1 9 9 3

OPTIMIZAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE QUIMIOSENSIBILIDADE *in vitro* PARA ESTUDO DA RESISTÊNCIA FARMACOLÓGICA EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Mestrado de Oncobiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

1 9 9 1 1 9 9 3

MARIA JOÃO dos REIS CONCEIÇÃO MARTINS

Optimização De Dois Métodos De Avaliação De Quimiossensibilidade *in vitro* Para Estudo Da Resistência Farmacológica Em Neoplasias Hematológicas.

Maria João Dos Reis Conceição Martins

Faculdade De Medicina do Porto
1993

Dissertação de candidatura ao Grau de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Artigo 48º, parágrafo 3 - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto - Decreto nº 19337, 29 de Janeiro de 1931).

ABREVIATURAS

Ara C - citosina arabinosídeo (peso molecular = 243.22)
Ara CTP - trifosfato de citosina arabinosídeo
Ara CMP - monofosfato de citosina arabinosídeo
Arg - arginina
ATP - "adenosine triphosphate", trifosfato de adenosina
b. - baixo
Ca - cálcio
cat. - catálogo
cc. - concentração
ccs - concentrações
cél/ml - células por mililitro
cél/poço - células por poço
cf. - conforme
CHO - "chinese Hamster ovary"
cit. - citado
CMN - células mononucleares
cont. - controlo
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - "deoxyribonucleic acid", ácido deoxirribonucleico
D.O. - densidade óptica
doxo - doxorrubicina (peso molecular = 543.34)
dsb - "double strand break", quebra dupla no DNA
DXR - doxorrubicina
EDTA - "ethylenediaminetetraacetic acid"
EPD - etoposídeo (peso molecular = 588.58)
et al - e outros
exp. - experiência
FCS - "fetal calf serum", soro bovino fetal
fig. - figura
g - força centrífuga
Gln - glutamina
gráf. - gráfico
GSH - glutatião
H2O2 - peróxido de hidrogénio
KDa - KiloDalton
LLA - leucemia linfoblástica aguda
LLC - leucemia linfóide crónica
LMA - leucemia mielóide aguda
LMC - leucemia mielóide crónica

LMP - "low melting point", baixo ponto de fusão
LMPA - "low melting point agarose", agarose com baixo ponto de fusão
LNH - linfoma não Hodgkin
Lys - lisina
M - molar
m. - muito
mA - miliampere
mAMSA - "4'-(9-acridinylamino) methane sulfon-m-anisidide" ou "amasacrine"
Mg - magnésio
µg/ml - micrograma por mililitro
mg/ml - miligrama por mililitro
min - minuto (s)
µl - microlitro
µM - micromolar
mM - milimolar
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
MTT - "(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide"
nº - número
NaCl - cloreto de sódio
NADH -"nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form of", dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH - "nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form of", fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NaOH - hidróxido de sódio
nm - nanómetro
NMP - "normal melting point", ponto de fusão normal
NMPA - "normal melting point agarose", agarose com ponto de fusão normal
pág. - página
PBS - "phosphate buffered saline"
pH - - log [H^+]
RNA - "ribonucleic acid", ácido ribonucleico
sol. - solução
ssb -"single strand break", quebra simples no DNA
tab. - tabela
v. - valor
V - volt
U.I. - unidades internacionais
U.I./ml - unidades internacionais por mililitro
vs - versus

NOTA PRÉVIA

As leucemias são classificadas de acordo com as características clínicas, com a linhagem celular e com o estado de maturação das células leucémicas.

Assim, as leucemias agudas são caracterizadas pela presença de células muito imaturas, blastos, e por uma evolução rápida. A acumulação de blastos leucémicos na medula óssea de indivíduos com leucemia aguda é devida a um bloqueio ou defeito na maturação, "congelando-os" em estadios primitivos de diferenciação, e à proliferação das células transformadas.

Por outro lado, as leucemias crónicas estão associadas, pelo menos inicialmente, à presença de células bem diferenciadas (maduras) e têm um curso relativamente indolente.

Existem dois grandes grupos de leucemias agudas e crónicas: as linfocíticas (ou linfóides) e as mielocíticas (ou mielóides), consoante as células-alvo da transformação estão envolvidas na linfopoiese ou na mielopoiese, respectivamente.

Os linfomas são tumores do sistema linfóide.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Eduardo Guimarães, responsável pelo laboratório de Hemapatologia do IPATIMUP, não só a orientação teórica e prática que me dispensou durante a realização deste trabalho mas também a leitura construtiva desta monografia.

Às Doutoras Cristina Figueiredo e Margarida Quinta e Costa, do laboratório de Hemapatologia do IPATIMUP, muito obrigado pela ajuda dada na manutenção das linhas celulares, nas encomendas de material e reagentes assim como nas pesquisas bibliográficas.

Agradeço a todos os meus amigos, colegas do Curso de Mestrado e do IPATIMUP que "voluntariamente" se ofereceram para dadores de sangue.

Agradeço ao Prof. Doutor Robert Hooghe do Vlaamse Instelling voor Technologish Onderzoek (VITO), Mol, Geel, Bélgica o apoio e facilidades concedidas para a realização de todo o trabalho experimental feito para a optimização do "Single Cell Gel assay".

Gostaria de agradecer ao Dr. João Pedro Ramos, do Serviço de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto, a possibilidade de utilizar o espectrofotómetro de leitura de placas de Elisa.

Agradeço à Junta Nacional de Investigação Científica (JNICT) a bolsa de Mestrado que me foi concedida assim como o financiamento de 3 estágios no estrangeiro.

Ao Professor Doutor Carolino Monteiro, Doutora Rosário Almeida, Doutora Ilídia Moreira, meus pais e irmã agradeço o todo apoio dado durante o Curso de Mestrado e na elaboração desta dissertação.

Reconheço a disponibilidade da Professora Doutora Maria Beatriz Porto, do laboratório de Genética Médica do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, para me ajudar na discussão de resultados aqui apresentada.

ÍNDICE

Abreviaturas

Nota Prévia

Agradecimentos

Índice

I - Introdução Teórica

1. Quimioterapia oncológica: quimiossensibilidade e resistência
    1.1. Métodos de avaliação da quimiossensibilidade

2. Mecanismos celulares de resistência
    2.1. Fenótipo de multiresistência a drogas
    2.2. MDR atípico ou por topoisomerase II alterada
    2.3. Outros processos celulares envolvidos na resistência
        2.3.1. Reparação do DNA
        2.3.2. Processos de destoxificação e eliminação de radicais orgânicos e de oxigénio
    2.4. Acção conjunta dos mecanismos celulares de resistência

3. Topoisomerases
    3.1. Drogas antitopoisomerases e mecanismos citotóxicos
        3.1.1. Síntese de DNA e RNA
    3.2. Mecanismos de resistência mediados pelas topoisomerases
        3.2.1. Redução nos níveis de topoisomerase II
        3.2.2. Resistência devido a topoisomerase II alterada

4. Bibliografia

II - Parte experimental

1. "MTT Assay"
    1.1. Material de trabalho
        1.1.1. Obtenção de material clínico e separação de células mononucleares

1.1.2. Obtenção de células das linhas celulares K562 e K562/R7
1.2. Optimização do "MTT assay"
1.2.1. Solução de MTT
1.2.2. Linearidade: Cc. de MTT vs densidade óptica / Cc. celular vs densidade óptica
1.2.3. Tempo de incubação com o MTT
1.2.4. Solubilização dos cristais de "formazan"
1.2.5. Exposição às drogas
1.3. Resultados e discussão
1.4. Perspectivas futuras
1.5. Bibliografia

2. "Single Cell Gel Assay"
2.1. Procedimento experimental
2.1.1. Obtenção das células
2.1.2. Preparação das lâminas
2.1.3. Desnaturação e electroforese do DNA
2.2. Optimização do SCG assay e resultados
2.3. Perspectivas futuras
2.4. Bibliografia

III - Anexo

Resumo

Summary

I - INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. Quimioterapia oncológica: quimiossensibilidade e resistência

A escolha da quimioterapia oncológica aplicada a cada doente não é feita de acordo com a sensibilidade individual às drogas aplicadas mas segundo padrões previamente estabelecidos com base não só na experimentação *in vitro* e animal mas também na resposta clínica de um elevado número de doentes a várias drogas utilizadas no tratamento da doença neoplásica.

A ineficácia da quimioterapia observada nalguns doentes pode ser devida à cinética de crescimento de certas neoplasias, ao facto de certos tecidos ou órgãos do doente criarem santuários farmacológicos que impedem o acesso das drogas às células malignas, a alterações metabólicas que aumentam ou diminuem a activação dos fármacos impedindo que atinjam as células alvo na concentração e forma desejadas ou ainda à capacidade das células tumorais de resistir aos compostos citotóxicos em concentrações que de outro modo seriam letais.

No laboratório de Hematologia do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto começaram a estudar-se os mecanismos celulares envolvidos na resistência *in vitro* de células neoplásicas de indivíduos com leucemia ou linfoma a agentes citotóxicos normalmente utilizados na clínica e que inibem a topoisomerase II, tentando relacionar os resultados obtidos com a resposta clínica dos doentes ao tratamento.

O trabalho prático que deu corpo a este relatório consistiu na padronização do "MTT assay", que permite avaliar globalmente a sensibilidade das amostras anteriores a agentes quimioterápicos, e do "SCG assay", que permite quantificar as lesões induzidas no DNA daquelas células por estas drogas.

1.1. Métodos de avaliação da quimiossensibilidade

Há já alguns anos que se envidam esforços para se determinar a quimiossensibilidade de células neoplásicas a agentes citotóxicos de modo que a terapêutica antitumoral possa ser ajustada numa base individual.

Entre estas tentativas contam-se, principalmente na década de 70, as que utilizaram ensaios clonogénicos que se baseiam na capacidade proliferativa de células tumorais *in vitro* (capacidade de formação de colónias em meio semi-sólido) (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990; cf. cit. Twentyman, P.R., 1985; cf. cit. Weisenthal, L.M. *et al* 1983 (a, b); cf.

cit. Weisenthal, L.M., Lippman, M.E., 1985). Neste ensaio a amostra é colocada em cultura e no final é contado o número de colónias formadas. A percentagem de inibição da formação de colónias na presença da droga é tida como uma medida da sensibilidade ao composto testado (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

Para além dos bons resultados obtidos com este ensaio para uma previsão da resposta inicial à quimioterapia de doentes com LMA foi ainda possível mostrar diferenças na sensibilidade a drogas entre doentes com LMA não tratados ou com recidiva após tratamento (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

No entanto, este método possui várias desvantagens que impedem a sua aplicabilidade no estudo de amostras em grande escala:

1) é necessário um grande número de células para a sua execução;

2) é difícil obter culturas de determinados tipos de tumores, nomeadamente linfomas e leucemias linfoblásticas;

3) o efeito da droga só é observado nas células que se dividem e não nas células em G_0 que podem ter potencial proliferativo *in vivo* ;

4) está sujeito a artefactos provenientes da existência de aglomerados de células que poderão ser contados como colónias e do facto de algumas delas resultarem de células normais que "contaminem" a amostra (quando esta provém de um tumor sólido) e

5) são muito laboriosos não permitindo informação clínica em tempo útil (mínimo 2 semanas) (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

Outro tipo de ensaio é aquele que utiliza precursores radioactivos de DNA (ou RNA) que são incorporados em células em cultura, considerando-se a inibição da incorporação de radioactividade como medida do efeito da droga (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

Embora com a vantagem sobre o anterior de ser mais rápido, algumas das desvantagens enunciadas para os ensaios clonogénicos existem também com este tipo de teste que também não quantifica o efeito inibitório da droga nas células em G_0 porque estas não sintetizam DNA. Por outro lado, pode haver alterações relativas induzidas na velocidade das vias das purinas e pirimidinas, no tamanho do "pool" de nucleósidos ou ainda maior recurso à via *de novo* de síntese de ácidos nucleicos que não utiliza nucleótidos exógenos mascarando e alterando os resultados (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

Embora muito utilizado para avaliar a quimiossensibilidade em linhas celulares, este tipo de teste tem sido pouco utilizado na medição da sensibilidade em espécimes clínicos e existem poucos estudos relacionando os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* em doentes com diferentes tipos de leucemias. No entanto, é de salientar um trabalho que

mostra uma boa concordância entre os resultados de sensibilidade e/ou resistência obtidos *in vitro* e a sobrevida dos doentes com LNH ao fim de 3,5 anos (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

O "Disc assay" foi criado por Weisenthal, L.M. *et al* em 1983 (a, b) e adaptado por Bird, M.C., *et al* em 1986 de modo a poder ser aplicado no rastreio de um grande número de drogas usando amostras tumorais de dimensões relativamente pequenas. "Disc" é a abreviatura de " differencial staining cytotoxicity". Neste método a integridade da membrana celular ou a sua ruptura no fim da incubação com a droga a testar condiciona a diferente coloração das células. A contagem do número de células viáveis (coloração característica da hematoxilina e eosina) e não viáveis (cor verde brilhante) é feita ao microscópio. Como controlo interno existem eritrócitos de pato que permitem corrigir a desintegração das células mortas e a proliferação contínua das células sobreviventes (Weisenthal, L.M. *et al* 1983 (a, b); cf. cit. Bird, M.C. *et al* 1988).

O facto de não se poder medir correctamente o efeito de drogas que exclusivamente inibem a proliferação celular representa uma desvantagem desta técnica que é comum a todos os ensaios de curto termo. Todos os resultados têm de ser lidos por um técnico com bastante experiência, facto que torna este método susceptível a erros de observador (Weisenthal, L.M. *et al* 1983, a).

A sua maior vantagem, além de permitir a utilização de um pequeno número de células (5×10^4 células viáveis por droga a testar) e de ser possível analisar o efeito da droga em células que não se dividem, é permitir minimizar a contaminação por células não malignas, pois estas são identificadas morfologicamente. Assim o resultado final apresenta o número de células tumorais sobreviventes e não o número total de células sobreviventes (Weisenthal, L.M. *et al* 1983 (a, b)) . É também possível determinar diferenças nos efeitos das drogas em diferentes populações de células de uma mesma amostra clínica. Como as lâminas preparadas com as amostras em estudo são permanentes, os resultados podem ser interpretados, confirmados ou não por outro observador e comparados com os de outros ensaios em qualquer altura (Weisenthal, L.M. *et al* 1983, a).

Este teste permite estudar células de doentes com leucemia linfoblástica e linfoma e, com ele, têm-se obtido boas relações entre os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* (Weisenthal, L.M. *et al* 1983, a; Bird, M.C. *et al* 1988; cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990; Kirkpatrick, D.L. *et al* 1990).

Além da identificação dos doentes com LLA, LLC, LNH, LMA, LMC e mieloma múltiplo sensíveis à quimioterapia inicial, o "Disc assay" tem sido usado para analisar não só a aquisição de resistência em casos de

LLA, LLC e LNH como também o efeito de moduladores de resistência na resposta a drogas citotóxicas em amostras de doentes com LLA, LLC, LMA e LNH (Bird, M.C. *et al* 1988; cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R., 1990).

Existe um outro método com algumas semelhanças ao "Disc assay", o "MTT assay", e que apresenta vantagens sobre o "Disc assay" porque, sendo também um teste de viabilidade, ajuiza desta viabilidade pela integridade de estruturas celulares cujo atingimento é mais específico do efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos. Por outro lado, é um teste colorimétrico que pode ser avaliado por espectrofotometria eliminando o risco da subjectividade do observador.

O "MTT assay" encontra-se descrito com pormenor na parte experimental.

2. Mecanismos celulares de resistência

Os mecanismos celulares responsáveis pela resistência às drogas que actuam na topoisomerase II (cf. ponto 3.1.) são principalmente dois:

- o que envolve a expressão aumentada do gene mdr1 que codifica uma proteína transmembranar (glicoproteína-P) que actua como uma bomba de extrusão de drogas de um modo dependente do ATP (fenótipo MDR, "multidrug resistance") e

- o que é devido a uma topoisomerase II alterada, enzima nuclear que possui uma "DNA double-strand passing activity" (MDR atípico).

2.1. Fenótipo de multiresistência a drogas

Linhas celulares humanas seleccionadas por serem resistentes a uma droga citotóxica mostraram exibir o fenótipo MDR, ou seja expressão aumentada de glicoproteína-P, que confere às células resistência cruzada a um largo espectro daqueles compostos, muitos deles utilizados no tratamento do cancro e nomeadamente de leucemias, e que não partilham nem a estrutura química nem o alvo celular. As drogas cuja acção é condicionada pelo efeito do fenótipo MDR são alcalóides ou antibióticos de origem natural e incluem os alcalóides da vinca, as antraciclinas, as epipodofilotoxinas, a actinomicina D e a colchicina. As únicas propriedades químicas comuns a estes compostos são a hidrofobicidade, devida à presença de anéis aromáticos, e a tendência para terem carga positiva a pH fisiológico (cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992).

A glicoproteína-P é uma proteína da membrana plasmática com 170 KDa (P-170) que contém 2 locais de ligação ao ATP e 12 segmentos transmembranares tendo sido descrita pela primeira vez por Ling, V. e colaboradores nos anos 70 (cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D.,1992). A P-170 é o produto do gene mdr1 localizado, no homem, no cromossoma 7q21-31. Existem 2 genes MDR humanos (mdr1 e mdr3 que estão "in linkage") sendo a expressão, em células com fenótipo MDR, regulada ao nível do número de cópias do gene, da transcrição, da translação ou de modificações da própria proteína. O produto do gene mdr3 possui substratos diferentes dos da P-170 tendo sido demonstrado, por estudos de transfecção, que apenas o produto do gene mdr1 medeia a resistência aos produtos naturais antitumorais (cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Rothenberg, M., Ling, V., 1989; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Haber, D.A., 1992; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D.,1992).

Normalmente em linhas celulares MDR humanas o aumento nos níveis de mRNA excede o aumento no número de cópias do gene e em amostras clínicas de tumores humanos com expressão aumentada da P-170 nunca foi observada amplificação génica. Não se conhece até ao momento qualquer mutação ou rearranjo génico responsáveis pelo aumento de expressão da proteína (cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Schinkel, A.H., Borst, P., 1991; cf. cit. Haber, D.A., 1992).

Esta proteína funciona como uma bomba que transporta agentes quimioterápicos para o exterior da célula (não se conhecendo ainda os seus substractos normais), reduzindo a concentração intracelular daqueles. As drogas que entram na célula, geralmente por difusão passiva, ligam-se à P-170 sendo, em seguida, activamente expelidas para o exterior através de um poro ou canal formado pelos múltiplos domínios transmembranares da P-170 e usando a energia proveniente da hidrólise do ATP, mediada por esta proteína (cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D.,1992).

In vitro, esta resistência pode ser anulada por vários compostos como por exemplo o verapamil (cf. cit. Rothenberg, M., Ling, V., 1989). O verapamil inibe reversivelmente a P-170, por competição ou modificando o seu estado de fosforilação, levando ao aumento da concentração intracelular dos agentes quimioterápicos e, consequentemente, da citotoxicidade dos mesmos (cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992).

A P-170 é o substracto de várias cinases (proteínas cinases A e C) encontrando-se fosforilada no seu estado basal em resíduos de serina e treonina, mas não se conhece totalmente a importância deste facto na sua função normal ou na sua capacidade para transportar drogas. Normalmente é glicosilada mas a alteração da glicosilação da P-170 não interfere com a resistência (cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Chabner, B.A., Fojo, A., 1989; cf. cit. Schinkel, A.H., Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D. , 1992).

A função da glicoproteína-P nos tecidos normais é ainda motivo de especulação, embora deva ter algum papel fundamental visto que a sua sequência é muito conservada entre espécies (cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991).

A P-170 ou glicoproteína-P encontra-se em muitos epitélios de orgãos excretores ou secretores: fígado, rim, intestino, estômago e pâncreas. Está também presente noutras barreiras naturais (barreira hemato-encefálica) assim como nos testículos e na placenta e no útero durante a gravidez. Esta distribuição tecidular é compatível com um papel na excreção de compostos tóxicos ou "waste products". No entanto, a elevada concentração de P-170 no cortéx suprarenal não deve ser devida a este facto. É possível que haja envolvimento da glicoproteína-P no transporte de esteróides uma vez que a progesterona pode inibir o transporte de drogas por uma das glicoproteínas de roedores (Thiebaut, F. *et al* 1987; cf. cit. Gottesman, M.M., Pastan, I., 1988; cf. cit. Gottesman, M.M., 1988; cf. cit. Rothenberg, M., Ling, V., 1989; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Schinkel, A.H., Borst, P., 1991; cf. cit. Haber, D.A., 1992; Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992).

Observou-se indução da síntese da P-170 como parte de um mecanismo geral de defesa do fígado a agentes carcinogénicos, no fígado de rato em regeneração após hepatectomia parcial (cf. cit. Gottesman, M.M., 1988; Burt, R.K., Thorgeirsson, S.S., 1988) e em linhas celulares humanas de tecidos que não o fígado. Embora estes últimos resultados estabeleçam que o gene MDR é indutível desconhece-se se tal acontece na clínica quando se usam concentrações moderadas de drogas. Os tratamentos usados *in vitro* são muito diferentes das situações que se verificam *in vivo* e só resultam em determinadas linhas não tendo ainda sido observada, em linhas celulares, a indução deste gene por drogas citotóxicas (cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Schinkel, A.H., Borst, P., 1991).

São normalmente encontrados níveis elevados de P-170 em tumores primários derivados de tecidos que costumam possuir expressão elevada do gene mdr1 ou em recidivas de tumores que foram sujeitas a quimioterapia (cf. cit. Rothenberg, M., Ling, V., 1989; cf. cit. Chabner, B.A.,

Fojo, A., 1989; cf. cit. Endicott, J.A., Ling, V., 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Haber, D.A., 1992). Existem trabalhos que confirmam níveis aumentados de P-170 em LLA, LMA e LMC em crise blástica e do seu aumento com o tratamento (cf. cit. Rothenberg, M., Ling, V., 1989; Rothenberg, M.L. *et al* 1989; cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Haber, D.A., 1992). A expressão elevada da P-170 em LMA aquando do diagnóstico inicial foi considerada como factor de mau prognóstico (cf. cit. Haber, D.A., 1992).

2.2. MDR atípico ou por topoisomerase II alterada

Na presença de antraciclinas uma selecção contínua de células pode não só originar células mutantes com expressão aumentada de glicoproteína-P mas também células mutantes que só apresentam resistência cruzada a drogas que têm um alvo comum, a topoisomerase II, e não aos alcalóides de vinca ou colchicina (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). Esta forma de multiresistência denomina-se por at-MDR, uma vez que a única lesão identificada na maior parte destas linhas celulares humanas é uma topoisomerase II alterada (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A resistência aos efeitos citotóxicos das drogas antitopoisomerase II pode ser devida a alterações que afectam o nível de topoisomerase II, a actividade catalítica do enzima e/ou a sensibilidade do enzima às drogas (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992), cf. ponto 3.2.. No entanto, ainda não se sabe ao certo se estas alterações na topoisomerase II contribuem ou não para a resistência *in vivo* aos agentes quimioterápicos (cf. cit. Borst, P., 1991).

2.3. Outros processos celulares envolvidos na resistência

2.3.1. Reparação do DNA

É possível que um início mais precoce e um aumento na velocidade de reparação de lesões no DNA estejam envolvidos na resistência a agentes quimioterápicos (responsáveis pelas lesões) embora ainda não existam dados concretos (cf. cit. Borst, P., 1991). Numa linha celular leucémica de roedores resistente à doxorrubicina observou-se que a reparação das quebras no DNA provocadas por aquele composto começava mais precocemente, embora com a mesma velocidade, do que na linha sensível

da mesma origem (Deffie, A.M. *et al* 1988) (no ponto 3.1. explica-se como os agentes quimioterápicos que actuam ao nível da topoisomerase II induzem quebras no DNA).

2.3.2. Processos de destoxificação e eliminação de radicais orgânicos e de oxigénio

As glutatião-S-transferases (GST) são uma família multifuncional de enzimas que possuem papel importante na destoxificação de compostos citotóxicos, encontrando-se bem distribuidas em muitos tecidos normais. Não só catalisam a conjugação de drogas citotóxicas e carcinogénios com o glutatião reduzido (cf. cit. Mattern, J., Volm, M., 1992) como também possuem uma actividade de GSH peroxidase independente do selénio que permite a destoxificação de hidroperóxidos com lípidos ou ácidos nucleicos. Estes peróxidos formam-se não só durante o "redox recycling" de muitas drogas como também durante o metabolismo normal resultante da utilização do oxigénio celular (cf. cit. Waxman, D.J., 1990).

Embora se encontrem níveis aumentados de glutatião e GST em várias linhas celulares resistentes, existem opiniões contraditórias sobre o efeito das GST na resistência aos compostos citotóxicos (cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992) sendo possível que seja o resultado de uma resposta geral e não específica da linha à pressão de selecção. Foram encontrados níveis aumentados de GST numa linha celular resistente seleccionada por exposição a um agente quimioterápico que não é substrato destes enzimas, não contribuindo assim para a destoxificação daquela droga (Whelan, R.D.H. *et al* 1992).

