

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Combinações de Modificadores da Resposta Biológica e 5-Fluorouracil no Tratamento do Câncer Colorretal: Estudo “in vitro”.

Orientador: Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

Fernando Medina da Cunha

1995





FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

C914c Cunha, Fernando Medina da
Combinacoes de modificadores da resposta biologica e 5- Fluorouracil no tratamento do cancer colorretal : estudo "in vitro" / Fernando Medina da Cunha. - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Carmino Antonio de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciencias Medicas.

1. Cancer. 2. Colon. 3. Reto. 4. Quimioterapia.
5.* 5- Fluorouracil. 6.* Interleucina -2. 7.* Interferon.
I. Souza, Carmino Antonio de. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciencias Medicas. III. Titulo.

“Parece-me que o prêmio mais alto possível para qualquer trabalho humano não é o que se recebe por ele, mas o que se torna através dele”.

Brock Bell

À Ludmila, Marcela, Ligia e Vinicius

Índice

Abreviaturas	5
Introdução	7
Incidência de câncer colorretal	7
Fatores de risco para câncer colorretal	8
Classificação da OMS dos tumores malignos	15
Classificação por extensão da doença	17
Fatores prognósticos	18
Quimioterápicos e modificadores de resposta biológica	23
Objetivos	35
Material e Métodos	36
Linhagens Celulares	36
Cultura de Tecido	49
Drogas Utilizadas	49
Testes de Quimiosensibilidade	50
MTT	50
SRB e Ensaio Clonogênico	51
Resultados	54
Citotoxicidade (IC ₅₀ das linhagens celulares)	54
Resultado para linhagem WiDr	54
Resultado para linhagem HCT116	54
Resultado para linhagem HCT8	55
Resultado para linhagem SW48	55
Resultado para linhagem SW403	56

Resultado para linhagem LoVo	56
Resultado para Linhagem Colo201	56
Radiosensibilidade	73
Discussão	83
Conclusões	92
Sumário	93
Summary	96
Referências	97

Abreviaturas

5-FU	5-fluorouracil - quimioterápico antimetabólito.
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATCC	American Tissue Culture Collection
BCG	bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovine serum albumine: albumina sérica bovina
CEA	Antígeno carcinoembrionário
D ₀	Dose de irradiação que causa uma redução da população celular irradiada para 37% da população inicial.
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Sal dissódico de ácido etilenodiaminotetraacético
Gy	Gray: unidade de dose absorvida de irradiação= 1 J/kg
IC ₅₀	Concentração de droga capaz de inibir a crescimento de 50% das células em cultura
IFN	Interferon alfa 2a - Citoquina produzida por linfócito
IL-2	Interleucina-2 - Citoquina produzida por linfócito T ativado.
LAK	Lymphokine Activated Killer- linfócitos ativados pela IL-2
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-difeniltetrazolio. Composto que forma precipitado de cristais de cor violeta por redução do composto na presença de enzimas mitocondriais.
NK	Subpopulação linfocitária com capacidade de lise à células de tumor

PBS	Phosphate buffer solution
RNA	Ácido Ribonucleico
SRB	Sulforodamina B. Substância corante das proreinas componentes da membrana celular.
TCA	Ácido tricloro acético
TCGF	Fator de crescimento de células T
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer

1. Introdução

Os tumores colorretais constituem um dos maiores grupos de neoplasias que acometem o homem na atualidade, sendo notado um aumento na sua incidência nos Estados Unidos da América de 21% no sexo masculino, quando comparados os períodos de 1956-58 e 1986-88. Estima-se, neste mesmo país, a ocorrência de 111.500 novos casos no ano de 1992. Aproximadamente 51.000 norte americanos deverão morrer devido a esta doença, sendo a segunda causa de óbito por câncer naquele país, superada apenas pelo câncer de pulmão (Câncer Facts and Figures, 1992).

Nos países em desenvolvimento a incidência é mais baixa. Em regiões de rápida urbanização e com estilo de vida ocidentalizado, como é o caso de algumas capitais brasileiras, os tumores colorretais representam, em ambos os sexos, a quarta localização mais freqüente dentre os tumores sólidos. Uma publicação recente do Ministério da Saúde do Brasil relata a incidência de câncer nas cidades de Belém, Fortaleza, Recife, São Paulo, Porto Alegre e Goiânia (Instituto Nacional do Câncer, 1991). Segundo esta estatística o câncer colorretal apresenta coeficiente de incidência que varia de 8.2 (Belém, sexo masculino) a 24 (Porto Alegre, sexo masculino), por 100.000 habitantes. Constitui a quarta localização de câncer mais freqüente em ambos os sexos nas cidades estudadas, com exceção de Goiânia e Recife onde, entre as mulheres, ocupa o terceiro posto. Estas neoplasias representam a segunda causa de morte por câncer na população feminina de Porto Alegre e estão entre as cinco causas mais importantes de mortalidade nas capitais analisadas, exceto na população masculina de Belém e Fortaleza. O câncer de intestino grosso apresenta fatores etiológicos complexos e multifatoriais, sendo que cada um destes fatores pode ter maior ou menor influência no aparecimento desta neoplasia. Alguns fatores podem ser causa direta, outros ainda podem aumentar ou promover o risco e outros, ainda, podem ser protetores ou inibidores do processo.

Na década passada, foram feitos grandes progressos no conhecimento dos fatores de risco e dos fatores de proteção à neoplasia. Ficaram bem estabelecidos fatos que podem alertar o público a mudar o estilo de vida e assim diminuir a incidência do câncer de cólon e reto.

Tem sido postulado, há vários anos, que os cânceres de cólon e reto são causados ou promovidos por fatores ambientais, especialmente por fatores dietéticos, que afetam o esvaziamento entérico (Bruce, 1980; Weisburger 1987). Suspeita-se que carcinógenos estão presentes podendo ser identificados nas fezes (Modan, 1977; Willet, 1984). O seu contato com a mucosa intestinal poderia promover a transformação maligna do epitélio normal. Atualmente, pelo menos seis hipóteses etiológicas estão sendo estudadas, tanto em testes pré-clínicos como em estudos epidemiológicos e clínicos. Tais testes são baseados não só na presença de fecapentanos, como também na de 3-cetosteróides, de catabólitos de pirólises, de ácidos biliares, de insuficiência de cálcio na dieta e do PH fecal.

Embora não seja possível identificar uma causa específica para o câncer do intestino grosso, estudos epidemiológicos de hábitos nutricionais e migrações são bem conhecidos. Estes estudos mostram a clara associação do câncer coloretal a algumas dietas (tais como aquelas ricas em gordura animal e carne, e pobres em fibras) em certas populações de alto risco (Ziegler, 1986; Palmer, 1983).

Outros fatores de riscos bem descritos são as doenças genéticas, familiares e inflamatórias coloretais precursoras do câncer.

Os estudos epidemiológicos de câncer de cólon e reto têm sugerido que são necessários múltiplos eventos para o desenvolvimento da doença (Foulds L., 1958).

Somente na década passada se identificaram os genes alvos para estes acontecimentos. Mais recentemente estes genes têm sido clonados e seqüenciados e as funções dos produtos proteicos destes genes estão sendo rapidamente elucidadas. A partir destes esforços, um melhor conhecimento das bases moleculares para o desenvolvimento do câncer de cólon e reto está

emergindo. Contudo, nenhum gene isolado parece estar alterado em todos os tumores colônicos e, provavelmente, existam vários caminhos moleculares para o seu desenvolvimento e progressão. Adicionalmente, o acúmulo de danos genéticos resulta em maiores mudanças nas vias de transdução de sinal envolvendo o controle de crescimento das células epiteliais do cólon. O entendimento destes processos regulatórios é também essencial para o desenvolvimento de modelos para a biologia molecular da transformação neoplásica das células epiteliais colônicas. Por exemplo, embora a transição do pólipo-a-carcinoma seja aceita (Muto T., 1958), nem todos os pólipos seguem esta via; muitos regredem ou param de crescer (Hoff G., 1986). Quando as diferenças moleculares entre os pólipos puderem ser definidas a ponto de prever se estes regredirão ou evoluirão, isto constituirá um dado clínico valioso para separar pacientes de alto risco para desenvolverem câncer de cólon. Esta possibilidade parece que se tornará realidade em pouco tempo devido ao rápido avanço no conhecimento do processo de transformação das células epiteliais do cólon.

Existem dois tipos de alterações moleculares importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de cólon. O primeiro é o evento genético primário, em que a mutação ocorre numa estrutura específica de um gene ou vários genes. Esta lesão genética inclui mutações que afetam predominantemente a ativação de um proto-oncogene e recessivamente a ativação de genes supressores de tumor. Em caráter dominante, ocorre a ativação dos proto-oncogenes, por exemplo, c-Ha-ras, que são reguladores positivos do crescimento das células normais. A mutação em um simples alelo gênico "ras", resulta em mudança de um único amino-ácido no seu produto protéico, o que é suficiente para que esta proteína exerça seu fenótipo tumorigênico. Mutações nos proto-oncogenes são raramente hereditárias, porém, mais frequentemente, são o resultado de exposição a mutagênicos ambientais (Yuspa S H, 1989).

Vale acrescentar que a ativação do proto-oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor também contribuem para o desenvolvimento de grande número de tumores

humanos. Primeiro postulados por Knudson (Knudson AG, 1971), os genes supressores de tumor, semelhantemente aos proto-oncogenes, exercem importante papel na regulação do crescimento celular (- Knudson AG, 1971 - Lee EY, 1991 - Hollingsworth RE, Marshall CJ, 1991). Contudo, sua atuação na natureza é recessiva; se um simples alelo é afetado por uma mutação, o produto do gene produzido pelo alelo não comprometido é usualmente suficiente para manter o fenótipo normal. São necessários, portanto, dois eventos genéticos inativando ambos os alelos, para se obterem conseqüências aberrantes a partir da perda da função do produto deste gene. Este evento pode resultar numa mutação distinta e simultânea em cada alelo, ou, como ocorre na polipose familiar múltipla, num defeito hereditário em um único alelo, seguido por uma mutação ou perda de um segundo alelo. A inativação de vários genes supressores de tumor é importante para a transformação das células epiteliais do cólon. Por isto, o modelo original de Knudson para retinoblastoma não é aplicável para o câncer de cólon por causa dos múltiplos eventos genéticos requeridos para a transformação das células epiteliais colônicas (Vogelstein B, 1988). Porém, os princípios hipotetizados por Knudson - perda hereditária ou mutação de um simples gene seguido por mutação ou perda de um segundo alelo - são análogos às mudanças que inativam o gene supressor de tumor envolvido no câncer de cólon.

O paradigma que mais claramente mostra a estrutura da etiologia molecular do câncer colorretal e o mecanismo de como se desenvolve têm sido possível a partir de uma série de estudos do grupo de B. Vogelstein no Johns Hopkins Medical School Baltimore, Maryland. A observação chave neste trabalho foi a descoberta de que existem múltiplas deleções nos cromossomos humanos no câncer de colorretal (Vogelstein, 1989). Algumas das regiões dos cromossomos deletados nos tumores colorretais ocorrem freqüentemente. Por exemplo, a deleção de 18q e 17p ocorre em 75% dos tumores, e os genes alvo já foram identificados e estudados em detalhes. Outras regiões alteradas são detectáveis menos freqüentemente, talvez em pequena percentagem dos tumores.

A figura 1 é uma representação esquemática de como mais frequentemente as deleções ocorrem, juntamente com outras alterações dos proto-oncogenes e metilação da DNA interagem na progressão do tumor. Observa-se que há um acúmulo de alterações estruturais nos genes chaves responsáveis pela progressão do tumor.

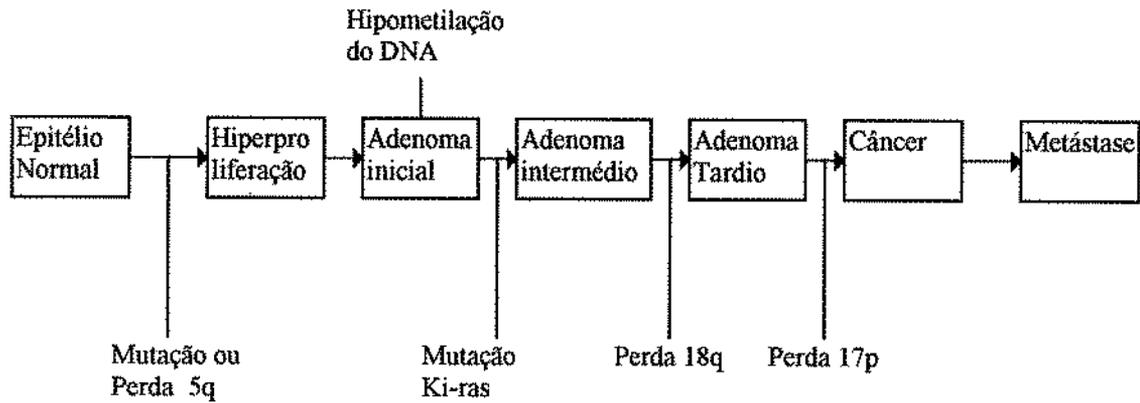


Figura 1: Diagrama que representa os eventos moleculares genéticos coincidentes com o desenvolvimento e progressão do câncer colorretal.

Várias síndromes hereditárias estão associadas à polipose adenomatosa e ao alto risco para desenvolver câncer de intestino grosso (McKusick, 1974). A mais importante é a Síndrome Adenomatosa Familiar. Sem nenhuma intervenção, virtualmente todos os pacientes afetados desenvolvem câncer colorretal. Apresenta-se com característica hereditária e autossômica dominante com 90% de penetrância e as pessoas afetadas desenvolvem pólipos adenomatosos pancólicos. Estes pólipos não estão presentes no nascimento, porém, na adolescência, são

facilmente visualizados. Se a polipose não for tratada, o risco de câncer cresce progressivamente com a idade. Assim, aos 40 anos, perto de 80% das pessoas com polipose familiar múltipla desenvolvem adenocarcinoma.

A síndrome de Gardner também é hereditária e autossômica dominante, ocorrendo na metade da frequência da polipose familiar múltipla. Outras anormalidades podem coexistir e são principalmente mesenquimais do tipo tumor desmóide do mesentério e parede abdominal, lipomas, cistos sebáceos, osteomas e fibromas (Gardner, 1962). A síndrome de Oldfield também associa-se a múltiplos cistos sebáceos, polipose adenomatosa e adenocarcinoma (Oldfield, 1954). A síndrome menos comum é de Turcot, provavelmente autossômica recessiva e que está associada a tumor do sistema nervoso central e à polipose (Turcot, 1959).

Outras síndromes hereditárias podem estar associadas ao câncer de cólon, tais como as síndromes de Peutz-Jegher e Polipose Juvenil. Estas síndromes são caracterizadas por hamartomas e pólipos de intestino. O paciente com a síndrome de Peutz-Jegher têm múltiplos tumores, usualmente no intestino delgado (duodeno) e lesões pigmentadas mucocutâneas (Jeghers, 1949). A chance de malignização é pequena (2% a 3%) . A polipose juvenil também é caracterizada por hamartomas múltiplos e a malignização é mínima (Reid, 1974; Kussin, 1979).

Algumas famílias parecem ter uma alta frequência de câncer de cólon sem pólipos adenomatosos. Esta condição clínica descrita por Lynch e Lynch é hereditária e autossômica dominante com mais de 90% de penetrância (Lynch, 1978). Caracteriza-se por várias condições clínicas não usuais, incluindo o desenvolvimento de múltiplos cânceres de cólon em jovens durante várias gerações e a maioria deles localizados no cólon proximal.

As doenças inflamatórias do cólon aumentam o risco de câncer de cólon em mais de trinta vezes. Para pacientes com retocolite ulcerativa, a incidência de tumor maligno aumenta com a extensão do intestino acometido, a idade, a severidade e a duração da doença (Edwards, 1964; Morson, 1986; Mir-Modjlessi, 1986; MacDougall, 1966). Pacientes que têm pancolite por

30 anos, têm chance maior do que 35% para desenvolver câncer de cólon (Ohman, 1982; Kewenter, 1978; Katzka, 1983; Prior, 1982). A colite granulomatosa ou Doença de Crohn, também aumenta o risco de desenvolvimento de câncer (Hamilton, 1985), embora com frequência inferior à da colite ulcerativa. Outra observação importante é que pacientes já tratados de adenocarcinoma de cólon têm maior possibilidade de desenvolver um segundo tumor de cólon. Este risco chega a ser três vezes maior do que a da população em geral (Morson, 1976; Heald, 1975; Schottenfeld, 1969).

