do ciclo celular, impedindo que ocorra replicação do DNA levando as células a morte (Burris III & Fields, 1994; Peters, 1995). Neste sentido, verificamos se os efeitos modulatórios dos pré-tratamentos estavam relacionados com as mudanças na distribuição das células nas fases do ciclo celular, tornando-as mais vulneráveis a citotoxicidade dos agentes.

Em nossas condições experimentais não foram observadas alterações significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular após os tratamentos, em nenhuma das três linhagens celulares (Fig. 14), indicando que a hipótese acima mencionada não é verdadeira.

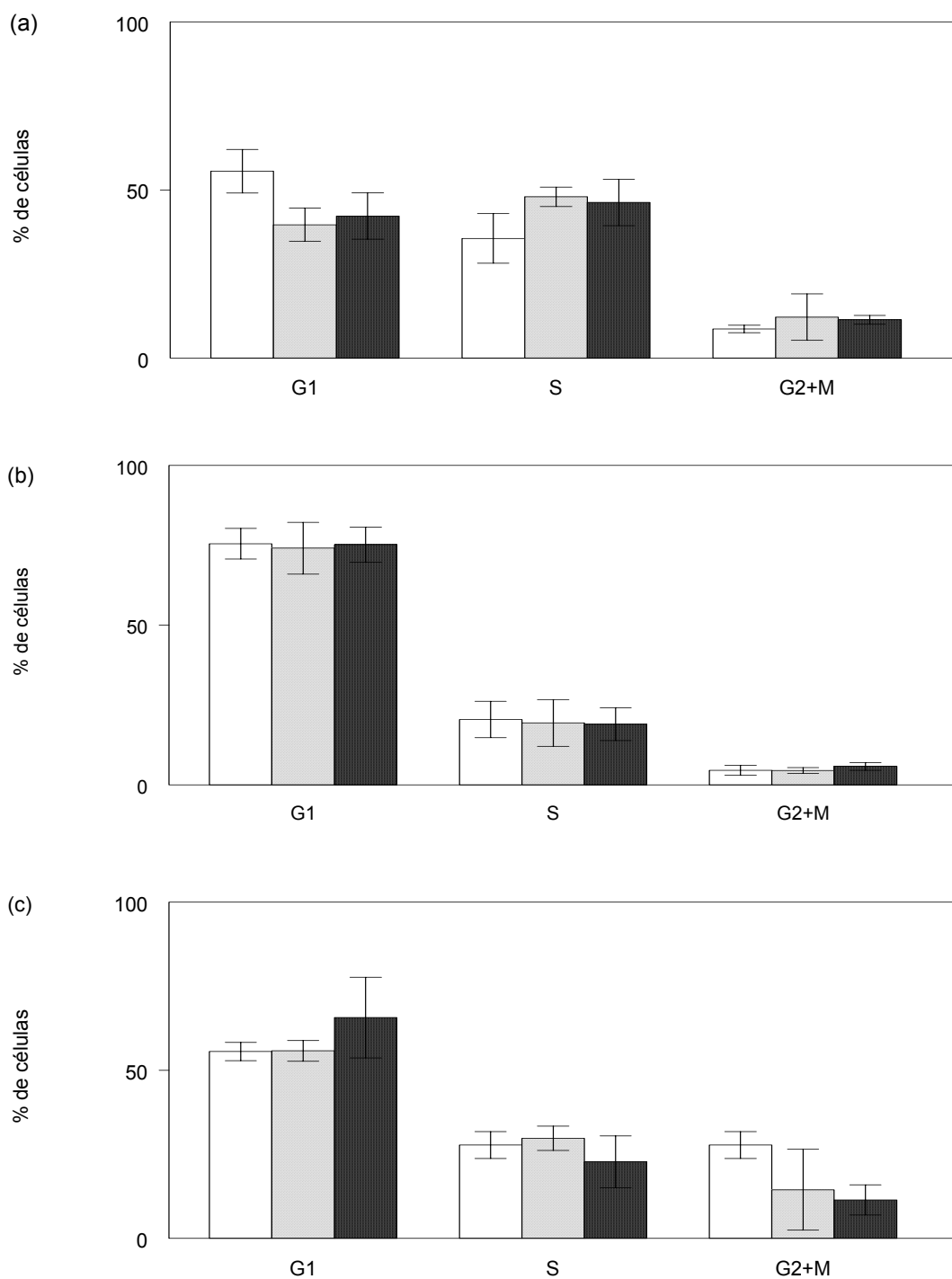


Fig. 14: Distribuição de células nas fases do ciclo celular nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (a), HT-29 (b) e SNU-C4 (c) em culturas não tratadas (□) e após tratamento com IC₂₀ do 5-FU por 2 h (▨) ou IC₂₀ do CPT-11 por 2 h (▩). A avaliação foi realizada por citometria de fluxo. Resultados são média ± DP (barras verticais; n = 3).

3.2.3 Níveis da Lactato Desidrogenase

O 5-FU pode servir como substrato para a síntese de 5-fluorouridina difosfato (FUDP)-hexose, FUDP-hexoseamina e FUDP-N-acetil-hexoseamina. Estes FUDP-açúcares podem interferir com a glicosilação de proteínas e lipídios que constituem as membranas plasmáticas das células (Peters & Van Groeningen, 1991a). Esta perturbação ao causar modificações na superfície celular, altera a permeabilidade da membrana e consequentemente interfere com os transportes transmembrana (Peters *et al.*, 1990).

Para verificarmos se o pré-tratamento por 2 h com 5-FU causava alterações na integridade da membrana plasmática, nós comparamos os níveis de LDH no meio de cultura de células tratadas com 5-FU e de células não tratadas. A LDH é uma enzima presente em todas as células do organismo, que participa da conversão do piruvato em lactato. O aumento dos níveis desta enzima no meio extracelular indica uma redução na integridade da membrana plasmática (Howell *et al.*, 1979).

Como mostrado na Tabela 12, não existe diferença significativa entre os níveis de LDH no meio de cultura das células tratadas e não tratadas em nenhuma das três linhagens. Ou seja, tratamento por 2 h com 5-FU não causa alterações nas membranas plasmáticas nas condições experimentais utilizadas, não contribuindo para os diferentes resultados observados.

Tabela 12: Níveis da enzima lactato desidrogenase (mU LDH/mg proteína; média \pm DP, n = 3) nos meios de culturas das linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4 após tratamento por 2 h com IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ do

5-FU. A avaliação foi realizada através da oxidação do NADH durante a conversão do piruvato em lactato.

	SW620	HT-29	SNU-C4
Controles não tratados	16,5 ± 3,2	22,5 ± 11,6	18 ± 3,4
5-FU IC ₂₀ , 2h	14,7 ± 3,4	31,7 ± 14,6	11,3 ± 1,5
5-FU IC ₅₀ , 2h	13,7 ± 5,1	32,5 ± 11,8	16,3 ± 6,1
5-FU IC ₈₀ , 2h	15,2 ± 4,5	23 ± 5,0	15 ± 4,2

3.2.4. Complexos DNA-Topoisomerase I

O número e/ou longevidade dos complexos DNA-topoisomerase I são importantes determinantes da citotoxicidade do CPT-11 (Burriss III & Fields, 1994). Verificamos se o efeito dos pré-tratamentos com IC₂₀ do 5-FU na citotoxicidade do CPT-11 e na indução de danos ao DNA foi causado pela formação de complexos DNA-topoisomerase I.

Nossos resultados preliminares, não demonstraram em nenhuma das três linhagens, diferença significativa no número de complexos DNA-topoisomerase I formados após tratamento (Fig. 15). No entanto, estes experimentos deverão ser confirmados.