Nem sempre a transfecção de linhas celulares com GST resulta em aumento da resistência a agentes quimioterápicos que são substratos deste enzima apesar de haver aumento da expressão da GST (cf. cit. Borst, P., 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992).

Num estudo de doentes com LLC não foi encontrada relação entre a resistência ao clorambucil (substrato da GST) e a expressão do enzima, não havendo diferença entre os linfócitos controlo e os de LLC (cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992). No entanto, encontraram-se valores mais baixos de actividade da GST em doentes com leucemias agudas que alcançaram remissão completa do que nos doentes que não responderam ao tratamento (cf. cit. Mattern, J., Volm, M., 1992). Observou-se ainda um aumento da actividade enzimática e da expressão do mRNA da GST numa linha celular leucémica de roedores resistente à doxorrubicina relativamente à linha sensível (Deffie, A.M. *et al* 1988).

A proteção contra a doxorrubicina, embora pequena, tem sido consistentemente relacionada com a GST em linhas celulares (cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992). Muitos dos agentes quimioterápicos, como por exemplo a doxorrubicina, levam à produção de hidroperóxidos ou outras espécies reactivas de oxigénio tendo-se observado aumento nos enzimas responsáveis pela eliminação daqueles em linhas celulares resistentes (Sinha, B.K. *et al* 1987; Mimnaugh, E.G. *et al* 1989; cf. cit. Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G., 1990; cf. cit. Waxman, D.J., 1990).

2.4. Acção conjunta dos mecanismos celulares de resistência

Convém referir que todos estes mecanismos celulares de resistência são autónomos mas podem coexistir numa mesma célula. Por exemplo, foram descritas situações em que se observa expressão aumentada da glicoproteína-P (ou acumulação reduzida das drogas) e actividade e/ou conteúdo baixos da topoisomerase II (Fergusson, P.J. *et al* 1988; Minato, K. *et al* 1990; Kasahara, K. *et al* 1992) bem como expressões aumentadas da glicoproteína-P e glutatião-S-transferase, em linhas celulares humanas (Whelan, R.D.H. *et al* 1992). Numa linha celular de roedores observou-se expressão aumentada de glicoproteína-P e glutatião-S-transferase e um nível reduzido de topoisomerase II (Hoban, P.R. *et al* 1992).

3. Topoisomerases

As topoisomerases do DNA modificam estados conformacionais e topológicos durante vários processos celulares: replicação do DNA, transcrição do DNA, troca de cromátides irmãs e recombinação de cromossomas. Estes enzimas estão também envolvidos na reparação do DNA e "assembly" da cromatina nos ciclos de condensação e descondensação dos cromossomas (cf. cit. Wang, J.C., 1985; cf. cit. Liu, L.F., 1989; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992); cortando momentaneamente uma cadeia da dupla hélice do DNA e permitindo a passagem da cadeia complementar através da ssb (topoisomerase I) ou actuando de modo a produzir uma dsb por onde pode passar um segmento de DNA com dupla hélice, pertencente ou não à mesma molécula (topoisomerase II), estes enzimas podem catalisar as interconversões entre os isómeros topológicos do DNA (cf. cit. Wang, J.C.,

1985; cf. cit. Liu, L.F., 1989; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

Cada uma das subunidades da topoisomerase II quebra, sequencialmente e não em simultâneo, uma cadeia da dupla hélice do DNA (designada por "cleavage helix") e forma uma ligação covalente transitória entre um resíduo de tirosina do enzima e a estrutura fosfodiéster da extremidade 5' recém obtida com a clivagem. Em seguida, a acção da topoisomerase II envolve ainda a associação ao ATP que, induzindo uma alteração conformacional da proteína, permite a passagem de um ou mais segmentos de DNA (denominados por "passage helices") observando-se o "turnover" do enzima após a reparação da dsb e a hidrólise do ATP com separação do complexo enzima-DNA (cf. cit. Wang, J.C., 1985; Osheroff, N., 1986; cf. cit. Liu, L.F., 1989; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; Lindsley, J.E., Wang, J.C., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). A ligação da topoisomerase II às cadeias de DNA "cleavage and passage" é independente sendo, no entanto, necessária a presença e associação à segunda para que ocorra uma clivagem eficiente do DNA (Corbett, A.H. *et al* 1992).

A topoisomerase I não precisa de nenhum cofactor para a catálise e a energia necessária para a religação da cadeia de DNA clivada pelo enzima provém, em parte, da ligação covalente tirosilfosfato que se forma entre o enzima e o fosfato terminal da extremidade 3' daquela ssb (cf. cit. Liu, L.F., 1989; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

As topoisomerases reconhecem e cortam sequências específicas no DNA originando padrões de clivagem característicos e as diferentes classes de fármacos antitopoisomerases estimulam ou estabilizam "cleavage sites" distintos onde cada droga, possivelmente, reconhece nucleótidos específicos: a mutação de um determinado nucleótido em oligonucleótidos sintéticos é selectiva na redução ou inibição da estimulação das quebras no DNA por um dos agentes quimioterápicos. Estes dados confirmam a hipótese de que as drogas formam um complexo ternário, DNA - droga - topoisomerase, interactuando na interface entre o enzima e os 2 nucleótidos clivados (Jaxel, C. *et al* 1991; Pommier, Y. *et al* 1991; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; Capranico, G., Zunino, F., 1992).

Os 2 tipos de topoisomerases são regulados de um modo diferente sob várias condições de crescimento e diferenciação celulares (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A topoisomerase I é um monómero com um peso molecular de aproximadamente 100 kDa codificada por um único gene localizado no cromossoma 20q12-13.2 (cf. cit. Liu, L.F., 1989; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991). Os níveis desta proteína variam pouco com o estado de

crescimento das células e fases do ciclo celular (Hsiang, Y.-H. *et al* 1988; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A topoisomerase II α é um homodímero com 170 kDa por subunidade (gene único no cromossoma 17q21-22) (cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., 1989) tendo sido recentemente descoberta uma isoforma β com 180 kDa (gene único no braço curto do cromossoma 3) (cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; Tan, K.B. *et al* 1992; cf. cit. Keith, W.N. *et al* 1992). É possível que estas 2 isoformas sejam reguladas de um modo distinto durante o ciclo celular: o nível da topoisomerase II α é mais elevado numa fase de proliferação rápida enquanto que o de topoisomerase II β é mais elevado nas células que atingiram a fase de patamar de crescimento (cf. cit. Saijo, M. *et al* 1992). No presente texto sempre que mencionar topoisomerase II refiro-me à topoisomerase II α.

Os níveis de topoisomerase II são bastante sensíveis ao estado de crescimento das células, podendo-se utilizar este enzima como um marcador da proliferação celular (Heck, M.M.S., Earnshaw, W.C., 1986), e fases do ciclo celular, (Heck, M.M.S., Earnshaw, W.C., 1986; Chow, K.-C., Ross, W.E., 1987; Saijo, M. *et al* 1992; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991), mas esta regulação é feita de um modo um pouco diferente nas células tumorais em relação às células normais (cf. cit. Liu, L.F., 1989); a alteração do controlo da topoisomerase II nas células tumorais ocorre provavelmente ao nível da transcrição e na estabilidade da proteína (cf. cit. Liu, L.F., 1989; Heck, M.M.S. *et al* 1988; Hsiang, Y.-H. *et al* 1988).

O nível e a actividade máximos deste enzima ocorrem na fase S (cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991) ou G_2 (Chow, K.-C., Ross, W.E., 1987; Saijo, M. *et al* 1992; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A topoisomerase II é fosforilada em resíduos de serina *in vitro*, pela caseína cinase II ou proteína cinase C, e *in vivo*, por cinases ainda não identificadas, de um modo dependente das fases do ciclo celular (fosforilação máxima na fase G_2) (cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992; Saijo, M. *et al* 1992; Devore, R.F. *et al* 1992). Acrescente-se que a regulação da fosforilação deste enzima é diferente da regulação do seu nível intracelular (Saijo, M. *et al* 1992) e que a sensibilidade da topoisomerase II a drogas antineoplásicas pode ser modulada alterando o estado de fosforilação do enzima (Devore, R.F. *et al* 1992).

3.1. Drogas antitopoisomerases e mecanismos citotóxicos

A camptotecina e seus derivados (topotecan, etc) formam a única classe de drogas que actua ao nível da topoisomerase I e mostraram possuir actividade contra tumores sólidos humanos implantados em animais estando agora a ser submetidos a ensaios clínicos. Este composto possui também actividade antivírica (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A camptotecina forma um complexo ternário com o DNA e a topoisomerase I mas não se costuma ligar a nenhum deles em separado (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). Alterações na sua estrutura química ou no tipo de estereoisómero interferem com a acção da droga no enzima e, consequentemente, na indução de complexos cliváveis, descritos mais adiante (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

São três as classes de agentes quimioterápicos que têm como alvo a topoisomerase II : epipodofilotoxinas, VP-16 (etoposídeo) (Wozniak, A.J., Ross, W.E., 1983; Glisson, B. *et al* 1986, b) e VM-26 (teniposídeo) (Glisson, B. *et al* 1986, b); antraciclinas, tais como a doxorrubicina (Glisson, B. *et al* 1986, a) e a daunorrubicina, e as aminoacridinas que incluem o m-AMSA (Rowe, T.C., *et al* 1986).

Inicialmente pensava-se que só as antraciclinas e as aminoacridinas se intercalavam no DNA mas, sob condições especiais, foi detectada uma ligação fraca do etoposídeo e da camptotecina ao DNA o que permite que também estas drogas antitopoisomerases se intercalem no "cleavage site" do DNA no complexo ternário já referido (cf. cit. Capranico, G., Zunino, F., 1992).

Todas as drogas acima referidas bloqueiam as topoisomerases num passo intermediário da sua acção originando estruturas denominadas por complexos cliváveis: quando se lisam células, que estiveram expostas a qualquer um daqueles compostos, com um forte agente desnaturante de proteínas obtêm-se fragmentos de DNA (com ssb ou dsb) associados ao enzima (DPC: "DNA-protein-complexes") o que significa que, ligado à droga, o enzima aparentemente quebra o ácido nucleico mas é incapaz de reparar as lesões (Covey, J.M. *et al* 1989; cf. cit Liu, L.F., 1989; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

O aumento da fosforilação da topoisomerase II parece atenuar as lesões no DNA induzidas pelas drogas devido ao aumento da velocidade de religação do DNA clivado, acção que também é mediada pelo enzima (Devore, R.F. *et al* 1992).

Sabe-se que os complexos cliváveis ou as quebras no DNA são os principais mediadores da acção citotóxica das drogas antitopoisomerases.

A ausência de topoisomerase I ou alterações na topoisomerase II que impedem ou diminuem a interacção da droga com os enzimas tornam as células resistentes à acção dos agentes quimioterápicos (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). Adicionalmente, para quase todas as drogas que interactuam com a topoisomerase II e aumentam o número de quebras no DNA existe uma boa relação da citoxicidade não só com o número de DPC mas também com o número de ssb e dsb induzidos no DNA após remoção do enzima (Goldenberg, G.J. *et al* 1986; Smith, P.J., Makinson, T.A., 1989; Pratesi, G. *et al* 1990; Webb, C.D. *et al* 1991; Fry, A.M. *et al* 1991; cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992). As divergências observadas podem ser devidas a outros modos de acção das drogas (cf. cit. Harris, A.L., Hochhauser, D., 1992) tal como a produção de radicais livres de oxigénio (Sinha, B.K. *et al* 1987; Mimnaugh, E.G. *et al* 1989; cf. cit. Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G., 1990), sendo também possível que as lesões no DNA produzidas pelos inibidores da topoisomerase II em diferentes locais genómicos não sejam igualmente citotóxicas para as células (Gewirtz, D.A., 1991).

Contudo, verifica-se que mesmo após a remoção da droga do meio de cultura, e embora as lesões no DNA sejam rapidamente reparadas, se continua a observar morte celular mesmo para curtas exposições à droga. Será que um pequeno número de complexos cliváveis não é reversível ou será que são transformados por processos celulares em lesões letais permanentes?

3.1.1. Síntese de DNA e RNA

A síntese de DNA parece ser necessária para a morte celular produzida pela camptotecina porque se aquela for bloqueada com um inibidor da DNA polimerase (facto que não interfere com as ssb produzidas por aquele agente) observa-se uma diminuição da citotoxicidade (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992; cf. cit. Liu, L.F.,1989).

Estes resultados são concordantes com outros que mostraram que a fragmentação do DNA, devido à formação de complexos cliváveis induzida por aquele composto, e sua reparação eram constantes nas várias fases do ciclo celular mas que as células em fase S eram muito mais sensíveis ao efeito citotóxico da droga (cf. cit. Liu, L.F.,1989; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

A síntese de DNA, na presença do inibidor da topoisomerase I, pode transformar a existência do complexo clivável, reversível na ausência da droga, numa lesão letal. O "replication fork" colide com o complexo covalente DNA-enzima estimulado e estabilizado pela droga o

que impede o seu movimento, leva à separação das 2 cadeias da dupla hélice do DNA e consequente quebra do "replication fork" (Hsiang, Y,-H. *et al* 1989). Pensa-se, assim, que quebras no DNA junto do "replication fork" sejam altamente citotóxicas (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

Os complexos cliváveis da topoisomerase II parecem ser processados de modo idêntico aos da topoisomerase I pela maquinaria de síntese do DNA uma vez que as células em fase S são mais sensíveis ao efeito citotóxico das drogas e a inibição da síntese do DNA parcialmente anula esta sensibilidade (cf. cit. Liu, L.F., 1989; D'Arpa, P. *et al* 1990; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). Contudo, como ainda se observa alguma citotoxicidade após a inibição da síntese do DNA, o "replication fork arrest" não é o único mecanismo responsável pela morte celular induzida pelas drogas antitopoisomerase II (cf. cit. Liu, L.F., 1989; Hsiang, Y,-H. *et al* 1989).

A preceder a morte celular há produção de RNA e síntese proteica induzida por drogas antitopoisomerase II. A inibição da síntese do RNA não afecta, no entanto, a toxicidade da camptotecina (Schneider, E. *et al* 1989; cf. cit. Liu, L.F., 1989; D'Arpa, P. *et al* 1990; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992). A paragem das células em G_2, consequência da inibição da actividade da cinase $p34^{cdc2}$ após exposição a drogas antitopoisomerase II, parece também estar envolvida na morte celular induzida por aqueles compostos (cf. cit. Liu, L.F., 1989; Lock, R.B., Ross, W.E., 1990 (a, b)).

3.2. Mecanismos de resistência mediados pelas topoisomerases

A resistência à camptotecina em linhas celulares leucémicas humanas pode ser devida a níveis reduzidos ou alterações na topoisomerase I, afectando a sua actividade enzimática ou a sua sensibilidade à droga, tal como acontece para as drogas antitopoisomerase II (Andoh, T. *et al* 1987; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

3.2.1. Redução nos níveis de topoisomerase II

Encontram-se frequentemente níveis reduzidos da topoisomerase II em células com at-MDR o que sugere que a resistência seja devido a uma redução no nível desta proteína e não à criação de um enzima resistente à droga (Ferguson, P.J. *et al* 1988; Deffie, A.M. *et al* 1989, (a, b); cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

Como já foi referido as drogas antitopoisomerase II bloqueiam a acção do enzima antes da separação das quebras por ele induzidas. Assim, uma redução na concentração da topoisomerase II diminui o número de potenciais alvos para as drogas e, consequentemente, a actividade total de clivagem do DNA reduzindo a formação de dsb e ssb no ácido nucleico (após remoção do enzima) (Deffie, A.M. *et al* 1989, a; Webb, C.D. *et al* 1991; Giaccone, G. *et al* 1992; Kasahara, K. *et al* 1992).

Na maior parte dos casos não foram ainda encontradas mutações responsáveis pelos baixos níveis deste enzima mas para linhas celulares leucémicas de roedores resistentes à doxorrubicina e à mAMSA, com níveis baixos do conteúdo e actividade da topoisomerase II, observou-se um rearranjo molecular de um dos alelos do enzima (Deffie, A.M. *et al* 1989, b; Tan, K.B. *et al* 1989). É possível que a hipermetilação do gene da topoisomerase II, observada no trabalho de Tan, K.B. *et al*, esteja envolvida na redução do nível desta proteína (Tan, K.B. *et al* 1989) desconhecendo-se o papel destas alterações na resistência de células tumorais humanas (cf. cit. Pratesi, G. *et al* 1990). No entanto, pela primeira vez foi recentemente descrito, numa linha celular humana com níveis baixos do conteúdo e actividade da topoisomerase II, um rearranjo molecular num alelo deste enzima que possivelmente estará associado à resistência da linha (Giaccone, G. *et al* 1992; Binaschi, M. et al 1992).

Foi demonstrado que a resistência intrínseca também resulta de uma "down-regulation" da topoisomerase II em células diferenciadas ou privadas de nutrientes e nalguns tumores que possuem baixo índice proliferativo. Foram encontrados baixos níveis de topoisomerase II em células de doentes com LLC, sendo estas células resistentes aos efeitos letais da doxorrubicina *in vitro* e *in vivo* (Hsiang, Y.-H. *et al* 1988; Potmesil, M. *et al* 1988; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

3.2.2. Resistência devido a topoisomerase II alterada

Muitas células resistentes a determinadas drogas possuem um nível normal de topoisomerase II mas, neste caso, o enzima é resistente à formação de complexos cliváveis (Minato, K. *et al* 1990; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

Este tipo de resistência pode ser devido a uma mutação que faz modificar o local de ligação da droga ao enzima ou qualquer outra característica que impeça a formação do complexo clivável, nomeadamente (cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992):

- 2 diferentes linhas celulares leucémicas humanas resistentes à mAMSA apresentam uma mutação com substituição da Arg na posição 486

por uma Lys, impede a indução e estabilização de complexo clivável por aquele composto (Lee, M.S. *et al* 1992);

- uma linha celular leucémica humana resistente ao VM-26 possui uma topoisomerase II alterada no domínio de ligação ao ATP. Esta linha celular necessita de ATP em maiores quantidades do que a correspondente linha sensível, muito provavelmente porque o seu enzima se associa ao ATP de um modo menos eficiente. As células resistentes possuem uma mutação no domínio de ligação ao ATP num aminoácido que é necessário para a estrutura e função deste domínio: Arg, na posição 449, para Gln. Nas células resistentes observa-se uma diminuição na formação de complexos cliváveis (Bugg, B.Y. *et al* 1991; cf. cit. Beck, W.T., Danks, M.K., 1991; cf. cit. Liu, L.F., D'Arpa, P., 1992).

4. Bibliografia

Andoh, T. *et al* (1987), Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5565-9.

Beck, W.T., Danks, M.K. (1991), Mechanisms of resistance to drugs that inhibit DNA topoisomerases, Seminars in Cancer Biol., 2, 235-44.

Binaschi, M. *et al* (1992), Characterization of a topoisomerase II gene rearrangement in a human small-cell lung cancer cell line, J. Natl. Cancer Inst., 84, 1710-6.

Bird, M.C. *et al* (1988), Long-term comparison of results of a drug sensitivity assay *in vitro* with response in lymphatic neoplasms, Cancer, 61, 1104-9.

Borst, P. (1991), Genetic mechanisms of drug resistance, Acta Oncol., 30: Rev. Oncol., 4, 87-105.

Bugg, B.Y. *et al* (1991), Expression of a mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM human leukemia cells selected for resistance to teniposide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7654-8.

Burt, R.K., Thorgeirsson, S.S. (1988), Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics, J. Natl. Cancer Inst., 80, 1383-6.

Capranico, G., Zunino, F. (1992), DNA topoisomerase-trapping antitumor drugs, Eur. J. Cancer, 28A, 2055-60.

Chabner, B.A., Fojo, A. (1989), Multidrug resistance: P-glycoprotein and its allies-the elusive foes, J. Natl. Cancer Inst., 81, 910-13.

Chow, K.-C., Ross, W.E. (1987), Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression, Mol. Cell. Biol., 7, 3119-23.

Corbett, A.H. *et al* (1992), A role for the passage helix in the DNA cleavage reaction of eukaryotic topoisomerase II, J. Biol. Chem., 267, 683-6.

Covey, J.M. *et al* (1989), Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, Cancer Res., 49, 5016-22.

D'Arpa, P. *et al* (1990), Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons, Cancer Res., 50, 6919-24.

Deffie, A.M. *et al* (1988), Multifactorial resistance to adriamycin: relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux, and P- glycoprotein in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia, Cancer Res., 48, 3595-602.

Deffie, A.M. *et al* (1989, a), Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines, Cancer Res., 49, 58-62.

Deffie, A.M. *et al* (1989, b), Evidence for a mutant allele of the gene for DNA topoisomerase II in adriamycin-resistant P388 murine leukemia cells, Cancer Res., 49, 6879-82.

Devore, R.F. *et al* (1992), Phosphorylation of topoisomerase II by casein kinase II and protein kinase C: effects on enzyme-mediated DNA cleavage/religation and sensitivity to the antineoplastic drugs etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methane-sulfon-*m*-anisidide, Cancer Res., 52, 2156-61.

Endicott, J.A., Ling, V. (1989), The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, Ann. Rev. Biochem., 58, 137-71.

Ferguson, P.J. *et al* (1988), Combined modalities of resistance in etoposide-resistant human KB cell lines, Cancer Res., 48, 5956-64.

Fry, A.M. *et al* (1991), Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines, Cancer Res., 51, 6592-5.

Gewirtz, D.A. (1991), Does bulk damage to DNA explain the cytostatic and cytotoxic effects of topoisomerase II inhibitors?, Biochem. Pharmacol., 42, 2253-8.

Giaccone, G. *et al* (1992), Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cells associated with topoisomerase II expression, Cancer Res., 52, 1666-74.

Glisson, B. *et al* (1986, a), Cross-resistance to intercalating agents in an epipodophyllotoxin-resistant chinese hamster ovary cell line: evidence for a common intracellular target, Cancer Res., 46, 1939-42.

Glisson, B. *et al* (1986, b), Characterization of acquired epipodophyllotoxin resistance in a chinese hamster ovary cell line: loss of drug-stimulated DNA cleavage activity, Cancer Res., 46, 1934-8.

Goldenberg, G.J. *et al* (1986), Resistance to adriamycin: relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single- and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia, Cancer Res., 46, 2978-83.

Gottesman, M.M. (1988), Multidrug resistance during chemical carcinogenesis: a mechanism revealed?, J. Natl. Cancer Inst., 80, 1352-3.

Gottesman, M.M., Pastan, I. (1988), The multidrug transporter, a double-edged sword, J. Biol. Chem., 263, 12163-66.

Haber, D.A. (1992), Multidrug resistance (MDR 1) in leukemia: is it time to test?, Blood, 79, 295-8.

Harris, A.L., Hochhauser, D. (1992), Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment, Acta Oncol., 31, 205-13.

Heck, M.M.S. *et al* (1988), Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukaryotic cell cycle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1086-90.

Heck, M.M.S., Earnshaw, W.C. (1986), Topoisomerase II: a specific marker for cell proliferation, J. Cell Biol., 103, 2569-81.

Hoban, P.R. *et al* (1992), Reduced topoisomerase II and elevated alpha class glutathione S-transferase expression in a multidrug resistant CHO cell line highly cross-resistant to mitomycin C, Biochem. Pharmacol., 43, 685-93.

Hsiang, Y.-H. *et al* (1988), Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in culture human cells, Cancer Res., 48, 3230-5.

Hsiang, Y.-H. *et al* (1989), Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, Cancer Res., 49, 5077-82.

Jaxel, C. *et al* (1991), Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin, J. Biol. Chem., 266, 20418-23.

Kasahara, K. *et al* (1992), Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines, J. Natl. Cancer Inst., 84, 113-8.

Keith, W.N. *et al* (1992), Amplification of the topoisomerase II α gene in a non-small cell lung cancer cell line and characterization of polymorphisms at the human topoisomerase II α and β loci in normal tissue, Genes Chrom. Cancer, 4, 169-75.

Kirkpatrick, D.L. et al (1990), Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay, Leukemia Res., 14, 459-66.

Lee, M.S. *et al* (1992), Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170 kDa form of human topoisomerase II, J. Mol. Biol., 223, 837-43.

Lindsley, J.E., Wang, J.C. (1991), Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10485-9.

Liu, L.F. (1989), DNA topoisomerases poisons as antitumor drugs, Ann. Rev. Biochem., 58, 351-75.

Liu, L.F., D'Arpa, P. (1992), In "Important advances in Oncology", Edited by DeVita, V.T., Hellman, S. & Rosenberg, S.A., J.B. Lippincott Company, Philadelphia.

Lock, R.B., Ross, W.E. (1990, a), Inhibition of $p34^{cdc2}$ kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G_2 arrest in chinese hamster ovary cells, Cancer Res., 50, 3761-6.

Lock, R.B., Ross, W.E. (1990, b), Possible role for $p34^{cdc2}$ kinase in etoposide-induced cell death of chinese hamster ovary cells, Cancer Res., 50, 3767-71.