Os pólipos inflamatórios e neoplásicos ocorrem no intestino grosso e podem ser divididos em tubulares e vilosos. Os tubulares são quatro vezes mais frequentes que os vilosos e são, usualmente, pequenos. Em geral, os pólipos grandes (acima de 2 cm) apresentam, na sua base, transformação maligna. Os pólipos vilosos têm oito a dez vezes mais probabilidades de desenvolver câncer (Appel, 1977; Morson, 1974; Lipkin, 1974; Muto, 1975).

A despeito das dificuldades em identificar o fator, ou fatores responsáveis pelo câncer de cólon, uma série de medidas têm sido tomada na tentativa de diminuir sua incidência. As principais medidas de prevenção primária estão relacionadas a dietas ricas em fibras que aumentam substancialmente o bolo fecal, conseqüentemente aceleram o trânsito intestinal com diminuição do contato entre a massa fecal, com carcinógenos, e a mucosa do intestino, reduzindo portanto a incidência de doenças intestinais, incluindo-se o câncer coloretal (Painter, 1971; Burkitt, 1974).

Outro ponto largamente discutido são as dietas com limitadas quantidades de gordura e de colesterol. Existem evidências de que a presença destas substâncias na alimentação diária aumenta a incidência de câncer coloretal (Weisbuger, 1987). O uso de cálcio por via oral e de agentes antioxidantes como a vitamina C, o tocoferol e o selênio serviriam para evitar o dano causado no epitélio colônico pelos carcinógenos.

Se a prevenção primária, baseada na identificação de fatores etiológicos é complexa, por outro lado, já é possível suspeitar ou descobrir os pacientes que têm alto risco de desenvolver câncer de cólon e reto. A prevenção secundária é a estratégia de tratar as lesões potencialmente malignas como pólipos adenomatosos.

A detecção precoce do câncer de cólon e reto está potencialmente associada a maiores taxas de cura e, evidentemente, a um substancial decréscimo da mortalidade causada por esta doença. O uso de exames relativamente complexos como o enema baritado de duplo contraste e a colonoscopia na detecção precoce faz com que nenhuma ação preventiva primária ou secundária, que cubra toda a população, seja economicamente viável. A atuação na população de alto risco como os que apresentam história familiar positiva, os portadores de polipose familiar, de retocolite ulcerativa e de história progressiva de um câncer de cólon ou reto, deve ser de vigilância intensa, sendo estes pacientes seguidos com rigor. Sem dúvida, a colonoscopia representa o exame de maior sensibilidade para o diagnóstico, tendo como desvantagem o alto custo e o desconforto para o paciente.

Os tumores do intestino grosso podem apresentar lesões vegetantes, ulceradas ou estenosantes. A maioria dos tumores malignos do intestino grosso (2/3) são ulcerados (Jackman, 1969). Isto não representa diferentes tipos de tumor mas sim, diferentes fases de uma progressão ordenada. As lesões têm origem a partir de um pólipo adenomatoso e crescem em direção ao lúmen ou penetram na parede intestinal. Com o crescimento lateral ou em circunferência, passam a ser denominados "infiltrativos". Os tumores do cólon direito tendem a ser vegetantes, crescem em direção ao lúmen e se estendem ao longo da parede. Já os localizados no cólon esquerdo tendem a crescer em circunferência, ocasionando muitas vezes oclusão do intestino grosso.

O tipo histológico mais freqüente é o adenocarcinoma correspondendo a uma fração entre 90% a 95% de todos os tumores coloretais (Hermanek, 1982). Outros tipos histológicos podem ocorrer e são raros (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação da Organização Mundial da Saúde dos Tumores Malignos Primários do Intestino Grosso.

Tumores Epiteliais

Adenocarcinoma

Adenocarcinoma Mucinoso

Adenocarcinoma de células em anel de sinete

Carcinoma espinocelular

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma indiferenciado

Carcinomas não classificados

Tumores Carcinóides

Argentafins

Não Argentafins

Compostos

Tumores não Epiteliais

Leiomiossarcomas

Outros

Neoplasias Hematopoiéticas e Linfóides

Não classificadas

O câncer de cólon e reto apresenta vários padrões de disseminação. Após o crescimento inicial na mucosa, pode progredir para o lúmen do intestino ou infiltrar a parede (Dukes, 1932; Cole, 1913). Quando o tumor atravessa a camada muscular e atinge a subserosa é considerado invasivo, pois pode chegar aos vasos sanguíneos e linfáticos (Dukes, 1958). A invasão da parede intestinal pelo tumor têm relação estreita com o grau de diferenciação histológica, ou seja, quanto menor a diferenciação das células maior será sua capacidade de invasão. Outra via freqüente de disseminação é a invasão perineural pela qual o tumor pode alcançar até 10 cm do local primário (Seefeld, 1943).

A invasão linfática também é dependente do grau de diferenciação histológica (Dukes, 1958). Dukes encontrou 30% de metástases linfáticas nos pacientes portadores de tumor de baixo grau de malignidade, enquanto nos de alto grau de malignidade a positividade foi de 81%. O número de linfonodos acometidos também aumenta com o grau histológico: uma média de 3.2 linfonodos para os tumores bem diferenciados e 6.8 linfonodos para os pouco diferenciados.

A disseminação hematológica é preferencialmente feita para fígado e pulmões, sendo que o envolvimento de outros órgãos sem a participação do fígado é raro em estudos de necrópsias, 40% das vezes o fígado foi o único órgão afetado por metástases (Brown, 1938; Grinnell, 1942; Weiss, 1986).

A avaliação da extensão da neoplasia de cólon e reto é fundamental para estipular o tratamento adequado pós-cirúrgico, concentrar pacientes em grupos em que se possam reproduzir os resultados e unificar a linguagem dos trabalhos científicos. Tradicionalmente, o câncer do intestino grosso utilizava a nomenclatura desenvolvida por Dukes (1932) e que foi modificada por ele e por outros durante as décadas seguintes (Gabriel, 1935). Atualmente, a classificação mais utilizada é da American Joint Committee on Câncer (AJCC)(1983) e a da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) (Harmer, 1978) que empregam o sistema TNM. (Tabelas 2a e 2b).

Tabela 2a - Classificação por Estádio da AJCC/UICC 1987 do Câncer Colorretal

Tumor Primário (T)

TX Tumor primário não encontrado

T0 Nenhuma Evidência do tumor na peça ressecada

Tis Carcinoma in situ

T1 Invade a submucosa

T2 Invade a muscular própria

T3/T4 Depende da presença da serosa

Serosa presente

T3 invade até a subserosa
serosa (mas não a atravessa) ou
Gordura pericólica

T4 Invade através da serosa a cavidade
peritoneal livre ou órgãos contíguo.

Serosa ausente (2/3 do reto distal)

T3 Invasão através da muscular própria

T4 Invasão de outros órgão : vagina, próstata

Linfonodo Regional (N)

NX Linfonodos não encontrados

N0 Linfonodos sem metástases

N1 1-3 Linfonodos positivos

N2 4 ou mais linfonodos positivos

(N3 linfonodos centrais positivos)

Metástases a Distância (M)

MX Metástases não acessadas

M0 Ausência de metástases à distância

M1 Presença de metástase à distância

Tabela 2b- Correlação entre o sistema Dukes e TNM

Dukes A	T1N0M0
	T2N0M0
Dukes B	T3N0M0
	T4N0M0
Dukes C	qqTN1M0
	qqTN2M0
Dukes D	qqTqqNM1

Legenda : qq = qualquer

Vários outros fatores prognósticos então envolvidos no câncer coloretal, embora o achado cirúrgico e o estadiamento patológico sejam as maiores determinantes da sobrevida. Muitos destes estão inter-relacionados e poucos trabalhos com análises multivariadas existem para defini-los como fatores prognósticos isolados (Wiggers, 1988; Newland, 1987). Desde 1958 Hoerner relata que o câncer coloretal em jovens têm pior prognóstico (Hoerner, 1958). Várias explicações têm sido tentadas, incluindo atraso no diagnóstico e grande incidência da histologia de adenocarcinoma mucoso nesta faixa etária que cursa com uma evolução pior. Dukes e Bussey (1958) sugerem que a taxa de metástases linfáticas é muito mais alta em pacientes com idade inferior a 40 anos, exatamente pelos mesmos motivos acima. Outros dados indicam que a idade média de pacientes com tumor de baixo grau de malignidade é de 62 anos, sendo que é consideravelmente mais alta do que nos portadores de neoplasias de alto grau em que a idade

média é de 55 anos (Dukes, 1958). Pacientes adolescentes, com idade inferior a 20 anos, se apresentam na grande maioria em estágios avançados com tumores produtores de muco e de alto grau de malignidade. A sobrevida deste grupo é pequena, mas quando se faz análise de sobrevida ajustando o estágio e a idade, não há diferença significativa no prognóstico para o grupo de pessoas jovens (Odone, 1982; Safford, 1981; Simstein, 1978; Bulow, 1980).

Com relação à sobrevida, o sexo feminino parece ter uma melhor evolução quando comparado ao sexo masculino (Welch, 1962; Hermanek, 1982; McDermitt, 1981). Em estudos controlados realizados no Memorial Sloan-Kettering Câncer Center (Sterans, 1974), a única variável de importância na sobrevida, além do estágio, foi o sexo, sendo que a sobrevida foi melhor para o sexo feminino. Porém, outros estudos não têm confirmado esta diferença (Bulow, 1980; Eisemberg, 1982; Corman, 1986; Fielding, 1986).

Beahrs and Sanfellipo (1971) reportam que 49% dos pacientes com câncer colorretal sintomático sobrevivem a 5 anos, enquanto 71% dos assintomáticos vivem o mesmo período. É de se esperar que pacientes com câncer colorretal detectados precocemente, com menor número de gânglios linfáticos acometidos, devam ser tratados com maior possibilidade de cura. Igualmente importante é a duração dos sintomas. Os pacientes com história clínica de sintomas por mais de 6 meses têm aumento na sobrevida de 5 anos. Esta melhora na sobrevida pode estar relacionada à baixa taxa de crescimento do tumor. Em estudo incluindo 1084 pacientes relatado por Copeland e cols (1968), a taxa de sobrevida livre de doença de pacientes com sintomatologia por um período de tempo menor ou igual a 6 meses foi de 31% comparado a 37% em pacientes com sintomas por mais de 6 meses.

A obstrução ou perfuração parece piorar o prognóstico e reduzir a sobrevida (Willett, 1985; Chapuis, 1985; Ulin, 1962; Steinberg, 1986). Uma das razões para este prognóstico reservado é a alta taxa de mortalidade operatória (Kelley, 1981). Os pacientes com obstrução e invasão de órgãos operados com intenção curativa têm uma expectativa de sobrevida

de 5 anos, enquanto os pacientes com perfuração intestinal apresentam a metade da expectativa de vida esperada para o grupo anterior (Kelley, 1981).

A presença da hemorragia têm sido associada a um melhor prognóstico. A erosão da mucosa causando o sangramento pode alertar o paciente, e o seu diagnóstico pode ser feito antes que haja invasão do tumor na parede do intestino (Thomas, 1986).

A localização do tumor primário é um fator controverso para prever o prognóstico. É reconhecido que a presença do tumor na região de retossigmoide confere uma sobrevida de 5 anos menor que nas demais regiões do intestino grosso (Corman, 1986; Spratt, 1967; Godwin, 1975; Copeland, 1968; Wolkmark, 1983; Dwight, 1969). Levando em consideração somente os cólons, alguns trabalhos reconhecem o pior prognóstico para os tumores de cólon direito (Spratt, 1967; Wolkmark, 1983), outros não encontram diferenças (Bulow, 1980; deMello, 1983), e alguns relatam pior prognóstico para pacientes com os tumores do cólon esquerdo (Pescatori, 1982).

A invasão de órgãos adjacentes pode ocorrer em 10% dos casos de câncer colorretal. Spratt e Spjut (1967) constataram que a remoção do órgão patologicamente invadido não alterava a sobrevida de 5 e 10 anos.

Dukes e outros correlacionam o grau histológico com invasão em linfonodos e a presença de metástases à distância encontradas na cirurgia (Dukes, 1958; Dukes, 1940; Gilbert, 1978). O grau histológico também foi relacionado à disseminação venosa (Winchester, 1987); Dukes, 1958), o risco de penetração linfática (Winchester, 1987), a disseminação local (Dukes, 1958), e ao número médio de linfonodos metastáticos (Koch, 1982).

Existe uma tendência atual para considerar o grau histológico como uma variável independente entre os fatores prognósticos no câncer colorretal. Outros parâmetros anatomopatológicos devem ser considerados como fatores de pior prognóstico: os tumores produtores de mucina (Trimpi, 1951), a invasão dos vasos sanguíneos (Dukes, 1940), a invasão de

vasos linfáticos (Grinnell, 1942), a invasão perineural (Seefeld, 1943), a resposta imunológica ao tumor primário (Kim, 1976). O valor da dosagem pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA) como variável prognóstica não está bem estabelecido. O nível pré-operatório do CEA reflete o volume de tumor presente (LoGerto, 1975; Wanebo, 1978). Muitos autores definem um CEA aumentado como indicativo de um maior risco de recidiva (Wanebo, 1978; Aobo, 1986), porém outros não têm dado a mesma importância prognóstica (Goslin, 1980). Steele e cols (1982) relataram que o aumento de CEA foi prognóstico para o câncer de cólon, porém não para os tumores de reto. Recentemente, a Mayo Clinic reportou que o nível de CEA estava fortemente associado à sobrevida, porém, dentro de cada estágio, somente foi de valor prognóstico independente, para os tumores Dukes C (q_qTN1M₀, q_qTN2M₀) com 4 ou mais linfonodos metastáticos (Moertel, 1986; Tabuchi, 1987).

Com o maior conhecimento da biologia molecular, nos últimos anos, vêm sendo desenvolvidos novos marcadores. Os oncogenes "ras" e "c-myc" têm importantes implicações na gênese e no prognóstico dos tumores colorretais. Der e cols, (1983) inicialmente, reportaram que o carcinoma de cólon estava associado a um oncogene ativado (c-Ki-ras-2-gene). A expressão elevada da família de oncogenes "ras" foi também encontrada em lesões pré-malignas e malignas do cólon e reto por Spandidos e Kerr (1984). O produto proteico do oncogene "ras" (p21) foi detectado por Gallick e cols (1985) em 9 de 17 cânceres de cólon. Contudo, em 4 de 5 pacientes com metástases à distância, a proteína não estava elevada, sugerindo que a ativação do oncogene "ras" é um fenômeno precoce na gênese do tumor. Thar e cols (1984) demonstram uma correlação da expressão da p21 com o grau de invasão do tumor. Assim, a proteína foi encontrada aumentada em 22 de 47 carcinomas de cólon, e está ausente em condições benignas ou normais do cólon.

O oncogene "c-myc" têm também sido encontrado em pólipos e câncer de cólon (Stewart 1986; Sikora, 1987). Em um estudo de 15 pacientes, tumores e tecidos normais adjacentes foram examinados para a expressão de "c-myc" (Sikora, 1987). O autor não encontrou

amplificação gênica ou rearranjo do "c-myc". Contudo, o "c-myc", transcrito do mRNA, estava elevado em 12 dos 15 tumores e o produto protéico p62 c-myc, estava elevado em 8 casos. Em ambas as situações, a elevação da transcrição e da proteína aconteceram nos tumores bem diferenciados.

Em conclusão, a deleção do locus p53 no cromossomo 17p, a deleção de um locus no cromossomo 18q no carcinoma colorretal, e a alta perda alélica fracionada podem, eventualmente, ser usadas como marcadores de prognóstico reservado.

A grande maioria dos pacientes portadores de câncer colorretal são submetidos a cirurgia do tumor primário com o intuito curativo, porém, 50% destes pacientes morrem com doença disseminada que, freqüentemente, está oculta na época da cirurgia inicial. Hoje, estima-se o prognóstico utilizando apenas os sistemas de estadiamento e, a maioria dos pacientes não têm evidência inicial de doença disseminada apesar de terem alto risco de recidiva (Ohman, 1982). A consequência disto é que, para um dado paciente, não se pode predizer o prognóstico com certeza. O aumento do uso de marcadores citogenéticos deve aumentar a segurança na indicação dos tratamentos cirúrgico e clínico, inclusive na definição da extensão das cirurgias.