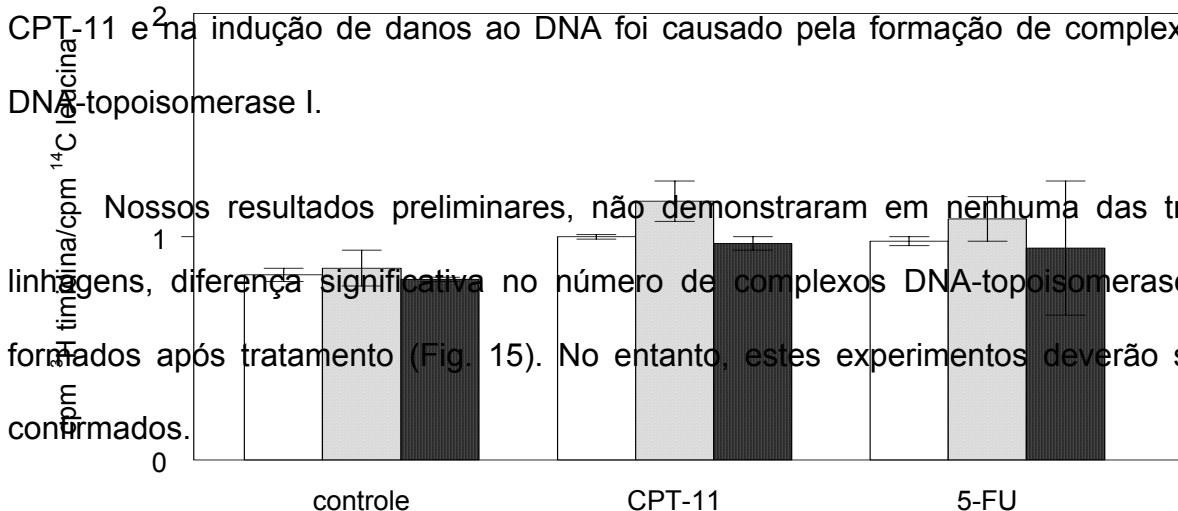


Fig. 15: Formação de complexos DNA-topoisomerase I nas linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620 (□) HT-29 (▨) e SNU-C4 (▩) após 2 h de exposição a IC₂₀ do CPT-11 ou IC₂₀ do 5-FU. A formação de DPC foi avaliada através de marcação radioativa e precipitação com SDS. Resultados são média ± DP (barras verticais; n = 3)

4. DISCUSSÃO

O câncer colorretal é o quarto tipo de tumor mais comum e a terceira causa de morte por câncer no mundo. O carcinoma de cólon é tratável e freqüentemente curável quando identificado em fases iniciais. Entretanto, a doença avançada não tem apresentado respostas satisfatórias com a terapia convencional (Venook *et al.*, 1996).

A utilização clínica do CPT-11 no câncer colorretal metastático demonstrou respostas comparáveis as obtidas com o 5-FU (Pito *et al.*, 1997). Neste sentido, estudos clínicos com 5-FU e CPT-11 foram iniciados e têm apresentado resultados promissores (Ducreux *et al.*, 1997). Portanto, o uso da combinação destas drogas representa um passo lógico no tratamento do câncer colorretal avançado. Com base nestas considerações, investigamos qual a importância da seqüência de administração destes agentes, bem como seus efeitos citotóxicos e os mecanismos moleculares possivelmente envolvidos nas respostas a esta combinação.

Usando as linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4, foi demonstrado que o pré-tratamento com CPT-11 em uma baixa concentração (IC_{20}) e por um curto período de tempo (2 h) potencializou a inibição

do crescimento celular induzida pelo 5-FU (2 a 4 vezes; Tabela 6). Entretanto a exposição ao 5-FU, nas mesmas condições, antes do CPT-11 levou a uma interação antagônica entre os agentes (2 a 4 vezes; Tabela 6). Tratamentos simultâneos com as drogas não alteraram o efeito anti-proliferativo dos agentes sozinhos nas linhagens SW620 e HT-29. Por outro lado, na linhagem SNU-C4 o CPT-11 junto com a IC_{20} do 5-FU agiu aditivamente na inibição do crescimento, enquanto que a seqüência inversa foi antagônica (aproximadamente 2 vezes; Tabela 6). Portanto, somente foi observado sinergismo quando o CPT-11 precede o 5-FU. A Tabela 4 apresenta estudos com resultados semelhantes.

Embora as três linhagens tenham apresentado significativa diferença (até 8 vezes) na sensibilidade ao 5-FU, elas demonstraram pequenas diferenças (2 vezes) nas respostas ao CPT-11. Estes achados estão de acordo com a ausência de resistência cruzada entre os agentes e com a eficácia do CPT-11 em carcinomas de cólon resistentes ao 5-FU (Benson III, 1998; Rougier *et al.*, 1997; Rothenberg *et al.*, 1996).

Para verificar se as diferenças nas respostas ao CPT-11 e ao 5-FU observadas entre as linhagens foram determinadas pelos principais alvos celulares dos agentes, avaliamos as atividades das enzimas TS, topoisomerase I e carboxil esterase. A inibição da TS é um importante mecanismo da citotoxicidade do 5-FU e foi demonstrado correlação entre os níveis de TS e sensibilidade ao 5-FU (Beck *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1992). A avaliação da TS nas linhagens celulares utilizadas neste estudo demonstraram uma maior relação entre as respostas ao 5-FU e a afinidade com o substrato (K_m). Considerando as diferenças de

quimiossensibilidade entre as três linhagens (SNU-C4 > HT-29 > SW620; Tabela 6), estes dados sugerem que as respostas das linhagens ao 5-FU foram determinadas, principalmente pelo K_m , da enzima, e não, pelos sítios de ligação para FdUMP ou pela atividade catalítica da TS. Estes resultados estão completamente de acordo com dados recentes (Van Triest *et al.*, 1999) em um painel de 13 linhagens celulares de cólon (incluindo SW620, HT-29 e SNU-C4) onde os sítios de ligação para o FdUMP não se relacionaram com a sensibilidade ao 5-FU. Além disso, nossos estudos com a exposição ao FdUMP por 24 h seguida de 2 dias em meio sem droga sustentam esta hipótese. Estes resultados demonstraram, diferenças na sensibilidade, semelhantes as taxas de K_m de 3:2:1 nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente (IC_{50} $14,5 \pm 2,0$, $9,5 \pm 3,5$ e $5,5 \pm 0,4$ μM , respectivamente). Contudo, devemos levar em consideração que outros processos, como transportes transmembrana e rotas metabólicas (Pinedo & Peters, 1988; Peters, 1995; Van der Wilt *et al.*, 1997) devem estar envolvidos com a diferença na sensibilidade ao 5-FU.

Em relação aos semelhantes valores de IC_{50} do CPT-11 nas três linhagens, nossos resultados mostraram que a linhagem SNU-C4 apresenta maior atividade da topoisomerase I quando comparada com as linhagens SW620 e HT-29. Porém, a atividade da carboxil esterase é menor na linhagem SNU-C4 em relação as outras duas linhagens celulares. Então, os valores comparáveis da IC_{50} do CPT-11 apresentados pelas três linhagens celulares podem ser explicados pelo equilíbrio entre as diferenças nas atividades da topoisomerase I e carboxil esterase. Isto é, a menor atividade da topo I pode ter sido compensada por uma maior atividade da carboxil esterase, e vice-versa. Esta suposição é sustentada por nossos estudos

iniciais com a exposição das células ao SN-38 por 24 h seguido de 2 dias em meio sem droga, demonstrando valores de IC_{50} de $4,8 \pm 1,2$, $6,0 \pm 1,3$ e $5,1 \pm 1,4$ nM nas linhagens SW620, HT-29 e SNU-C4, respectivamente.

As diferentes combinações e seqüências utilizadas mostraram respostas diversas que aparentemente não foram determinadas somente pelas diferenças observadas nas atividades enzimáticas. Sendo o DNA o principal alvo do 5-FU e do CPT-11, nossas observações também devem ter sido atribuídas a formação de diferentes tipos e quantidade de dano ao DNA.