Mattern, J., Volm, M. (1992), Prediction of drug resistance in human tumors using immunohistochemical techiques, Anticancer Res., 12, 413-8.

Mimnaugh, E.G. *et al* (1989), Differential oxygen radical susceptibility of adriamycin-sensitive and -resistant MCF-7 human breast tumor cells, Cancer Res., 49, 8-15.

Minato, K. *et al* (1990), Characterization of an etoposide-resistant human small-cell lung cancer cell line, Cancer Chemother. Pharmacol., 26, 313-7.

Osheroff, N. (1986), Eukaryotic topoisomersae II, J. Biol. Chem., 261, 9944-50.

Pommier, Y. *et al* (1991), Local base sequence preferences for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of amsacrine or tenoposide, Nucleic Acids Res., 19, 5973-80.

Potmesil, M. *et al* (1988), Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II, Cancer Res., 48, 3537-43.

Pratesi, G. *et al* (1990), Relationships among tumor responsiveness, cell sensitivity, doxorubicin cellular pharmacokinetics and drug-induced DNA alterations in two human small-cell lung cancer xenografts, Int. J. Cancer, 46, 669-74.

Rothenberg, M., Ling, V. (1989), Multidrug resistance: molecular biology and clinical relevance, J. Natl. Cancer Inst., 81, 907-10.

Rothenberg, M.L. *et al* (1989), Expression of the mdr-1/P-170 gene in patients with acute lymphoblastic leukemia,Blood, 74, 1388-95.

Rowe, T.C., *et al* (1986), DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II, Cancer Res., 46, 2021-6.

Saijo, M. *et al* (1992), Growth state and cell cycle dependent phosphorylation of DNA topoisomerase II in swiss 3T3 cells, Biochemistry, 31, 359-63.

Schinkel, A.H., Borst, P. (1991), Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins, Seminars in Cancer Biol., 2, 213-26.

Schneider, E. *et al* (1989), Inhibition of protein synthesis reduces the cytotoxicityof 4'-(9-acridinylamino)methane-sulfon-*m*-anisidide without affecting DNA breakage and DNA topoisomerase II in a murine mastocytoma cell line, Biochem. Pharmacol., 38, 263-9.

Sinha, B.K. *et al* (1987), Differential formation of hydroxyl radicals by adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells: implications for the mechanism of action, Biochemistry, 26, 3776-81.

Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G. (1990), Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors, Free Rad. Biol. & Med., 8, 567-81.

Smith, P.J., Makinson, T.A. (1989), Cellular consequences of overproduction of DNA topoisomerase II in an ataxia-telangiectasia cell line, Cancer Res., 49, 1118-24.

Tan, K.B. *et al* (1989), Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors, J. Natl. Cancer Inst., 81, 1732-5.

Tan, K.B. *et al* (1992), Topoisomerase II α and topoisomerase II β genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively, Cancer Res., 52, 231-4.

Thiebaut, F. *et al* (1987), Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7735-8.

Twentyman, P.R. (1985), Predictive chemosensitivity testing, Br. J. Cancer, 51, 295-9.

Veerman, A.J.P., Pieters, R. (1990), Drug sensitivity assays in leukaemia and lymphoma , Br. J. Haematol., 74, 381-4.

Wang, J.C. (1985), DNA topoisomerases, Ann. Rev. Biochem., 54, 665-97.

Waxman, D.J. (1990), Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy, Cancer Res., 50, 6449-54.

Webb, C.D. *et al* (1991), Attenuated topoisomerase II content directly correlates with a low level of drug resistance in a chinese hamster ovary cell line, Cancer Res., 51, 6543-9.

Weisenthal, L.M. *et al* (1983, a), A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumors, Cancer Res, 43, 749-57.

Weisenthal, L.M. *et al* (1983, b), Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity, Cancer Res., 43, 258-64.

Weisenthal, L.M., Lippman, M.E. (1985), Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays, Cancer Treat. Rep., 69, 615-32.

Whelan, R.D.H. *et al* (1992), Over-expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase PI in MCF-7 cells selected for vincristine resistance *in vitro*, Int. J. Cancer, 52, 241-6.

Wozniak, A.J., Ross, W.E. (1983), DNA damage as a basis for 4'-demethylepipodophyllotoxin-9-(4,6-O-ethylidene-β-D-glucopyranosode) (etoposide) cytotoxicity, Cancer Res., 43, 120-4.

II - PARTE EXPERIMENTAL

1. "MTT Assay"

1. "MTT Assay"

A desidrogenase mitocondrial do succinato reduz o sal solúvel de tetrazólio (MTT) num produto insolúvel de cor violeta ("formazan") (Slater, T.F. *et al* 1963) que, posteriormente, pode ser dissolvido em DMSO. Esta reacção pode ser aplicada na quantificação da viabilidade celular, através da leitura da absorvância num espectrofotómetro, uma vez que a conversão só se dá na presença de células viáveis e a quantidade de "formazan" produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes.

A primeira descrição de um método colorimétrico, rápido e simples, usando o MTT, para estimar o número de células viáveis em linhas celulares foi feita por Mosmann, T. em 1983.

Mais tarde o "MTT assay" foi adaptado para testar a quimiossensibilidade de células leucémicas da medula óssea ou de sangue periférico de doentes (Sargent, J.M., Taylor, C.G., 1989; Twentyman, P.R. *et al* 1989; Campling, B.G. *et al* 1988) e os resultados obtidos são concordantes com os do "Disc assay" (Pieters, R. *et al* 1989; Twentyman, P.R. *et al* 1989; Kirkpatrick, D.L. *et al* 1990; Hanson, J.A. *et al* 1991). Já foi descrita a utilização deste teste para avaliação da sensibilidade a vários agentes quimioterápicos em células recém colhidas de neoplasias gástricas humanas (Yamaue, H. *et al* 1992).

É um teste de curto termo que usa um pequeno número de células em suspensão obtendo-se os resultados ao fim de 2-4 dias. A leitura é feita automaticamente num espectrofotómetro de leitura de placas de Elisa, o que elimina os erros de observador. Demora cerca de 1 hora processar uma microplaca de 96 poços onde se testaram várias concentrações de drogas enquanto que com o "Disc assay" seriam necessárias cerca de 12 a 16 horas (Pieters, R. *et al* 1989). No entanto, com o "MTT assay" não é possível distinguir entre os vários tipos de células que se encontram na amostra em estudo (cf. cit. Kaspers, G.J.L. *et al* 1991).

O "MTT assay" será utilizado para avaliar a sensibilidade de células neoplásicas de doentes leucémicos ou com linfomas à doxorrubicina (Farmatalia Carlo Erba), ao etoposídeo (Bristol Farmacêutica Portuguesa) e ao Ara C (Upjohn) descrevendo-se, a seguir, a optimização desta técnica com CMN de indivíduos normais e com as linhas celulares K562 e K562/R7.

1.1. Material de trabalho

1.1.1. Obtenção de material clínico e separação de células mononucleares

Foi colhido sangue em heparinato de cálcio (500 U.I. / ml de sangue) a dadores normais voluntários do Serviço de Sangue do Hospital de S. João e, logo que possível, diluído 1:2 com RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de FCS (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 50 U.I. de penicilina / estreptomicina (Gibco) e 1 mM de piruvato de sódio (Gibco). Separei a fracção de células mononucleares num gradiente de LSM (meio de separação de linfócitos, Gibco) durante 30 minutos a 350 g sendo a interface recolhida e lavada 2 vezes com RPMI 1640 com aditivos. Após a última lavagem, ressuspendi as células em RPMI 1640 com aditivos mas sem vermelho de fenol (Gibco) e ajustei a concentração celular para os valores abaixo referidos (cf. pontos 1.2.2. e 1.2.3.).

1.1.2. Obtenção de células das linhas celulares K562 e K562/R7

A linha celular leucémica humana K562 (derivada de um doente em crise blástica eritroleucémica de leucemia mielóide crónica) e a sua mutante K562/R7 resistente à doxorrubicina, generosamente cedidas pelo Prof. Jean-Pierre Marie, são mantidas em crescimento exponencial no nosso laboratório. As linhas celulares são alimentadas 3 vezes por semana com RPMI com aditivos e 1% de fungizona (Gibco) mas como as K562/R7 expressam glicoproteína-P adiciona-se, 1 vez por semana, 0.5 µg de DXR/ml para manutenção da resistência. Nas experiências com as linhas lavei as células 2 vezes com RPMI completo mas sem vermelho de fenol e ajustei a concentração celular para os valores citados em 1.2.2. e 1.2.3..

1.2. Optimização do "MTT assay"

Utilizei CMN de indivíduos saudáveis e células das linhas celulares para testar as várias condições deste teste de viabilidade. Executei sempre em triplicado todas as condições testadas em cada experiência que foi necessário realizar para a optimização desta técnica.

1.2.1. Solução de MTT

Dissolvi o MTT (Sigma, M-2128) em PBS estéril (Gibco, sem Ca e sem Mg) sendo a solução stock (5 mg/ml) armazenada no escuro e a 4ºC por um período de tempo não superior a 3 semanas. Filtrei sempre esta solução antes de a usar (Schleider & Schuell, 0,2 µm) para remoção de pequenas quantidades de cristais de "formazan" que se tivessem formado.

1.2.2. Linearidade : Cc. de MTT vs Densidade Óptica / Cc. Celular vs Densidade Óptica

Este conjunto de experiências permitiu-me escolher qual a melhor concentração de MTT assim como a adequada concentração celular a aplicar por poço nas placas de 96 poços de fundo em U (Nunclon). A escolha das placas de fundo em U em relação às de fundo chato deveu-se ao facto de estas últimas não aguentarem a velocidade de centrifugação utilizada para deposição dos cristais de "formazan" observando-se o derramamento do DMSO adicionado para a solubilização do precipitado violeta. A escolha deste solvente orgânico está de acordo com vários trabalhos (Carmichael, J. *et al* 1987 (a, b); Twentyman, P.R., Luscombe, M., 1987; Twentyman, P.R. *et al* 1989; Kirkpatrick, D.L. *et al* 1990; Hanson, J.A. *et al* 1991).

As concentrações celulares inicialmente testadas variaram entre 30 x 10^5 cél/ml e 10 x 10^5 cél /ml para as CMN e entre 21 x 10^5 e 2.5 x 10^5 cél/ml para as K562 e K562/R7.

Apliquei, em triplicado, 100 µl de cada concentração celular por poço adicionando em seguida o mesmo volume das seguintes concentrações de MTT: 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, a cada uma das diferentes suspensões celulares.

De notar que mantive constante, durante todo o procedimento experimental, o volume de suspensão celular aplicado por poço mas num passo posterior, aquando do estudo da exposição às drogas, reduzi o volume da solução de MTT, facto que será referido na altura apropriada.

1.2.3. Tempo de incubação com o MTT

Para seleccionar o melhor tempo de incubação com o MTT preparei placas com K562 e K562/R7 nas concentrações de 1 e 2.5 X 10^5

cél/ml e com CMN nas concentrações de 1 e 10 X 10^5 cél/ml variando a exposição ao MTT de 1 a 6 horas.

1.2.4. Solubilização dos cristais de "formazan"

Após o tempo de incubação apropriado da suspensão celular com a solução de MTT numa estufa a 37 ºC as placas foram centrifugadas durante 15 minutos a 400 g. Este passo é necessário para a sedimentação das células e remoção do sobrenadante (MTT não utilizado). Posteriormente adicionei a cada poço 200 µl de DMSO (Sigma, D-5879) para solubilização dos cristais de "formazan".

A remoção do sobrenadante foi tentada de 2 modos distintos: por inversão rápida da placa (Denizot, F., Lang, R., 1986; Sargent, J.M., Taylor, C.G., 1989) ou por recolha do sobrenadante poço a poço, cuidadosamente para não pertubar os cristais de "formazan" (Twentyman, P.R., Luscombe, M., 1987; Twentyman, P.R. *et al* 1989; Hongo, T. *et al* 1990; Kirkpatrik, D.L. *et al* 1990). Acabei por optar pelo 2º método por razões que serão apresentadas na discussão de resultados.

Para facilitar a solubilização do precipitado violeta agitei cada poço com a micropipeta. A absorvância dos cristais foi lida num espectrofotómetro de leitura de placas de Elisa (Diagnostics Pasteur) a 550 nm utilizando um filtro de 620 nm para referência. De notar que se devem eliminar todas as bolhas que se formam durante a solubilização do precipitado violeta com a ajuda da micropipeta porque interferem na leitura, diminuindo a densidade óptica.

1.2.5. Exposição às drogas

Este conjunto de experiências permitiu-me escolher qual a concentração dos agentes quimioterápicos e o tempo de incubação óptimos para avaliar a morte celular nas amostras de doentes. O tempo de exposição ao agente citotóxico e as concentrações testadas são descritas na tabela nº1.

As soluções stock de cada droga (cf. tabela nº1) foram feitas em PBS estéril e conservadas a -70 ºC e as diluições, para um valor 3 vezes mais concentrado que o indicado na tabela nº1, foram feitas na altura de cada experiência em RPMI 1640 com aditivos mas sem vermelho de fenol. Apliquei 50 µl de cada concentração de droga por poço.

Droga Solução stock (mg/ml)	Tempo de exposição (horas)	K562 K562/R7 Cc. final	CMN (sangue periférico) (µg/ml)
Ara C 1.25	24 48 72	.0016 -- 15	.1-- 20
Doxorrubicina 0.05	24 48 72	.05 -- 1	.15 -- 1.25
Etoposídeo 1	24 48 72	.5 -- 200	1 -- 100

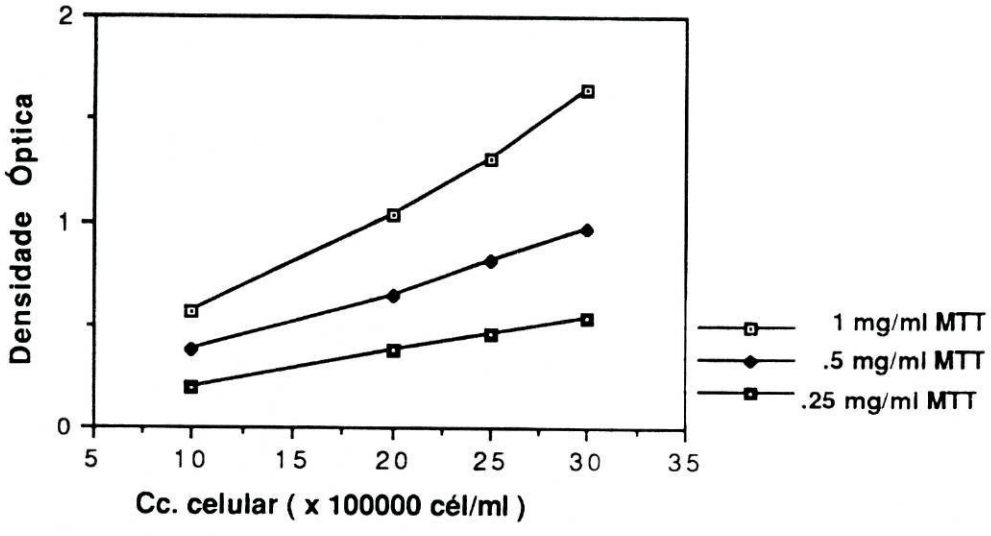
Tab. nº1: Drogas e respectivos intervalos de concentração utilizados para 1, 2 e 3 dias de exposição.

Nesta altura, como o volume por poço era de 150 µl (100 µl de suspensão celular + 50 µl de droga), passei a aplicar 50 µl de MTT no dobro da concentração que inicialmente escolhi. A adição deste composto foi feita 4 horas (tempo considerado óptimo, ver discussão de resultados) antes do fim dos diferentes tempos de incubação com a droga, sendo o resto do procedimento experimental idêntico ao anteriormente descrito.

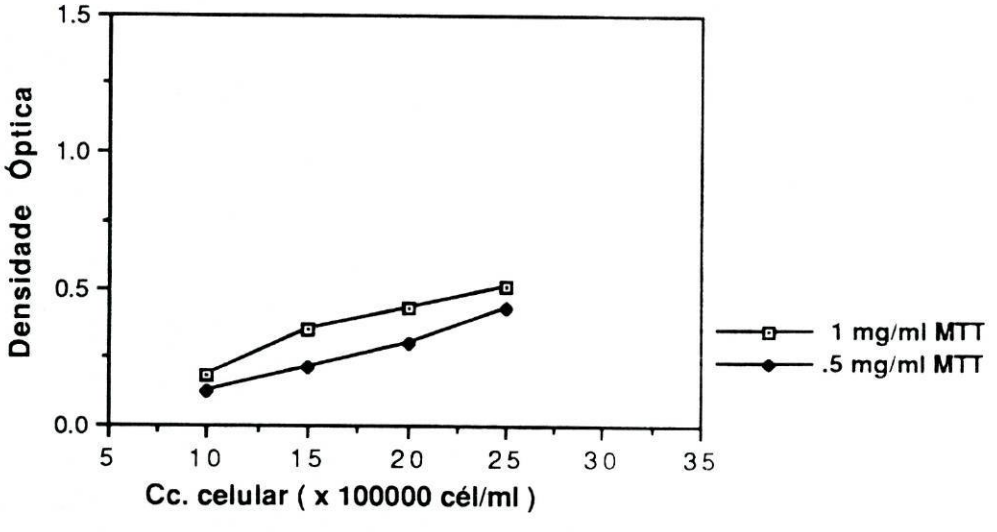
1.3. Resultados e discussão

Testei a relação entre número de cél/poço e densidade óptica para CMN, K562 e K562/R7 usando 3 concentrações diferentes de MTT, encontrando-se os resultados nas tabelas 2, 3, e 4, respectivamente.

Observa-se linearidade no aumento da densidade óptica com o aumento da concentração celular (concentração de MTT fixa) ou com o aumento da concentração de MTT (concentração celular fixa), que pode ser confirmada nos gráficos nº1 (nº1a e nº1b) e nº2, respectivamente.



(Gráf. nº1a, 2º método de remoção do sobrenadante, exp. nº1a)



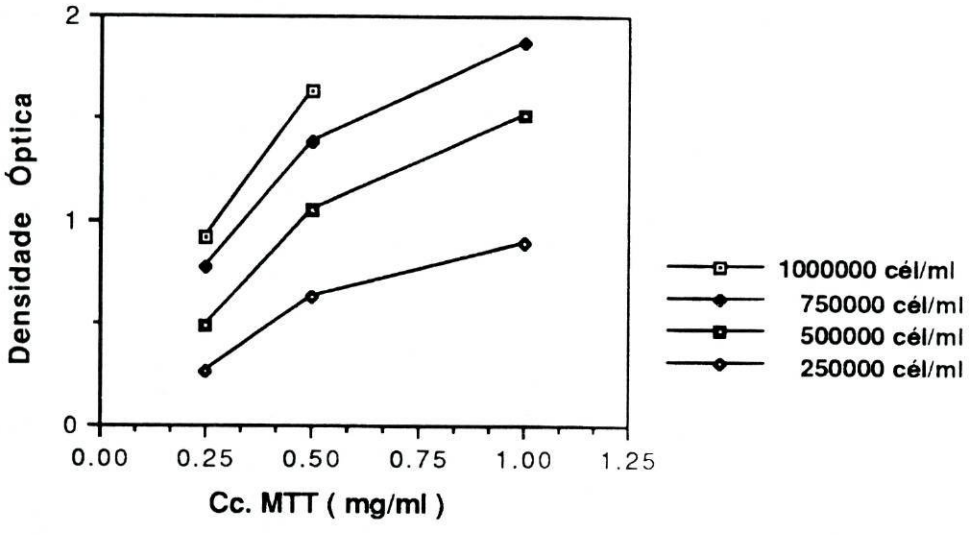
(Gráf. nº1b, 1º método de remoção do sobrenadante, exp. nº2a)

Gráf. nº1: Densidade óptica vs cc. celular de CMN (com cc. de MTT fixa).
Resultados que constam da tab. nº2, exp. nº1a e nº2a.
Apliquei 100 µl de cada uma das ccs indicadas para o MTT e CMN , sendo as ccs finais metade dos valores dos gráficos.

Ambos os métodos utilizados na remoção do MTT sobrenadante (não utilizado) das placas, antes da adição do DMSO, mostraram relação

linear mas o 2º método (remoção poço a poço) origina valores mais elevados de absorvância para as mesmas condições experimentais (concentração celular e de MTT) e maiores diferenças nos valores de absorvância de uma mesma concentração celular incubada com diferentes concentrações de MTT, como se pode apreciar nos gráficos nº1a e nº1b.

Assim, relativamente ao MTT escolheu-se a concentração de 1 mg/ml, por ser a que origina maiores valores de absorvância para uma concentração celular constante, e em relação às CMN a de 2 x 10^6 cél/ml, por proporcionar valores de D.O. suficientemente altos para se poder quantificar a morte celular, ou seja, a diminuição da absorvância após exposição a agentes citotóxicos. Relativamente às linhas celulares K562 e K562/R7 escolhi a concentração de 6 x 10^4 cél/ml de modo que, no estudo da exposição destas células aos agentes citotóxicos, os controlos ao fim de 3 dias de incubação não originem valores de D.O. que ultrapassem a escala do espectrofotómetro mas que, simultaneamente, me permitam obter valores suficientemente altos ao fim de 1 dia de incubação para poder quantificar a morte celular. Os valores de D.O. obtidos ao longo dos 3 dias são da mesma ordem de grandeza que os das curvas de linearidade iniciais.

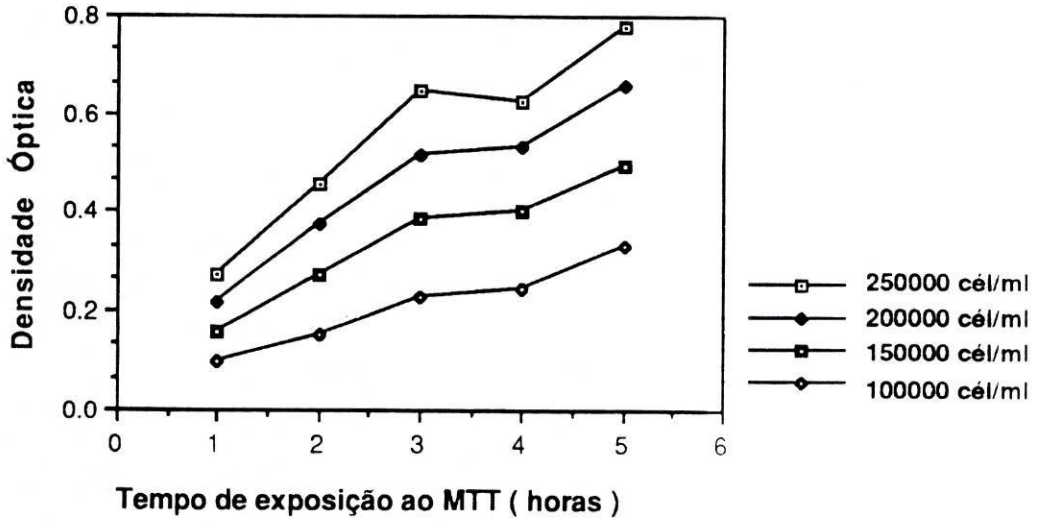


Gráf. nº2: Densidade óptica vs cc. de MTT (com cc. celular de K562 fixa).
Resultados que constam da tab. nº3 exp. nº3.
Apliquei 100 µl de cada uma das ccs indicadas para o MTT e CMN, sendo as ccs finais metade dos valores do gráfico.

O quadro nº1 mostra que as concentrações de MTT e de CMN escolhidas e testadas estão de acordo com as utilizadas por outros investigadores.

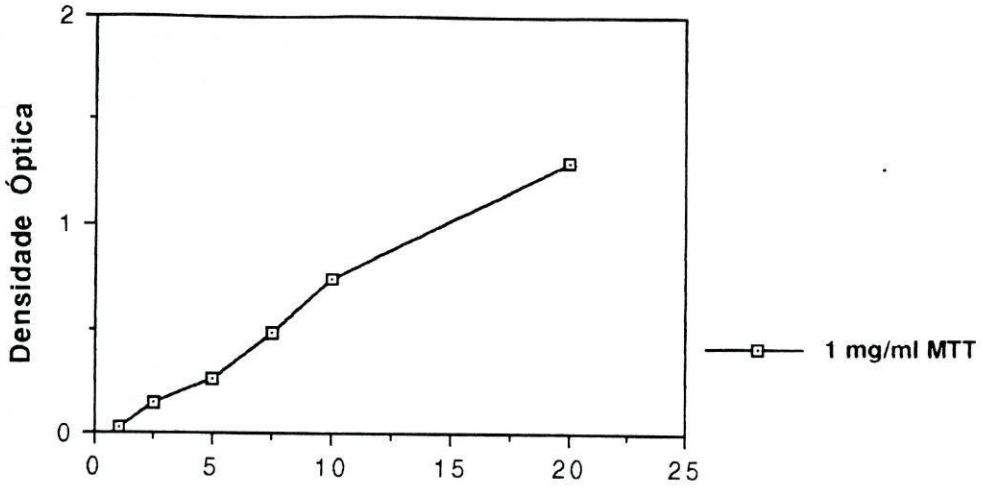
O gráfico nº3 mostra-nos que a linearidade entre D.O. e número de cél/poço se mantém para as K562 (e K562/R7) e CMN se diminuirmos a concentração celular até 1.0 x 10^5 e 2.5 x 10^5 cél/ml, respectivamente.