O câncer coloretal constitui, assim, uma doença muito freqüente no mundo e, a despeito de todos os avanços no diagnóstico precoce, no entendimento da gênese da neoplasia, no conhecimento dos fatores prognósticos, a taxa de sobrevivência seguida ao tratamento cirúrgico não mudou significativamente nos últimos 40 anos (Sugarbaker, 1982). Aproximadamente 38% de todos os pacientes com câncer de cólon que são operados têm a doença disseminada em linfonodos regionais; 21% têm metástases à distância e não mais que 20% a 30% destes pacientes sobrevivem 5 anos (Minton, 1982). Outra causa de óbito, constitui a recidiva do tumor, sendo que 2/3 dessas ocorrem nos dois primeiros anos após a cirurgia e 90% das recidivas ocorrem dentro dos primeiros 5 anos após a ressecção do tumor. Assim, as pesquisas devem avançar também no sentido de descobrir tratamentos efetivos para os pacientes com doença avançada.

A quimioterapia têm sido usada em caráter paliativo na atualidade e não têm potencial curativo na doença avançada. Seu emprego clássico envolve principalmente o 5-fluorouracil que foi sintetizado como antagonista das pirimidinas, portanto um antimetabólito introduzido na clínica por Heidelberger em 1957 . O 5-fluorouracil vem sendo utilizado na clínica há 3 décadas, principalmente no tratamento dos tumores gastrointestinais e, em especial, dos tumores coloretais. Recentes avanços no conhecimento da distribuição da droga no organismo humano têm permitido sua administração em altas doses ou em combinação com agentes não citotóxicos com a capacidade de modulação bioquímica nas reações químicas atingidas pelo 5-fluorouracil no metabolismo celular: DNA, RNA e a enzima timidilato sintetase.

Os maiores efeitos citotóxicos do 5-fluorouracil são produzidos através da incorporação de seu metabólito ativo no ácido ribonucléico da célula do tumor e através da inibição da síntese da timidina por inativação da enzima timidilato sintetase realizado pelo metabólito do 5-fluorouracil o fluoro-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). A incorporação do 5-fluorouracil no ácido desoxirribonucléico (DNA) da célula neoplásica é outra importante via de ação citotóxica.

O mecanismo de ação do 5-fluorouracil é devido basicamente a:

- inativação da enzima timidilato sintetase realizada por seu metabólito fluoro-desoxiuridina-5'-monofosfato(5-FdUMP)
- incorporação do metabólito ativo,5-FUTP, no ácido ribonucléico(RNA) da célula do tumor
- incorporação do 5-FU no ácido desoxirribonucléico(DNA)

O regime de 5-Fluorouracil diário por 5 dias têm sido universalmente empregado e serve de base para comparação com resultados de outros agentes isolados ou em combinação (Ansfield, 1962). As taxas de respostas variam de 8% a 85% (Calter, 1976; Moertel, 1969). A razão para este amplo espectro de resposta inclui vários fatores de seleção dos pacientes tal como o "performance status"; os fatores relacionados à doença, tais como o sítio de metástase e o

tratamento prévio, bem como os fatores relacionados ao tratamento, em particular a intensidade de dose que melhora o índice de resposta apesar de aumentar muito a intolerância ao tratamento. Infelizmente, o 5-fluorouracil não alterou a sobrevida dos pacientes com câncer de cólon e reto avançados e está associado a uma sobrevida mediana de 6 a 8 meses. Contudo, para pacientes que evidenciam resposta objetiva, esta sobrevida pode chegar a 12 ou 18 meses (Moertel, 1969).

Se o 5-fluorouracil for administrado em doses plenas, os pacientes podem apresentar mucosite intensa, diarreia e leucopenia, fatores que são limitantes das doses (Moertel, 1969; 1975). Portanto, após mais de três décadas de uso, não se sabe ainda qual o esquema ideal de administração 5-fluorouracil, se como agente simples ou combinado, com ou sem intensificação de dose e como se poderiam evitar os efeitos tóxicos destas "megadoses". A tentativa de melhorar o benefício terapêutico do 5-fluorouracil inclui modificações na dose e na maneira de administrá-las, associação com outras drogas citotóxicas, associação com imunomoduladores e moduladores bioquímicos, além da administração de quimioterapia precocemente, após o tratamento cirúrgico curativo em pacientes de alto risco para recidiva e/ou metástases.

Quatro grandes estudos randomizados fase III (Veterans Administration Adjuvant Câncer Chemotherapy Cooperative Group, 1963; Dwight RW e cols., 1973; Grage TB, 1981; Higgins GA, 1978) compararam a quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil ou 5-fluorodeoxiuridina com o tratamento cirúrgico em complementação com quimioterapia. Estes estudos demonstraram pequenas diferenças no intervalo livre de doença e na sobrevida geral em favor do grupo que era submetido à quimioterapia; contudo, os resultados não foram estatisticamente significativos. Uma meta-análise realizada por Buyse e cols. (Buyse M e cols, 1988) usando dados de quimioterapia com 5-fluorouracil adjuvante como monoquimioterapia, incluía estudos clínicos envolvendo mais de 3.000 pacientes randomizados para receber quimioterapia após cirurgia ou não. O resultado foi uma vantagem na sobrevida acumulada de apenas 3.4% em favor do grupo que foi submetido à quimioterapia. Por este inexpressivo resultado

como agente isolado, a combinação de quimioterapia tornou-se o foco das atenções para os futuros estudos adjuvante para o câncer colorretal.

Na década de 70 iniciaram os estudos fase III para avaliar a combinação de 5-fluorouracil e semustine com ou sem vincristina (Higgins GA, 1984; Gastrointestinal Tumor Study Groups, 1984; Mansour EG, 1981). Esta combinação foi escolhida com base no uso para tumores avançados nos quais a combinação de 5-fluorouracil, sesamustine, e vincristina (MOF) parecia ser superior ao 5-fluorouracil isolado. Dois destes estudos conduzidos pelo “Veterans Administration Surgical Oncology Group (VASOG) e o Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) não conseguiram demonstrar um significativo benefício na sobrevida geral comparando-se com a cirurgia isolada. Porém, estes estudos serviram como base para grandes estudos desenhados para elucidar o valor da quimioterapia pos-operatória.

O primeiro estudo realizado para câncer de cólon pelo “National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP C-01) foi para comparar quimioterapia, imunoterapia e observação (Wolmark N, 1988). Este estudo randomizou 1.166 pacientes em três grupos: imunoterapia inespecífica com BCG, MOF e cirurgia isolada e, em 1988, reportou que MOF produzia melhora na sobrevida livre de doença e sobrevida geral estatisticamente significativa comparado com os pacientes observados. Nenhum benefício na sobrevida livre de doença foi visto com o uso do BCG, porém o benefício na sobrevida global foi marginal.

Dados têm mostrado que a modulação bioquímica do 5-fluorouracil pelo ácido folínico melhora as respostas em doença avançada (Poon MA, 1989); novo estudo (NSABP C-23) foi realizado comparando a combinação MOF, como controle, e 5-fluorouracil associado ao ácido folínico. Como reportado por Wolmark, 1993, 73% de sobrevida livre de doença no grupo fluorouracil e ácido folínico contra 64% para o grupo MOF ($p=0.0004$); O resultado da sobrevida a 3 anos também foi superior para o grupo 5-fluorouracil e ácido folínico (84% vs 77%; $p=$

0.003). Este estudo demonstrou que 5-fluorouracil e ácido folínico é superior ou MOF quando administrado como tratamento adjuvante.

Em pacientes avançados, com doença metastática, o ácido folínico mostrou-se capaz de aumentar a resposta citotóxica do 5-fluorouracil e produzir segunda resposta nos pacientes já resistentes ao 5-fluorouracil. O mecanismo de ação parece ser uma oferta maior de folatos reduzidos, promovendo uma ligação mais forte entre fluorodesoxiuridilato e a timidilato sintetase resultando em depleção de timidina e, conseqüentemente morte da célula (Moran, 1989).

As observações no laboratório criaram condições para se iniciar trabalhos clínicos fase II e fase III e, mais de 300 pacientes têm sido tratados. Há uma grande variação de resultados mesmo com regimes de tratamento semelhantes. O que se notou é que 6 de 14 trabalhos fase I-II e 3 de 3 fase III encontraram respostas completas com a combinação de ácido folínico e 5-fluorouracil após falha de 5-fluorouracil isolado (Grem JL, 1987). Mais de 1.500 pacientes já foram tratados sob randomização e fase III. As taxas de resposta foram significativamente melhores.

Outra combinação sinérgica utilizada na clínica com base em experimentos em laboratório é 5-fluorouracil e methotrexate. O methotrexate aumenta o efeito tóxico do 5-fluorouracil quando administrado de maneira seqüencial 18 a 24 horas antes da infusão do 5-fluorouracil (Bruckner HW, 1983). Comparando ao 5-fluorouracil mais ácido folínico, que exerce sua atividade inibindo a síntese de DNA por depleção de timidina, o methotrexate mais 5-fluorouracil exerce seu efeito citotóxico através do RNA.

Estudos prospectivos comprovaram benefício tanto na resposta clínica quanto na sobrevida para a administração seqüencial do methotrexate 24 horas antes do 5-fluorouracil comparada com administração no mesmo dia (Marsh JC, 1989). Entre os estudos randomizados envolvendo esta combinação somente um mostrou aumento significativo nas taxas de respostas quando comparados com 5-fluorouracil isolado: 28% versus 12% (Macchiavelli M, 1990). Outros

estudos mostraram comparáveis taxas de respostas por volta de 25% (The Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group, 1989; Poon MA, 1989).

Recentemente as atenções voltaram-se para o levamisole, droga comumente usada como anti-helmíntico, que, a partir de estudos pré-clínicos, mostrou habilidade em aumentar a resposta imune em hospedeiros normais e restaurar funções imunes em hospedeiros com imunodeficiência (Jassen PA, 1976; Renoux G, 1980). Assim, levamisole oral foi testado isoladamente e em combinação com 5-fluorouracil para tratamento de câncer colorretal avançado e como tratamento adjuvante. No tratamento para câncer colorretal avançado, três estudos randomizados incluindo mais de 400 pacientes falharam para demonstrar algum benefício em favor do 5-fluorouracil mais levamisole comparados com 5-fluorouracil isolado (Buroker TR, 1985; Borden EC, 1982; Bedikian AY, 1978).

Em 1978, Verhaegen realizou o primeiro estudo não randomizado utilizando levamisole isolado em caráter adjuvante. Este estudo incluiu 60 pacientes com câncer colorretal Dukes A,B e C; destes pacientes um grupo recebeu levamisole pos-operatório e outro grupo não. A sobrevida a 5 anos foi de 69% para o grupo tratado e 37% para o grupo controle. Embora o desenho deste estudo não fosse ideal, ele estimulou estudos randomizados utilizando levamisole.

Um estudo randomizado fase III em pacientes com linfonodos positivos falhou para demonstrar vantagens na sobrevida para pacientes que receberam levamisole isolado comparado com outro grupo que realizou apenas cirurgia (Arnoud JP, 1989).

A despeito da falha como agente isolado na resposta ao tratamento do câncer colorretal, o levamisole foi combinado com 5-fluorouracil em um estudo adjuvante realizado pelo "North Central Câncer Treatment Group (NCCTG) (Laurie JA, 1989). Os pacientes foram randomizados para o tratamento com 5-fluorouracil mais levamisole, levamisole isolado, ou observação pos-operatória. Neste estudo, 401 pacientes tinham carcinoma de cólon estágio Dukes B2 ou C e 28 tinham câncer primário de reto. Num seguimento de 7.5 anos, a combinação de 5-

fluorouracil e levamisole produziu significante melhora na sobrevida livre de doença quando comparada à do grupo sem tratamento adjuvante. Embora a sobrevida não tenha melhorado, a análise de subgrupo revelou uma significante vantagem na sobrevida livre de doença para o grupo 5-fluorouracil e levamisole em paciente com estágio Dukes C. Nenhum benefício foi notado para os pacientes estágio Dukes B2.

Um estudo foi realizado na tentativa de confirmar estes resultados empregando algum tipo de randomização com drogas e doses idênticas, excluindo apenas os pacientes com câncer primariamente de reto (Moertel CG, 1990). Neste estudo foram envolvidos 1.296 pacientes (929 com estágio Dukes C), e os resultados foram publicados com um seguimento mediano de 3.5 anos. Para pacientes estágio Dukes C, o levamisole não produziu qualquer efeito benéfico na sobrevida e na redução das recidivas. Contudo, a combinação de 5-fluorouracil e levamisole produziu uma significante melhora na sobrevida geral e na sobrevida livre de doença comparada com o grupo controle (66% vs 47%, $p=0.00001$; e 74% vs 64%, $p= 0.0064$ respectivamente). Quando foram publicados estes resultados, a redução estimada na recidiva e na mortalidade foi de 41% e 33%, respectivamente, para os pacientes tratados com 5-fluorouracil mais levamisole.

Em sua publicação final, Moertel e cols (Moertel C, 1992) mostraram que, após um seguimento mediano de 5 anos (4-7.5 anos), havia 168 recidivas no grupo de cirurgia isolada, 162 no grupo de cirurgia mais levamisole e 112 com levamisole e fluorouracil. Com respeito à mortalidade por câncer encontraram 141 com cirurgia somente, 136 no grupo do levamisole e 100 no grupo de levamisole e 5-fluorouracil. A combinação de levamisole e 5-fluorouracil reduziu a taxa de recidiva para 39% ($p<0.0001$), e a mortalidade pelo câncer para 32% ($p<0.004$).

Após este estudo que demonstrou claramente a vantagem de tratar câncer de cólon, estágio Dukes C em caráter adjuvante com 5-fluorouracil e levamisole, esta combinação passou a ser usada como rotina.

Mais recentemente e baseados em dados obtidos “in vitro” que mostravam sinergismo entre 5-fluorouracil e interferon em doses e esquemas dependentes, Waldler e cols (Wadler S, 1989) descreveram o uso de interferon alfa-2a em câncer de cólon e reto avançados.

Embora os interferons fossem originariamente reconhecidos por sua potente atividade antiviral, agora está bem estabelecido que eles afetam profundamente outras células do organismo humano e as funções destas células. Os interferons formam, pelo menos, três tipos de proteínas funcionalmente relacionadas que são produzidas e secretadas por células do nosso organismo quando estimuladas por substâncias estranhas a ele. Os interferons têm, entre suas atividades biológicas, uma ação antiproliferativa e antitumor. Resultados investigacionais têm sugerido que os interferons reduzem o crescimento celular sem efeito tóxico imediato. Contudo, esta inibição não se estende a todos os tipos de células e a todas as condições dos experimentos (Baron S, 1966). Análise do ciclo celular mostra que o tempo total para gerar uma célula é prolongado pelo interferon e que esta extensão ocorre em todas as fases do ciclo. Contudo, rápidas mudanças na membrana celular refletidas pela inibição da timidina endógena têm sido detectadas antes de o efeito na taxa de crescimento ser demonstrado. Processos iniciais específicos, portanto, podem estar envolvidos na inibição da multiplicação celular pelo interferon e estes processos permanecem por ser determinados (Brouty-Boyle D, 1980). O efeito antiproliferativo não é o único mecanismo direto do interferon nas células que podem contribuir para a citotoxicidade do tumor “in vivo”. Prolongada permanência de células de tumor em meio de cultura contendo interferon têm mostrado uma parcial reversão do fenótipo maligno (Hicks, NJ). Além do mais, o tratamento com interferon aumenta a expressão dos antígenos de histocompatibilidade e pode aumentar a expressão dos “antígenos do tumorais” (Liao S-K, 1981; Imai K, 1981). Outro investigador injetou células L interferon-resistentes e interferon-sensíveis em rato e tratou-os com interferon. Inexplicavelmente, foi ativo contra as células resistentes “in vitro” para o efeito antiproliferativo.