Quando administrado em curtos períodos de tempo o 5-FU age preferencialmente sobre o RNA através do FUTP, enquanto que em exposições prolongadas prevalece a toxicidade no DNA (Grem, 1996). Esta última é devido a inibição da TS pelo FdUMP interferindo com a síntese e/ou reparo do DNA (Peters *et al.*, 1986), ou através da interferência na elongação da cadeia de DNA após a incorporação do FdUTP, podendo formar quebras nas fitas do DNA (Yin & Rustum, 1991; Major *et al.*, 1982). A citotoxicidade do CPT-11, por sua vez, é decorrente da inibição da atividade da topoisomerase I resultando em quebras nas cadeias do DNA, independente de tempo de exposição (Takimoto & Arbusk, 1996). Como nossos tratamentos foram de 24 h, focalizamos estes estudos nos danos causados ao DNA.

Entretanto, a IC_{50} do 5-FU causou significativo dano ao DNA somente na linhagem SNU-C4 (aproximadamente 40%), o qual foi removido quando as células foram cultivadas por 2 dias em meio sem drogas. Isto pode ter ocorrido devido ao reparo por excisão de sítios apirimídicos formados durante a clivagem da ligação

glicosídica do FdUMP no DNA (Peters, 1995). Este fenômeno provavelmente ocorre em curtos períodos de exposição seguidos por um período de recuperação de aproximadamente duas vezes o tempo de duplicação celular. A ausência de dano detectável nas linhagens SW620 e HT-29 pode ser graças a uma maior resistência ao 5-FU e FdUMP quando comparamos com a linhagem SNU-C4. A inibição do crescimento pelo 5-FU nas três linhagens observada no dia 3, apesar da aparente ausência de dano ao DNA, pode ter sido determinada por outras lesões. Por exemplo, a não excisão de sítios contendo fluorouracil ou uracil (Schuetz *et al.*, 1984; Pourquier *et al.*, 1997), e/ou dano ao RNA gerado pela incorporação do FUTP nos diversos tipos de RNA (Peters, 1995).

Embora não causando lesões detectáveis inicialmente, a IC₅₀ do 5-FU quando precedida pela IC₂₀ do CPT-11 induziu a formação de aproximadamente 30% e 40% de dano nas linhagens SW620 e HT-29, respectivamente, no dia 3. Na linhagem SNU-C4, esta combinação causou aproximadamente 60% de dano ao DNA no dia 1 que foi conservado até o dia 3. Aparentemente, a exposição prévia a uma dose baixa de CPT-11 intensifica o dano ao DNA induzido pelo 5-FU, determinando uma maior inibição do crescimento celular quando comparada com a causada pelo 5-FU sozinho. Estas observações podem ser explicadas pela interferência do CPT-11 com a síntese de DNA, resultando em tentativas sem sucesso de remover e reparar o DNA que contem fluorouracil ou uracil (Pourquier *et al.*, 1997; Mattern *et al.*, 1993). Um mecanismo semelhante foi sugerido para fundamentar o sinergismo entre radiação ionizante e topotecan levando a morte células de ovário de hamster chinês e de leucemia murina P388 (Mattern *et al.*, 1991); bem como a potencialização da

citotoxicidade da cisplatina quando precedida por SN-38 em células de carcinoma escamoso HST-1 (Naoko *et al.*, 1994).

Se a perturbação na síntese do DNA causada pela utilização prévia do CPT-11 é necessária para modular a inibição do crescimento celular induzida pelo 5-FU, pode-se prever que a exposição do CPT-11 e 5-FU juntos teria um impacto menor nesse fenômeno. Isto ocorre porque, ao contrário do que foi observado quando o CPT-11 precede o 5-FU, o tratamento simultâneo com os agentes fez com que as células não perdessem a sua habilidade de resistir ao dano induzido pelo 5-FU. Particularmente, nas linhagens mais resistentes ao 5-FU, SW620 e HT-29, os efeitos adicionais do CPT-11 seriam relativamente menores, não modificando significativamente a inibição do crescimento e o dano ao DNA causado pelo 5-FU. Nossos resultados (Tabelas 6 e 11) indicam que este é o caso.

Na linhagem SNU-C4 a simultânea exposição a IC_{20} do CPT-11 reduz a inibição de crescimento mediada pelo 5-FU em mais ou menos 2 vezes. Surpreendentemente esta combinação introduziu 60% de dano ao DNA no dia 1 que persistiu até o dia 3. Este achado pode ser explicado se admitirmos que estas lesões representam um dano não letal, por exemplo sítios apirimídicos não letais detectados após tratamento com alcali durante o FADU. Embora esta suposição deva ser confirmada em estudos futuros, a possível produção deste tipo de dano não letal foi descrita anteriormente para o radical semi-quinona do agente inibidor da topoisomerase II etoposide (Mans *et al.*, 1991).

Mesmo apresentando mecanismo de ação relacionado com a indução de quebras no DNA (Champoux, 1976), a IC_{50} do CPT-11 não causou quebras

mensuráveis nas fitas de DNA em nenhuma das três linhagens. Nesta concentração, o CPT-11, pode ter não produzido suficiente quantidade de SN-38 para induzir quebras no DNA mensuráveis pelo FADU. A partir de estudos farmacocinéticos com a linhagem HT-29 exposta ao CPT-11 (Bissery *et al.*, 1991; Guichard *et al.*, 1998b) podemos inferir que em nossas condições experimentais foi formado no máximo 0.5 nM SN-38 e somente cerca de 10 rad-equivalente de quebras no DNA, quantidades muito baixas para serem detectadas pelo FADU (Kanter & Schwatz, 1982). Contudo, este pequeno número de quebras no DNA pode afetar a viabilidade celular, como foi sugerido antes para a camptotecina (Goldwasser *et al.*, 1996), e como verificado pela inibição do crescimento celular no dia 3.

A utilização da IC_{20} do 5-FU junto com a IC_{50} do CPT-11 apresentou uma situação semelhante. Somente a linhagem SNU-C4 demonstrou dano ao DNA no dia 1 que foi removido 2 dias após a retirada da droga. Estas lesões podem ter sido geradas pelo FdUTP, sendo reparadas no dia 3 (Peters & Van Groeningen, 1991; Yin & Rustum, 1991). Esta observação esta de acordo com os resultados de citotoxicidade (Tabela 6) onde o 5-FU sozinho apresenta semelhante resposta ao tratamento simultâneo da IC_{20} do 5-FU com o CPT-11 nesta linhagem. Nas linhagens resistentes ao 5-FU e menos sensíveis ao CPT-11, SW620 e HT-29 (Tabela 6) os efeitos do CPT-11 possivelmente prevaleceram sobre os do 5-FU, não introduzindo dano mensurável ao DNA.

O CPT-11 em concentração de IC_{50} precedido pela IC_{20} do 5-FU, também não interferiu com a integridade do DNA nas linhagens SW620 e HT-29, mas causou significativo dano ao DNA na linhagem SNU-C4 no dia 1, o qual foi eliminado no dia

3. Provavelmente estas lesões podem ser atribuídas ao dano causado pelo 5-FU, que foi reparado após a retirada da droga. Não obstante, a exposição a IC₂₀ do 5-FU antes do CPT-11 levou a uma diminuição na inibição do crescimento celular (2 a 4 vezes) quando comparado com o observado com o CPT-11 sozinho. Este aparente antagonismo pode ter sido causado pela inibição da síntese do DNA induzida pelo FdUMP e/ou FdUTP (Peters & Van Groeningen, 1991a; Yin & Rustum, 1991; Major *et al.*, 1982). Isto estaria impedindo a ação do CPT-11, que necessita do processo de replicação do DNA em andamento (Burriss III & Fields, 1994). O maior antagonismo, observado na linhagem SNU-C4 quando comparada com as linhagens SW620 e HT-29, pode ser explicado pela maior sensibilidade ao 5-FU.