O efeito da duração do período de incubação com o MTT nos valores de D.O. foi examinada para os 3 tipos de células (tabelas 5, 6 e 7). A absorvância aumenta com o tempo de exposição ao MTT (no intervalo testado). No entanto, como ao fim de 4 horas de exposição já há suficiente formação de cristais para uma leitura eficaz (valores de densidade óptica superiores a 0.100) em todas as concentrações celulares testadas, optei por este tempo por uma questão de organização de trabalho.

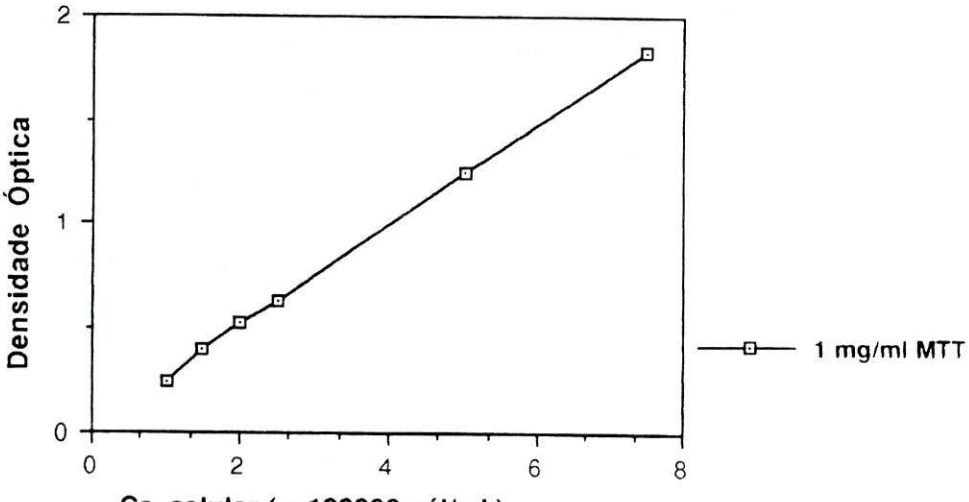


Gráf. nº4: Efeito do tempo de exposição ao MTT (apliquei 100 µl de uma sol. a 1 mg/ml) na produção de "formazan" pelas K562 em 4 ccs diferentes (cf. tab. nº6, exp. nº5). Apliquei 100 µl de cada uma das ccs celulares indicadas no gráfico sendo o volume final da reacção de 200 µl.

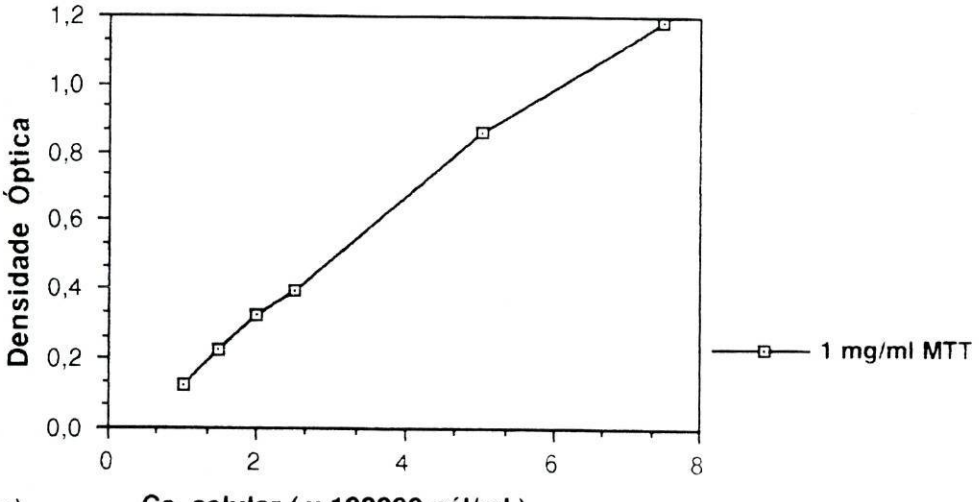
No entanto, como se pode observar no gráfico nº4, há um aumento na produção de cristais de "formazan" para as diferentes concentrações de K562 até às 5 horas de incubação com o sal (tempo máximo testado) aumentando-se a sensibilidade do teste de forma a detectar diferenças de 5 x 10^3 células (até ao valor mínimo testado de 100000 cél/ml). O mesmo se conclui para as CMN e K562/R7.



(Gráf. nº3a)



(Gráf. nº3b)



(Gráf. nº3c)

Gráf. nº3: Intervalo máximo de linearidade testado entre densidade óptica e cc. celular (apliquei 100 µl de uma sol. de MTT a 1 mg/ml). Apliquei 100 µl de cada uma das ccs indicadas para as CMN sendo as ccs finais metade dos valores dos gráficos.
Gráfico nº3a: CMN, resultados da tab. nº2 e exp. nº3.
Gráfico nº3b: K562, resultados da tab. nº3 e exp. nº4.
Gráfico nº3c: K562/R7, resultados da tab. nº4 e exp. nº2.

Nestes estudos observei perda da linearidade e irregularidade no aumento da absorvância com o aumento da concentração celular e do tempo de exposição ao MTT quando removi o MTT sobrenadante invertendo a placa.

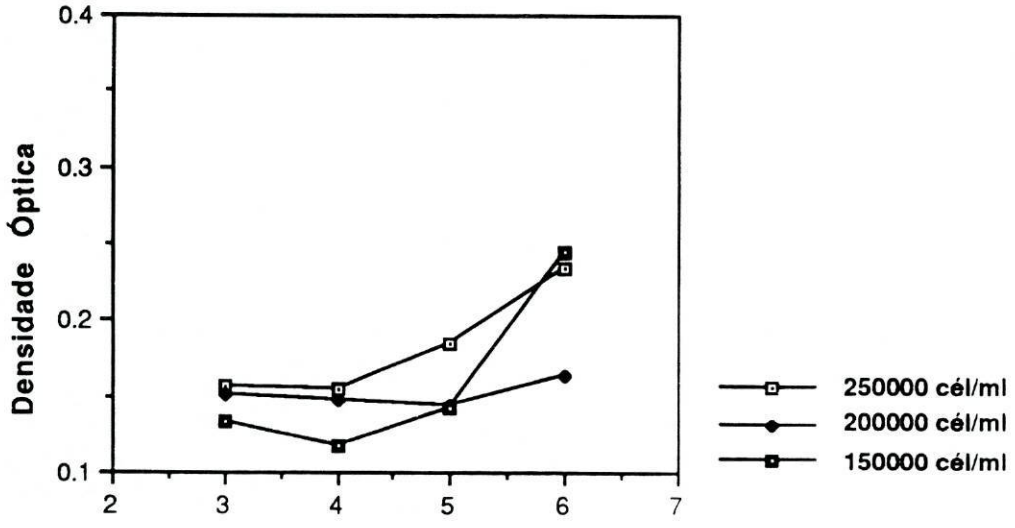
Nos gráficos nº5a e nº5b podem-se observar exemplos do anteriormente referido:

- gráfico nº5.a) não se notam as esperadas diferenças na D.O. para as diferentes concentrações de R7 nem o aumento da absorvância com o aumento do tempo de exposição ao MTT (dados que constam da tab. nº7 exp. nº4)
- gráfico nº5.b) observa-se um ligeiro aumento no valor da absorvância com o aumento do tempo de exposição ao MTT, até 3 horas de incubação com o MTT, mas não se notam as diferenças esperadas das várias concentrações de K562 utilizadas (dados que constam da tab. nº6 exp. nº1).

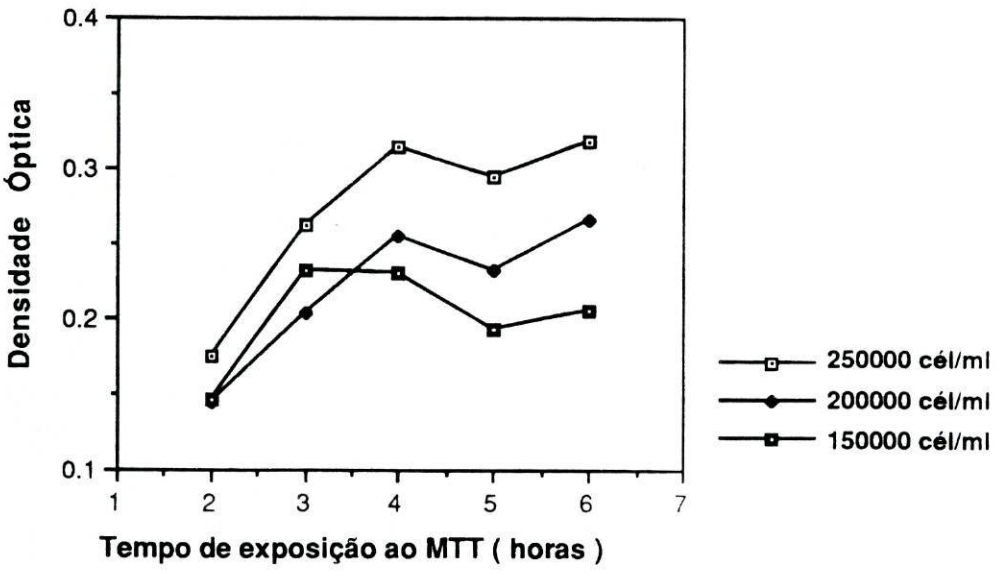
Após a padronização de 4 condições fundamentais para este teste de viabilidade (concentração de CMN, linhas celulares e de MTT, tempo de exposição ao sal e remoção do sobrenadante) estudei o efeito na viabilidade celular da duração da incubação das células com as drogas.

Referência bibliográfica	Cc. final de CMN (*) (cél/ml)	Cc. final de MTT (*) (mg/ml)	Tempo de exposição ao MTT (horas)
Twentyman, P.R. *et al* 1989	0.8×10^6	0.4	5
Hongo, T. *et al* 1990	1.67×10^6	0.42	4
Pieters, R. *et al* 1989	0.7×10^6	0.45	6
Campling, B.G. *et al* 1988	$4.44 - 22 \times 10^5$	0.22	6
Kirkpatrick, D.L. *et al* 1990	2.3×10^6	0.45	24
Eu	1×10^6	0.5	4

Quadro nº1: Comparação das condições experimentais que padronizei com as utilizadas por outros investigadores. (*) O cálculo das ccs finais foi feito tendo em conta os volumes das suspensões celulares, das soluções de droga e de MTT.



(Gráf. nº5a)



(Gráf. nº5b)

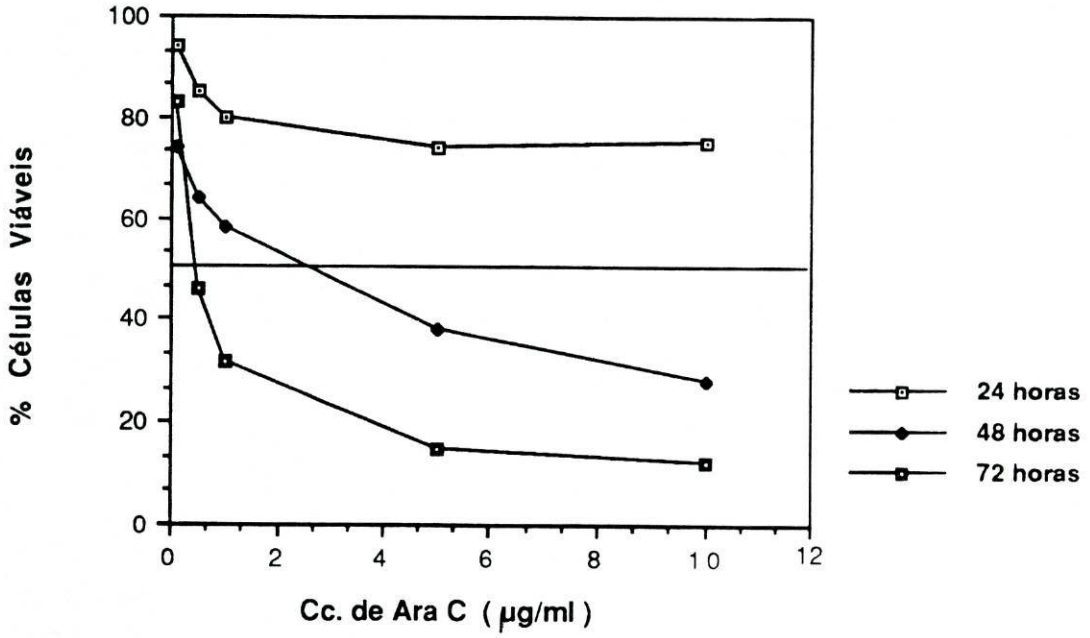
Gráf. nº5: Influência do método de remoção do sobrenadante nos valores de absorvância dos vários tempos de incubação das células das 2 linhas celulares com o MTT (100 µl de uma sol. a 1 mg/ml).
Apliquei 100 µl de cada uma das ccs celulares indicadas nos gráficos sendo o volume final da reacção de 200 µl.

A percentagem de células viáveis é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cél. viáveis} = \frac{\text{D.O. (cél. tratadas com droga)- D.O. (meio com droga)}}{\text{D.O. (cél. controlo) - D.O. (meio)}} \times 100$$

As tabelas nº8, nº9 e nº10 indicam os resultados obtidos com as CMN após exposição durante 1, 2 e 3 dias ao Ara C, à DXR e ao EPD respectivamente.

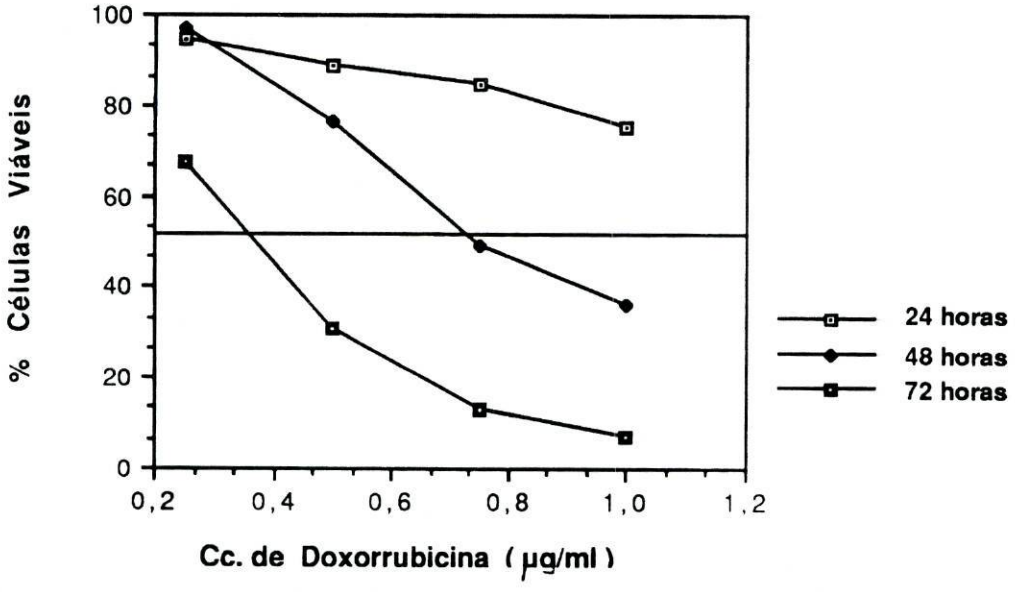
O gráfico nº6 (exp. nº1, tab. nº8) mostra-nos (para uma experiência representativa) que é ao fim do 3º dia de exposição ao Ara C que se observam os valores mais baixos de viabilidade celular. Obtém-se 50 % de morte celular ao fim de 3 dias com uma concentração de Ara C ligeiramente inferior a 0.5 µg/ml.



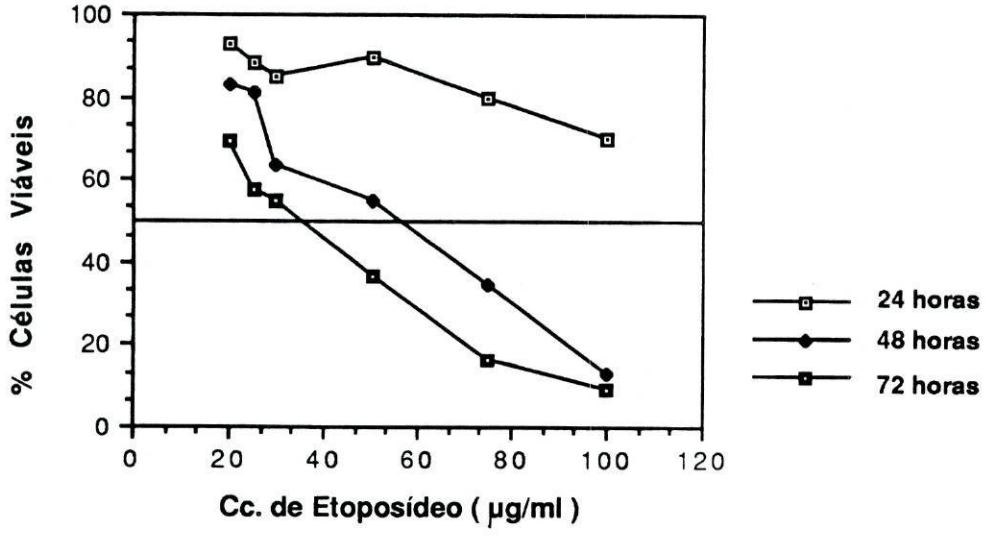
Gráf. nº6: Viabilidade celular das CMN após exposição ao Ara C.
% de células viáveis vs cc. de Ara C para 1, 2 e 3 dias de incubação com a droga.
Resultados da exp. nº1 da tab. nº8.

Também se obtêm no 3º dia as menores percentagens de viabilidade celular para a exposição à DXR e ao EPD, gráficos nº7 e nº8 respectivamente. Observa-se 50% de morte celular para a exposição à DXR e ao EPD ao fim de 3 dias para concentrações nos intervalos 0.25 - 0.5 µg/ml e 30 - 50 µg/ml respectivamente. A título de curiosidade, o gráfico

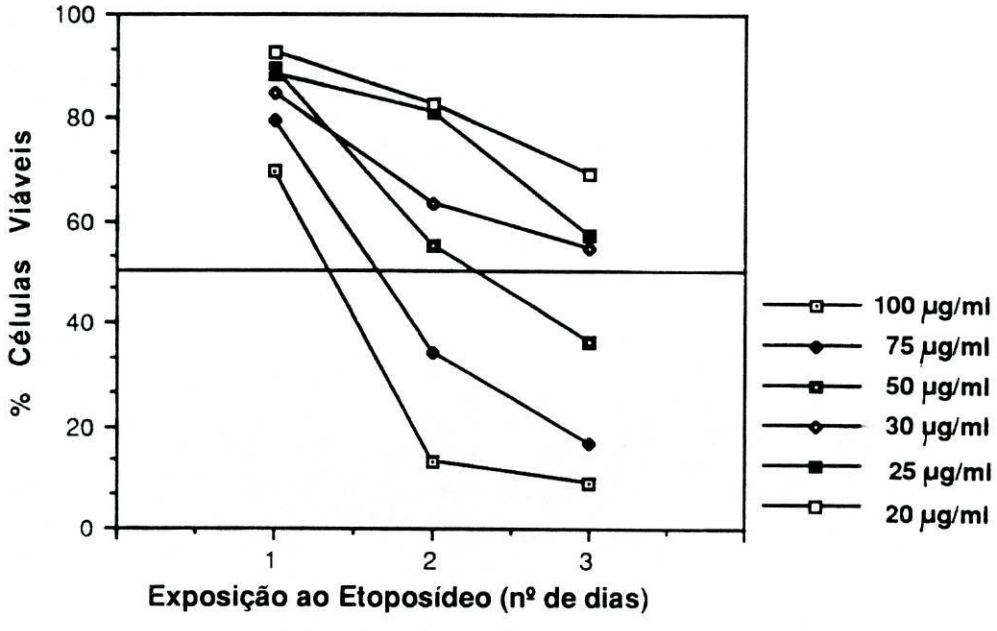
nº9, com os mesmos dados do gráfico nº8, representa a diminuição da viabilidade celular para cada concentração de EPD ao longo dos 3 dias.



Gráf. nº7: Viabilidade celular das CMN após exposição à doxorrubicina.
% de células viáveis vs cc. de doxorrubicina para 1, 2 e 3 dias de incubação com a droga. Resultados da exp. nº6 da tab. nº9.



Gráf. nº8: Viabilidade celular das CMN após exposição ao etoposídeo.
% de células viáveis vs cc. de etoposídeo para 1, 2 e 3 dias de incubação com a droga. Resultados da exp. nº11 da tab. nº10.

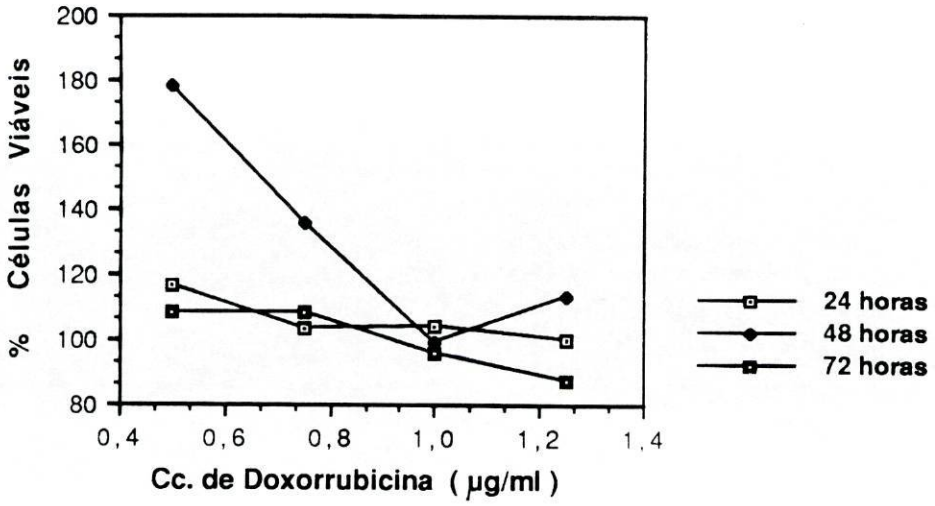


Gráf. nº9: Viabilidade celular das CMN após exposição ao etoposídeo.
% de células viáveis vs dias de exposição ao etoposídeo para as diferentes ccs utilizadas.
Resultados da exp. nº11 da tab. nº10.

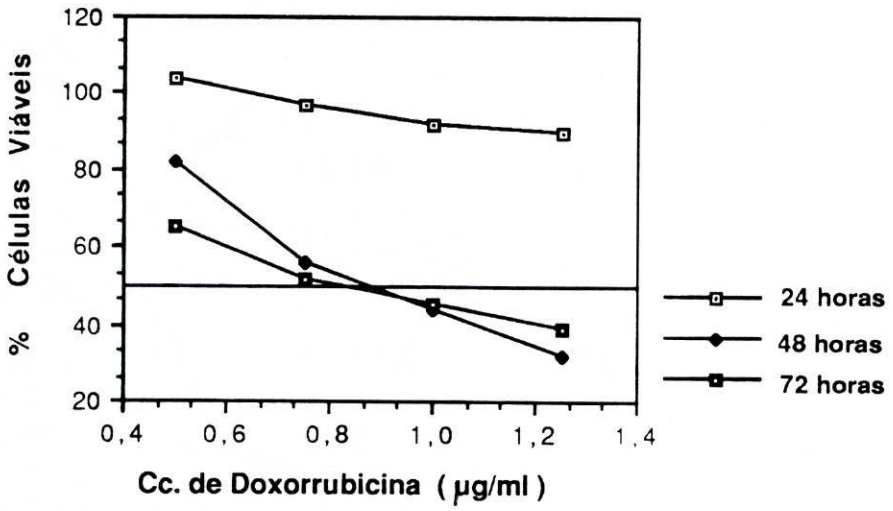
Não se alargou o tempo de exposição aos agentes quimioterápicos uma vez que para quase todas as 14 experiências realizadas se observa uma ligeira diminuição da viabilidade das CMN controlo ao fim de 3 dias de cultura sem estímulo (tab. nº11).

Os gráficos nº10a e nº10b e a tabela nº12 mostram como o 1º método de remoção do sobrenadante influenciava os resultados, introduzindo um erro sistemático como se verá a seguir:

- gráfico nº10.a) não se observa qualquer efeito da doxorrubicina na % de células viáveis obtendo-se valores maiores do que 100 % (exp. nº19);
- gráfico nº10.b) observa-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do agente citotóxico e aumento com o tempo de exposição à droga (no entanto, a diferença entre os valores de % de células viáveis ao fim de 2 e 3 dias é muito pequena, exp. nº18).