Conclui-se que mecanismos de defesa do hospedeiro estão envolvidos na ação anti-tumor do interferon (Belardelli F, 1982). Os possíveis mecanismos antitumor do interferon incluem:

- (1) Inibição da divisão celular
- (2) Imunomodulação
- (3) Interação hormonal
- (4) Ativação dos macrófagos
- (5) Aumento das células NK
- (6) Aumento da atividade de anticorpos dependentes da célula citotóxica (ADCC)
- (7) Citólise direta pelo interferon gama.

Os mecanismos de 4 a 7 podem ser particularmente potentes contra células tumorais, devido a sua direta ação citolítica. Estes achados mostram que a erradicação completa das células do tumor pelo interferon “in vitro” pode ocorrer somente na presença de tipo de interferon e concentrações particulares e podem requerer, freqüentemente, a presença de células efectoras apropriadas do tipo mononucleares (Tying SK, 1984).

Revisões da experiência com interferon no tratamento do câncer sugerem que a dose do 5-fluorouracil deve ser intensiva (Clark PI, 1987; Wadler, 1990) e a combinação pode proporcionar uma forma de biomodulação. O mecanismo desta biomodulação permanece desconhecido; suspeita-se que há uma relação da enzima timidilato sintetase com o interferon prevenindo a resistência ao 5-fluorouracil (Wadler S, 1989; Clark PI, 1987; Wadler S, 1990), pois isoladamente, o interferon é inativo.

Um estudo piloto usando 5-fluorouracil e interferon (Wadler S, 1989) em dose escalonada mostrou uma resposta de 5 em 9 pacientes tratados com dose mais baixas de interferon e curiosamente 0 de 9 tratados com doses altas de interferon (Wadler, 1990). De 17 pacientes não

tratados previamente, 13 (76%) apresentaram respostas parciais (Wadler S, 1989) e nenhum paciente, previamente tratado com combinações de 5-fluorouracil com ácido folínico ou methotrexate, teve resposta clínica. A sobrevida mediana dos pacientes não tratados previamente foi de 16 meses (Wadler S, 1989). Vários outros estudos mostram uma taxa de resposta em câncer de cólon e reto avançados que varia de 23% a 38% (Pazdur R, 1990; Yalavarrthi P, 1990; Huberman M, 1990; Kemeny N, 1990).

Em conclusão, o uso de interferon recombinante alfa-2a em combinação com 5-fluorouracil pode aumentar a taxa de resposta terapêutica no câncer colorretal, inclusive proporcionando remissões completas. Não há confirmação, entretanto, de melhora na sobrevida dos pacientes com câncer avançado.

Uma estratégia para tratamento do câncer colorretal avançado é explorar o sinergismo entre as diversas modalidades terapêuticas, haja visto que, isoladamente, as drogas são inativas ou pouco ativas. Entre os modificadores da resposta biológica, os interferons e a interleucina-2 são altamente sinérgicos e, eventualmente, poderiam ser usados no tratamento desta neoplasia.

A interleucina-2 (IL-2) foi primeiramente reconhecida como resultado da observação de que o sobrenadante das culturas de linfócitos T ativados tinha a capacidade de estimular a proliferação e a ativação destas mesmas células. Sua primeira denominação foi de Fator de Crescimento de Células T (TCGF) e ficou estabelecido tratar-se de uma substância produzida pela célula que poderia controlar o seu próprio crescimento. Esta observação inicial sugeriu que a interleucina-2 poderia ser um exemplo de um fator autócrino de crescimento. Esta proposição têm sido amplamente confirmada. A função da interleucina-2 têm sido intensamente estudada e, além de atuar no crescimento, pode participar na diferenciação celular e causar efeitos críticos em outras células, incluindo células B, onde a interleucina-2 atua como fator de diferenciação e, nas células "Natural Killer" (NK), onde têm uma potente atuação promovendo a

proliferação. Ela também têm função estimulante do crescimento de células "Lymphokine-activated killer" (LAK) (Rosenberg SA, 1989).

A interleucina-2 é uma glicoproteína de peso molecular igual a 15.000 daltons. A seqüência dos nucleotídeos do cDNA da interleucina-2 humana é conhecida e sabe-se que possui 133 aminoácidos. Sua função é mediada por ligações a receptores expressos nas células a serem atingidas. O receptor para interleucina-2 (IL-2R) apresenta-se como uma multisubunidade molecular do qual dois componentes são claramente definidos. Uma das subunidades têm peso molecular de 55.000 e é designada como p55, cadeia alfa do IL-2R ou antígeno Tac. Normalmente, esta cadeia não é expressada nos linfócitos. Sua expressão é rapidamente induzida após ativação do linfócito. Um dos mais potentes estimulantes da expressão da p55 é a própria interleucina-2. O segundo componente, p70-75 ou cadeia beta do IL-2R, é encontrado na superfície das células T, B e NK. Sua afinidade pela IL-2 é ainda maior que a cadeia alfa.

A Interleucina-2 é uma linfocina derivada das células T e que têm múltiplas funções, sendo a principal delas, um potente regulador do crescimento dos linfócitos T. Ela funciona de maneira autócrine, regulando o crescimento das células que irão produzi-la e estimular o crescimento de outras células T. Embora o CD4+ e CD8+ possam ser produzidos, parece que o crescimento de muitos linfócitos CD8+ depende de interleucina-2 exógena, presumivelmente vindas dos CD4+ ativos, como células "helper", para o crescimento e diferenciação de CD8+, particularmente no seu papel de precursora de células citotóxicas.

A interleucina-2 têm um importante papel na regulação da função das células B, tanto em ratos como em humanos. Portanto, exerce importante papel no controle da secreção das imunoglobulinas. A função da interleucina-2 na regulação do crescimento das células NK é bem conhecida. Esta propriedade parece estar relacionada ao efeito da interleucina-2 causar "in vitro" expansão de células "lymphokine activated killer" (LAK) e a possibilidade da ação "in vivo" da

interleucina-2 juntamente com as células LAK em diminuir o tamanho de alguns tumores humanos e tumores transplantados em rato.

Quanto ao emprego clínico, a interleucina-2 é atualmente utilizada como molécula recombinante e têm sido usada em vários ensaios clínicos. Como agente simples é ativa no câncer de células renais, nos melanomas e nos linfomas não Hodgkin. Vários outros estudos estão sendo feitos em outros tumores. A toxicidade da interleucina-2, administrada sistemicamente, é substancial e inclui febre, náuseas, vômitos, diarreia, hipotensão, eritema cutâneo, retenção de líquidos, eosinofilia, anemia, confusão mental e alterações das funções hepática e renal. As reações de toxicidade da interleucina-2 se resolvem em algumas horas ou dias após a suspensão da droga. O fato de o linfócito ativado pela interleucina-2 aderir às células endoteliais de maneira dose dependente e de esta substância ser citotóxicas "in vitro" para células do endotélio, pode explicar algumas das toxicidades sistemicas observadas com a interleucina-2.

Os mecanismos pelos quais a interleucina-2 intermedia os efeitos antitumor não são conhecidos, mas observa-se um aumento da expressão do antígeno do HLA-DR no tumor, nas células endoteliais e nas células T perivasculares em pacientes que recebem interleucina-2. Dados preliminares sugerem que este fenômeno ocorre mais intensamente nos pacientes que respondem ao tratamento. Os exames histopatológicos de tumor antes e depois do tratamento mostram infiltração com células T grandes, ativadas, o que é consistente com resposta imune mediada por células.

Baseada no dado de a interleucina-2 estimular todos os subtipos de células T, foi elaborada uma estratégia para diminuir o número de células T-supressoras injetando concomitantemente baixas doses de ciclofosfamida. Seis de 24 pacientes com melanoma responderam ao tratamento e os pacientes que responderam tinham células LAK "in vivo". Outras estratégias para aumentar sua atividade incluem combinações com as demais linfocinas como interferons, fator de necrose tumoral ou anticorpos monoclonais.

A interleucina-2 têm sido usada em estudos fase I para tratar câncer coloretal (Rosenberg, SA, 1987; Mittelman A, 1989; Creekmore SP, 1989; Paciucci PA, 1989) .Os dados iniciais revelam 12% de respostas objetivas (Rosenberg SA, 1987)..

Baseados nestes vários mecanismos sinérgicos, envolvendo 5-fluorouracil com interferon e interferon com interleucina-2, imaginamos o estudo de dupla modulação “in vitro” envolvendo 5-fluorouracil, interferon alfa-2a, interleucina-2 e radioterapia.

2. Objetivos:

Estudar novas possibilidades de tratamento, "in vitro" para neoplasias de cólon e reto:

1. Avaliar "in vitro" os agentes citotóxicos, modificadores da resposta e radioterapia em um painel de linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon.
2. Avaliar "in vitro" a associação de agentes citotóxicos com modificadores da resposta biológica em um painel de linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon, dando ênfase à combinação de 5-fluorouracil, interferon alfa 2a e interleucina-2.
3. Estudar a potencialização da combinação de radioterapia e 5-fluorouracil em linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon.

3. Material e Métodos

Estes experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Experimental e Farmacologia da Universidade do Missouri , na cidade de Kansas, nos Estados Unidos da América, sob a orientação do Professor Albert Leyva, PhD.

3.1. Linhagens Celulares utilizadas nos experimentos : origens e características.

Todas as linhagens foram obtidas da ATCC, mantidas em nitrogênio líquido com meio de cultura acrescido de 5% de dimetil sulfoxido (DMSO), sendo aquecidas rapidamente a 37 °C, em banho maria, para serem recolocadas em cultura. As células eram lavadas uma vez com meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10 % de soro fetal bovino, gentamicina 2.5 mg/ml e anfotericina B 250 ug/ml. A manutenção das culturas era em incubadoras a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO₂. Sempre se aguardava a estabilização das células por 2 ou 3 passagens antes de se iniciarem os experimentos. Os processos de colheita da cultura variavam em detalhes que serão descritos com as características de cada linhagem, mas, após colhidas, acrescentavam-se 2 ml de meio de cultura e processava-se a centrifugação a 2000 rpm para precipitação das células que eram então resuspensas em novo meio de cultura completo para contagem, recolocação em cultura ou preparo de experimentos.

3.1a. Linhagem "Colo 205"

Esta linhagem foi isolada em 1975, a partir do líquido ascítico de um paciente de 70 anos, do sexo masculino, portador de carcinoma de cólon. O paciente foi tratado com 5-Fluorouracil durante 4 a 6 semanas antes da remoção do líquido ascítico. A linhagem foi

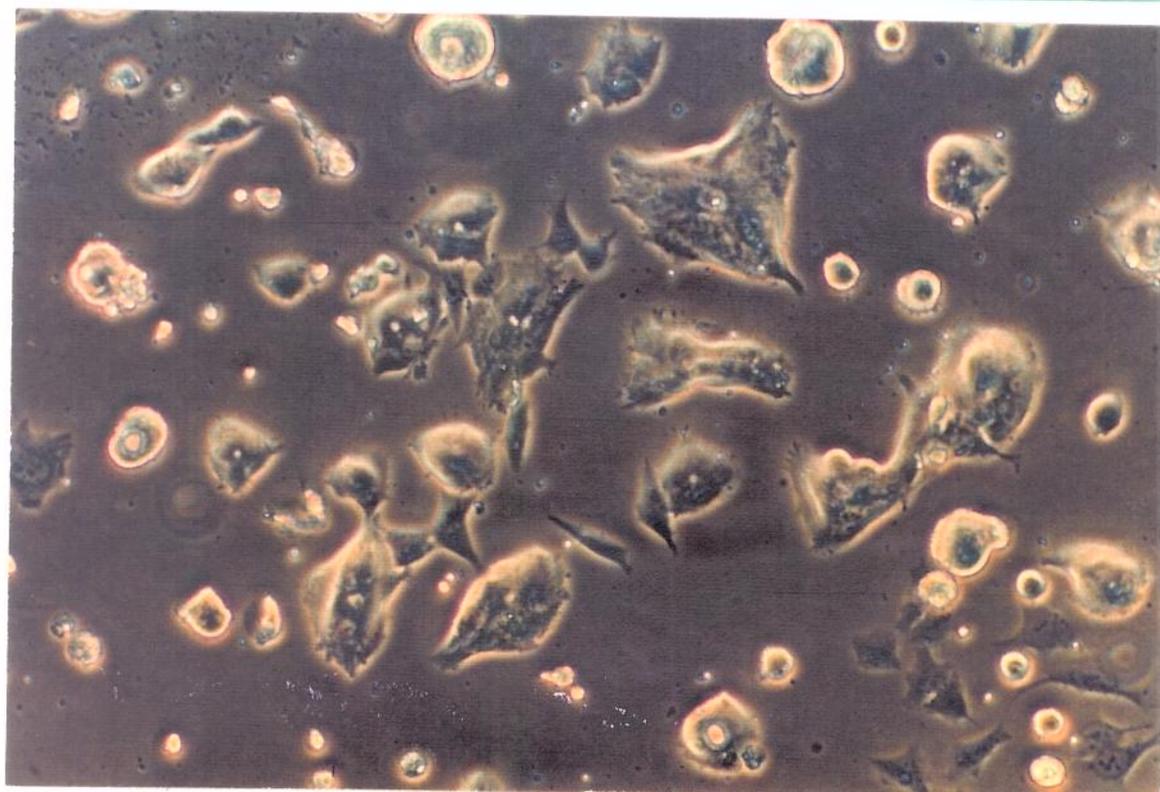
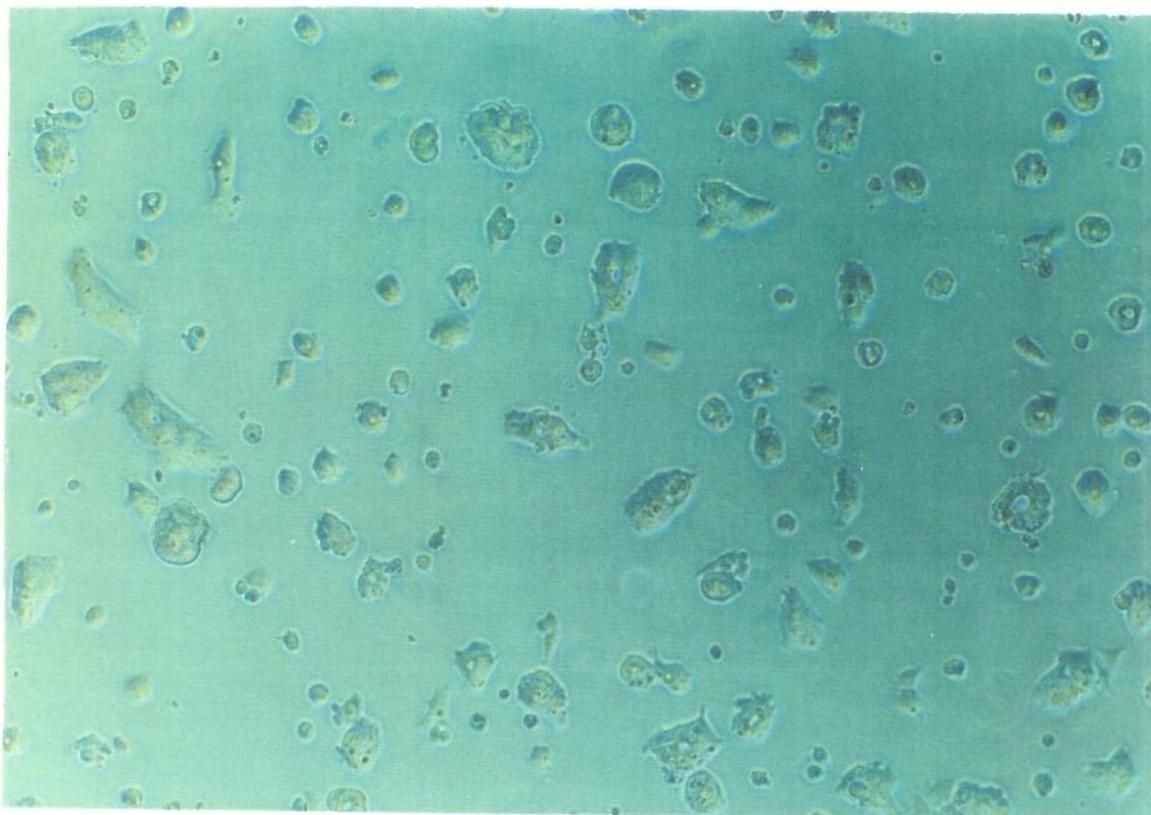
estabelecida após menos de 2 meses de manutenção "in vitro". Colo 205 produz antígeno carcinoembrionário, têm morfologia semelhante às linhas epiteliais e é tumorigênica transplantável em animais hospedeiros. As duas características prévias somadas a pequenas diferenças no cariótipo indicam que esta é uma linhagem distinta da linhagem COLO 201 (ATCC CCL 224), isolada de um mesmo paciente. As células eram colhidas da cultura com incubação por 3 minutos em solução de tripsina a 0.2% e EDTA a 0.25% em PBS, à temperatura ambiente, após a retirada do meio de cultura e de rápida lavagem com PBS estéril a 37 °C.