Demonstramos um efeito aditivo ou sinérgico com a IC₂₀ do CPT-11 por 2 h seguido do 5-FU, e uma interação antagônica ou aditiva com a seqüência inversa. Além disso, a avaliação dos danos ao DNA sugeriu que a produção de lesões no DNA é dependente da seqüência de exposição às drogas. Com o objetivo de entender os mecanismos destas interações investigamos se os pré-tratamentos induziram alterações no metabolismo das células, influenciando os efeitos da administração subsequente das drogas. Com este propósito, avaliamos a exposição das células por 2 h ou 24 h com IC₂₀, IC₅₀ ou IC₈₀ do 5-FU ou CPT-11 quanto a capacidade de reparo por excisão do DNA, distribuição das células nas fases do ciclo celular, integridade da membrana plasmática e a formação de complexos DNA-topoisomerase I.

O tratamento com IC₅₀ ou IC₂₀ do 5-FU por 24 h ou 2 h, respectivamente, levou a uma incorporação significativa de [³H-metil]timidina exclusivamente na

linhagem SNU-C4. Este resultado vai de encontro com nossa hipótese de que o dano causado ao DNA pelo 5-FU ocorreu pela incorporação do FdUTP no DNA, sendo reparado por excisão de sítios apirimídicos e é dependente da sensibilidade da linhagem a este agente (Peters, 1995). A incorporação não significativa de [³H-metil]timidina nas linhagens menos sensíveis ao 5-FU, SW620 e HT-29 (Tabela 12), sugere que a citotoxicidade do 5-FU nestas linhagens pode estar relacionada com outros mecanismos que não envolvem reparo por excisão. De acordo com estes resultados foi demonstrado que na linhagem HT-29 a TS representa o principal determinante da citotoxicidade do 5-FU (Pizzorno & Handschumacher, 1995).

O aumento da incorporação de [³H-metil]timidina nas três linhagens celulares (Tabela 1) quando tratadas com CPT-11 parece estar diretamente relacionado com o aumento da dose e tempo de exposição a droga. Estes resultados estão de acordo com a ação do CPT-11, isto é, a citotoxicidade do CPT-11 depende da dose e tempo de exposição (Takimoto & Arbutck, 1996). Este acréscimo na incorporação de [³H-metil]timidina indica que o dano causado pelo CPT-11 foi rapidamente reparado, não sendo possível de ser detectado pelo FADU (Tabela 11). Porém demonstrando citotoxicidade 2 dias após a remoção da droga (Tabela 6). Este fato está de acordo com resultados prévios mostrando citotoxicidade dos análogos da camptotecina mesmo após cultivo por vários dias em meio sem droga (Takimoto & Arbutck, 1996; Boothman, 1994).

Diferente do possível envolvimento dos mecanismos de reparo por excisão nos efeitos citotóxicos da combinação CPT-11/5-FU, os pré-tratamentos não causaram alterações aparentes na distribuição das células nas fases do ciclo celular,

na integridade da membrana plasmática, ou na formação de Complexos DNA-topoisomerase I.

Como demonstrado na Fig. 13, a exposição por 2 h com IC_{20} do 5-FU ou do CPT-11 não alterou significativamente a distribuição das células nas fases do ciclo celular quando comparadas com controles não tratados (Fig. 14). Estes resultados podem ter sido determinados pelo curto período de exposição aos agentes em doses relativamente baixas. De fato, utilizando incubações mais prolongadas e concentrações mais altas foi observado que o 5-FU induz a acumulação de células na fase S do ciclo celular na linhagem HT-29 (Pizzorno *et al.*, 1995). Além disso, um estudo com linhagens celulares de carcinoma de cólon humano, incluindo HT-29 e SW620, demonstrou que o número de células na fase S do ciclo celular não serve como prognóstico para a sensibilidade à camptotecina (Goldwasser *et al.*, 1995).

O 5-FU demonstrou ter a capacidade de induzir modificações na superfície celular, podendo interferir com a permeabilidade da membrana plasmática (Peters *et al.*, 1990). Além disso, elevações dos níveis de LDH foram observadas no plasma de pacientes com câncer de pâncreas após tratamento de 28 dias com 5-FU combinado com Interferon- α (Sparano *et al.*, 1996). Em nosso estudo a avaliação dos níveis de LDH no meio de cultura das células não demonstrou alterações após tratamentos com doses de até IC_{80} do 5-FU por 2 h (Tabela 12), sugerindo que o pré-tratamento com 5-FU não interfere na integridade da membrana plasmática.

Resultados iniciais não demonstraram acréscimo na formação de complexos DNA-topoisomerase I quando comparamos células não tratadas com as pré-tratadas por 2 h com IC_{20} do CPT-11 ou do 5-FU (Fig. 15) em nenhuma das três linhagens

celulares. Estas observações sugerem que esta dose não é suficiente para formar de Complexos DNA-topoisomerase I detectável pela técnica utilizada neste estudo. Por outro lado, foi demonstrado na linhagem HT-29 que o CPT-11 induz a formação de duas vezes mais complexos DNA-topoisomerase I quando comparado com células não tratadas, e que o pré tratamento com 5-FU leva a formação de 1,4 vezes mais de Complexos DNA-topoisomerase I do que células tratadas com CPT-11 (Guichard *et al.*, 1998b). Este estudo porém, foi realizado com concentrações muito altas (8,3 μM e 13,8 μM para 5-FU e CPT-11, respectivamente), fisiologicamente irrelevantes. Entretanto, estes resultados (Guichard *et al.*, 1998b) mostram a necessidade de uma confirmação de nosso estudos de formação de Complexos DNA-topoisomerase I, utilizando doses maiores e exposição mais longa aos agentes sozinhos e em combinação. Tais experimentos estão em andamento.

Juntos, os resultados do nosso estudo demonstraram que a citotoxicidade da combinação 5-FU e CPT-11 depende da seqüência de administração das drogas. Além disso, existe uma relação entre os efeitos citotóxicos da combinação e lesões introduzidas ao DNA que podem ser removidas por mecanismos de reparo por excisão, causando diferentes efeitos na viabilidade celular.

Este estudo mostra a importância da seqüência de administração do CPT-11/5-FU na utilização desta combinação no tratamento de pacientes com carcinoma colorretal avançado. Além disso, mostra que o CPT-11 pode ser utilizado como agente único em carcinomas de cólon resistentes ao 5-FU, uma vez que linhagens resistentes (SW620, HT-29) responderam ao tratamento com CPT-11. Ou ainda, que o tratamento prévio com CPT-11 em uma concentração baixa e fixa pode sensibilizar

células de câncer de cólon resistentes ao 5-FU. E que, em células de tumores sensíveis ao 5-FU, concentrações baixas de 5-FU podem adicionar à citotoxicidade do CPT-11.

Fica claro a necessidade de mais estudos para elucidar a interferência de outros determinantes da citotoxicidade destes agentes. Neste sentido, estamos no momento, investigando o impacto das drogas nas atividades da topoisomerase I e da timidilato sintase, além dos efeitos dos metabólitos SN-38 e 5FdUMP. Sabe-se que o 5-FU e CPT-11 não somente inibem o crescimento celular, mas também levam as células a morte por apoptose. Estudos bastante recentes (Albanese *et al.*, 1999) sugerem a interferência do 5-FU e CPT11 na expressão do FAS, um receptor envolvido na indução da apoptose em câncer de cólon, fenômeno que também será investigado em estudos futuros.