(Gráf. nº10a)

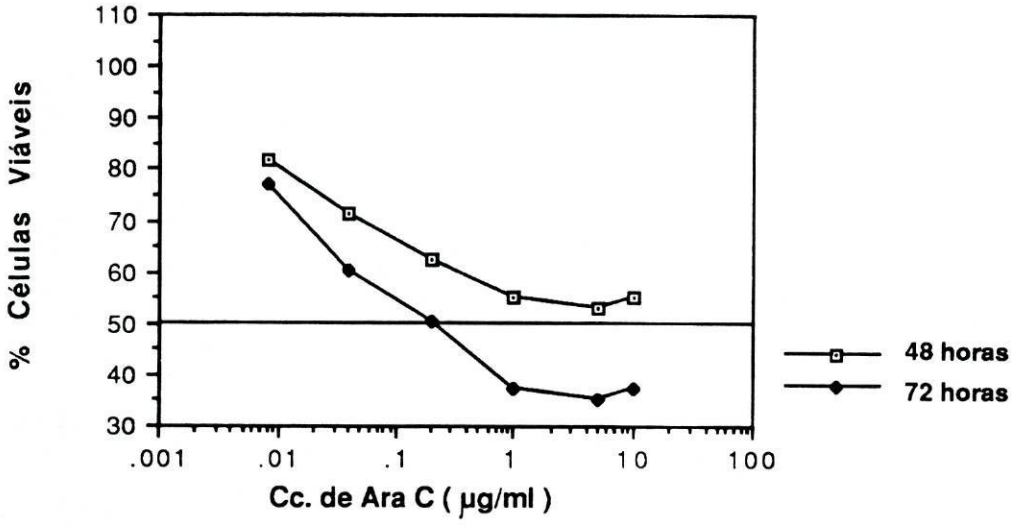


(Gráf. nº10b)

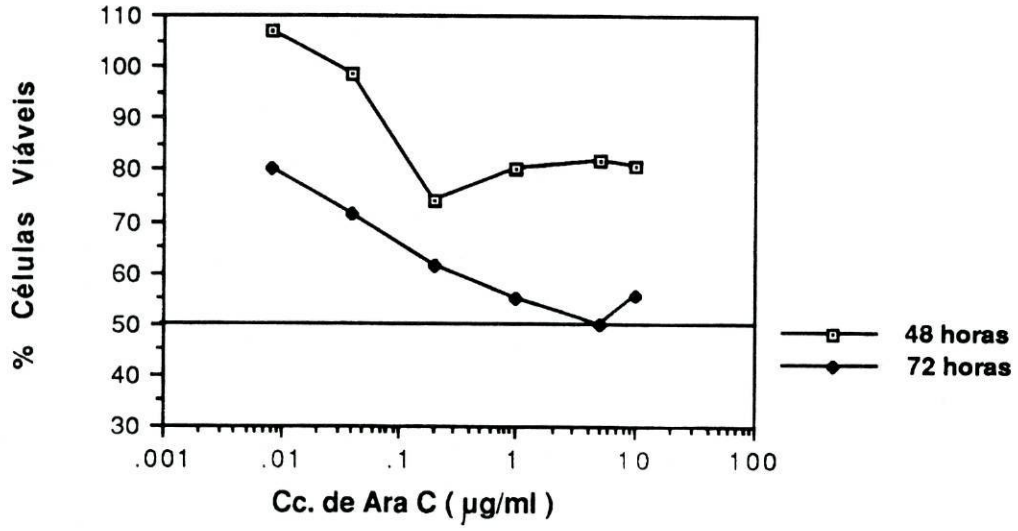
Gráf. nº10: Viabilidade celular das CMN após exposição à doxorrubicina.
% de células viáveis vs cc. de doxorrubicina para 1,2 e 3 dias de incubação com a droga. Resultados da exp. nº18 e 19 da tab. nº12.
Embora estas experiências sejam anteriores às outras das tabelas nº8, nº9 e nº10 a sua numeração mais elevada deve-se à ordem de aparecimento na discussão de resultados.

Com as células K562 e K562/R7 obteve-se um comportamento semelhante ao das CMN durante a exposição aos 3 agentes citotóxicos referidos: são necessárias 72 horas de incubação para se observar a maior citotoxicidade dos 3 agentes, embora esta seja sempre mais elevada nas K562.

Para o Ara C concentrações entre 1 e 15 µg/ml originam valores de % de viabilidade celular praticamente idênticos embora variando com o tempo de incubação (tab. nº13). Para obter diferenças sensíveis na percentagem de viabilidade celular experimentei um intervalo de concentrações de Ara C entre 10 e 0.0016 µg/ml (com 4 diluições sucessivas de 1:5 a partir da sol. a 1 µg/ml). Como se pode ver no gráfico 11 as diferenças mais amplas obtinham-se após 3 dias de exposição à droga e o valor de 50% de viabilidade celular, com este tempo de incubação, é alcançado com as concentrações de 0.2 µg/ml para a linha K562 e de 5 µg/ml para a linha K562/R7.

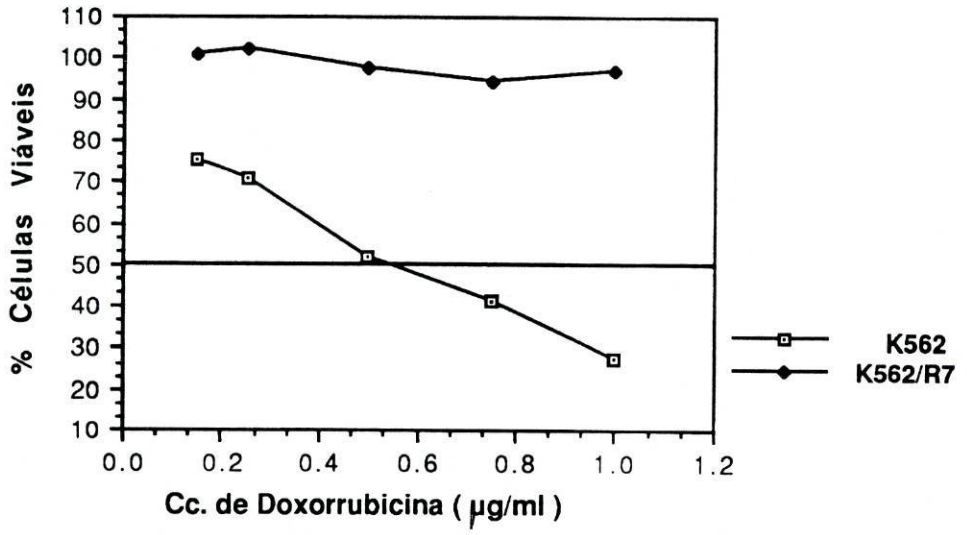


(Gráf. nº11a, K562)



(Gráf. nº11b, R7)

Gráf. nº11: Viabilidade celular das K562 (a) e K562/R7 (b) após exposição ao Ara C. % de células viáveis vs cc. de Ara C para 2 e 3 dias de incubação com a droga. Resultados da experiência nº4 da tabela nº13

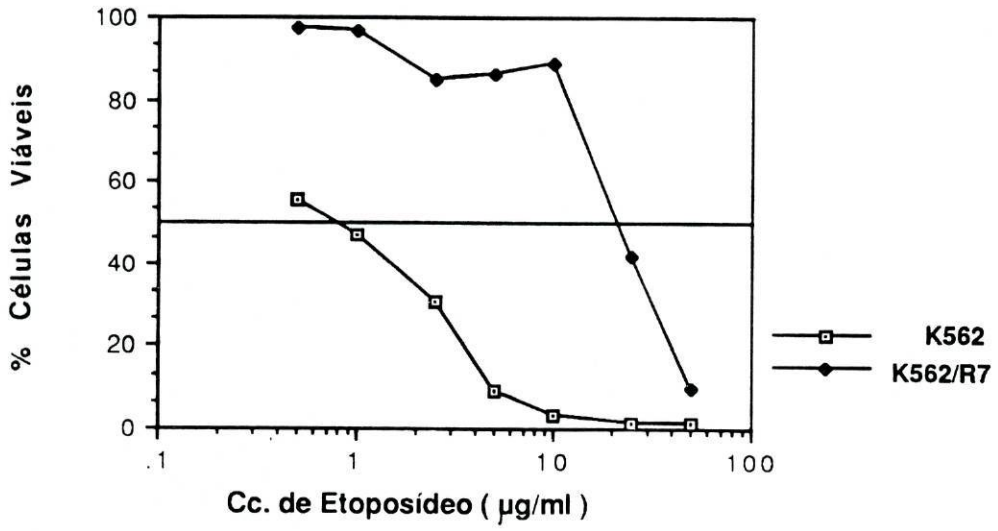


Gráf. nº12: Viabilidade celular das K562 e K562/R7 após 3 dias de exposição à doxorrubicina. % de células viáveis vs cc. de doxorrubicina. Resultados da exp. nº3 da tab. nº14.

A viabilidade das K562/R7 mantém-se praticamente inalterada ao fim de 3 dias de incubação com a doxorrubicina, como se pode observar no gráfico nº12, o que já não acontece para a linha K562 observando-se

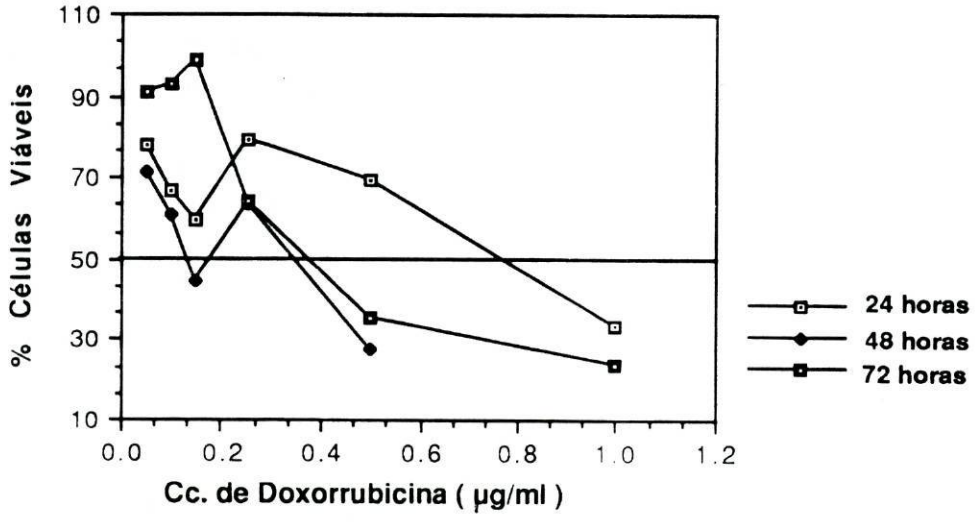
50% de morte celular com a concentração de 0.5 µg/ml ao fim dos mesmos 3 dias (tabela nº14).

Para o etoposídeo (tab. nº15) comecei por utilizar um intervalo de concentrações amplo mas que se veio a revelar demasiado elevado pois obtinha valores de viabilidade muito baixos, mesmo ao fim de um dia de exposição das K562 a este composto (exp. nº1), com concentrações iguais ou superiores a 50 µg/ml. Isto obrigou-me a reduzir as concentrações. As outras experiências mostram como se comportam as K562 e as K562/R7 quando expostas a valores mais baixos de etoposídeo (gráf. nº13). Ao fim de 3 dias de incubação com a droga obtenho 50% de morte celular para as K562 com uma concentração no intervalo 0.5 - 1 µg/ml e para as K562/R7 com uma concentração no intervalo 10 - 25 µg/ml de etoposídeo.

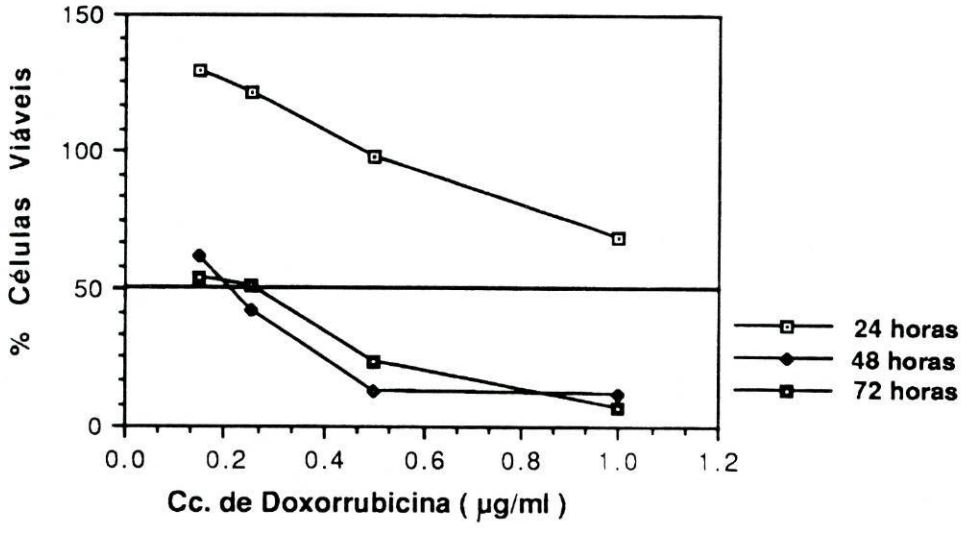


Gráf. nº13: Viabilidade celular das K562 e K562/R7 após exposição ao etoposídeo.
% de células viáveis vs cc. de etoposídeo para 3 dias de incubação com a droga.
Resultados da exp. nº3 da tab. nº15.

Mais uma vez mostro, agora no gráfico nº14 e para as K562 e K562/R7 expostas à doxorrubicina, como os resultados eram modificados pelo método de remoção do MTT não utilizado.



(Gráf. nº14a)



(Gráf. nº14b)

Gráf. nº14: Viabilidade celular das K562 (só esta linha celular por uma questão de simplicidade) após exposição à doxorrubicina.
% de células viáveis vs cc. de doxorrubicina para 1,2 e 3 dias de incubação com a droga.
Gráf. 14a: curva bifásica, exp. nº1a da tab. nº16;
Gráf. 14b: alguns valores de % de viabilidade celular superiores a 100 e no 3º dia algumas % são superiores às do 2º dia, exp. nº5 da tab. nº 16.

Foi com as experiências em que obtive os resultados presentes na tabela 16 que detectei o que alterava os resultados (curva bifásica, valores superiores a 100%, más correlações com o tempo de exposição ao MTT). Como?

Nas 3 primeiras experiências a disposição da droga nas placas era a esquematizada na figura nº1:

Experiência nº	Poços			
	Cc. de doxorrubicina (µg/ml)			
1,a (K562)	1 0.15	0.5 0.1	0.25 0.05	0 (cont. K562)
1,b (K562)				
1,a (R7)	1 0.15	0.5 0.1	0.25 0.05	0 (controlo R7)
1,b (R7)				

Figura nº1

Não sendo *a priori* de esperar que a concentração de 0.15 µg/ml fosse mais citotóxica do que a de 0.25 µg/ml continuei a repetir as experiências, para ter a certeza de que tal facto não era devido a um erro de diluições das drogas aplicadas, e reduzi o intervalo de concentrações testadas para 0.15 - 1 µg/ml.

A partir da altura em que a disposição na placa passou a ser a representada na figura nº2 deixei de obter a curva bifásica (exp. nº4, nº5, nº6, nº7 e nº8).

Experiência nº	Poços			
	Cc. de doxorrubicina (µg/ml)			
5 (K562)	1	0.5	0.25	0.15
5 (R7)	1	0.5	0.25	0.15
5 (R7)	1 (+ verapamil)	0.5 (+ verapamil)	0.25 (+ verapamil)	0.15 (+ verapamil)
5 (controlo)		R7	K562	

Figura nº2

Contudo, nestas mesmas experiências, comecei a obter valores superiores a 100 para a percentagem de células viáveis. Notando, com as experiências nº4, nº5, nº6 e nº7 da tabela nº16, que os resultados eram tanto mais anómalos quanto mais afastados eram as localizações dos controlos relativamente às células expostas às drogas, na experiência nº8 coloquei uma mesma concentração de droga e células controlo em locais distintos na placa (fig. nº 3). Os resultados encontram-se na tabela nº17.

Tempo de exposição	Absorvância dos controlos				Absorvância da K562	
	K562 (nº1)	K562 (nº2)	R7 (nº1)	R7 (nº2)	Doxo=0.15 µg/ml (nº1)	Doxo=0.15 µg/ml (nº2)
24 horas	0.61	0.956	0.387	0.397	0.707	0.846
48 horas	0.9	1.08	0.511	0.443	0.879	0.865
72 horas	0.61	0.818	0.337	0.461	0.718	0.893

Tab. nº17: Estudo da possível influência da localização de uma dada condição na placa nos valores de absorvância dessa mesma condição. Estes resultados foram obtidos aquando da realização da experiência nº8 da tab. nº16. Os números 1 e 2 representam localizações diferentes para cada uma das condições testadas que se mostram na fig. nº3.

Experiência nº	Poços			
	Cc. de doxorrubicina (µg/ml)			
8 (K562)	1	0.5	0.25	0.15 (nº2)
	0.15 (nº1)			controlo nº2 K562
8 (R7)	1	0.5	0.25	0.15
				controlo nº2 R7
8 (R7)	1 (+ verapamil)	0.5 (+ verapamil)	0.25 (+ verapamil)	0.15 (+ verapamil)
8 (controlo)	nº1 K562	nº1 R7		
Figura nº3				

Para ter a certeza do factor experimental que me alterava os resultados, após 4 horas de incubação de 100 µl de uma suspensão celular de CMN com 100 µl de MTT (1 mg/ml), experimentei retirar poço a poço, com uma micropipeta, diferentes volumes de MTT não utilizado, adicionar 200 µl de DMSO e ler a absorvância. Utilizei 2 frascos diferentes do solvente orgânico (um aberto na altura e outro há mais de 30 dias e mantido à temperatura ambiente). Testei também se a diferença de cor resultante do facto de ter diferentes volumes de MTT não utilizado nos poços, aquando da leitura da absorvância, influenciava os resultados.

Os volumes de MTT não utilizado que permanecem na placa após inversão da mesma, e que não são idênticos para todos os poços, são a causa para a diferença na absorvância de uma dada condição em poços afastados na mesma placa. Como se pode observar na tabela nº18 só obtive diferenças no valor da absorvância para a mesma condição quando varia o volume do MTT sobrenadante que permanecia na placa.

Volume de MTT sobrenadante na placa				DMSO	Lavagem
50 µl	40 µl	30 µl	20 µl		
0,421	0,588	0,813	0,967	Novo	com
0,428	0,518	0,662	0,986	Velho	com
0,467	0,671	0,876	0,952	Novo	sem
0,495	0,633	0,759	0,985	Velho	sem

tab. nº 18: Depois de retirar com uma micropipeta 150, 160, 170 e 180 µl de MTT não utilizado de diferentes poços da placa adicionei a metade destes RPMI 1640 completo sem vermelho de fenol de modo a perfazer 200 µl. Em seguida centrifuguei de novo a placa e voltei a retirar daqueles poços o mesmo volume. Para os poços com e sem lavagem usei DMSO com origens diferentes.

As células K562/R7 foram seleccionadas pela resistência à doxorrubicina exibindo expressão aumentada de glicoproteína-P na membrana. Assim, para se saber se as K562/R7 se comportam do mesmo modo que as K562 quando se inibe o funcionamento da P-170, incubei as K562/R7 com DXR e verapamil ou com EPD e verapamil. O Ara C não é afectado pelo fenótipo MDR. Nesta altura passei a adicionar 25 µl de verapamil e 25 µl de droga mas fazendo as diluições destes dois compostos 6 vezes mais concentradas.

Em algumas experiências das tabelas nº 14 , nº15 e nº16 utilizei 100 µM de verapamil, concentração final em cada poço, para inibir o funcionamento da glicoproteína-P pensando que aquela concentração não fosse citotóxica para as células (Rivoltini, M. P. *et al* 1990). No entanto, um estudo anterior utilizava uma concentração de verapamil 10 vezes menor referindo que a concentração por mim utilizada é bastante citotóxica (Rowe, T *et al* 1985).

Decidi então testar várias concentrações de verapamil para poder escolher a que inibindo a P-170 não é citotóxica para as K562/R7 (tab. nº 19), observando que a concentração de 10 µM é a menos citotóxica. Não voltei a repetir as incubações de K562/R7 com DXR, EPD e com 10 µM de verapamil por falta de tempo.

Comparando as concentrações dos 3 agentes citotóxicos utilizados que reduzem, ao fim de 3 dias de incubação, a 50% a viabilidade

das CMN, K562 e K562/R7 observa-se que são sempre necessárias concentrações mais elevadas para as células da linha K562/R7 do que para as da linha K562 e que os valores obtidos para as CMN estão de acordo com os de outros investigadores (Kaspers, G.J.L. *et al* 1991). No entanto, as experiências realizadas com as CMN e as células das linhas foram efectuadas em separado não sendo correcto comparar estes resultados.

Como as células K562/R7 possuem expressão aumentada de glicoproteína-P a concentração intracelular (e incorporação nuclear) de doxorrubicina, no intervalo de concentrações testado, é menor nestas do que nas células K562. No nosso laboratório, recorrendo à citometria de fluxo, observou-se que as células K562 quando expostas a 1 μg/ml de doxorrubicina incorporam o dobro ou mais droga do que as células K562/R7 nas mesmas condições experimentais.

Isto faz com que a globalidade dos mecanismos bioquímicos envolvidos na citotoxicidade deste agente quimioterápico, como sejam quebras no DNA mediadas pela acção da droga na topoisomerase II, formação de radicais livres devido à activação metabólica da droga por redução enzimática, intercalação no DNA, alterações nas membranas celulares e associação a iões metálicos, sejam menos sentidos na linha celular K562/R7 do que na linha K562 nas condições experimentais referidas para a exposição à doxorrubicina (cf. cit. Sinha, B.K. *et al* 1987; cf. cit. Speth, P.A.J. *et al* 1988; cf. cit. Mimnaugh, E.G. *et al* 1989; Tritton, T.R., Yee, G., 1982). Os radicais livres que se formam durante activação metabólica da doxorrubicina (catalizada por reductases flavínicas: NADPH citocromo P_{450} reductase, NADH citocromo b_5 reductase e xantina oxidase) podem levar à morte celular ao reagir com o DNA, RNA, membranas celulares e proteínas (cf. cit. Sinha, B.K. *et al* 1987; cf. cit. Speth, P.A.J. *et al* 1988). No entanto, esta droga pode ainda alterar a função e constituição das membranas celulares de um modo não dependente dos radicais livres (cf. cit. Speth, P.A.J. *et al* 1988).

Também nas CMN a citotoxicidade da doxorrubicina é devida aos mecanismos acima referidos. No entanto, a contribuição das quebras no DNA mediadas pela acção da droga na topoisomerase II para a morte celular é muito menor nas células mononucleares de sangue periférico do que na linha celular K562 porque a actividade da topoisomerase II é muito baixa em células que não se dividem (Potmesil, M. *et al* 1988).

Relativamente ao etoposídeo os resultados obtidos para as células K562 e K562/R7 são explicados do mesmo modo que os observados para a doxorrubicina.

A citotoxicidade deste composto é devida a vários processos bioquímicos: acção na topoisomerase II que aumenta o número de quebras

no DNA; activação enzimática (pela NADPH citocromo P_{450} reductase ou por peroxidases, como por exemplo a prostaglandina sintetase) originando intermediários reactivos, que se ligam de um modo irreversível ao DNA e proteínas alterando as suas funções, associação a iões metálicos gerando espécies reactivas de oxigénio, que podem quebrar o DNA, e inibição da respiração mitocondrial (Haim, N. *et al* 1986; cf. cit. Clark, P.I., Slevin, M.L., 1987; cf. cit. Sinha, B.K. *et al* 1988; cf. cit. Maamen, J.M.S. *et al* 1988; Sakurai, H. *et al* 1991; cf. cit. Rang, H.P., Dale, M.M., 1993).

Pelas razões descritas anteriormente o primeiro mecanismo de acção referido para o etoposídeo e o mais importante não deve contribuir significativamente para a citotoxicidade deste composto nas CMN (cf. cit. Clark, P.I., Slevin, M.L., 1987; Potmesil, M. *et al* 1988).

Efectuando exposições em paralelo das CMN, K562 e K562/R7 à doxorrubicina e ao etoposídeo seria possível avaliar correctamente a contribuição, entre outras diferenças metabólicas, do baixo nível de actividade da topoisomerase II para a citotoxicidade daqueles compostos.

O Ara C, droga análoga ao nucleótido 2'-deoxicitidina que possui o grupo hidroxilo do carbono 2' da pentose numa configuração oposta à do composto fisiológico, ao entrar na célula alvo passa pelas mesmas reacções de fosforilação que este, formando Ara CTP, e é incorporado tanto no RNA como no DNA (cf. cit. Rang, H.P., Dale, M.M., 1993).