3.1b. Linhagem "HT-29"

A linhagem HT-29 foi isolada de um tumor primário, num paciente de 44 anos, portador de adenocarcinoma de cólon, moderadamente diferenciado (grau II) em 1964. São células produtoras de antígeno carcinoembrionário (CEA). Sua colheita era realizada com solução de tripsina/EDTA descrita em processo igual ao descrito para a linhagem anterior.

3.1c. Linhagem "SW403" (figuras 2 e 3)

A SW403 é uma das 11 linhagens de adenocarcinoma colorretal isolada e descrita por Leibovitz. É um adenocarcinoma grau III histológico, de uma paciente do sexo feminino, de 51 anos de idade. As células produzem antígeno carcinoembrionário e mostram proeminente aparelho de golgi na microscopia eletrônica. Foram colhidas da cultura com solução de tripsina e EDTA na mesma concentração, mas deixadas a 37 °C por 5 minutos, sendo então adicionados 2 ml de meio de cultura para centrifugação e precipitação, com resuspensão, conforme já descrito.



Figuras 2 e 3 : Microfotografias da cultura da linhagem SW403 em aumentos de 100 e 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1d. Linhagem "WiDr" (figuras 4 e 5)

A linhagem WiDr foi iniciada em 1971, através da expansão de tecido de adenocarcinoma primário de cólon da área retosigmóide de um paciente de 78, anos do sexo feminino. É produtora de antígeno carcinoembrionário, possui marcadores cromossômicos distintos e é altamente tumorigênico em animais. WiDr têm sido propagada por mais de 200 passagens "in vitro", representa um modelo para investigações em biologia de tumor. Ela é reconhecida como derivada da linhagem HT29 por estudos citogenéticos e dados isoenzimológicos. A colheita da cultura é realizada com solução de tripsina /EDTA por 3 minutos, à temperatura ambiente.

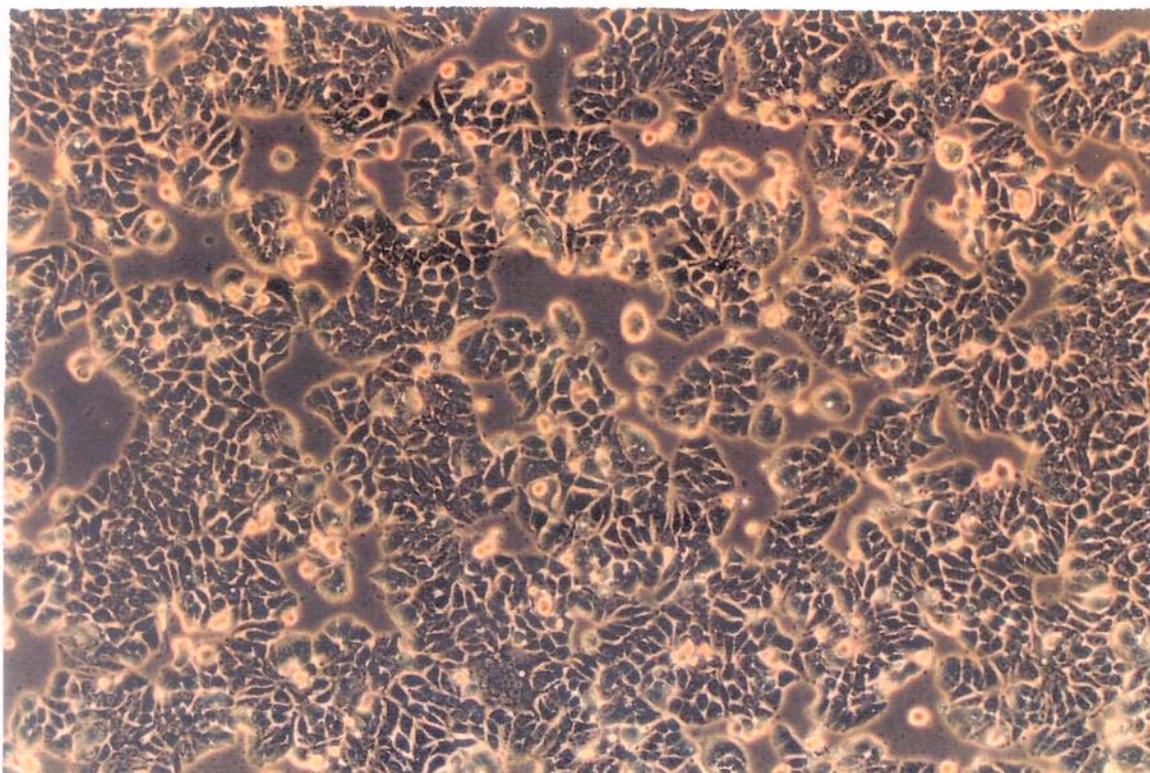


Figura 4 - Microfotografia da linhagem WiDr 100x em crescimento exponencial

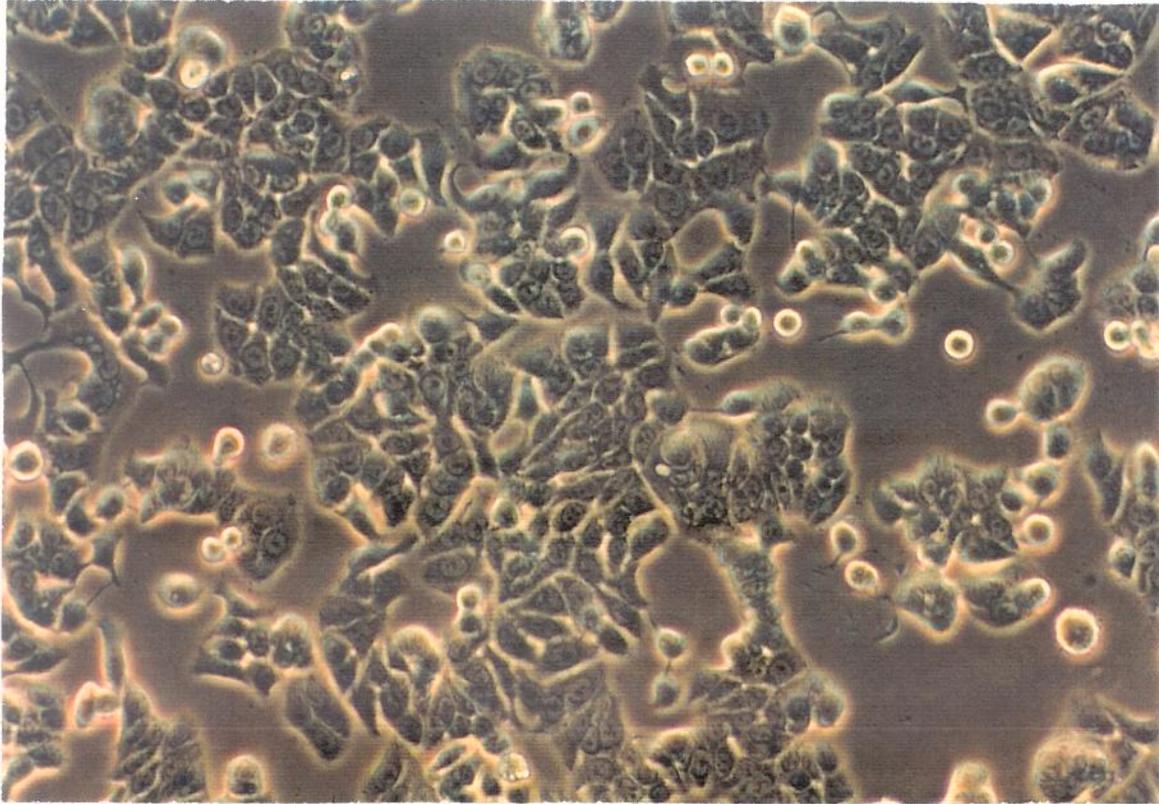


Figura 5 - Microfotografia da cultura da linhagem WiDR em aumento de 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1f. Linhagem "COLO 201" (figuras 6 e 7)

Foi isolada de líquido ascítico do mesmo paciente com adenocarcinoma de cólon que deu origem à linhagem COLO 205. Esta linhagem difere da COLO 205, pois exibe uma morfologia bipolar semelhante a fibroblastos, produz menos antígeno carcinoembrionário e tem menor frequência do complemento do cromossomo 20 e ausência do cromossomo 9 de forma

estatisticamente significativa. Sete marcadores cromossômicos são comuns a ambas as linhagens. A colheita destas células em cultura era feita através de resfriamento a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos sem o uso de tripsina ou EDTA, seguindo-se centrifugação e resuspensão em novo meio.

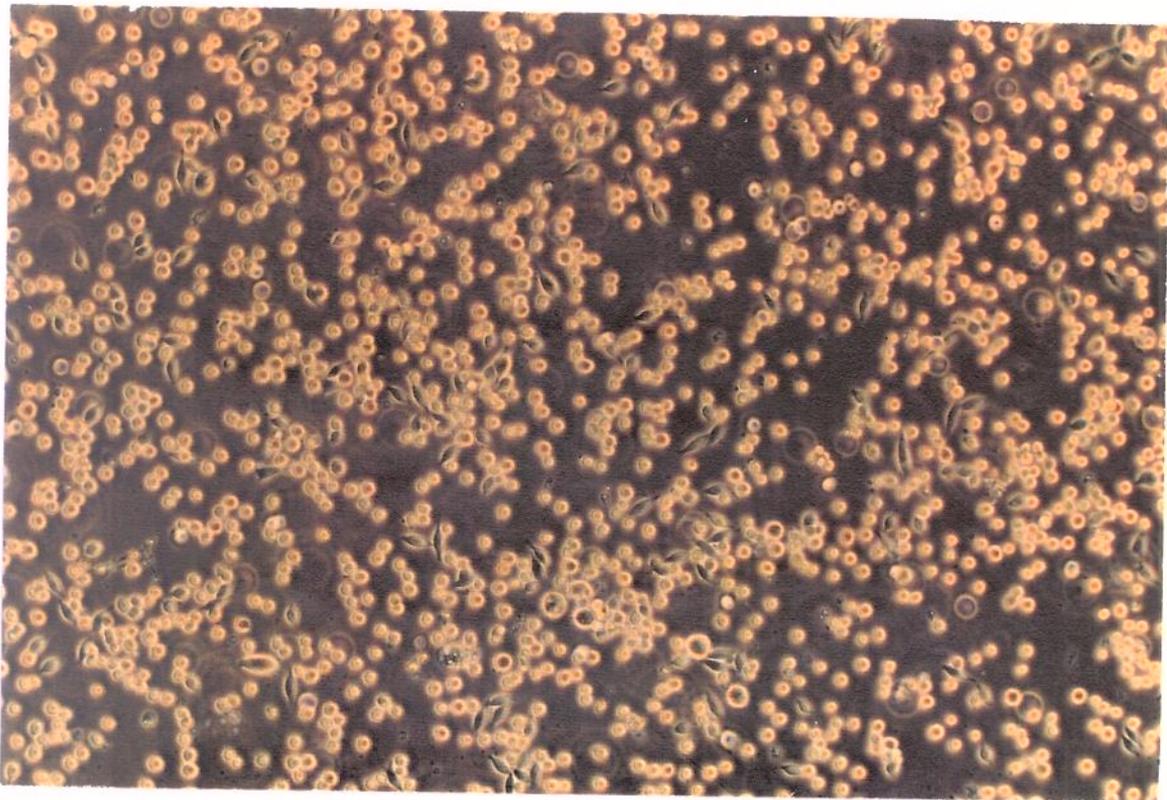


Figura 6 - Microfotografia linhagem Colo201 com aumento de 100x em crescimento exponencial

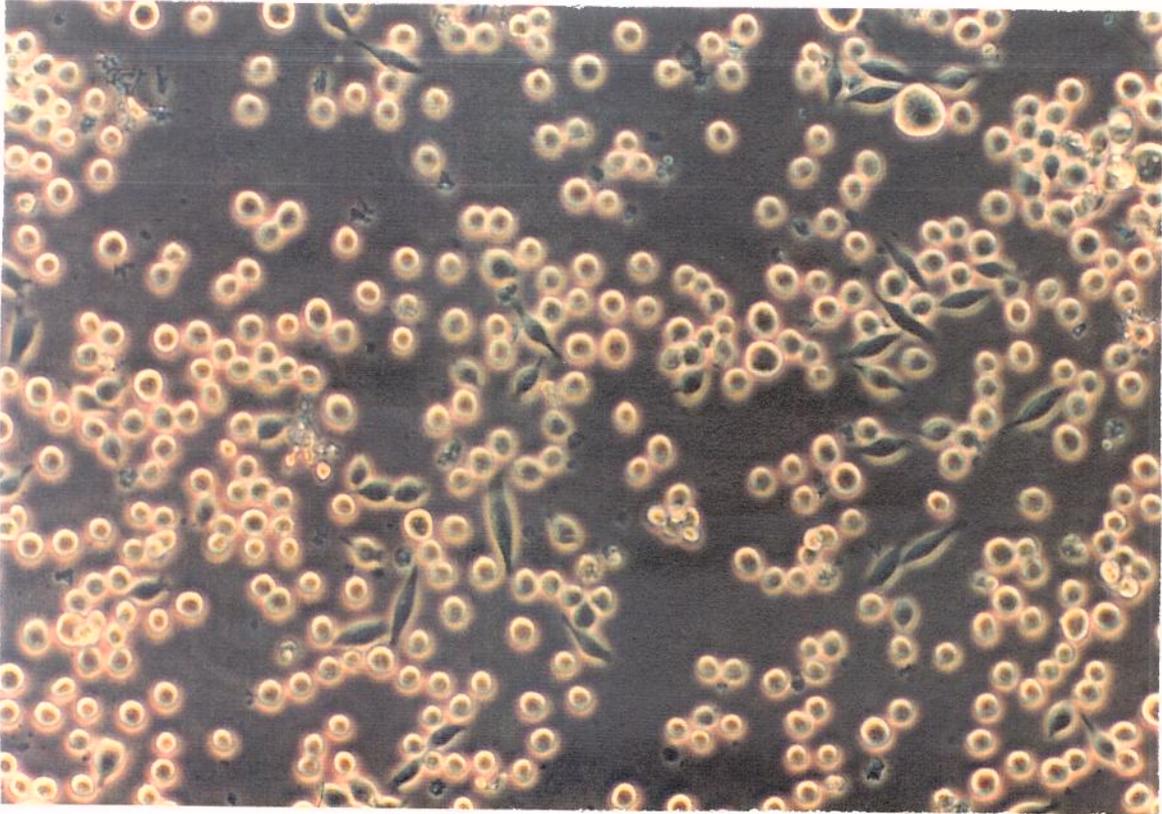
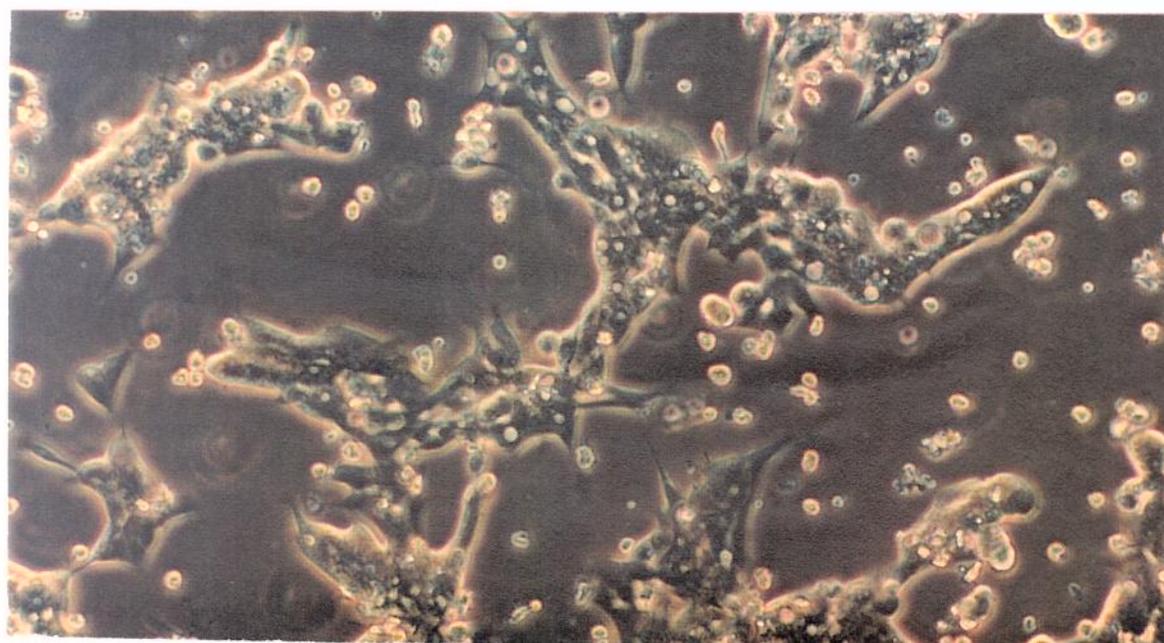
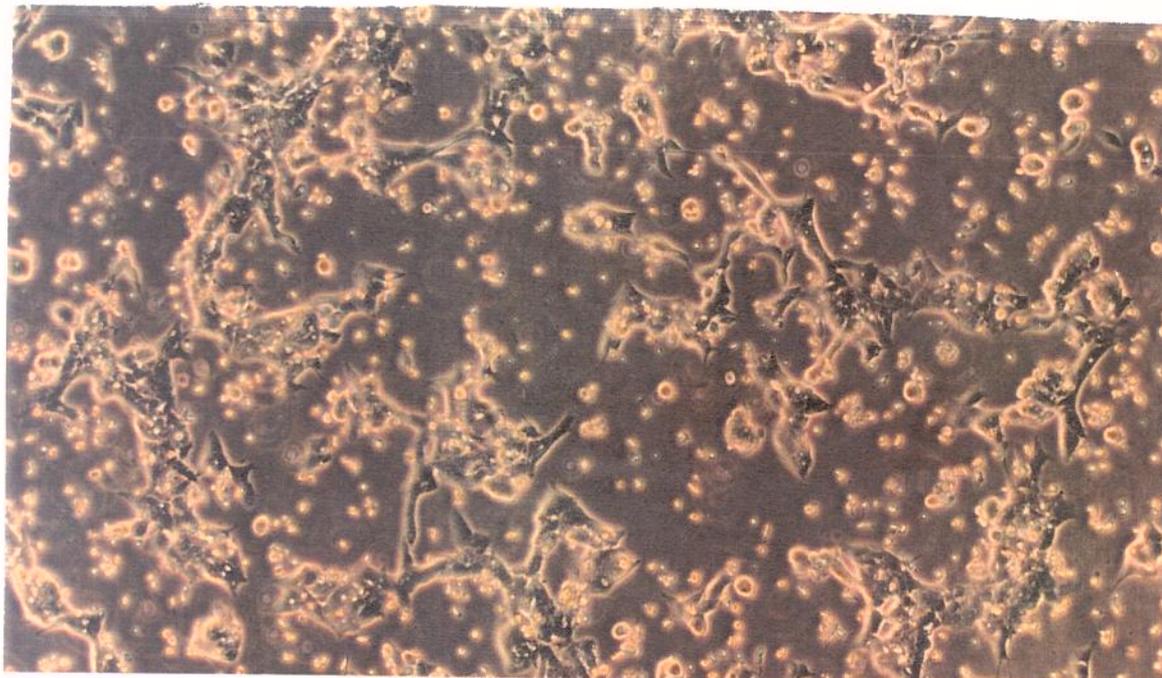