5. CONCLUSÕES

Usando as linhagens celulares de carcinoma de cólon humano SW620, HT-29 e SNU-C4 mostramos neste estudo que:

- A sensibilidade celular ao 5-FU foi determinada principalmente pelo Km e não pelos sítios de ligação nem pela atividade catalítica da TS.
- O equilíbrio entre as atividades da topoisomerase I e carboxil esterase determinou as respostas celulares ao CPT-11.
- A combinação do 5-FU com CPT-11 causa um maior efeito na inibição do crescimento quando comparada com os agentes sozinhos somente quando o CPT-11 precede o 5-FU.
- A seqüência inversa age antagonicamente.
- A inibição do crescimento celular pela combinação CPT-11/5-FU e a introdução de danos ao DNA estão relacionadas, e dependem da seqüência de administração das drogas.

- Este fenômeno deve estar associado com um maior ou menor efeito nos mecanismos de reparo por excisão do DNA, induzido pelos pré-tratamentos.
- Os pré-tratamentos com 5-FU ou CPT-11 não induziram alterações significativas na distribuição das células nas fases do ciclo celular, na integridade da membrana plasmática e na formação dos complexos DNA-topoisomerase I, portanto não contribuíram para as nossas observações.
- Avaliações clínicas do uso de doses baixas do CPT-11 antes do 5-FU em carcinoma de cólon avançado estão justificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, RLP, BERRYMAN, S, THOMPSON, A. Deoxyribonucleoside triphosphate pools in synchronized and drug-inhibited L 929 cells. *Biochim Biophys Acta* 240: 455-462, 1971.
- Advanced Colorectal Cancer Meta-analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. *J Clin Oncol* 10: 896-903, 1992.
- AKUTSU, M, SUZUKI, K, TSUNODA, S, *et al.* Effects of SN-38 in combination with other anticancer agents against Dauji cells. *Gan To Kagaku Ryoho* 21: 1607-1611, 1994.
- ALBANESE, J, KRECZKO, S, ROSMAN, M *et al.* Modulation of fas expression in colon carcinoma cells by ionizing radiation and anti-cancer drugs. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 1495, 1999.
- American Joint Committee of colon and rectum cancer. In: BEAHRS, OH, HENSON, DE, HUTTER, RV, *et al.* eds. Manual for staging of cancer. 3 ed. Philadelphia: JB Lippincott, 75-80, 1988.
- ANDRÉ, T, DE GRAMONT, A, LOUVET, C, *et al.* Bi-monthly CPT-11 with leucovorin (LV) and 5-fluorouracil in pretreated metastatic colorectal cancer (FOLFIRI). in combination with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil as first line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17: 273a, 1998.
- ARBUCK, SG, TAKIMOTO, CH. An overview of topoisomerase I - targeting agents. *Semin Hematol* 35: 3-12, 1998.
- ASTLER, VB, COLLER, FA. The prognostic significance of direct extension of carcinomas of the colon and rectum. *Ann Surg* 139: 846-851, 1958.
- ATCC catalogue of cell lines and hybridomas. American Type Culture Collection: Rockville, USA, 116-227, 1992.

- AVGERPOULOS, NG, BATCHELOR, TT. New treatment strategies for malignant gliomas. *The Oncol* 4: 209-224, 1999.
- BARONE, C, POZZO, C, STARKHAMMAR, H, *et al.* CPT-11 alternating with 5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA): a multicenter phase II study in first-line chemotherapy (CT) of metastatic colorectal cancer (CRC). Preliminary results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 16: 270a, 1997.
- BECK, A, ETIENNE, MC, CHRADAME, S, *et al.* A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumor sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 10: 1408-1411, 1994.
- BENHAMMOUDA A, BASTIAN G, RIXE O, *et al.* A phase I and pharmacokinetic (PK) study of CPT-11 (C) and 5-FU (F) combination. *Proc Am Soc Clin Oncol* 16: 202a, 1997.
- BENSON III, AB. Therapy for advanced colorectal cancer. *Sem Oncol*, 25: 2-11, 1998.
- BEVILACQUA, RG, CERQUEIRA, EMM, ALCÂNARA, PSM. Genética em câncer digestivo. In: CASTRO, LP, Savassi-Rocha PR, Petroianu A eds. Tópicos em gastroenterologia: Rio de Janeiro (Brasil), MEDSI, 31-48, 1997.
- BISSERY, MC, MATHIEU-BOUE, A, LAVELLE, F. Preclinical evaluation of CPT-11, a camptothecin derivative. *Proc Am Assoc Cancer Res* 32: 401, 1991.
- BOOTHMAN, DA. Enhanced malignant transformation is accompanied by increased survival recovery after ionizing radiation in Chinese hamster embryo fibroblasts. *Radiat Res* 138: 121-125, 1994.
- BOS, JL, FEARON, ER, HAMILTON, SR, *et al.* Prevalence of ras gene mutation in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297, 1987.
- BOSTICK, RM, POTTER, JD, FOSDICK, L *et al.* Calcium and colorectal epithelial cell proliferation: a preliminary randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 85: 132-141, 1993.
- BURRIS III, HA, FIELDS, SM. Topoisomerase I inhibitors. *New Drug Therapy* 2: 333-351, 1994.
- CARTER, SK. Large bowel cancer - the current status of treatment. *J Natl Cancer Inst* 56: 3-10, 1976.
- CHAMPOUX, J. Evidence for an intermediate with a single-strand break in the reaction catalyzed by the DNA untwisting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3488-3491, 1976.
- CHOU, T-C, TALAHAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationship: the

- combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors. In Weber G, ed. *Advances in enzyme regulation*. New York (USA), Pergamon Press, 27-55, 1983.
- Chronic Diseases: The Nation's Leading Causes of Death. *Drug Benefit Trends* 10(11): 45-46, 1998.
- COHEN, AM, MINSKY, BB, SCHILSKY, RL. Cancer of the colon. In DEVITA, VT, HELLMAN, S, ROSENBERG, AS, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia (USA), Lippincott-Raven, 1144-1196, 1997.
- CREPSI, MD, IVANIER, SE, GENOVESE, J, et al. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 521-528, 1986.
- DUCREUX, M, ROUGIER, M, YCHOU, M, et al. Phase I/II study of escalating dose of CPT-11 in combination with LV5FU2 ("De Gramont" regimen) every two weeks in the treatment of colorectal cancer (CRC) after 5-FU failure. *Proc Am Soc Clin Oncol* 16: 234a, 1997.
- DUKES, CE, BUSSEY, HJR. The spreads of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12: 309-320, 1954.
- ERLICHMAN, C, SVINGEN, PA, MULLANY, AS, et al. Synergistic interaction of SN-38 and 5-FU/Leucovorin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 37: 294, 1996.
- FALCONE, A, ALLEGRINI, G, MASI, G, et al. Irinotecan in combination with leucovorin and 5-fluorouracil 48 hours continuous infusion: a phase I study with pharmacokinetics, DNA damage and topoisomerase I-DNA complexes evaluation in chemotherapy naive metastatic colorectal cancer patients. in combination with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil as first line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17: 290a, 1998.
- FEARON, ER, CHO, KR, NIGRO, JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56, 1990.
- FEARON ER. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In MENDELSON, J, HOWLEY, P, ISRAEL, M et al., eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia (USA), WB Saunders Company, 340-357, 1995.
- FILIPSKI, J, KOHN, KW. Ellipticine-induced protein associated DNA breaks in isolated L1210 nuclei. *Biochem Biophys Acta* 698: 280-286, 1982.
- FONSECA, R, GOLDBERG, RM, ERLICHMAN, C, et al. Phase I study of CPT-11/5-FU/leucovorin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38: 76, 1997.