A sua principal acção citotóxica consiste na inibição da DNA polimerase: não só a replicação como também a síntese para reparação de lesões são inibidas pelo trifosfato de Ara C, sendo o primeiro processo mais afectado que o segundo (cf. cit. Rang, H.P., Dale, M.M., 1993). No entanto, existem vários acontecimentos celulares que condicionam o seu efeito citotóxico: velocidade de transporte do Ara C para o interior da célula; capacidade de retenção do Ara C e de fosforilação em Ara CTP; catabolismo e anabolismo de nucleótidos nomeadamente da 2'-deoxicitidina; extensão da incorporação no DNA e RNA e tempos de semivida do Ara CTP e do Ara CMP, quando incorporado no DNA (Rustum, Y.M., Preisler, H.D., 1979; Rustum, Y.M., 1978; cf. cit. Riva, C.M. *et al* 1985; cf. cit. Haanen, C. *et al* 1985; cf. cit. Kufe, D.W., Spriggs, D.R., 1985). Quando as células estão expostas a elevadas concentrações de Ara C observa-se lise celular (Haanen, C. *et al* 1985).

Como a concentração intracelular do Ara C não é afectada pela expressão aumentada da glicoproteína-P, a diferença observada na concentração da droga para reduzir a 50 % a viabilidade das linhas K562 e K562/R7 deve ser devida ao facto de as primeiras crescerem mais rapidamente. Esta hipótese resulta da observação diária dos frascos em que as linhas são mantidas em cultura devendo, no entanto, ser feita a

avaliação quantitativa, para cada uma das linhas, da percentagem de células em fase S recorrendo à citometria de fluxo.

Expondo simultaneamente CMN, K562 e K562/R7 ao Ara C poder-se-ia comparar as concentrações de droga necessárias para reduzir a 50% a viabilidade de cada tipo celular.

No entanto, refiro que Kaspers, G.J.L. *et al* ao estudarem a sensibilidade de CMN de sangue periférico de indivíduos normais e de blastos leucémicos de indivíduos com LLA a vários agentes quimioterápicos observaram que a concentração de Ara C necessária para reduzir a 50% a viabilidade celular das CMN era 5 vezes superior à necessária para os blastos leucémicos, 2.5 e 0.5 μg/ml respectivamente. Este grupo de investigadores não apresentou explicação para esta diferença de sensibilidade referindo apenas que as causas deste facto são grandemente desconhecidas.

O "MTT assay" tem tido inúmeras aplicações.

Em 1990, Hongo, T. *et al* publicaram os resultados do primeiro estudo simultâneo de 26 drogas usando amostras de doentes com LLA e LMA concluindo que, após comparação com as respostas clínicas dos doentes, o método é util na selecção da quimioterapia efectiva nas situações de leucemia aguda.

Com esta técnica pode-se distinguir os indivíduos com LMA que responderão à quimioterapia inicial (Sargent, J.M., Taylor, C.G., 1989) assim como se observa uma boa relação entre a sensibilidade *in vitro* a agentes quimioterápicos de células leucémicas obtidas aquando do diagnóstico inicial e o "long-term clinical outcome" em crianças com LLA (Pieters, R. *et al* 1991). Hanson, J.A. *et al* em 1991 apresentaram um trabalho que sugere que o "MTT assay" possa ser usado na identificação de doentes com LLC que sejam clinicamente sensíveis ao clorambucil.

Tem também sido aplicado não só na detecção de resistência adquirida em situações de recidiva de LMA e LLA (Sargent, J.M., Taylor, C.G., 1989; Pieters, R. *et al* 1990; Hongo, T. *et al* 1990) como no estudo de métodos para ultrapassar resistência a drogas (Twentyman, P.R. *et al* 1989; Lambert, E. *et al* 1992).

Em relação ao problema teórico das drogas que actuam ao nível da proliferação celular é de salientar a determinação de um ponto de "cut-off" para o Ara C com este teste de viabilidade entre doentes com LMA clinicamente sensíveis e resistentes (cf. cit. Veerman, A.J.P., Pieters, R. 1990).

1.4. Perspectivas Futuras

1) Avaliar a contribuição das quebras no DNA originadas pela acção da doxorrubicina e etoposídeo na topoisomerase II na citotoxicidade destes compostos.

2) Avaliar o efeito de factores de crescimento na quimiossensibilidade de células de leucemias e linfomas aos 3 agentes quimioterápicos utilizados neste trabalho prático. Este estudo será feito expondo as células durante 72 horas à doxorrubicina (1.25, 0.75 e 0.25 μg/ml), ao etoposídeo (50 , 25, 10 e 1 μg/ml) e ao Ara C (5, 1 e 0.5 μg/ml) na presença e ou ausência dos factores de crescimento.

3) Avaliar o efeito do verapamil (10 μM) na quimiossensibilidade das amostras à doxorrubicina e ao etoposídeo.

4) Comparar os resultados obtidos "*in vitro* " com a resposta clínica dos doentes.

1.5. Bibliografia

Campling, B.G. *et al* (1988), Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells, Leukemia Res., 12, 823-31.

Carmichael, J. *et al* (1987, a), Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, Cancer Res., 47, 936-42.

Carmichael, J. *et al* (1987, b), Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity, Cancer Res., 47, 943-6.

Clark, P.I., Slevin, M.L. (1987), The clinical pharmacology of etoposide and teniposide, Clinical Pharmacokinetics, 12, 223-52.

Denizot, F., Lang, R. (1986), Rapid colorimetric assay for cell growth and survival (modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability), J. Immunol. Methods, 89, 271-7.

Haanen, C. *et al* (1985), Studies on the cytotoxicity of cytosine arabinoside, Seminars in Oncology, 12, 120-9.

Haim, N. *et al* (1986), Peroxidative free radical formation and O-demethylation of etoposide (VP-16) and tenoposide (VM-26), Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 215-20.

Hanson, J.A. *et al* (1991), *In vitro* chemosensitivity testing in chronic lymphocytic leukaemia patients, Leukemia Res., 15, 565-9.

Hongo, T. *et al* (1990), An*in vitro* chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia, Cancer, 65, 1263-72.

Kaspers, G.J.L. *et al* (1991), *In vitro* drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood, Br. J. Cancer, 64, 469-74.

Kirkpatrick, D.L. *et al* (1990), Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay, Leukemia Res., 14, 459-66.

Kufe, D.W., Spriggs, D.R. (1985), Biochemical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside, Seminars in Oncology, 12, 34-48.

Lambert, E. *et al* (1992), Resistance circumvention strategies tested in clinical leukaemia specimens using the MTT colorimetric assay, Leukemia, 6, 1063-71.

Maamen, J.M.S. *et al* (1988), Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review, J. Natl. Cancer Inst., 80, 1526-33.

Mimnaugh, E.G. *et al* (1989), Differential oxygen radical susceptibility of adriamycin-sensitive and -resistant MCF-7 human breast tumor cells, Cancer Res., 49, 8-15.

Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, 65, 55-63.

Pieters, R. *et al* (1989), Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia, Br. J. Cancer, 59, 217-20.

Pieters, R. *et al* (1990), In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions, Blood, 76, 2327-36.

Pieters, R. *et al* (1991), Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia, Lancet, 338, 399-403.

Potmesil, M. *et al* (1988), Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II, Cancer Res., 48, 3537-43.

Rang, H.P., Dale, M.M. (1993), In "Farmacologia", pp.484-5, Edited by Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro

Riva, C.M. *et al* (1985), Pharmacokinetics and cellular determinants of response to 1-β-arabinofuranosylcytosine (Ara-C), Seminars in Oncology, 12, 1-8.

Rivoltini, M. P. *et al* (1990), Modulation of multidrug resistance by verapamil or mdr1 anti-sense oligodeoxynucleotide does not change the high susceptibility to lympokine-activated killers in mdr-resistant human carcinoma (LoVo) line, Int. J. Cancer, 46, 727-32.

Rowe, T *et al* (1985), Inhibition of epipodophyllotoxin cytotoxicity by interference with topoisomerase-mediated DNA cleavage, Biochem. Pharmacol., 34, 2483-7.

Rustum, Y.M. (1978), Metabolism and intracelular retention of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine as predictors of response of animal tumors, Cancer Res., 38, 543-9.

Rustum, Y.M., Preisler, H.D. (1979), Correlation between leukemic cell retention of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate and response to therapy, Cancer Res., 39, 42-9.

Sakurai, H. *et al* (1991), Metal- and photo-induced cleavage of DNA by podophyllotoxin, etoposide, and their related compounds, Mol. Pharmacol., 40, 965-73.

Sargent, J.M., Taylor, C.G. (1989), Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia, Br. J. Cancer, 60, 206-10.

Sinha, B.K. *et al* (1987), Differential formation of hydroxyl radicals by adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells: implications for the mechanism of action, Biochemistry, 26, 3776-81.

Sinha, B.K. *et al* (1988), DNA strand breaks produced by etoposide (VP-16, 213) in sensitive and resistant human breast tumor cells: implications for the mechanism of action, Cancer Res., 48, 5096-100.

Slater, T.F. *et al* (1963), Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts, Biochim. Biophys. Acta, 77, 383-93.

Speth, P.A.J. *et al* (1988), Clinical pharmacokinetics of doxorubicin, Clinical Pharmacokinetics, 15, 15-31.

Tritton, T.R., Yee, G. (1982), The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells, Science, 217, 248-50.

Twentyman, P.R., Luscombe, M. (1987), A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, Br. J. Cancer, 56, 279-85.

Twentyman, P.R. *et al* (1989), Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay, Br. J. Haematol., 71, 19-24.

Veerman, A.J.P., Pieters, R. (1990), Drug sensitivity assays in leukaemia and lymphoma, Br. J. Haematol., 74, 381-4.

Yamaue, H. *et al* (1992), Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT asaay, Br. J. Cancer , 66, 794-9.

2. "Single Cell Gel Assay"

2. "Single Cell Gel Assay"

Os métodos bioquímicos normalmente usados para detectar lesões no DNA (como por exemplo gradientes alcalinos de sacarose, eluição neutra ou alcalina do DNA, FADU-"fluorimetric analysis of DNA unwinding", entre outros) requerem um grande número de células e/ou que o DNA seja marcado com isótopos radioactivos, podendo ou não ser demorados e laboriosos. Algumas destas características condicionam a sensibilidade do método e impedem a análise de células que não se dividem. Adicionalmente os resultados obtidos, e a análise feita dos mesmos, reflectem o comportamento global da amostra não sendo possível avaliar diferenças intercelulares no que respeita às lesões no DNA e reparação do mesmo (cf. cit. Tice, R.R. *et al* 1992; cf. cit. Vijayalaxmi *et al* 1992).

O "single cell gel electrophoresis assay", "SCG assay", foi desenvolvido por Singh, N.P. *et al* 1988 e permite quantificar o nível e variabilidade intercelular das lesões no DNA induzidas por agentes genotóxicos, e consequente reparação das mesmas, em quase todos os tipos de populações de células eucariotas. Necessita de um pequeno número de células e é um método simples, rápido, sensível e reprodutível.

Não possui as limitações citadas para os outros métodos mas não é específico uma vez que os seus resultados reflectem o conjunto de ssb, dsb, DNA-DNA cross linking e "alkali-labile sites" que existem em cada célula da população em estudo (Comunicação pessoal de Dr. Tice, R.R.1992).

No "SCG assay" células eucariotas são diluídas em agarose líquida (a 37 °C) e colocadas em lâminas de microscópio. São, em seguida, lisadas com detergentes e elevadas concentrações de sais. Posteriormente o DNA celular é tratado com um forte tampão alcalino para o desenrolar, produzir ssb e expressar "alkali-labile damage" e, por fim, sujeito a uma electroforese no mesmo tampão (Singh, N.P. *et al* 1988).

Após a electroforese o DNA é corado com brometo de etídeo e as lâminas observadas num microscópio de fluorescência. A maior ou menor migração do DNA na direcção do ânodo relaciona-se bem com a magnitude das lesões no ácido nucleico de cada célula (Singh, N.P. *et al* 1988).

Cada "cometa" (DNA no núcleo + fragmentos de DNA que migraram (cf. figuras nº5 e nº6) é caracterizado por vários parâmetros que são determinados usando um sistema de análise de imagem acoplado ao microscópio de fluorescência (SCG Assay Workshop III):

- **migração do DNA** (comprimento da imagem - diâmetro do núcleo) é função da dimensão dos fragmentos de DNA;
- **intensidade da cauda** é função da quantidade total de fragmentos que migraram;

- **momento da cauda** (distância de migração do DNA x intensidade da cauda) entra em conta com os 2 pontos anteriores ;

- **diâmetro do núcleo** (diferentes tipos de células possuem diâmetros distintos) e

- **forma** (migração : diâmetro).

Até agora têm sido inúmeras as aplicações deste método:

- estudo, *in vitro*, da intensidade e da reparação das lesões induzidas no DNA de células de mamíferos (linfócitos humanos ou de roedores, células "HeLa", células "CHO", hepatócitos de rato, etc) por agentes químicos (H_2O_2, bleomicina, acrilamida, tricloetano) ou radiação (raios X, raios ultravioleta), (Singh, N.P. *et al* 1988; Andrews, P.W. *et al* 1990 (a, b); Gedik, C.M. *et al* 1992; Vijayalaxmi *et al* 1992; cf. cit. SCG Assay Workshop III);

- estudo da especificidade tecidular, em ratos machos, das lesões induzidas por vários agentes químicos (Andrews, P.W. *et al* 1989);

- relação entre lesões no DNA e velocidade de reparação das mesmas com a idade em linfócitos humanos expostos, *in vitro*, a radiação ionizante (Singh, N.P. *et al* 1990) e

- estudo de lesões no DNA em humanos expostos a agentes genotóxicos, ou seja, estudo da biomonitorização humana (Tice, R.R. *et al* 1990; Tice, R.R. *et al* 1992).

O "SCG assay", neste estudo, é utilizado para quantificar as lesões induzidas pela doxorrubicina no DNA de espécimes clínicos de leucemias e linfomas, descrevendo, a seguir, a optimização desta técnica com CMN, usando amostras de indivíduos saudáveis, e com K562.

2.1. Procedimento experimental

2.1.1. Obtenção das células

As CMN e as K562 foram obtidas do mesmo modo que para o "MTT assay". Para a exposição das células à droga usaram-se placas de cultura de 4 poços (Nunclon).

As CMN foram expostas durante 24 horas a 0.5, 1, 2, 6 e 10 μg/ml de DXR. As K562 foram expostas durante 2.5, 5 e 24 horas a 0.25, 0.5, 1 e 2 μg/ml de DXR.

2.1.2. Preparação das lâminas

Todos os passos seguintes foram realizados sob luz fraca e indirecta de modo a evitar quebras no DNA para além das resultantes do tratamento a que as células são submetidas.

a) A uma lâmina de vidro, completamente fosca, adicionei 100 µl de agarose NMP (BRL, cat. nº 540-5510UA) 0.75% a 37 ºC (em PBS sem Ca e sem Mg) cobrindo-a de imediato com uma lamela. Este passo deve ser feito com cuidado para evitar a formação de bolhas de ar.

As lâminas são colocadas no gelo durante 5 minutos para gelificação da NMPA.

b) As lamelas são cuidadosamente removidas para não danificar a 1ª camada de agarose. Em seguida adicionei, a cada uma das lâminas, 30 µl de agarose LMP (BRL, cat. nº 5517UB) 0.5%, também a 37 ºC em PBS, à qual previamente tinha adicionado as células expostas por períodos de tempo diferentes a várias concentrações de DXR. Cada lâmina é coberta com uma lamela que é removida após a gelificação da LMPA (cerca de 5 minutos no gelo).

A quantidade de células que se adiciona à agarose não deve ser muito elevada de modo a evitar a sobreposição de caudas de diferentes "cometas". O ideal será entre 5 a 50 x 10^3 células / 75 µl de agarose.

c) Adiciona-se a terceira camada de agarose: 75 µl de LMP 0.5% a 37 ºC (sem células) a cada uma das lâminas.

Recolocam-se as lamelas.

d) Após a gelificação da última camada de agarose (também no gelo), removem-se as lamelas e mergulham-se as lâminas, durante uma hora, na solução de lise a 4 ºC (2.5 M NaCl (Merck), 100 mM EDTA (Sigma), 10 mM Tris-base (Sigma), 1% de N-laurosilsarcosina (sal de sódio, Sigma, L-5125) pH=10.0 adicionando-se, na altura, 1% Triton X-100 (Sigma) e 10% de DMSO). Durante este período de tempo as lâminas são mantidas ao abrigo da luz e a 4 ºC.

2.1.3. Desnaturação e electroforese do DNA

a) Coloca-se o tampão alcalino (300 mM NaOH (Merck) e 1 mM EDTA , pH=13) na tina de electroforese horizontal.

b) Retirei as lâminas da solução de lise, lentamente para evitar que a agarose deslizasse, colocando-as directamente na tina de electroforese o mais perto possível umas das outras e do ânodo. As lâminas permanecem mergulhadas naquele tampão entre 20 a 60 minutos.

c) A electroforese deverá durar, entre 20 a 40 minutos, a 25 V ajustando-se a corrente para 300 mA subindo ou descendo lentamente o nível do tampão.

d) No final da electroforese as lâminas são retiradas da tina de electroforese e cobertas com a solução de neutralização (0.4 M Tris pH=7.5) durante 5 minutos. Repeti este procedimento 3 vezes.

e) Após as lavagens elimina-se o excesso da solução neutralizante e cobrem-se as lâminas com uma solução de brometo de etídeo (2 µg/ml, Sigma) durante 15 minutos.

Depois da coloração do DNA com o agente intercalante as lâminas são novamente lavadas 3 vezes com a solução de neutralização. Depois de secar os bordos e as zonas livres de agarose com um papel absorvente, adicionei 50 µl da solução de neutralização sobre o gel cobrindo-o, em seguida, com uma lamela.

f) As lâminas estão prontas para serem observadas ao microscópio.

2.2. Optimização do "SCG assay" e resultados

A montagem desta técnica envolveu o ajuste da espessura das 3 camadas de agarose e dos tempos de desnaturação e electroforese do DNA.

A escolha das quantidades de agarose utilizadas na preparação das lâminas foi cuidada porque:

- a 1ª camada de agarose é fundamental para reduzir o "background" da coloração do DNA com brometo de etídeo: volumes inferiores a 100 µl dificultam a observação dos "cometas" porque o gel de agarose, tal como o DNA, apresenta coloração laranja não existindo contraste suficiente entre o ácido nucleico e a agarose;
- a 2ª camada deve ser suficientemente fina para que as células fiquem todas num mesmo plano: com volumes superiores a 30 µl obtêm-se células em planos diferentes e com volumes inferiores não é possível cobrir a 1ª camada de agarose na totalidade e

- a 3ª camada é importante para eliminar desníveis existentes devido a qualquer bolha de ar que tenha ficado quando se cobriu a 2ª camada de agarose com a lamela.

A modificação dos tempos de desnaturação e de electroforese do DNA nuclear permite aumentar a sensibilidade do "SCG assay".

Em primeiro lugar nem todas as classes de lesões "alkali-labile" são susceptíveis de serem clivadas se for curto o tempo de exposição ao tampão alcalino: assim, aumentando o tempo de desnaturação do DNA aumenta-se a expressão deste tipo de lesões. Em segundo lugar a migração do DNA é directamente dependente da duração da electroforese, quando esta duração aumenta também aumenta o tamanho do "cometa". Assim, a detecção de pequenas diferenças no número de lesões no DNA, provocadas por baixas concentrações de agentes químicos ou pequenos tempos de exposição aos mesmos, poderá ser mais fácil se aumentarmos o tamanho dos "cometas" das células sujeitas a tratamento relativamento aos das células controlo, modificando os tempos do tratamento alcalino e electroforese do DNA.

Para adequar o "SGC assay" à detecção das lesões provocadas pela DXR comecei por seleccionar o tempo de incubação mínimo necessário para que a droga, nas concentrações usadas no "MTT assay", quebre o DNA das K562, e os tempos óptimos para a desnaturação e electroforese do DNA de modo a obter uma boa relação entre lesões no DNA destas células, concentração de droga utilizada e tempo de incubação com a DXR.

Na tabela relativa à experiência nº1 encontram-se as respectivas condições e resultados obtidos.

Concentração de doxo (µg/ml)	**Tamanho dos "cometas"**	
	Tempo de exposição	
	5 horas	24 horas
(K562)		
0	4,9	5,1
0,25	5,7	parti a lâmina
0,5	6,8	8,5
1	8	>=10
(experiência nº1)		
Desnaturação e electroforese do DNA: 20 min		
Leitura manual dos resultados		

Estes resultados mostram que há um aumento do tamanho dos "cometas" com o aumento da concentração de DXR e do tempo de exposição

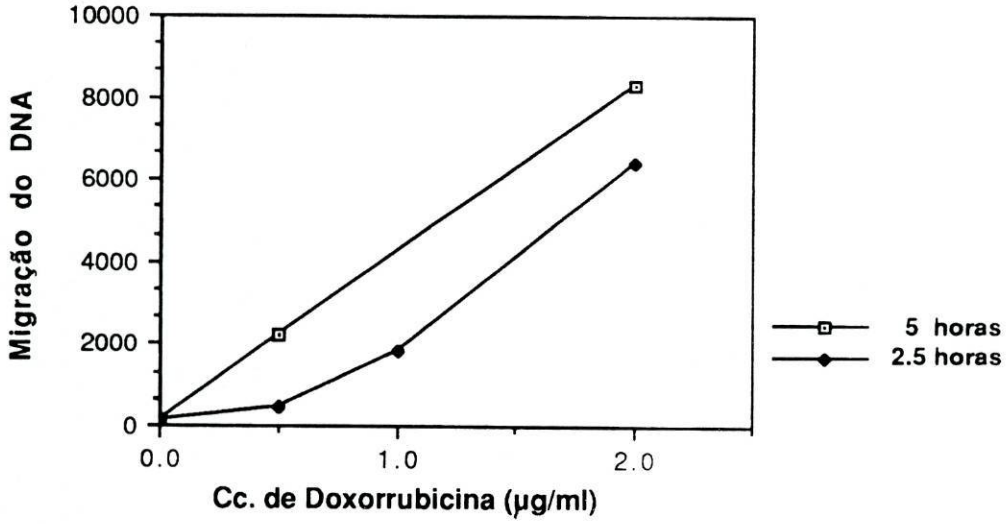
à droga. No entanto, 24 horas de exposição às concentrações mais elevadas de DXR originam "cometas" demasiado grandes para serem correctamente medidos. Tive necessidade de determinar o tamanho dos "cometas" com a ajuda de uma ocular com escala micrométrica, uma vez que o microscópio de fluorescência utilizado não estava associado a nenhum sistema de análise de imagem, e alguns deles ultrapassavam o tamanho da escala. Para cada condição experimental determinei o comprimento de 20 "cometas" sendo os resultados apresentados neste relatório a média desses valores. No entanto, fotografei algumas experiências para posterior análise computorizada dos negativos (20 por condição experimental).

Em seguida, adoptando 20 minutos como o tempo adequado para a desnaturação e electroforese do DNA das K562, reduzi o tempo de exposição e modifiquei ligeiramente as concentrações de DXR (experiências nº2 e nº3, gráf. nº15).

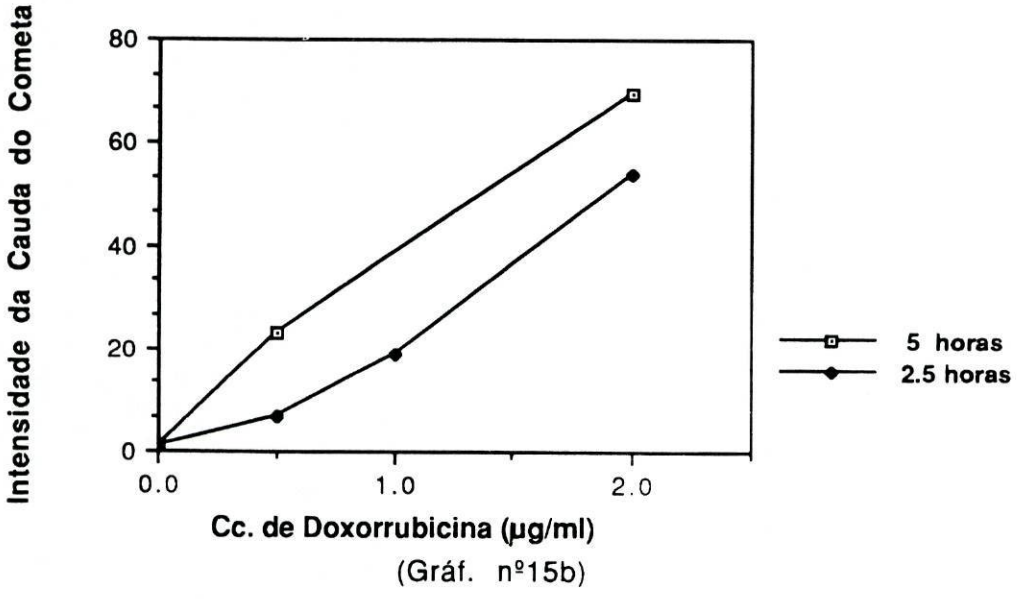
Concentração de doxo (µg/ml)	**Tamanho dos "cometas"**	
	Tempo de exposição	
	2.5 horas	5 horas
(K562)		
0	4,9	4,9
0,5	5,9	8,2
1	8,2	
2	8,2	9,6
(experiência nº2)		
Desnaturação e electroforese do DNA: 20 min		
Leitura manual dos resultados		

Concentração de doxo (µg/ml)	**Tamanho/intensidade "cometas"**	
	Tempo de exposição	
	2.5 horas	5 horas
(K562)		
0	99/1	99/1
0,5	470/7	2218/23
1	1825/19	
2	6435/54	8333/69
(experiência nº2)		
Desnaturação e electroforese do DNA: 20 min		
Leitura automática dos resultados		
Unidades arbitrárias		

Concentração de doxo (µg/ml)	Tamanho dos "cometas" Tempo de exposição	
	2.5 horas	5 horas
(K562)		
0	4,2	4,2
0,5	5,1	8,9
1	6,5	>=10
2	8,2	sem células
(experiência nº3)		
Desnaturação e electroforese do DNA: 20 min		
Leitura manual dos resultados		



(Gráf. nº15a)



(Gráf. nº15b)

Gráf. nº15:Efeito do tempo de exposição à doxorrubicina na migração do DNA (Gráf. nº15a) e na intensidade da cauda dos "cometas" (Gráf. nº15b) de células da linha K562 (resultados da exp. nº2 obtidos automaticamente).