Figura 7 - Microfotografia da cultura da linhagem COLO201, em aumentos 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1g. Linhagem "LoVo "(figuras 8 e 9)

LoVo foi iniciada em 1971, a partir de um fragmento de uma metástase nodular na região supraclavicular de um homem com 56 anos de idade, com diagnóstico histologicamente confirmado de adenocarcinoma de cólon. Morfologicamente, as culturas possuem uma estrutura acinar, e células em anel de sinete são observadas. Estudos em microscopia eletrônica revelaram a presença de desmossomos. LoVo é bem caracterizada, sendo produtora de antígeno

carcinoembrionário, com 5 a 6 duplicações celulares em 7 dias, e com alto índice tumorigênico em animais atímicos. Era colhida da cultura com solução de tripsina e EDTA por 5 minutos à temperatura ambiente, após o que, procedia-se à lavagem, centrifugação e resuspensão em novo meio.



Figuras 8 e 9 : Microfotografias da cultura da linhagem LOVO em aumentos de 100 e 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1i. Linhagem "SW-1116" (figuras 10 e 11)

A linhagem SW1116 foi derivada de um adenocarcinoma grau II de cólon que se estendia até a muscular. Marcada melanose estava presente. O paciente doador era do sexo masculino e tinha 73 anos de idade. As colônias celulares têm mostrado bordas em escova e grande quantidade de antígeno carcinoembrionário (CEA). O índice mitótico é de 10 divisões em 14 dias em condições ideais de cultura, com meio renovado duas vezes neste período. É tumorigênica em animais. São colhidas da cultura com incubação por 5 minutos à temperatura de 37 °C com de tripsina /EDTA.

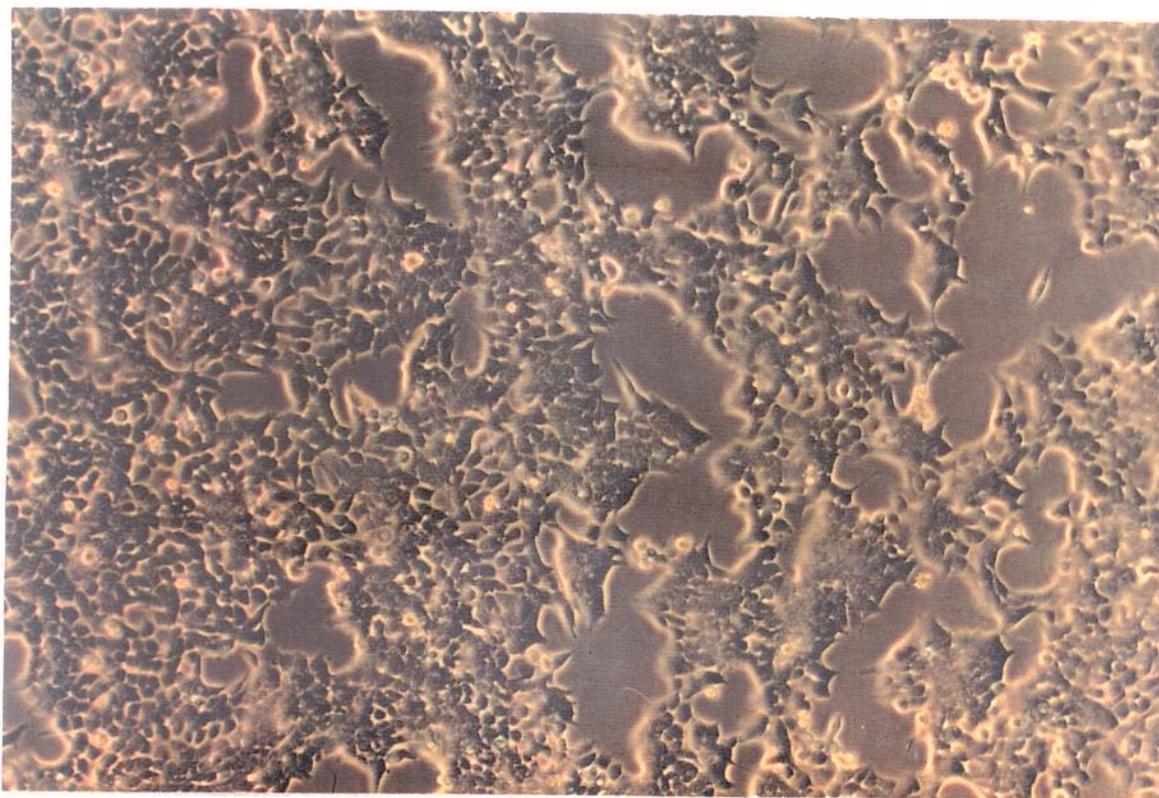


Figura 10: Microfotografia da linhagem SW1116 100x em crescimento exponencial

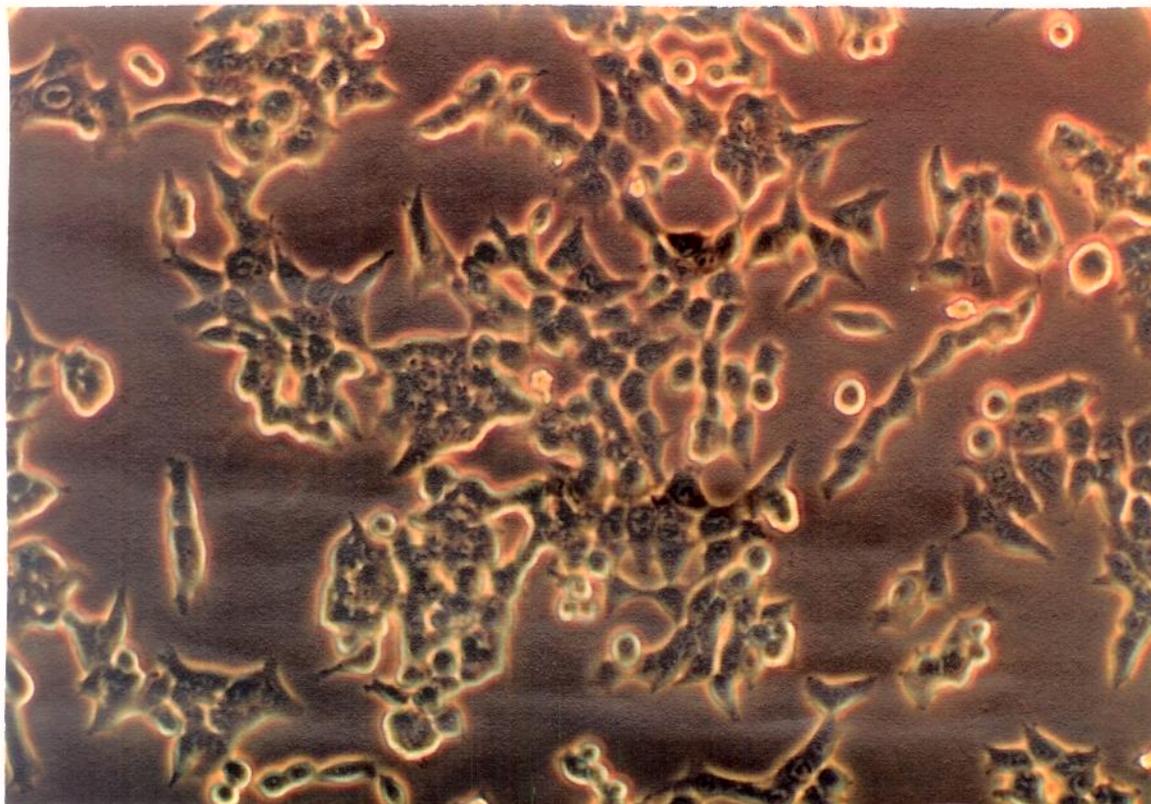


Figura 11 Microfotografia da cultura da linhagem SW1116 em aumento 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1j. Linhagem "HCT-8" (figuras 12 e 13)

Esta linhagem celular foi isolada por dissociação de um adenocarcinoma ileocecal de um paciente do sexo masculino, de 67 anos. HCT-8 forma grumos de núcleos grandes e citoplasma escasso. Numerosas e uniformes microvilosidades foram observadas na superfície livre das células que produz CEA. Apresenta alto índice mitótico com 20 divisões em 5 dias e é tumorigênica em animais atímicos. Colhida com solução de tripsina e EDTA por 3 minutos à temperatura ambiente.

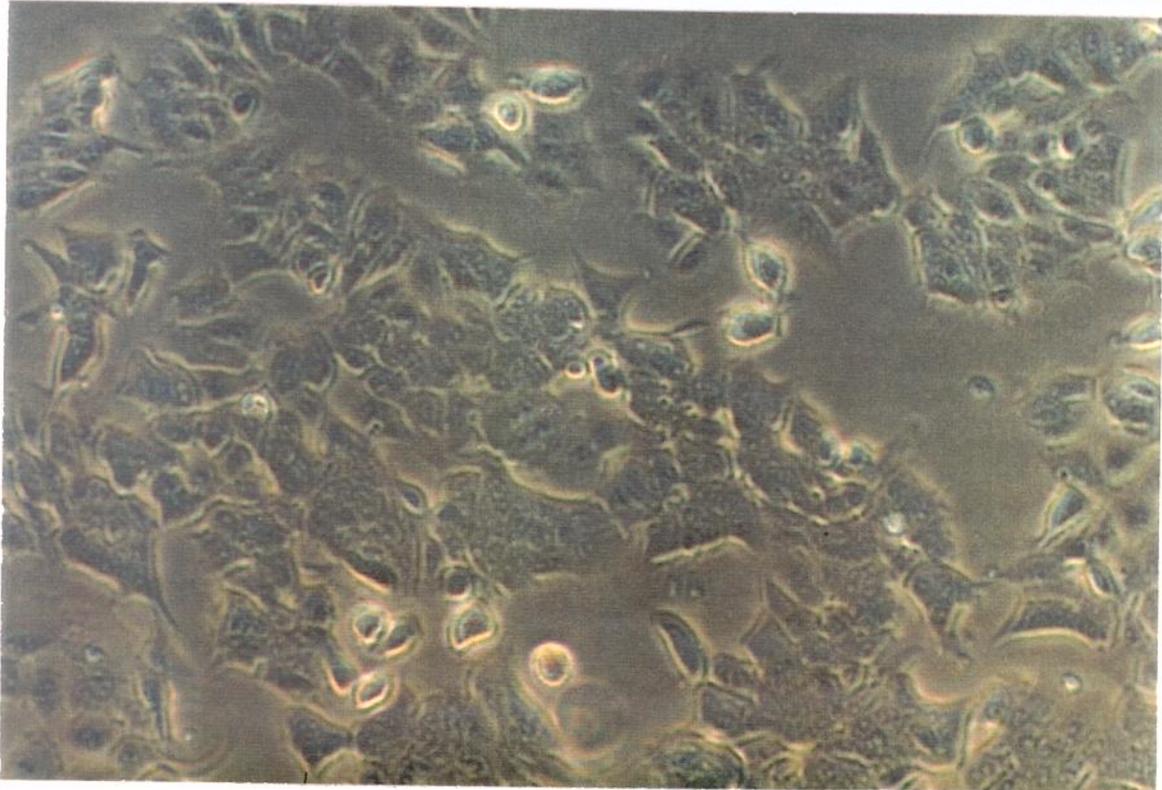
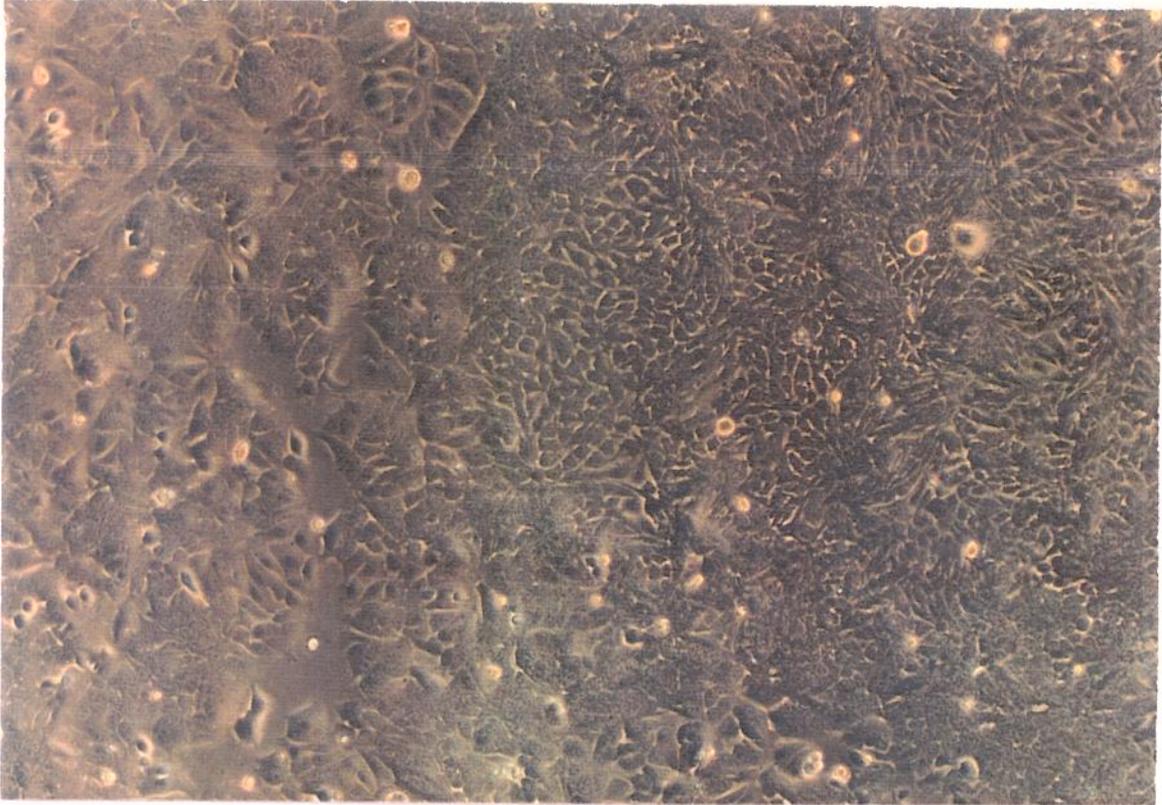