- FONSECA R, GOLDBERG RM, ERLICHAMN C, *et al.* Phase I study of the combination of CPT-11/5-FU and leucovorin (LV) in combination with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil as first line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17: 203a, 1998.
- FRESHNEY, RI. Measurement of cytotoxicity and viability. In LISS, AR ed. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York: IRL Press, 245-256, 1987.
- GARDNER, EJ. Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am J Hun Genet* 14: 376-390, 1962.
- Gastrointestinal Tumor Study Group. Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med* 312: 1465-1472, 1975.
- GIOVANNUCCI, E, RIMM, EB, STAMPFER, MJ, *et al.* A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men. *J Natl Cancer Inst* 86: 183-191, 1994.
- GOLDWASSER, F, BAE, I, VALENTI, M, *et al.* Topoisomerase I- related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute Anticancer Screen. *Cancer Res* 55: 2116-2121, 1995.
- GOLDWASSER, F, SHIMIZU, T, JACKMAN, J, *et al.* Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 56: 4430-4437, 1996.
- GREM, JL. Fluoropyrimidines. In CHABNER, BA, LONGO, DL, eds. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. Philadelphia (USA), Lippincott-Raven, 149-212, 1996.
- GRIFFITHS, B. Scaling-up of animal cell cultures. In FRESHNEY, RI ed. *Animal cell culture: A practical approach*. 2 ed. New York: IRL Press, 47-93, 1992.
- GRIVICICH I, MANS DRA, DA ROCHA AB, *et al.* The cytotoxicity of the irinotecan (CPT-11)-5-fluorouracil (5-FU) combination in human colon carcinoma cell lines is related to the sequence-dependent introduction of DNA lesions. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38: 318, 1997.
- GROSSIN, F, BARBAULT, H, BENHAMMOUDA, A, *et al.* A phase I pharmacokinetics study of concomitant CPT-11 (C) and 5-FU (F) combination. *Proc Am Assoc Cancer Res* 37: 168, 1996.
- GUICHARD, SM, MORTON, CL, KRULL, EJ, *et al.* Conversion of the CPT-11 metabolite APC to SN-38 by rabbit liver carboxylesterase. *Clin Cancer Res* 4: 3089-3094, 1998a.

- GUICHARD S, HENNEBELLE I, BUGAT R, *et al.* Cellular interactions of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11 (irinotecan) in a human colorectal carcinoma cell line. *Biochem Pharmacol* 55: 667-676, 1998b.
- GUICHARD, S, CUSSAC, D, HENNEBELLE, I, *et al.* Sequence-dependent activity of the irinotecan-5-FU combination in human colon-cancer model HT-29 in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 73: 729-734, 1997.
- HAAZ MC, RICHE C, RIVORY LP, *et al.* Biosynthesis of an aminopiperidino metabolite of irinotecan [7-ethyl-10-[4-1-piperidino]carbonyloxycamptothecine] by human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 26: 769-774, 1998.
- HALLER, DG. Chemotherapy in gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 15 (suppl 4): 50-64, 1988.
- HARSTRICK, A, VANHOEFER, U, MÜLLER, C, *et a.* Combination of CPT-11 and 5-FU in colorectal cancer: Preclinical rationale and initial phase I results. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38: 318, 1997.
- HEIDELBERGER, C, CHANAKARI, NK, DANENBERG, PV, *et al.* Fluorinated pyrimidines: a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 179: 663-666, 1957.
- HEYMANN, E, MENTLEIN, R. Carboxylesterases – amidases. *Methods Enzymol* 77, 333-344, 1981.
- HOUGHTON, JA, CHESHIRE, PJ, HALLMAN, JD 2ND, *et al.* Evaluation of irinotecan in combination with 5-fluorouracil or etoposide in xenograft models of colon adenocarcinoma and rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2: 107-118, 1996.
- HOWELL, BF, MCCLURE, S, SCHAFFER, R. Lactate-o-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination. *Clin Chem* 25: 269-272, 1979.
- JACKMAN, AL, FARRUGIA, DC, GIBSON, W, *et al.* ZD1694 (Tomudex): a new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A: 1277-1282, 1995.
- JANSEN, WJ, ZWART, B, HULSCHER, ST, *et al.* CPT-11 in human colon cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *Int J Cancer* 70, 335-340, 1997.
- JESSUP, JM, MCGINNIS, LS, WINCHESTER, DP *et al.* Clinical highlights from the national cancer data base: 1996. *CA Cancer J Clin* 46: 185-187, 1996.
- JOHNSTON, PG, DRAKE, JC, TREPEL, J, *et al.* Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and – resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 4306-4312, 1992.

- KAKOLYRIS, S, ANDROULAKIS, N, SOUGLAKOS, J, *et al.* Phase I study with irinotecan (CPT-11) plus 5-fluorouracil (5-FU; 4-DY C.I) combination in advanced colon cancer. in combination with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil as first line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17: 278a, 1998.
- KANEDA, N, NAGATA, H, FURUTA, T, *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res* 50: 1715-1720, 1990.
- KANO, Y, SUZUKI, K, AKUTSU, M, *et al.* Effects of CPT-11 in combination with other anti-cancer agents in culture. *Int J Cancer* 50: 604-610, 1992.
- KANTER PM, SCHWARTZ HS. A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Mol Pharmacol* 22: 145-151, 1982.
- KAWATO, Y, AONUMA, M, HIROTA, Y, *et al.* Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 51: 4187-4191, 1991.
- KUNIMOTO, T, NITTA, K, TANAKA, T, *et al.* Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res* 47: 5944-5947, 1987.
- LEMOINE, NR. The *c-ras* oncogenes and GAP. In CARNEY D, SIKORA K eds. *Genes and cancer*. England: John Willey & Sons, 19-42, 1990.
- LEVINE, AJ. Tumor suppressor genes. In MENDELSON, J, HOWLEY, P, ISRAEL, M *et al.*, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia (USA), WB Saunders Company, 86-104, 1995.
- LIU, LF, MILLER, KG. Eucaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3487-3491, 1981.
- LIU, B, FARRINGTON, SM, PETERSEN, GM *et al.* Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nature (Med.)* 1: 348-352, 1995.
- LOWRY, OH, ROSEBROUGH, NJ, FARR, L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- LYNCH, HT, ALBANO, WA, LYNCH, JF, *et al.* Recognition of the cancer family syndrome. *Gastroenterology* 84: 672-673, 1983.
- MACHOVER, D, DIAZ-RUBIO, E, DE GRAMONT, A, *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. *Ann Oncol* 7: 95-98, 1996.

- MAJOR, PP, EGAN, E, HERRICK, D, *et al.* 5-Fluorouracil incorporation in DNA of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 42: 3005-3009, 1982.
- MANDEL, HG. The target cell determinants of the antitumor actions of 5-FU: does 5-FU incorporation into RNA play a role. *Cancer treatment Reports*, 65: 63-71, 1981.
- MANS, DRA, LAFLEUR, MVM, WESTMIJZE, EJ, *et al.* Formation of different reaction products with single- and double-stranded DNA by the ortho-quinone and the semi-quinone free radical of etoposide (VP-16-213). *Biochem Pharmacol* 42: 2131-2139, 1991.
- MANS, DRA, BRONDANI DA ROCHA, A, GRIVICICH, I *et al.* The cytotoxicity of the irinotecan (CPT-11)-5-fluorouracil (5-FU) combination in human colon carcinoma cell lines is sequence-dependent. *Annals of Oncol* 9, 1996a.
- MANS DRA, BRONDANI DA ROCHA A. ,VARGAS SCWARTZBOLD C, *et al.* Assessment of the efficacy of the irinotecan (CPT-11)-5-fluorouracil (5-FU) combination in a panel of human colon carcinoma cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 37: 291, 1996b.
- MANS, DRA, GRIVICICH, I, PETERS, GJ, *et al.* Sequence-dependent growth inhibition and DNA damage formation by the irinotecan-5-fluorouracil combination in human colon carcinoma cell lines. Aceito para publicação no *Eur J Cancer*, 1999.
- MATSUOKA, H, YANO, K, TAKIGUCHI, S, *et al.* Advantage of combined treatment of CPT-11 and 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 15: 1447-1452, 1995.
- MATTERN, MR, HOFMANN, GA, MCCABE, FL, *et al.* Synergistic cell killing by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864). *Cancer Res* 51: 5813-5816, 1991.
- MATTERN, MR, ZWELLING, LA, KERRIGAN, DJ, *et al.* Reconstitution of higher order DNA structure following X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 1077-1084, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Programas de Controle de Câncer - Pro-Onco. "O problema do Câncer no Brasil". 4.ed. Rio de Janeiro, 1999.
- MONKS, A, SCUDIERO, D, SKEHAN, P, *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766, 1991.
- MUKHERJEE, JJ, JAY, FT, CHOY, PC. Purification, characterization and modulation of a microsomal carboxylesterase in rat liver for the hydrolysis of acyl-CoA. *Biochem J* 295: 81-86, 1993.
- MULLANY, S, SVINGEN, PA, KAUFMANN, SH, *et al.* Effect of adding the topoisomerase I poison 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) to 5-fluorouracil