As figuras nº4, nº5 e nº6 representam células da linha celular K562 sujeitas a diferentes tratamentos.

Os resultados obtidos mostram que a incubação das K562 durante 2.5 ou 5 horas com DXR nas concentrações de 0.5, 1 e 2 µg/ml é suficiente para quebrar o DNA obtendo-se uma boa relação entre o aumento do tamanho e intensidade dos "cometas" com o tempo de exposição e as concentrações de DXR testadas. Na experiência nº2, o tamanho dos "cometas", avaliado com a ocular com escala micrométrica, para as concentrações de 1 e 2 µg/ml e 2,5 horas de exposição à DXR não aumentou como seria de esperar, mas observei um aumento na intensidade dos mesmos que foi confirmado pela análise computorizada, obtendo-se também um aumento no tamanho dos "cometas" com as 2 concentrações de droga.

Optimizando o "SCG assay" para as CMN não me foi possível reduzir o tempo de exposição à droga do mesmo modo que para as K562 porque a incubação das CMN durante 24 horas com 2 µg/ml de DXR origina "cometas" menores do que quando as células da linha K562 são expostas a metade dessa concentração de droga durante 5 horas (com tempos de



Fig. nº4: Célula controlo da linha K562 (exp. nº2).

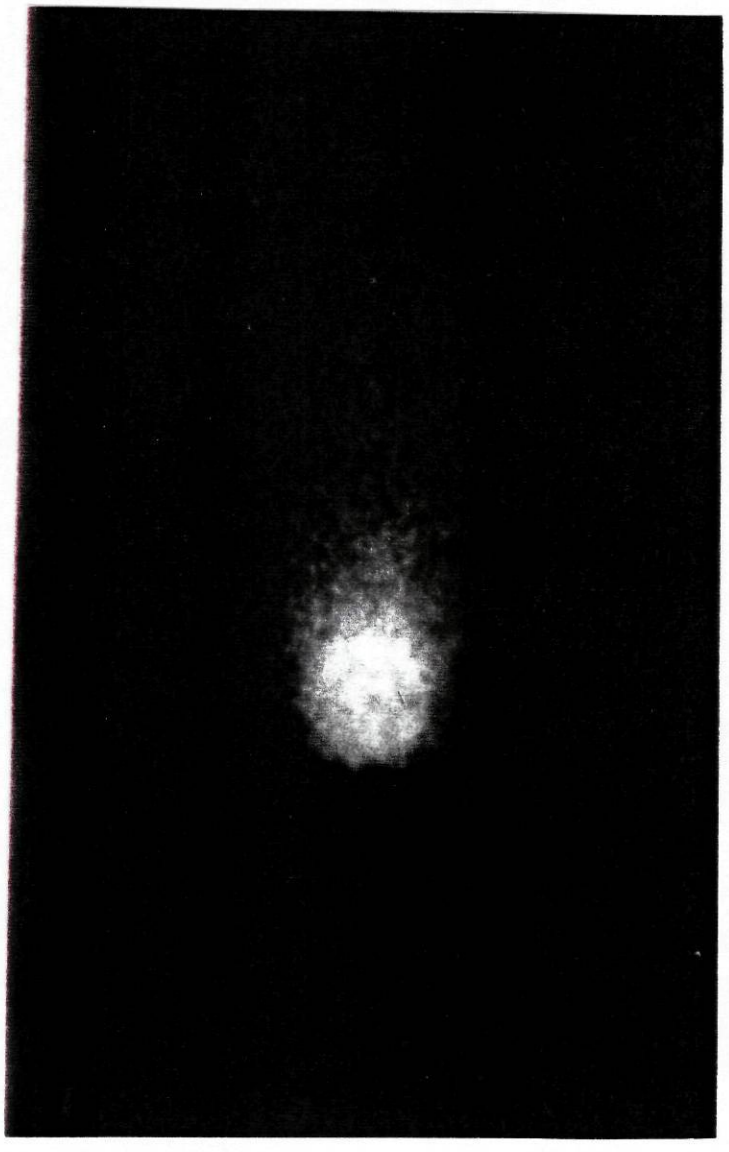


Fig. nº5: Célula da linha K562 exposta a 0.5 µg/ml de DXR durante 5 horas (exp. nº2).



Fig. nº6: Célula da linha K562 exposta a 2 µg/ml de DXR durante 5 horas (exp. nº2).

desnaturação e electroforese do DNA das CMN que originam valores baixos para as células controlo, 20/20 ou 40/20) (exp. nº4).

Desnaturação / Electroforese do DNA (min)	Tamanho dos "cometas"	
	0 µg/ml de DXR	2 µg/ml de DXR
(CMN)		
20/20	3,25	4,37
20/40	9	>=10
40/20	4,41	7,15
60/20	7,46	8,86
(experiência nº4)		
Leitura manual dos resultados		
Tempo de exposição à doxo: 24 horas		

Continuando o trabalho experimental com as CMN fixei o tempo de exposição à droga em 24 horas e escolhi como tempos de desnaturação e electroforese do DNA 40/20 e 40/40 (experiências nº5 e nº6) porque a maior diferença entre o tamanho dos "cometas" para as células controlo e para as expostas a 2 µg/ml de DXR foi obtida, na experiência anterior, com 40/20.

Na experiência nº5 com 40 minutos para a desnaturação e electroforese do DNA obtive "cometas" muito grandes não só nas células expostas a DXR como também nas células controlo, mas com 20 minutos de electroforese obtive aumento no tamanho dos "cometas" com o aumento na concentração da DXR.

Cc. de Doxo (µg/ml)	Desnaturação / electroforese do DNA (min)	
	40/20	40/40
(CMN)		
0	3,8	muito grande
0,5	4,6	muito grande
1	6,8	muito grande
2	7,5	muito grande
(experiência nº5)		
Leitura manual dos resultados		
Tempo de exposição à doxo: 24 horas		

Na experiência nº6 não obtive diferenças no tamanho dos "cometas" para as diferentes concentrações de DXR muito embora os valores destes sejam superiores aos do controlo. Embora não tenha explicação para este facto, como esta é a única de 6 experiências em que tal acontece, presumo que tenha sucedido algo de errado na execução técnica.

Cc. de Doxo (µg/ml)	**Desnaturação e electroforese do DNA (min)**
	40/20
(CMN)	
0	4,2
0,5	5,3
1	6,1
2	5,9
(experiência nº6)	
Leitura manual dos resultados	
Tempo de exposição à doxo: 24 horas	

Mantendo as 24 horas de exposição à DXR decidi alterar novamente os tempos de desnaturação e electroforese do DNA assim como as concentrações de DXR utilizadas.

Na experiência nº7 expus as CMN a 0, 2 e 6 µg/ml de DXR para os seguintes tempos de electroforese e desnaturação do DNA:

- 20/20, não obtendo grandes diferenças no tamanho dos "cometas";
- 20/40, observam-se valores de controlo demasiado elevados;
- 40/20, obtive uma boa diferença entre o tamanho dos "cometas" das CMN expostas a 2 µg/ml de DXR em relação às controlo, mas para as CMN expostas a 6 µg/ml de DXR a diferença era ao nível da intensidade dos "cometas" e não no tamanho. Esta diferença não foi quantificada mas era facilmente perceptível pela simples observação das lâminas.

Desnaturação / Electroforese do DNA (min)	**Tamanho dos "cometas"**		
	0 µg/ml de DXR	**2 µg/ml de DXR**	**6 µg/ml de DXR**
(CMN)			
20/20	3	3.6	4.1
20/40	7.2	8.9	não fiz
40/20	2.9	5.5	5.8
(experiência nº7)			
Leitura manual dos resultados			
Tempo de exposição à doxo: 24 horas			

Desnaturação / Electroforese do DNA (min)	Tamanho/intensidade dos "cometas"		
	0 µg/ml de DXR	2 µg/ml de DXR	6 µg/ml de DXR
(CMN) 20/20 20/40 40/20 (experiência nº7)	 46/1 397/8	 88/2 1584/30	
Leitura	automática	dos	resultados
Tempo de	exposição	à doxo:	24 horas

Assim, para as CMN expostas a 0.5, 1 e 2 µg/ml de DXR, 24 horas de incubação com a droga é o tempo mínimo para que consiga detectar lesões no DNA.

Relativamente aos tempos de desnaturação e electroforese do DNA, apesar do pequeno número de experiências realizadas com CMN, posso concluir que:

- 20/20 (exp. nº 4, nº7 e nº9) é muito pouco para conseguir obter diferenças sensíveis no tamanho dos "cometas" para as várias concentrações de DXR utilizadas (0.5 a 10 µg/ml);

- 20/40 (exp. nº 4 e nº7), 40/40 (exp. nº 5), 60/20 (exp. nº 4 e nº8) originam valores demasiados altos para os controlos para conseguir detectar as diferenças produzidas pelas concentrações de DXR e

- 40/20 mostraram ser os tempos adequados para a desnaturação e electroforese do DNA em todas as experiências realizadas, embora nas experiências nº6 e nº9 os aumentos do tamanho dos "cometas" com a concentração de DXR tenham sido pequenos ou até não progressivos.

Desnaturação / Electroforese do DNA (min)	Tamanho dos "cometas"		
	0 µg/ml de DXR	2 µg/ml de DXR	10 µg/ml de DXR
(CMN) 40/20 60/20 (experiência nº8)	 3.6 7.3	 7.5 >=10	 8.7 >=10
Leitura	manual	dos	resultados
Tempo de	exposição	à doxo:	24 horas

Desnaturação / Electroforese do DNA (min)	Tamanho dos "cometas"		
	0 μg/ml de DXR	2 μg/ml de DXR	10 μg/ml de DXR
(CMN)			
20/20	3.1	3.7	3
40/20	6.12	7.1	8.5
(experiência nº9)			
Leitura manual dos resultados			
Tempo de exposição à doxo: 24 horas			

2.3. Perspectivas futuras

1) Padronizar esta técnica para as células da linha K562/R7 não esperando, no entanto, obter "cometas" do mesmo tamanho que os observados com células da linha K562 nas condições experimentais estabelecidas para estas células uma vez que naquelas a incorporação de doxorrubicina é muito menor devido à presença da glicoproteína-P.

2) Contribuir para o estudo das lesões induzidas pela doxorrubicina no DNA de espécimes clínicos de leucemias e linfomas para a sensibilidade a este composto. Contudo, não será possível distinguir o(s) mecanismo(s) responsável por uma dada situação de resistência.

3) Fazer a distinção entre as lesões originadas pela acção da droga na topoisomerase II e as originadas por radicais livres de oxigénio que se formam durante o metabolismo celular da doxorrubicina. Como o brometo de etídeo impede a formação de quebras no DNA mediadas pela topoisomerase II e as drogas que nela actuam (Rowe, T. *et al* 1985) talvez seja possível obter diferenças no tamanho e intensidade dos "cometas" de células incubadas simultaneamente com brometo de etídeo e doxorrubicina ou só com este agente quimioterápico. Com o "MTT assay" escolher-se-á uma concentração de brometo de etídeo que não seja citotóxica para as células, começando por padronizar esta aplicação do "SCG assay" com linhas celulares e CMN de indivíduos saudáveis.

2.4. Bibliografia

Andrews, P.W. *et al* (1989), The single cell gel (SCG) assay: a new tool for detecting organ-specific levels of DNA damage induced by genotoxic agents, Environ. Molec. Mutagenesis, 14, S15, 10.

Andrews, P.W. *et al* (1990, a), *In vitro* genotoxicity testing of ammunition residue extracts, Environ. Molec. Mutagenesis, 15, S17, 6.

Andrews, P.W. *et al* (1990, b), *In vitro* DNA damage in peripheral blood leukocytes as measured by the single cell gel (SCG) assay, Environ. Molec. Mutagenesis, 15, S17, 6.

Gedik, C.M. *et al* (1992), Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, Int. J. Radiat. Biol. , 62, 313-20.

Rowe, T. *et al* (1985), Inhibition of epipodophyllotoxin cytotoxicity by interference with topoisomerase-mediated DNA cleavage, Biochem. Pharmacol., 34, 2483-7.

SCG Workshop III, Genetic Toxicology Division (Nov 18-20 1991)
Integrated Laboratory Systems
P.O. Box 13501
Research triangle Park, NC 27709.

Singh, N.P. *et al* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell Res., 175, 184-91.

Singh, N.P. *et al* (1990), DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, Mutation Res., 237, 123-30.

Tice, R.R. *et al* (1990), The single cell gel (SCG) assay: a sensitive technique for human biomonitoring, Environ. Molec. Mutagenesis, 15, S17, 60.

Tice, R.R. *et al* (1992), High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay, Mutation Res., 271, 101-13.

Vijayalaxmi *et al* (1992), Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique, Mutation Res., 271, 243-52.

III - ANEXO

Tipo Celular	Células aplicadas por poço (x10000)	MTT cc. utilizada 1 D.O.	0,5 D.O.	(µg/ml) 0,25 D.O.
CMN				
	30	1,653	0,97	0,535
	25	1,31	0,804	0,455
Experiência nº1,a	20	1,039	0,635	0,384
	10	0,556	0,373	0,199
CMN				
	30	maior que 2	1,307	0,57
	25	1,702	0,998	0,529
Experiência nº1,b	20	1,392	0,759	0,422
	10	0,621	0,395	0,225
CMN				
	25	0,495	0,402	
	20	0,411	0,349	
Experiência nº2,a	15	0,377	0,301	
	10	0,211	0,17	
CMN				
	25	0,514	0,432	
	20	0,434	0,3	
Experiência nº2,b	15	0,355	0,216	
	10	0,186	0,127	
CMN				
	20	1,294		
	10	0,739		
Experiência nº3	7,5	0,483		
	5	0,256		
	2,5	0,139		
	1	0,026		

Tab. nº2: Estudo da linearidade entre cc. de MTT e cc. celular de CMN.
Nas experiências nº1a, nº1b e nº3 removeu-se o sobrenadante poço a poço.
Os gráficos nº1 e nº3a representam as experiências nº1a, nº2a e nº3.
Apliquei 100 µl de cada uma das soluções de MTT referidas nesta tabela sendo a cc. final metade da indicada.
O volume final em cada poço é de 200 µl.

Tipo Celular	Células aplicadas por poço (x10000)	MTT cc. utilizada (µg/ml)		
		1	0,5	0,25
		D.O.	D.O.	D.O.
K562				
	15	1,581	1,11	0,878
Experiência nº1,a	10	1,101	0,889	0,561
	5	0,562	0,459	0,32
K562				
	15	1,627	1,186	0,768
Experiência nº1,b	10	1,344	0,851	0,502
	5	0,729	0,531	0,329
K562				
	15	1,286	0,889	0,443
Experiência nº2,a	10	0,894	0,747	0,31
	5	0,549	0,408	0,133
K562				
	15	1,067	0,834	0,434
Experiência nº2,b	10	1	0,676	0,378
	5	0,714	0,472	0,214
K562	10	maior que 2	1,636	0,92
	7,5	1,873	1,384	0,776
Experiência nº3	5	1,511	1,048	0,492
	2,5	0,89	0,636	0,266
K562	7,5	1,83		
	5	1,256		
	2,5	0,627		
Experiência nº4	2	0,532		
	1,5	0,4		
	1	0,243		

Tab. nº3: Estudo da linearidade entre cc. de MTT e cc. celular de K562. Somente nas experiências nº3 e nº4 se removeu o sobrenadante pelo 2º método. Os gráficos nº2 e nº 3b são relativos às experiências nº3 e nº4, respectivamente. Apliquei 100 µl de cada uma das soluções de MTT referidas nesta tabela sendo a cc. final metade da indicada. O volume final em cada poço é de 200 µl.

Tipo Celular	Células aplicadas por poço (x10000)	MTT cc. utilizada (µg/ml)		
		1	0,5	0,25
		D.O.	D.O.	D.O.
R7	21			
	15	1,119	0,833	0,407
Experiência nº1,a	10	1,023	0,677	0,324
	5	0,496	0,314	0,178
R7	21	maior que 2	1,3	0,467
	15	1,402	0,791	0,409
Experiência nº1,b	10	1,036	0,495	0,306
	5	0,431	0,264	0,13
R7	7,5	1,183		
	5	0,859		
	2,5	0,396		
Experiência nº2	2	0,325		
	1,5	0,225		
	1	0,127		

Tab. nº4: Estudo da linearidade entre cc. de MTT e cc. celular de K562/R7.

A experiência nº2 foi feita removendo o sobrenadante pelo 2º método. O gráfico nº 3c mostra os resultados da experiência nº2. Apliquei 100 µl de cada uma das soluções de MTT referidas nesta tabela sendo a cc. final metade da indicada. O volume final em cada poço é de 200 µl.

Tipo e concentração cc. (x100000 cél/ml)	Tempo de exposição ao MTT (horas) (D. O.) 4	(D. O.) 5
CMN		
20	1,294	1,264
10	0,739	0,684
7,5	0,483	0,487
5	0,256	0,258
2,5	0,139	0,086
1	0,026	0,02

Tab. nº5: Densidade óptica vs tempo de exposição ao MTT de ccs diferentes de CMN.
Experiência feita removendo o sobrenadante poço a poço. Como o volume final é de 200 µl e apliquei 100 µl de cada uma das suspensões celulares referidas na tabela, as ccs finais são metade das indicadas.

Tipo Celular e cc. (x10000 cél/ml)	Tempo D. O. 1	de D. O. 2	exposição D. O. 3	ao D. O. 4	MTT D. O. 5	(horas) D. O. 6
K562						
25		0,175	0,263	0,315	0,294	0,317
20		0,144	0,203	0,255	0,233	0,266
15		0,146	0,233	0,231	0,192	0,205
Experiência nº1						
K562						
10				0,23	0,198	0,205
7,5				0,187	0,158	0,187
5				0,109	0,118	0,12
1				0,056	0,031	
Experiência nº2						
K562						
25				0,299	0,233	0,297
20				0,294	0,219	0,266
15				0,238	0,244	0,248
Experiência nº3						
K562						
25		0,113	0,132	0,104	0,096	0,112
20			0,098	0,108	0,084	0,13
15			0,079	0,077	0,059	0,078
Experiência nº4						
K562						
25	0,27	0,458	0,65	0,627	0,779	
20	0,217	0,376	0,519	0,532	0,66	
15	0,156	0,271	0,385	0,4	0,497	
10	0,097	0,154	0,231	0,243	0,334	
Experiência nº5						

Tab. nº6: Densidade óptica vs tempo de exposição ao MTT de ccs diferentes de K562.

Somente a experiência nº5 foi feita com o 2º método de remoção do sobrenadante cujos resultados se mostram no gráfico nº4. No gráfico 5b encontram-se os resultados da experiência nº1. Como o volume final é de 200 µl e apliquei 100 µl de cada uma das suspensões celulares referidas na tabela, as ccs finais são metade das indicadas.

Tipo Celular e cc. (x10000 cél/ml)	Tempo de exposição ao MTT (horas)					
	D. O. 1	D. O. 2	D. O. 3	D. O. 4	D. O. 5	D. O. 6
R7						
12,5				0,271	0,213	0,27
10				0,135	0,118	0,157
7,5				0,118	0,078	0,135
5				0,104	0,063	0,089
Experiência nº1						
R7						
10				0,132	0,149	0,125
7,5				0,101	0,111	0,127
5				0,092	0,1	0,102
1				0,055	0,061	0,065
Experiência nº2						
R7						
25				0,128	0,149	0,155
20				0,166	0,17	0,202
15				0,19	0,163	0,165
Experiência nº3						
R7						
25		0,154	0,157	0,155	0,185	0,235
20			0,152	0,147	0,144	0,163
15			0,133	0,117	0,143	0,245
Experiência nº4						
R7						
25	0,134	0,251	0,345	0,396	0,407	
20	0,081	0,153	0,276	0,325	0,316	
15	0,047	0,115	0,18	0,225	0,205	
10	0,042	0,054	0,07	0,127	0,133	
Experiência nº5						

Tab. nº7: Densidade óptica vs tempo de exposição ao MTT de ccs diferentes de K562/R7.

Somente a experiência nº5 foi feita com o 2º método de remoção do sobrenadante. No gráfico 5a encontram-se os resultados da experiência nº4. Como o volume final é de 200 µl e apliquei 100 µl de cada uma das suspensões celulares referidas na tabela, as ccs finais são metade das indicadas.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %	96 horas Viab. Cel. %
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº1	Ara C 10	74,96	28,19	12,05	
	5	74,44	37,77	14,85	
	1	79,55	58,3	31,79	
	0,5	84,66	64,26	45,76	
	0,1	94,46	73,83	82,71	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº2	Ara C 20	75,12	14,64	0	
	10	76,41	24,26	0	
	7,5	74,75	23,53	0	
	5	84,18	43,77	0	
	2,5	87,05	50,96	12,72	
	1	95,28	48,94	24,7	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº3	Ara C 10		47,18		32,3
	7,5		46,6		37,68
	5		49,75		40,19
	1		74,05		55,5
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº4	Ara C 10	61,17	5,45	3,95	
	5	67,48	7,88	4,78	
	1	74,26	23,64	11,85	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº12	Ara C 10	70,36	43,65	25,82	
	5	72,28	46,67	27,7	
	1	81,17	58,33	46,65	
	0,5	89,92	65	50,33	

Tab. nº8: Percentagem de viabilidade celular (viab. cel. %) das células mononucleares de sangue periférico após exposição ao Ara C.
O gráfico nº6 apresenta os resultados da experiência nº1 como exemplo da acção desta droga nas células sanguíneas. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº5	Doxo 1	89,33	59,16	38,36
	0,75	88,13	76,17	58,25
	0,5	93,14	93,89	76,07
	0,25	98,52	98,32	76,17
	0,15	92,95	98,2	83,06
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº6	Doxo 1	75,24	36,34	7,16
	0,75	84,73	49,27	12,74
	0,5	88,83	76,19	30,95
	0,25	94,77	96,99	67,16
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº7	Doxo 1	73,66	36,9	17,9
	0,75	81,26	55,2	35,93
	0,5	90,3	79,36	63,8
	0,25	89,52	100	89,21
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº13	Doxo 1	98,68	99,33	90,8
	0,75	100,47	99,89	91,86
	0,5	96,61	99,33	95,52
	0,25	98,97	106,03	105,78

Tab. nº9: Percentagem de viabilidade celular das células mononucleares de sangue periférico após exposição à doxorrubicina.
O gráfico nº7 apresenta os resultados da experiência nº6 como exemplo da acção desta droga nas células sanguíneas. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº10	Etoposídeo 30	90,45	63,09	60,27
	20	92,02	79,91	71,81
	10	89,41	83,64	77,02
	7,5	89,78	94,36	57,1
	5	99,85	90	79,06
	1	101,27	98,73	89,17
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº8	Etoposídeo 100	84,24	36,84	16,02
	75	88,73	61,4	40,1
	50	95,62	75,91	67,96
	25	98,95	87,6	87,42
	10	95,62	85,85	80,75
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº9	Etoposídeo 100	20,85	2,05	2,7
	75	41,61	6,26	2,97
	50	62,46	25,27	13,38
	25	78,58	62,45	51,49
	10	91,09	79,3	74,19
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº11	Etoposídeo 100	69,72	13,03	8,88
	75	79,69	34,41	16,53
	50	89,52	55,05	36,61
	30	84,8	63,25	54,78
	25	84,34	80,97	57,24
	20	92,53	83,02	69,54
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº14	Etoposídeo 100	83,19	43,93	19,51
	75	92,06	67,89	35,94
	50	92,56	74,06	51,05
	25	91,81	94,72	65,27
	10	89,8	92,78	76,63

Tab. nº10: Percentagem de viabilidade celular das células mononucleares de sangue periférico após exposição ao etoposídeo.
Os gráficos nº8 e nº9 apresentam os resultados da experiência nº11 como exemplo da acção desta droga nas células sanguíneas. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante.