Figura 13 e 14 Microfotografias da cultura da linhagem HCT8 em aumentos de 100 e 200 vezes na fase de crescimento exponencial

3.1k. Linhagem "SW-48" (figuras 14 e 15)

SW-48 foi isolada com dez outras linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal durante o período de 1971-1975 por Leibovitz e cols. Era um grande tumor ulcerado que envolvia toda a circunferência do intestino grosso, grau IV histológico, em uma paciente do sexo feminino, branca de 82 anos de idade. Este tumor produzia pouco antígeno carcino-embriônico e suas células têm sido tumorigênicas em camundongo atímico. Seu índice mitótico é de 3 divisões em 7 dias. São colhidas com solução de tripsina/EDTA por 5 minutos à 37 °C.

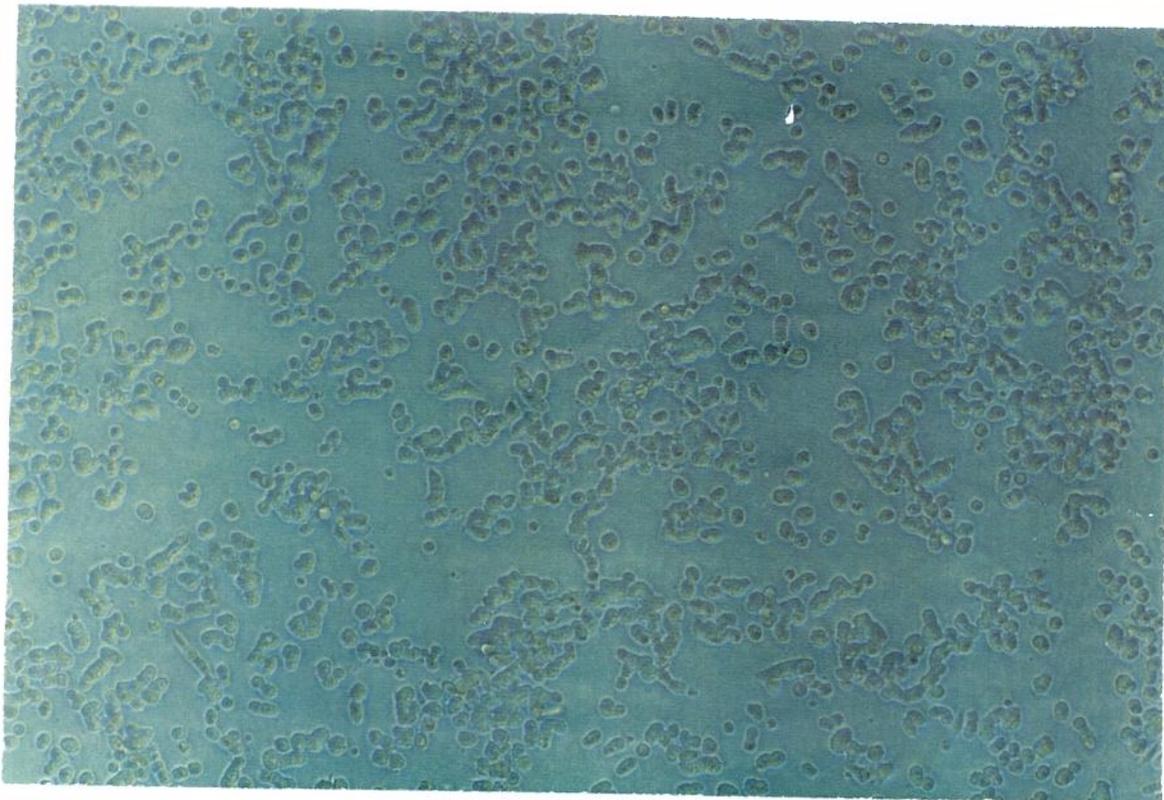


Figura 14: Microfotografia da linhagem celular SW48 100x em crescimento exponencial

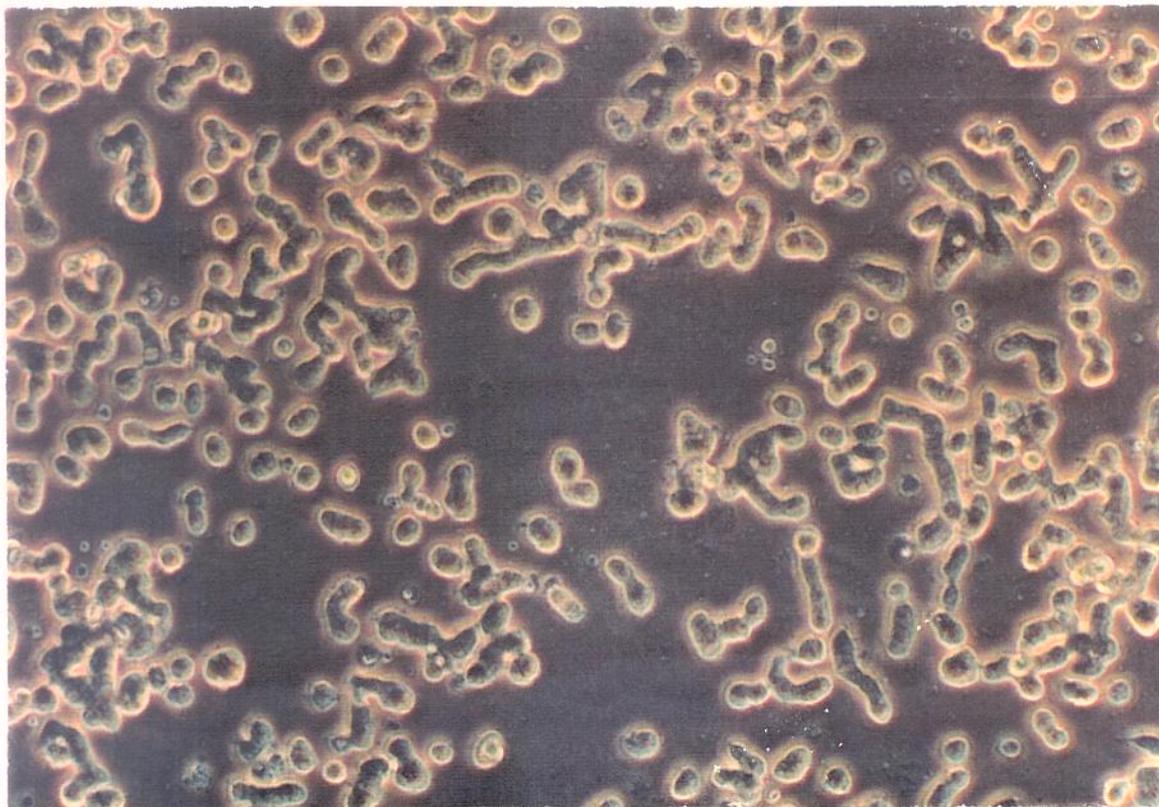


Figura 15: Microfotografia da cultura da linhagem SW48 em aumentos de 200 vezes na fase de crescimento exponencial.

3.1h. Linhagem "LS 174T"

LS 174T é uma linhagem de adenocarcinoma de cólon, variante tripsinizada da LS 180 (CL 187). Ela é mais facilmente cultivada que a linhagem original e, semelhantemente à LS 180, produz grande quantidade de antígeno carcinoembrionário (CEA). Ela é tumorigênica em camundongos atímicos. O cariótipo é similar ao da LS 180 com a perda do cromossomo X na maioria das células. Estudo em microscopia eletrônica revelou abundantes microvilos e vacúolos intracitoplasmáticos mucinosos. Apresenta índice mitótico elevado multiplicando aproximadamente 13 vezes com 7 dias a 37 °C. Colhida da cultura após exposição à solução de tripsina e EDTA por

5 minutos a 37 °C. Forma grumos celulares que devem ser desfeitos com intensa pipetagem da suspensão celular.

3.2. Cultura de Tecido

As linhagens eram mantidas, utilizando-se como meio de cultura o Meio Essencial Modificado por Dulbecco (DME), suplementado com 2 mM de l-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina, e soro bovino fetal 10% (laboratório Flow, Escócia). O meio DME contém uma concentração 4 vezes maior de amino ácidos e vitaminas do que o meio Basal de Eagle. Utilizava-se também o meio de cultura RPMI com 2.05 mM de L-glutamina e 25 mM HEPES sendo suplementado com 10% de soro bovino fetal, e 50 ug/ml de gentamicina com 2.5 ug/ml de anfotericina nos experimentos com incubação maior que 3 dias (JRH Biosciences, EUA). RPMI foi desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute em 1966 por Moore. Sendo uma modificação do meio de McCoy's, ele foi formulado para cultura em suspensão de células linfoblastóides, porém têm dado suporte a uma grande variedade de células.

As células permaneciam a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e as replicações eram, sistematicamente, realizadas duas vezes por semanas. O material plástico para a cultura era fornecido pelo laboratório Greiner (Alemanha) e Falcon (EUA).

3.3 Drogas Utilizadas

5-Fluorouracil: quimioterápico obtido na forma comercial do laboratório Roche, em ampolas contendo 250 mg da droga em 10 ml. O frasco original foi diluído com água destilada

estéril para a concentração de 10 mM e alicotado em frascos de 10 ml, que foram estocados à 4 °C e protegidos da luz.

Interferon alfa-2a: obtido na forma comercial do laboratório Roche em frasco de emprego clínico de 1 ml, na concentração de 9 milhões de unidades por ml, foi gradualmente sendo diluído com água destilada estéril para 1 milhão de unidades por ml e mantido em refrigerador na temperatura de 4 °C.

Interleucina-2: substância obtida na forma comercial de Proleukin® do laboratório EuroCetus (Holanda) na forma de emprego clínico em frasco com 18 milhões de Unidades Internacionais. Foi diluída, à medida do necessário para cada experimento, com água destilada estéril para a concentração de 1 milhão de unidades por ml e conservada a temperatura de 4 °C.

3.4 Teste de Sensibilidade em Microcultura com Tetrazolium (MTT):

Foram estudadas as linhagens de células de tumores de câncer de cólon : WiDr, COLO201, SW48, HCT8, LoVo, SW403 e HCT116. Estes experimentos foram divididos em duas etapas : Primeiro foi realizada a incubação com a droga isolada para se descobrir a concentração ideal para ser usada nas combinações. Em algumas linhagens, a droga era adicionada diariamente para estudarmos a importância da dose diária versus dose única. Em outro experimento adicionava-se timidina (Sigma, EUA) na dose de 5 uM por cavidade para estudar o mecanismo de ação predominante em cada linhagem. A segunda fase consistiu na incubação do 5- fluorouracil com as citocinas para avaliar o aumento ou não da citotoxicidade. As células eram coletadas do frasco de cultura com solução de tripsina a 0.2% e EDTA a 0.25% em PBS. Após serem lavadas e ressuspensas com meio de cultura, eram semeadas em placas estéreis de 96 cavidades em meio de cultura RPMI adquirido de JRH Biosciences (Lenexa, KS, EUA) nas seguintes concentrações (número de células/100 ul de meio de cultura): WiDr 3.000/100ul, HCT8

2.000/100 ul, COLO201 30.000/100 ul, HCT1116, LoVo, SW48 e SW403: 5.000/100 ul. As placas eram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, por 18 horas. Completado este período, que permitia a adesão das células no fundo da cavidade, adicionavam-se as drogas Fluorouracil®, Proleukin®, Roferon-a®, ao volume de 100 ul por cavidade. As linhagens eram incubadas com as drogas dentro da seguinte variação de concentração: 5-Fluorouracil de 0.14 uM a 100 uM, com interferon alfa-2a de 1 U/ml a 100 x 10³ e com Interleucina-2 de 1 U/ml a 100 x 10³ U/ml. A seguir, as placas eram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 4 dias, período necessário a estas linhagens para 2 a 3 duplicações celulares. Usualmente, com este período de tempo, as cavidades de controle atingiam 90% de confluência das células. Os resultados eram lidos como os descritos por Alley (1988). O meio sobrenadante era desprezado, adicionando MTT (Sigma Chemical Company, EUA) à concentração de 0.5 mg/ml no volume total de 200 ul/cavidade. Seguia-se a incubação por 3 horas a 37 °C, na ausência de luz, para a precipitação de cristais de Formazam. Retirava-se o meio sobrenadante por aspiração e os cristais eram dissolvidos adicionando-se 150 ml/cavidade de DMSO (Bakker, Alemanha) e lidos em Multiscanner Titertek (Cambridge Technology inc, EUA) no comprimento de onda de 550 nm. A leitura era realizada na primeira hora após a adição de DMSO. As concentrações das drogas eram testadas em triplicada para cada experimento. Os resultados eram expressos em curva de % de crescimento x concentração da droga e comparados pelo índice de citotoxicidade que expressa a concentração de droga correspondente a 50% de células vivas em relação à população controle não tratada (IC₅₀).

3.6 Métodos de SRB e Ensaio Clonogênico para determinação da Radiosensibilidade.

Estes testes foram realizados nas linhagens WiDr, SW1398, LoVo, SW1116, COLO205, HT29 e LS174T.

Suspensões de células colhidas da cultura com solução de EDTA (0.2%) e tripsina (0.25%) eram lavadas e resuspensas em meio de cultura na concentração final entre 2.000 e 10.000 células/200 ul. As amostras eram irradiadas com o aparelho Gamma Cell 200 (Atomic Energy of Canada Limited, Canadá) com rendimento de 7.8 rads por segundo. Oito doses de irradiação eram utilizadas na faixa entre 0 a 50 Gys (grays), e testadas em quadruplicata, num mesmo experimento.

Nos testes de associação do 5-fluorouracil com irradiação as células eram ressuspensas em meio já contendo as concentrações de 5-fluorouracil escolhidas e eram irradiadas no tempo máximo de 30 minutos após a adição da droga. As concentrações de 5-fluorouracil variavam de 0.01 ug/ml a 1.0 ug/ml. As linhagens testadas neste experimento foram a WiDr, HT29 e LS174T.

As células irradiadas eram imediatamente semeadas em dois tipos de cultura, que permitiam a comparação entre o teste clássico para radiosensibilidade, o teste clonogênico, e o teste de citotoxicidade com SRB (sulforodamina B) (Sigma Chemical Company, EUA); este último ainda não descrito na literatura como método passível de ser utilizado na avaliação de radiosensibilidade.