- and folinic acid in HCT-8 cells: elevated dTTP pools and enhanced cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 391-399, 1998.
- MURPHY, GP, LAWRENCE, JR. W, LENHARD JR, RE. American Cancer Society Textbook of Clinical Oncology. Second edition. American Cancer Society, Atlanta, Ga., 1995
- NAOKO, M, NAKANO, S, ESAKI, T, *et al.* Modulation of the removal of cisplatin-induced interstrand cross-links by 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) in a human squamous carcinoma cell line. *Proc Am Assoc Cancer Res* 35: A1984, 1994.
- NOWELL, PC. Mechanisms of Tumor Progression. *Cancer* 6: 2203-2207, 1986.
- PAVILLARD, V, FORMENTO, P, ROSTAGNO, P, *et al.* Combination of irinotecan (CPT-11) and 5-fluorouracil with an analysis of cellular determinants of drug activity. *Biochem Pharmacol* 56: 1315-1322, 1998.
- PETERS, GJ, LAURENSSE, E, LEYVA, A, *et al.* Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 46: 20-28, 1986.
- PETERS, GJ, PINEDO, HM, FERWEDA, W, *et al.* Do antimetabolites interfere with the glycosylation of cellular glycoconjugates? *Eur J Cancer* 26: 516-523, 1990.
- PETERS, GJ, VAN GROENINGEN, CJ, LAURENSSE, E, *et al.* Thymidylate synthase from untreated human colorectal cancer and colonic mucosa: enzyme activity and inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate. *Eur J Cancer* 27: 263-267, 1991.
- PETERS, GJ, VAN GROENINGEN, CJ. Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil. *Ann Oncol* 2: 469-480, 1991.
- PETERS, GJ. Antimetabolites. In PECKHAM, M, PINEDO, H, VERONESI, U, eds. Oxford Textbook of oncology. 1 v. Oxford University Press, 524-552, 1995.
- PETERS, GJ, JANSEN, G. Resistance to antimetabolites. IN SCHILSKY, RL, MILANO, GA, RATAIN, MJ, eds. Principles of antineoplastic drug development and pharmacology. Merck Dekker, Inc, 543-585, 1996.
- PETERS, GJ, KOHNE, CH. Fluoropyrimidines as antifolate drugs. In JACKMAN, AL, ed. Anticancer drug development guide: antifolate drugs in cancer therapy. Totowa (USA), Humana Press, 101-145, 1997.
- PINEDO, HM, PETERS GJ. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6: 1653-1664, 1988.
- PITO, HC, WENDER, DB, O'CONNELL, MJ, *et al.* Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 15, 2910-2919, 1997.

- PIZZORNO, G, HANDSCHUMACHER, RE. Effect of clinically modeled regimens on the growth response and development of resistance in human colon carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 49: 559-565, 1995.
- PIZZORNO, G, SUN, Z, HANDSCHUMACHER, RE. Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 49: 553-557, 1995.
- PORQUIER, P, UENG, LM, KOHLHAGEN, G, *et al.* Effects of uracil in incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J Biol Chem* 272: 7792-7796, 1997.
- POTTER, JD. Reconciling the epidemiology, physiology, and molecular biology of colon cancer. *JAMA* 268: 1573-1577, 1992.
- RAMOS JR, J. *Oncologia Clínica*. São Paulo: Sarvier, 1984, 320 p.
- RIVORY, LP, RIOU, JF, HAAZ, MC, *et al.* Identification and properties of a major plasma metabolite of irinotecan (CPT-11) isolated from the plasma of patients. *Cancer Res* 56: 3689-3694, 1996.
- ROTHENBERG, ML, ECKARDT, JR, KUHN, JG, *et al.* Phase II trial of irinotecan in patients with progressive or rapidly recurrent colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 1128-1135, 1996.
- ROTHENBERG, ML, PAZDUR, R, ROWNSKY, EK, *et al.* A phase II multicenter trial of alternating cycles of irinotecan (CPT-11) and 5-FU/LV in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (CRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 16: 266a, 1997
- ROUGIER, P, BUGAT, R, DOUILLARD, JY, *et al.* Phase II study of irinotecan in the treatment of advanced colorectal cancer in chemotherapy-naïve patients and patients pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 15, 251-260, 1997.
- SALTZ, LB, KANOWITZ, J, KEMENY, NE, *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 14: 2959-2967, 1996.
- SANDOVAL, A, CONSOLI, U, PLUNKETT, W. Fludarabine-mediated inhibition of nucleotide excision repair induces apoptosis in quiescent human lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2: 1731-1741, 1996.
- SASAKI, Y, OHTSU, A, SHIMADA, Y *et al.* Simultaneous administration of CPT-11 and fluorouracil: alteration of the pharmacokinetics of CPT-11 and SN-38 in patients with advanced colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 86: 1096-1098, 1994.
- SCHLEUCHER N, HARSTRICK A, STAHL M, *et al.* Evaluation of the interactions of SN-38, a topoisomerase I inhibitor and various cytotoxic agents in established

- human colorectal and lung carcinoma cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 37: 288, 1996.
- SCHUETZ, JD, WALLACE, HJ, DIASIO, RB. 5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity. *Cancer Res* 44: 1358-1363, 1984.
- SHIMADA, Y, YOSHINO, M, WAKUI, A, et al. Phase II study of CPT-11, a new Camptothecin derivative, in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 11: 909-913, 1993.
- SHIRAO, K, KONDO, H, MATSUMURA, Y, et al. Phase I study of CPT-11 combined with sequential 5-FU in metastatic colorectal cancer (CRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 15: 481, 1996.
- SHUETZ, JD, DIASIO, RB. The effect of 5-fluorouracil on DNA chain elongation in intact bone marrow cells. *Biochem and Biophys Res Comm* 133: 161-167, 1985.
- SLATTER, JG, SU, P, SAMS, JP, et al. *Wienkers LC*. Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterase and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos* 25: 1157-1164, 1997.
- SPARANO, JA, LIPSITZ, S, WADLER, S, et al. Phase II trial of prolonged continuous infusion of 5-fluorouracil and interferon-alpha in patients with advanced pancreatic cancer. Eastern Cooperative Oncology Group Protocol 3292. *Am J Clin Oncol* 19: 546-551, 1996.
- STEWART, AF, SCHUTZ, G. Camptothecin - induced *in vivo* topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 50: 1109-1117, 1987.
- TAKIMOTO, CH, ARBUCK, SG. Camptothecins. In CHABNER, BA, LONGO, DL, eds. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. Philadelphia (USA), Lippincott-Raven, 463-484, 1996.
- TAKIMOTO, CH, KIEFFER, LV, ARBUCK, SG. DNA topoisomerase I inhibitors. In PINEDO, H, LONGO, DL, CHABNER, BA, eds. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual* 17. Elsevier Science, 79-113, 1997.
- TANIZAWA, A, FUJIMORI, A, FUJIMORI, Y, et al. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 86, 836-842, 1994.
- TURCOT, J, DESPRES, JP, ST, PIERRE F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 2: 645-468, 1959.