Tipo Celular	Experiência nº	Tempo de exposição 24 horas D.O.	48 horas D.O.	72 horas D.O.	96 horas D.O.
Sangue Periférico (CMN) Controlo	1	1,154	0,94	1,145	
	2	1,081	0,962	0,668	
	3		1,206		0,836
	4	0,618	0,495	0,481	
	5	1,078	0,835	0,915	
	6	0,796	0,715	0,732	
	7	1,277	1,061	0,95	
	8	0,958	0,855	0,93	
	9	1,055	0,831	0,74	
	10	1,341	1,263	1,111	
	11	0,796	0,715	0,732	
	12	1,508	1,26	1,224	
	13	1,061	0,896	0,848	
	14	1,196	0,956	0,907	

Tab. nº11: Valores de absorvância dos controlos para os vários dias em cultura de cada uma das experiências feitas com CMN pelo 2º método de remoção do sobrenadante das placas.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (ug/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %	96 horas Viab. Cel. %
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº15	Doxo 1,25		48,77	25,4	6,96
	1		70,63	31,15	10
	0,75		94,97	27,08	8,39
	0,5		106,08	60,91	17,86
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº16	Doxo 1,25		29,65	9,31	
	1		41,72	12,5	
	0,75		53,78	27,21	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº17	Doxo 1,25		32,57	11,57	
	1		47,95	10,5	
	0,75		61,05	26,96	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº18	Doxo 1,25	89,48	32,31	38,68	
	1	91,62	43,97	45,26	
	0,75	96,97	55,89	51,54	
	0,5	104,1	81,79	65	
Sangue Periférico (CMN) Experiência nº19	Doxo 1,25	100,19	113,56	95,61	
	1	103,81	99,09	108,62	
	0,75	103,1	135,61	108,62	
	0,5	117,02	178,64	87,14	

Tab. nº12: Percentagem de viabilidade celular das células mononucleares de sangue periférico após exposição à doxorrubicina.

O gráfico nº10 apresenta os resultados das experiências nº18 e nº19 como exemplo da acção desta droga nas células sanguíneas. O sobrenadante foi removido invertendo a placa de 96 poços.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
K562	AraC			
	15	106,87	67,07	31,51
	12,5	105,15	67,8	32,6
	10	99,36	64,16	31,17
Experiência nº1	8	93,13	72,05	35,21
(75000 cél/ml)	6	98,28	68,65	33,02
	4		69,14	35,8
	2		65,01	28,31
	1		68,16	39,6
K562	Ara C			
	10	90,53	55,1	31,79
	5	95,56	53,51	34,9
	1	94,67	60,29	39,4
Experiência nº2	0,75	95,41	64,67	42,45
(60000 cél/ml)	0,5	91,27	63,16	34
	0,25	97,34	64,91	44,04
K562	Ara C			
	10	98,83	54,07	39,42
	5	102,48	55,67	43,02
	1	99,56	56,55	43,94
Experiência nº3	0,2	106,41	66,88	55,61
(60000 cél/ml)	0,04	104,08	75,32	73,46
	0,008	102,92	85,83	83,64
	0,0016	99,13	93,92	96,4
K562	AraC			
	10		55,18	37,18
	5		52,94	35,2
	1		55,18	37,44
Experiência nº4	0,2		62,39	50,16
(60000 cél/ml)	0,04		71,22	60,49
	0,008		81,79	76,9
K562	Ara C			
	10			33,8
	5		60,62	33,9
	1		70,75	44,05
Experiência nº5	0,2		71,44	49,4
(60000 cél/ml)	0,04		72,05	63
	0,008		88,49	86,55
K562	Ara C			
	1		59,22	43,25
Experiência nº6	0,2		58,38	52,71
(60000 cél/ml)	0,04		78,36	62,01
	0,008		92	95,76
K562	Ara C			
	10		38,95	26,12
	5		49,48	33,2
	1		76,24	52,08
Experiência nº7	0,2		76,63	58,54
(60000 cél/ml)	0,04		95,65	70,42
	0,008			105,59
K562	Ara C			
	10		47,84	32,67
	5		56,95	39,05
	1		61,84	44,04
Experiência nº8	0,2		70,96	54,34
(60000 cél/ml)	0,04		84,68	69,64
K562	Ara C			
	10		51,23	28,08
	5		58,75	31,01
	1		68,13	35,06
Experiência nº9	0,2		77,94	48,11
(60000 cél/ml)	0,04		95,35	65,62
K562	Ara C			
	10		61,77	39,95
	5		59,88	41,05
	1		63,81	43,55
Experiência nº10	0,2		70,49	52,3
(60000 cél/ml)	0,04		75,73	75,05
K562	Ara C			
	10		86,99	52,75
	5		93,1	54,68
	1		99,84	63,19
Experiência nº11	0,2		111,13	81,36
(60000 cél/ml)	0,04		115,05	91,8

Tipo Celular	Tempo de exposição 48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
R7		
(60000 cél/ml)	80,79	55,54
	81,86	50
	80,19	55,01
	73,95	61,38
	98,57	71,11
	107,04	80,02
R7		
(60000 cél/ml)		62,2
	89,5	72,41
	88,92	65,61
	85,14	66,64
	91,86	74,85
		88,91
R7		
(60000 cél/ml)	70,56	54,93
	71,19	52,82
	77,79	63,73
	93,15	84,11
R7		
(60000 cél/ml)	42,71	19,15
	61,59	41,74
	71,35	57,35
	73,18	64,94
	80,08	73,45
	92,84	100,41
R7		
(60000 cél/ml)	64,19	41,95
	70,97	48,44
	72,58	51,22
	75,16	49,36
	82,42	62,57
R7		
(60000 cél/ml)	67	48,65
	72,91	51,35
	68,1	51,17
	74,91	51,29
	78,45	65,34
R7		
(60000 cél/ml)	72,41	48,09
	80,08	51,45
	82,91	54,63
	90,17	60,89
	90,85	68,69

Tab. nº13: Percentagem de viabilidade celular das K562 e K562/R7 após exposição ao Ara C.

O gráfico nº11 apresenta os resultados da experiência nº4 como exemplo da acção desta droga nas linhas célulares mencionadas. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
K562	Doxo			
	1	65,71	47,65	19,83
	0,75	76,04	60,53	54,55
	0,5	82,21	78,2	68,5
	0,25	69,87	83,32	83,07
Experiência nº1	0,15	104,45	83,48	84,09
(75000 cél/ml)	0,1	99,14	91,41	88,01
	0,05	101,58	93,48	83,62
K562	Doxo			
	1	73,74	36,09	17,4
	0,75	89,61	54,3	38,27
Experiêncianº2	0,5	97,63	73,36	53,94
(60000 cél/ml)	0,25	108,46	84,6	69,39
	0,15	98,66	78,89	73,36
K562	Doxo			
	1	79,9	53,34	27,72
	0,75	86,52	62,06	41,36
Experiência nº3	0,5	88,44	67,42	51,92
(60000 cél/ml)	0,25	96,15	83,81	70,76
	0,15	101,78	81,63	75,45
K562	Doxo			
	1		15,04	4
	0,75		35,15	16,3
Experiência nº4	0,5		49,06	34,59
(60000 cél/ml)	0,25		73,68	59,49
	0,15		90,7	52,11
	0,1		88,72	58,19
K562	Doxo			
	1		32,76	11,88
	0,75		50,7	27,92
Experiência nº5	0,5		59,09	33,62
(60000 cél/ml)	0,25		76,54	52,64

Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
R7			
(60000 cél/ml)	101,91	94,59	96,92
	104,69	95,5	94,05
	102,08	98,83	97,9
	104,69	101,8	101,96
	105,38	101,71	100,56
R7			
(60000 cél/ml)		71,45	64,66
		79,03	75,67
		91,61	89,34
		106,45	100,81
		107,1	99,88
		98,71	95,02

Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
R7 + Verapamil			
(60000 cél/ml)	73,96	36,85	20,22
	84,72	41,71	20,15
	84,37	51,98	26,8
	85,94	58,2	46,96
	85,07	63,24	42,34
R7 + Verapamil			
(60000 cél/ml)			

Tab. nº14: Percentagem de viabilidade celular das K562 e K562/R7 após exposição à doxorrubicina.

O gráfico nº12 apresenta os resultados da experiência nº3 como exemplo da acção desta droga nestas linhas células. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante. Foi também utilizado verapamil nas R7, na cc. de 100 µM, para inibir o funcionamento da glicoproteína-P.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
K562	Etoposideo			
	200	4,43	6,45	0
	150	16,38	7,9	0
	125	20,23	7,7	0
	100	9,44	9,73	0
Experiência nº1	75	35,26	9,63	0
(75000 cél/ml)	50	40,46	10,98	0
	25	48,94	12,04	0
	10	57,03	20,62	0
K562	Etoposideo			
	10	60,22	14,54	5,39
	7,5	65,72	20,74	7,48
	5	76,42	30,26	11,87
Experiência nº2	2,5	100,31	53,21	37,76
(60000 cél/ml)	1	105,35	68,71	47,07
	0,5	105,03	70,48	52,33
K562	Etoposideo			
	50	22,13	4,97	1,5
	25	31,8	7,06	1,4
	10	45,4	12,02	3,4
Experiência nº3	5	69,51	27,46	9,45
(60000 cél/ml)	2,5	89,67	53,06	30,5
	1	98,36	72,07	47,1
	0,5	97,38	83,01	55,3
K562	Etoposideo			
	50	27,1	3,13	v. m. b.
	25	45,42	7,24	1,07
	10	64,89	18,35	6,02
Experiência nº4	5	75	33,17	10,12
(60000 cél/ml)	2,5	92,18	58,44	28,93
	1		74,65	45,55
	0,5		79,01	54,02
K562	Etoposideo			
	50	10,45	v. m. b.	v. m. b.
	25	44,03	v. m. b.	v. m. b.
	10	63,43	13,45	v. m. b.
Experiência nº5	5	73,13	33,79	v. m. b.
(60000 cél/ml)	2,5	82,09		17,2
	1	96,27		41,99
K562	Etoposideo			
	50		1,88	v. m. b.
	25		8,46	v. m. b.
	10		22,1	1,7
Experiência nº6	5		38,56	4,56
(60000 cél/ml)	2,5		64,58	29,7
K562	Etoposideo			
	50		3,56	v. m. b.
	25		4,36	v. m. b.
	10		7,41	v. m. b.
Experiência nº7	5		19,11	5,3
(60000 cél/ml)	2,5		41,79	22,6

Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
R7			
(60000 cél/ml)	72,66	36,19	9,53
	94,57	73,71	42,02
	106,5	100,89	89,18
	109,06	91,71	86,06
	96,98	93,94	85,21
	100,45	94,47	96,82
	92,75	102,67	97,08
R7			
(60000 cél/ml)	53,21	7,53	
	78,92	33,42	12,2
	79,92	84,79	61,52
	89,96	94,25	72,89
	88,76	96,16	82,59
	100	109,04	102,4
R7			
(60000 cél/ml)		7,94	v. m. b.
		36,74	9,44
		76,18	46,64
		81,83	60,8
		87,21	68,87
R7			
(60000 cél/ml)		29,55	12,12
		59,82	47,66
		81,18	71,6
		84,73	66,1
		88,55	78,81

Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
R7 + Verapamil			
(60000 cél/ml)	63,44	27,27	8,11
	82,32	58,56	25,1
	94,41	77,01	64,01
	101,81	80,04	72,44
	105,29	85,83	80,48
	108,01	93,76	85,15
	96,83	90,82	83,53

Tab. nº15: Percentagem de viabilidade celular das K562 e K562/R7 após exposição ao etoposídeo.

O gráfico nº13 apresenta os resultados da experiência nº3 como exemplo da acção desta droga nestas linhas células. Todas estas experiências foram feitas com o 2º método de remoção do sobrenadante. Foi também utilizado verapamil nas R7, na cc. de 100 μM, para inibir o funcionamento da glicoproteína-P.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %	Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %	Tipo Celular	Tempo de exposição 24 horas Viab. Cel. %	48 horas Viab. Cel. %	72 horas Viab. Cel. %
K562	Doxo				R7							
	1	33,21	v. m. b.	23,58	(106700 cél/ml)	63,19	65,49	111,13				
	0,5	69,19	27,84	35,19		89,35	84,62	111,79				
	0,25	78,97	63,54	64,27		92,13	87,32	109,8				
Experiência nº1,a	0,15	59,4	44,33	98,92		75,69	75,05	125,7				
(106700 cél/ml)	0,1	66,79	61,12	92,8		78,24	76,3	111,26				
	0,05	77,86	71,41	90,73		88,46	88,36	103,97				
K562	Doxo				R7							
	1	23,49	v. m. b.	18,8	(106700 cél/ml)	77,66	57,83	114,01				
	0,5	58,7	24,36	36,74		75,63	70,68	113,77				
	0,25	77,09	60,99	63,34		83,5	92,77	99,28				
Experiência nº1,b	0,15	52,01	53,66	105,29		73,1	61,24	125,24				
(106700 cél/ml)	0,1	57,86		96,71		92,89	70,08	107,97				
	0,05	84,45	78,66	95,41		96,95	90,76	86,23				
K562	doxo				R7							
	1		18,78	15,36	(106700 cél/ml)		80,42	106,02				
	0,5		47,59	39,33			96,49	112,28				
	0,25		82,74	75,34			100,25	103,94				
Experiência nº2,a	0,15		69,34	66,11			90,09	100,35				
(106700 cél/ml)	0,1		76,24	77,31			94,8	108,69				
	0,05		87,32	81,39			99,75	101,39				
K562	doxo				R7							
	1		17,54	11,12	(106700 cél/ml)		71,48	98,26				
	0,5		42,01	36,74			80,29	104,67				
	0,25		77,77	77,18			90,86	103,47				
Experiência nº2,b	0,15		69,6	68,62			71,37	93,16				
(106700 cél/ml)	0,1		74,36	78,25			81,06	98,81				
	0,05		88,23	85,26			86,89	99,78				
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	41,37	15,66		(106700 cél/ml)	55,6	39,96		(106700 cél/ml)	20,24	6,39	
	0,5	60,68	57,77			68,66	62,41			53,36	26,46	
	0,25	78,9	85,32			80,41	82,48			53,45	34,85	
Experiência nº3	0,15	54,52	42,6			57,84	60,58			24,44	5,47	
(106700 cél/ml)	0,1	70,14	67,72			65,86	70,8			41,42	19,16	
	0,05	78,9	70,63			80,22	98,72			37,87	20,99	
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	43,62	15,12	5,4	(106700 cél/ml)	80	76,22	62,77	(106700 cél/ml)	66,4	8,39	8,92
Experiência nº4	0,5	58,23	35,7	19,56		92,8	76,92	53,23		92,8	20,98	6,46
(106700 cél/ml)	0,25	77,08	72,31	50,66		100	69,93	78,46		109,6	47,55	24,92
	0,15	77,26	73,04	55,77		117,6	83,22	65,23		126,4	69,23	36
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	68,7	11,47	6,78	(106700 cél/ml)	102,71	85,39	74,67	(106700 cél/ml)	32,18	8,35	4,83
Experiência nº5	0,5	97,71	12,83	23,2		125,97	68,78	111,42		90,31	31,48	38,07
(106700 cél/ml)	0,25	121,37	41,69	50,75		120,54	76,52	104,83		95,35	23,48	36,16
	0,15	129,26	61,32	54,39		118,22	96	96,19		97,67	12,7	24,74
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	78,76	34,67	25	(106700 cél/ml)	96,19	83,1	79,36	(106700 cél/ml)	19,03	2,82	3,01
Experiência nº6	0,5	83,5	62,4	55,78		87,54	100,56	79,96		23,53	18,31	45,39
(106700 cél/ml)	0,25	91,67	72,71	64,89		77,16	122,82	87,17		59,52	51,27	57,31
	0,15	94,61	83,64	67,42		93,77	144,23	97,19		75,78	81,97	59,32
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	62,88	16,58	2,32	(106700 cél/ml)	147,93	132,18	81,43	(106700 cél/ml)	46,28	19,8	6,43
Experiência nº7	0,5	93,94	44,1	3,61		150,41	155,45	117,14		122,31	44,06	8,57
(106700 cél/ml)	0,25	120,83	76,58	17,68		175,21	153,46	115,36		202,48	80,2	29,29
	0,15	145,45	99,32	59,1		219,01	160,4	144,26		225,62	97,03	70,71
K562	Doxo				R7				R7 + Verapamil			
	1	43,2	26,57	2,32	(106700 cél/ml)	72,8	78,08	79,61	(106700 cél/ml)	28,97	17,03	5,42
Experiência nº8	0,5	59,41	52,22	5,01		91,18	89,24	89,37		62,97	43,64	15,18
(106700 cél/ml)	0,25	81,17	79,63	44,62		102,27	94,91	111,93		84,89	72,41	71,8
	0,15	88,49	80,09	109,17		110,58	87,28	114,1		119,4	84,15	105,64

Tab. nº16: Percentagem de viabilidade celular das K562 e K562/R7 após exposição à doxorrubicina.
O gráfico nº14 apresenta os resultados das experiências nº1a e nº5. Todas estas experiências foram feitas com o 1º método de remoção do sobrenadante. Foi também utilizado verapamil nas R7, na cc. de 100 μM, para inibir o funcionamento da glicoproteína-P.

Tipo Celular	Droga utilizada cc. utilizada (µg/ml)	Tempo 24 horas Viab. Cel. %	de 48 horas Viab. Cel. %	exposição 72 horas Viab. Cel. %	Droga utilizada	Tempo 24 horas Viab. Cel. %	de 48 horas Viab. Cel. %	exposição 72 horas Viab. Cel. %	Tipo Celular (so com doxo 1 µg/ml)	Tempo 24 horas Viab. Cel. %	de 48 horas Viab. Cel. %	exposição 72 horas Viab. Cel. %
R7	Verapamil								R7		77,41	73,59
	100	62,39	55,08	51,58		22,64	2,28	2,11				
Experiência nº1	50	81,11	93,4	99,52	Verapamil	23,89	6,47	2,39				
(60000 cél/ml)	25	81,28	101,02	100,86	+ doxo (1ug/ml)	19,25	8,88	1,44	K562		23,73	11,45
	10	69,7	88,2	89,38		17,47	8,5	2,58				
R7	Verapamil								R7	93,62	95,72	72,86
	100	98,38	92,95	59,47		42,11	17,63	4,22				
Experiência nº2	50	114,39	108,73	41,92	Verapamil	53,02	43,24	5,03				
(60000 cél/ml)	25	103,13	97,9	40,46	+ doxo (1ug/ml)	52,9	58,94	4,88	K562		17,12	
	10	96,88	85,47	48,82		63,57	65,41	34,17				
R7	Verapamil								R7		92,28	93,18
	100	90,85	47,15	32,45		57,44	9,26	2,41				
Experiência nº3	50	115,33	97,86	93,09	Verapamil	86,27	28,38	8,15				
(60000 cél/ml)	25	119,91	99,88	87,6	+ doxo (1ug/ml)	83,3	45,72	20,88	K562			
	10	101,37	86,1	74,54		79,41	59,38	35,61				
R7	Verapamil								R7	85,4	78,12	73,25
	100	94,12	61,2	30,19		30,5	4,95	4,86				
Experiência nº4	50	99,78	68,62	46	Verapamil	40,96	17,19	7,09				
(60000 cél/ml)	25	98,04	71,61	57,45	+ doxo (1ug/ml)	73,2	33,2	17,63	K562		39,4	22,66
	10	100,22	84,51	73,86		78,65	47,92	29,28				
R7	Verapamil								R7	107,22	99,18	92,91
	100	90,36	59,45	30,45		74,05	11,78	5,42				
Experiência nº5	50	100,6	66,58	45,88	Verapamil	78,92	16,16	10,01				
(60000 cél/ml)	25	96,59	67,4	47,24	+ doxo (1ug/ml)	72,69	28,77	16,79	K562	66,42	13,45	v. m. b.
	10	96,59	74,66	65,17		73,69	43,7	25,23				

Tab. nº 19: Estudo da cc. de verapamil a utilizar de modo a não ser tóxica para a linha celular R7 e que iniba o funcionamento da glicoproteína P. Neste estudo incluiram-se controlos de K562 e K562/R7 só com doxorrubicina (últimas 3 colunas desta tabela).

RESUMO

As células viáveis reduzem o sal solúvel de tetrazólio (MTT) num produto insolúvel de cor violeta ("formazan") que pode ser dissolvido e quantificado, lendo-se a absorvância num espectrofotómetro. Quando se incubam células com uma solução de MTT a quantidade de "formazan" produzida depende não só das concentrações de células e de MTT usadas mas também do tempo de incubação. Das várias condições testadas para a padronização do "MTT assay" 1 mg/ml de MTT e 4 horas de incubação foram consideradas condições óptimas para a produção de "formazan".

Este teste foi adaptado para testar a quimiossensibilidade de células mononucleares de sangue periférico normal (2 x 10^6 células/ml) e de células das linhas K562 e K562/K7 (0.6 x 10^5 células/ml) a três agentes quimioterápicos. Para qualquer um dos tipos celulares adoptou-se 72 horas de exposição contínua à doxorrubicina, ao etoposídeo e citosina arabinosídeo nos seguintes intervalos de concentração 0.05 - 1.25, 0.5 - 200 and 0.0016 - 20 μg/ml, respectivamente.

Foi recentemente descrita uma nova técnica para detecção de quebras no DNA de células eucariotas: electroforese em tampão alcalino com as células incorporadas num gel de agarose. Os fragmentos de DNA migram na direcção do ânodo criando uma imagem semelhante à cauda de um "cometa".

Esta técnica foi padronizada para detectar lesões no DNA de 2 tipos diferentes de células. Células mononucleares de sangue periférico normal e células da linha K562 foram incubadas com várias concentrações de doxorrubicina por diferentes períodos de tempo, expostas a um tampão alcalino (pH>13) de 20 a 60 minutos e sujeitas a uma electroforese a 25 mV (300 mA) durante 20 ou 40 minutos. A extensão das lesões no DNA foi detectada pela migração do DNA e intensidade da cauda do "cometa".

Para as células K562 20 minutos de desnaturação e 20 minutos para a electroforese do DNA são suficientes para obter uma boa relação entre o tamanho e intensidade dos "cometas" observados e as concentrações de droga utilizadas (0.5 a 2 μg/ml) em exposições de 2.5 e 5 horas.

Para obter uma boa relação entre o tamanho dos "cometas" e intensidade da cauda com a concentração de doxorrubicina em células mononucleares expostas à droga em concentrações de 0.5 a 10 μg/ml, durante 24 horas, a melhor condição testada foi 40 minutos para a desnaturação e 20 minutos para a electroforese do DNA.

SUMMARY

Various factors involved in the optimal use of a tetrazolium salt (MTT) based colorimetric assay for cell growth and chemosensitivity have been studied.

The MTT assay is dependent on the ability of viable cells to metabolise a yellow water-soluble tetrazolium salt into a violet water-insoluble formazan product that can be quantitated using a spectrophotometer. When cells are incubated with MTT, the resulting optical density of the formazan product is dependent upon both cell and MTT concentrations and the incubation time. As 1 mg/ml MTT and 4 hours incubation gave enough formazan production we used this concentration and incubation time as the standard procedure.

This assay has been adapted for chemosensitivity testing of normal peripheral blood mononuclear cells (2 x 10^6 cells/ml), K562 and K562/R7 cells (0.6 x 10^5 cells/ml) to three chemotherapeutic agents. For all cell types a 72 hours continous exposure to doxorubicin, etoposide and cytosine arabinoside has been adapted with concentrations ranging 0.05 - 1.25, 0.5 - 200 and 0.0016 - 20 µg/ml, respectively.

DNA breaks in eukaryotic cells can be detected by alkaline electrophoresis of cells embedded in agarose. DNA breaks extend in the direction of the anode forming an image resembling the tail of a comet. This technique was standardized to detect DNA damage in two different cell types. Normal peripheral blood mononuclear cells and K562 cells were incubated with various doxorubicin concentrations for different periods of time, exposed to alkali (pH>13) for 20 to 60 minutes and electrophoresed at 25 V (300 mA) for 20 or 40 minutes. The extent of DNA damage was detected by DNA migration and by tail intensity.

For K562 cells 20 minutes of denaturation and 20 minutes of DNA electrophoresis were enough to get a good correlation between the size and intensity of the comets and doxorubicin concentrations ranging from 0.5 to 2 µg/ml (2.5 to 5 hours incubation time).

For mononuclear cells 40 minutes of denaturation and 20 minutes of DNA electrophoresis were optimal conditions to obtain good comet size and tail intensity correlation to doxorubicin concentrations in the range of 0.5 to 10 µg/ml (24 hours incubation time).