- VAN CUTSEM, E, ROUGIER, PH, DROZ, JP, *et al.* Clinical benefit of irinotecan (CPT-11) in metastatic colorectal cancer (CRC) resistant to 5-FU. *Proc Am Soc Clin Oncol* 16: 268A, 1997.
- VAN CUTSEM, E, POZZO, C, STARKHAMMAR, H, *et al.* A phase II study of irinotecan alternated with five days bolus of 5-fluorouracil and leucovorin in first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 9: 1199-1204, 1998.
- VAN DER WILT, CL, PINEDO, HM, SMID, K, *et al.* Elevation of thymidylate synthase following 5-fluorouracil treatment is prevented by the addition of leucovorin in murine colon tumors. *Cancer Res* 52: 4922-4928, 1992.
- VAN DER WILT, CL, SMID, K, AHERNE, GW, *et al.* Biochemical mechanisms of interferon modulation of 5-fluorouracil activity in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 33: 471-478, 1997.
- VAN TRIEST, B, PINEDO, HM, VAN HENSBERGEN, Y, *et al.* Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 5: 643-654, 1999.
- VANHOEFER, U, HAPKE, G, HARSTRICK, A, *et al.* Schedule-dependent antitumor efficacy of irinotecan (CPT-11) in 5-FU resistant human colon tumor xenograft HT29R1. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 728, 1999a.
- VANHOEFER, U, HARSTRICK, A, KÖHNE, C, *et al.* Phase I study of a weekly schedule of irinotecan, high-dose leucovorin, and infusional fluorouracil as first-line chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 17: 907-913, 1999b.
- VENOOK, A, GOODNIGHT, J, KUMAR, S, *et al.* Practice guidelines for colorectal cancer. *The Can J* 2: S23-S36, 1996.
- VINDELOV, LL, CHRISTENSEN, ID, NISSEN, NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometry DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983.
- VOLGESTEIN, B, FEARON, ER, HAMILTON, SR, *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 319:525-532, 1988.
- VOSBERG, HP. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. *Curr Top Microbiol Immunol* 114: 19-102, 1985.
- WEINBERG, RA. Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138, 1991.
- WINGO, PA, TONG, T, BOLDEN, S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 45: 8-30, 1995.

YIN, M, RUSTUM, YM. Comparative DNA strand breakage induced by Fura and FdUrd in human ileocecal adenocarcinoma (HCT-8) cells: relevance to cell growth inhibition. *Cancer Commun* 3: 45-52, 1991.

ZEGHARI-SQUALLI N, MISSET JL, GOLDWASSER F. Mechanism of the in vitro interaction between SN-38 and 5-FU. *Proc Am Assoc Cancer Res* 38: 19, 1997.

ZWELLING, LA, HINDS, M, CHAN, D, et al. Characterization of an Amsacrine-resistant Line of Human leukemia cells. *J Biol Chem* 264: 16411-16420, 1989.

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most frequent human malignancies, and the third leading cause of cancer death in the world. Notwithstanding important improvements in therapeutic strategies, results in advanced disease remain unsatisfactory. This is illustrated by the fact that the most widely used drug in this malignancy, the antimetabolite 5-fluorouracil (5-FU), was more than 40 years ago developed, and produces response rates of only 10-15%. Recently, the topoisomerase I inhibitor irinotecan (CPT-11) was found to elicit comparable responses rates in both untreated and 5-FU-pretreated, relapsed patients suffering from colon carcinoma. This prompted the evaluation of the 5-FU/CPT-11 combination in this disease. Although the obtained results in early clinical studies are promising, the best sequence of administration has yet to be established.

In this study, the CPT-11/5-FU combination has been evaluated for increased cell growth inhibition with respect to that by either agent alone in the SW620, HT-29, and SNU-C4 human colon carcinoma cell lines. For this purpose, cells were exposed to either drug alone or to various combinations and sequences of fixed, low doses (IC_{20}) of one drug, with higher, varying doses of the other. Then assessed for cell growth inhibition by the sulforhodamine B assay, either immediately, and/or after culturing for 2 additional days in drug-free medium. The interactions between CPT-11 and 5-FU were evaluated using a computer program for multiple drug effect analysis, which enables calculation of combination indices (CIs) referring to synergism, additivity, or antagonism when < 1 , $= 1$, or > 1 , respectively. Cellular responses were related to thymidylate synthase, topoisomerase I, and carboxyl esterase activities, assessed by a ligand-binding and a 3H -release assay, a DNA decatenation assay, and a spectrophotometric method, respectively. As DNA damage formation is implicated in the mechanism of action of both drugs, cellular responses were also related to the introduction of frank and/or alkali-labile DNA strand-breaks using a fluorescence-enhancement assay for DNA unwinding. To better understand the molecular basis of the drug interactions, we furthermore examined the effects of 2 h or 24 h IC_{20} , IC_{50} , and/or IC_{80} of 5-FU or CPT-11 alone on cellular determinants likely relevant to drug cytotoxicity. These included DNA excision repair capacity, cell cycle phase distribution, plasma membrane integrity, and DNA-topoisomerase I complex formation. For these purposes we made use of a [3H -methyl]thymidine incorporation

assay, fluorescence-activated cell sorting, lactate dehydrogenase (LDH) release into the culture medium, and an SDS precipitation assay, respectively.

The cell growth inhibition studies showed IC_{50} values for 5-FU alone in the SW620, HT-29, and SNU-C4 cells of approximately 15, 8, and 2 μ M, respectively, and for CPT-11 of approximately 2, 2, and 4 μ M, respectively. The differential sensitivities of the cell lines to 5-FU alone were mainly determined by differences in substrate affinity. The comparable cellular sensitivities to CPT-11 alone might be accounted for by the counterbalancing effects of differences in topoisomerase I and carboxyl esterase activities. Multiple drug effect analysis showed additivity to synergism by IC_{20} CPT-11 prior to 5-FU in all three cell lines. On the other hand, pretreatment with IC_{20} 5-FU antagonized the CPT-11-mediated growth inhibition. None of the simultaneous drug treatments produced more cell growth inhibition than either drug alone in the SW620 and the HT-29 cells, but these treatments were additive or antagonistic in the SNU-C4 cells, depending on the ratio of the drugs. Considerable DNA damage in the SW620 and HT-29 cells was only evident when IC_{20} CPT-11 preceded IC_{50} 5-FU. In the SNU-C4 cells, not only such a treatment, but also simultaneous drug treatment produced more DNA damage than either drug alone. Two or 24 h IC_{20} , IC_{50} , and/or IC_{80} of 5-FU or CPT-11 did not cause significant alterations in cell cycle phase distribution, medium concentrations of LDH, or DNA-topoisomerase I complex formation. This indicated that alterations in these determinants were not involved in the modulating effects the prior treatment on drug cytotoxicity. However, [3 H-methyl]thymidine incorporation in cells treated with CPT-11 in the presence of hydroxyurea, increased with more prolonged exposure times and higher drug concentrations. This suggested a time- and dose-dependent introduction of DNA damage by CPT-11 that was removed through excision repair mechanisms. Significant incorporation of [3 H-methyl]thymidine in 5-FU-treated cells was only seen after 2 h exposure to IC_{20} of this drug, suggesting that excision repair mechanisms were only operative on the damage introduced by low doses, and short exposure periods to 5-FU.

Taken together, the results of this study showed clear sequence-dependent anti-proliferative effects and DNA damage formation by CPT-11 plus 5-FU in the SW620, HT-29, and SNU-C4 human colon carcinoma cell lines at combinations of low, fixed doses of one drug with higher, varying doses of the other. Different effects of prior low-dose drug treatment on DNA repair machinery may determined this phenomena.