No ensaio clonogênico, 2 ml de agarose a 0.6% em meio de cultura era adicionada a cada placa de Petri de 35 mm de diâmetro. 1×10^4 células/ml irradiadas eram adicionadas à agarose a 0,3% e colocadas sobre a camada basal no volume de 1 ml por placa de Petri e incubadas a 37 °C em ambiente de CO₂ a 5%. A linhagem LS174T foi semeada na concentração de 5×10^4 . As colônias contendo mais que 20 células eram contadas no décimo dia de incubação. Os experimentos eram realizados em duplicatas.

Para os testes de sensibilidade com SRB, as suspensões celulares irradiadas eram transferidas para placas de 96 cavidades na concentração de 2.000 células por cavidade (volume total de 200 ul/cavidade), e incubadas em condições idênticas às descritas para as placas do ensaio

clonogênico. A coloração era efetuada com sulforodamina B (SRB), após a fixação com TCA a 50% (ácido tricloroacético) (Bakker, EUA) durante 1 hora a 4 °C (em ácido acético 1%), 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, era seguida de secagem e dissociação dos cristais com solução de Tris (tri[hidroximetil]aminometano) Sigma, EUA. Procedia-se à leitura em Multiscanner Titertek no comprimento de onda de 540 nm e o resultado era analisado comparando-se ao crescimento dos controles. Subtraía-se do valor total da leitura a coloração de fundo, que era obtida através da leitura da coloração realizada logo após a semeadura das células.

4. Resultados

Os resultados estão relatados pela descrição individual de cada linhagem e seu comportamento no experimento.

4.1 Citotoxicidade

Linhagem WiDr (Figuras 17 e 18 - página 59, 60): mostrou ser uma linhagem sem citotoxicidade direta significativa a Interleucina-2 até a dose máxima de 100×10^3 UI/ml. O interferon alfa mostrou-se citotóxico a 20% das células nas concentrações acima de 10×10^3 UI/ml. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o fluorouracil foi de 2.11 μ M (+/- 2.04). Os experimentos que foram realizados com dose diária ou dose única não mostraram diferenças significativas. O acréscimo de timidina na dose de 5 μ M uma vez ou duas vezes durante a incubação, não mostrou diferença significativa na citotoxicidade do fluorouracil. Quando combinamos 5.000 UI/ml interferon com o 5-fluorouracil, o IC_{50} foi de 1.075 μ M (+/- 1.3), e para 5.000 UI/ml de interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} foi 3.2 μ M (+/- 3.9). Na combinação de 5-fluorouracil, interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 5.000 UI/ml) o IC_{50} mostrou-se de 0.85 μ M (+/- 0.91). Pelo teste de "T student" não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos com 5-fluorouracil e a combinação do 5-Fluorouracil com as citoquinas, mas no teste de paralelismo de curva a diferença foi estatisticamente significativa.

Linhagem HCT116 (Figuras 19 e 20 - páginas 61, 62): não apresentou citotoxicidade direta à interleucina-2 até a dose de 100.000 UI/ml. Ao alfa interferon, sua toxicidade máxima foi de 20% nas concentrações acima de 5.000 UI/ml. O IC_{50} do 5-Fluorouracil foi de 2.92 μ M (+/- 1.91). A dose diária ou única não mudou significativamente os resultados. As combinações de 5- fluorouracil e com 5.000 alfa interferon resultaram num IC_{50} 5.25 μ M (+/- 3.89). A combinação de 5-Fluorouracil mais interleucina-2 na concentração de 5.000 UI/ml resultou num IC_{50} de 4.75 μ M (+/- 3.18) e para a combinação de 5-fluorouracil mais 5.000 UI/ml

das citocinas o IC_{50} foi de 6.0uM(+/- 2.83). A diferença entre os IC_{50} não foi estatisticamente significativa.

Linhagem HCT8 (Figuras 21 e 22 - páginas 63, 64): mostrou-se como uma linhagem sem citotoxicidade direta significativa à Interleucina-2 até a dose máxima de 100×10^3 UI/ml. O interferon alfa não mostrou citotoxicidade nas doses testadas. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o fluorouracil foi de 2.45 uM (+/- 1.95). Os experimentos que foram realizados com dose diária ou com dose única não mostraram diferenças significativas. O acréscimo de timidina na dose de 5 uM, uma ou duas vezes durante a incubação, não mostrou diferença significativa na citotoxicidade do fluorouracil. Quando combinamos 10.000 UI/ml interferon com o 5-fluorouracil o IC_{50} foi de 2.8 uM (+/- 0.88), e para 10.000 UI/ml de interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} foi 1.28 (+/- 0.67). Na combinação de 5-fluorouracil, interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 10.000 UI/ml) o IC_{50} mostrou-se de 2.63 uM (+/- 0.56). Pelo teste de "T student" não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos com 5-fluorouracil e a combinação do 5-fluorouracil com as citocinas. Na combinação entre 5-fluorouracil e interleucina-2 houve um intenso sinergismo com IC_{50} da combinação sendo 1.3 uM ou seja aproximadamente 50% do IC_{50} do 5-fluorouracil isolado que foi de 2.45 uM.

Linhagem SW48 (Figuras 23 e 24 páginas 65, 66): não demonstrou citotoxicidade direta significativa à Interleucina-2 até a dose máxima de 100×10^3 UI/ml. O interferon alfa mostrou citotoxicidade de 40% nas doses acima de 10.000 UI/ml. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o 5-fluorouracil foi de 11.75 uM (+/- 5.56). Quando combinamos 5.000 UI/ml de interferon alfa com o 5-fluorouracil, o IC_{50} foi de 30 uM (+/- 28.28), e para 5.000 UI/ml de interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} foi 25 (+/- 21.2). Para a combinação de 5-fluorouracil, interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 5.000 UI/ml) o IC_{50} foi 25 uM (+/- 21.2). O teste de "T student" não mostrou diferenças significativas entre os resultados obtidos com 5-fluorouracil e a combinação do 5-Fluorouracil com as citocinas.

Linhagem SW403 (Figuras 25 e 26 - páginas 67, 68): resultou em uma linhagem sem citotoxicidade direta significativa à interleucina-2 até a dose máxima de 100×10^3 UI/ml. O interferon alfa não mostrou citotoxicidade até doses de 100.000 UI/ml. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o 5-fluorouracil foi de 2.46 μ M (+/- 1.46). Quando combinamos 5.000 UI/ml de interferon com o 5-fluorouracil, o IC_{50} variou para 3.05 μ M (+/- 2.05); e com 5.000 UI/ml de interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} foi 3.8 μ M (+/- 3.11). Na combinação de 5-fluorouracil, interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 5.000 UI/ml) o IC_{50} mostrou-se de 3.3 μ M (+/- 2.4). Pelo teste de "T student" não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos com 5-fluorouracil e a combinação do 5-fluorouracil com as citoquinas.

Linhagem LoVo (Figuras 27 e 28 - páginas 69, 70): mostrou ser uma linhagem com 30% de citotoxicidade direta à Interleucina-2 para a dose de 100×10^3 UI/ml. O interferon alfa mostrou citotoxicidade com um IC_{50} de 20.000 UI/ml. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o 5-fluorouracil foi de 2.25 μ M (+/- 1.55). Quando combinamos 1.000 UI/ml interferon com o 5-fluorouracil o IC_{50} foi de 22.6 μ M (+/- 31.7), e para 5.000 UI/ml de interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} oscilou para 1.2 μ M (+/- 0.4) aproximadamente a 50% do IC_{50} do 5-fluorouracil isolado (2.25 μ M). Na combinação de 5-fluorouracil, interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 5.000 UI/ml) o IC_{50} mostrou-se de 20.4 μ M (+/- 27.8). O teste de "T student" não mostrou diferenças significativas entre os resultados obtidos com 5-fluorouracil e a combinação do 5-Fluorouracil com as citoquinas.

Linhagem COLO201 (Figuras 29 e 30 - páginas 71, 72): apresentou-se como uma linhagem com comportamento diferente das outras linhagens previamente descritas, com uma citotoxicidade direta à Interleucina-2 e ao interferon alfa em torno de 50% desde 10 UI/ml até 10^3 UI/ml. O índice de citotoxicidade (IC_{50}) para o 5-fluorouracil foi de 10.7 μ M (+/- 16.4). Quando combinamos 1.000 UI/ml de interferon com o 5-fluorouracil não foi possível cálculo do IC_{50} e para interleucina-2 mais 5-fluorouracil o IC_{50} foi 5.2 μ M (+/- 7.1). Na combinação de 5-fluorouracil,

interleucina-2 e interferon (ambos na concentração de 5.000 UI/ml) o IC₅₀ não pode ser calculado. Pelo teste de "T student" não se detectou uma diferença significativa entre os resultados com 5-fluorouracil.

Todos os IC₅₀ são sumarizados na tabela 3.

Tabela 3a. Sumário dos IC₅₀ para as Linhagens de Tumores Coloretais com 5-FU e em Combinações com IFN e IL-2

Linhagem	IC ₅₀ de 5-FU isolado	IC ₅₀ de IFN +5FU	IC ₅₀ de IL-2 +5FU
WiDR	2.11 uM +/- 2.04	1.1 uM +/- 1.3	3.2 uM +/- 3.9
HCT1116	2.92 uM +/- 1.91	5.25 uM +/- 3.89	4.8 uM +/- 3.18
HCT8	2.45 uM +/- 1.95	2.8 uM +/- 0.88	1.3 uM +/- 0.67
SW48	11.75 uM +/- 5.56	30.0 uM +/-28.28	25.0 uM +/- 21.2
SW403	2.46 uM +/- 1.46	3.05 uM +/- 2.05	3.8 uM +/- 3.11
LOVO	2.25 uM +/- 1.55	22.6 uM +/- 31.7	1.2 uM +/- 0.4
COLO201	10.70 uM +/- 16.4	-----	5.2 uM +/- 7.1

Tabela 3b. Sumário dos IC₅₀ da Combinação de 5-FU, IFN e IL-2 em Linhagens de Tumores Colorretais

Linhagem	IC50 de 5-FU + IFN + IL-2	5-FU Isolado
WiDR	0.85 uM +/- 0.91	2.11 uM +/-2.04
HCT1116	6.00 uM +/- 2.83	4.8 uM +/-1.91
HCT8	2.63 uM +/- 0.56	2.45 uM +/-1.95
SW48	25.00 uM +/- 21.2	11.75 uM +/-5.56
SW403	3.30 uM +/- 2.40	2.46 uM +/-1.46
LOVO	20.4 uM +/- 27.8	2.25 uM +/-1.55
COLO201	--	10.70 uM +/-16.4

Figura 17 Curvas de Inibição de Crescimento para a Linhagem WiDr - Drogas Isoladas

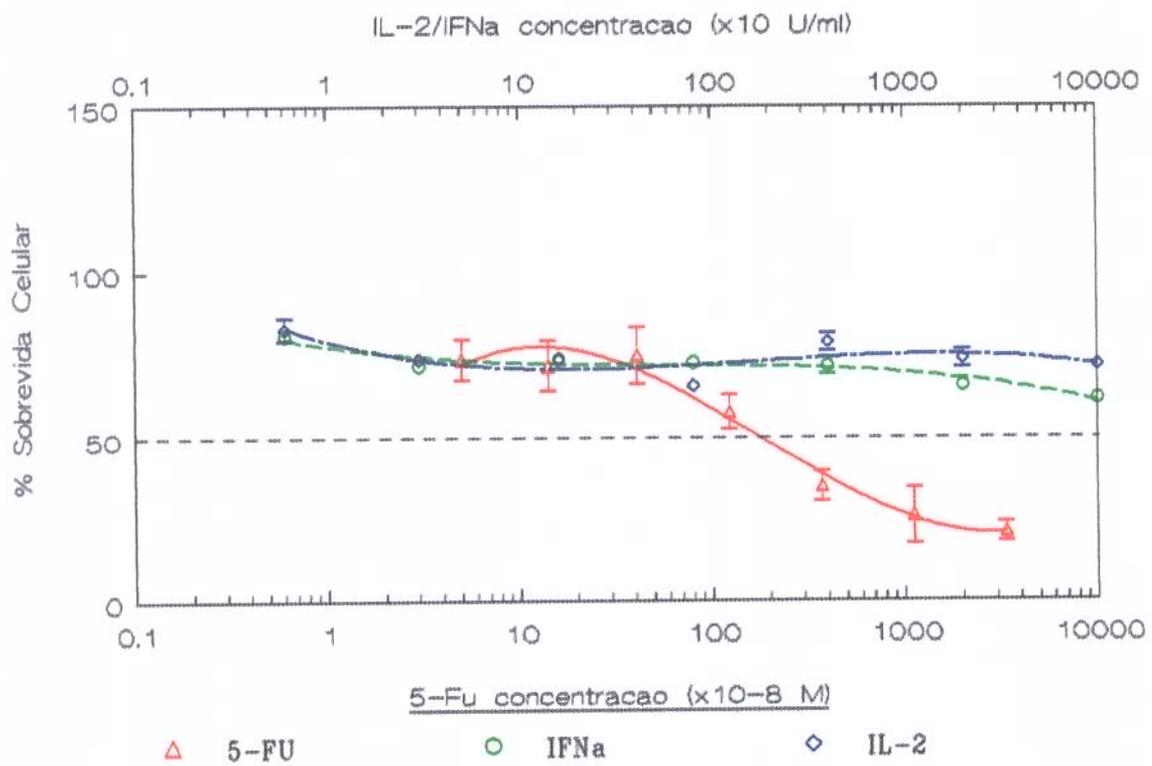
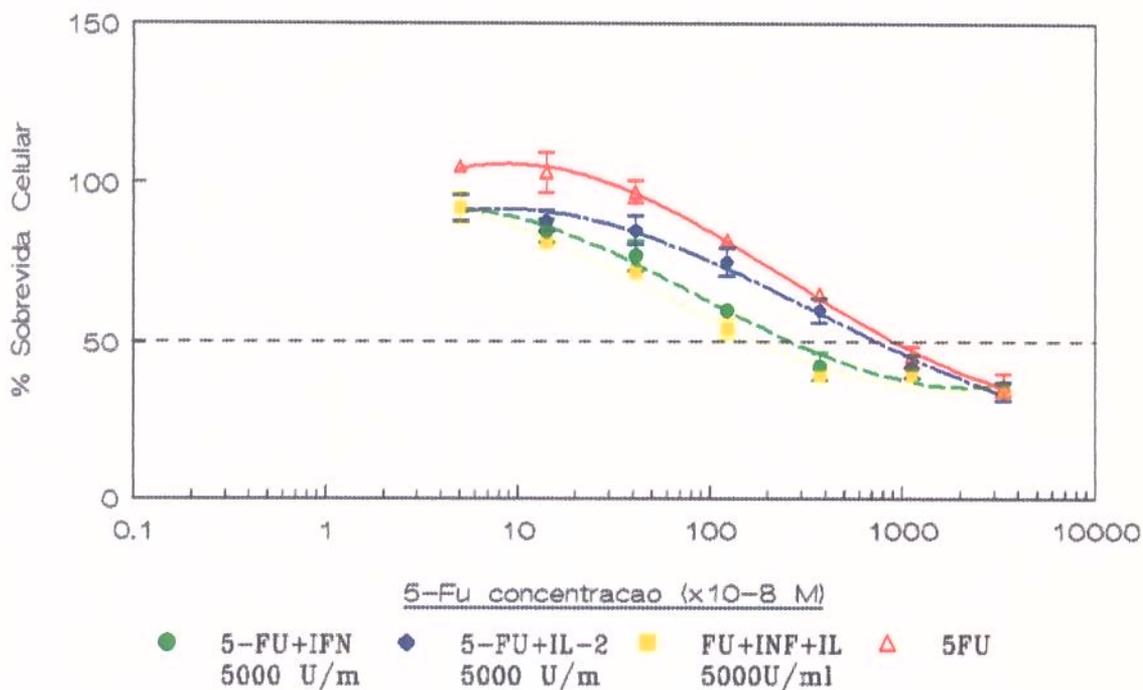


Figura 18 Curvas de Inibição de Crescimento para a Linhagem WiDr - Combinações das Drogas



Observa-se toxicidade muito discreta do interferon alfa e da interleucina-2 como drogas isoladas até a dose de 10.000 U/ml nesta linhagem e a alteração do IC_{50} obtida com a adição do IFN ao 5-FU. Não houve alteração da citotoxicidade ao se acrescentar a IL-2.
 (IFN) :interferon alfa - (IL-2) :interleucina-2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 19 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem HCT116 - Drogas Isoladas

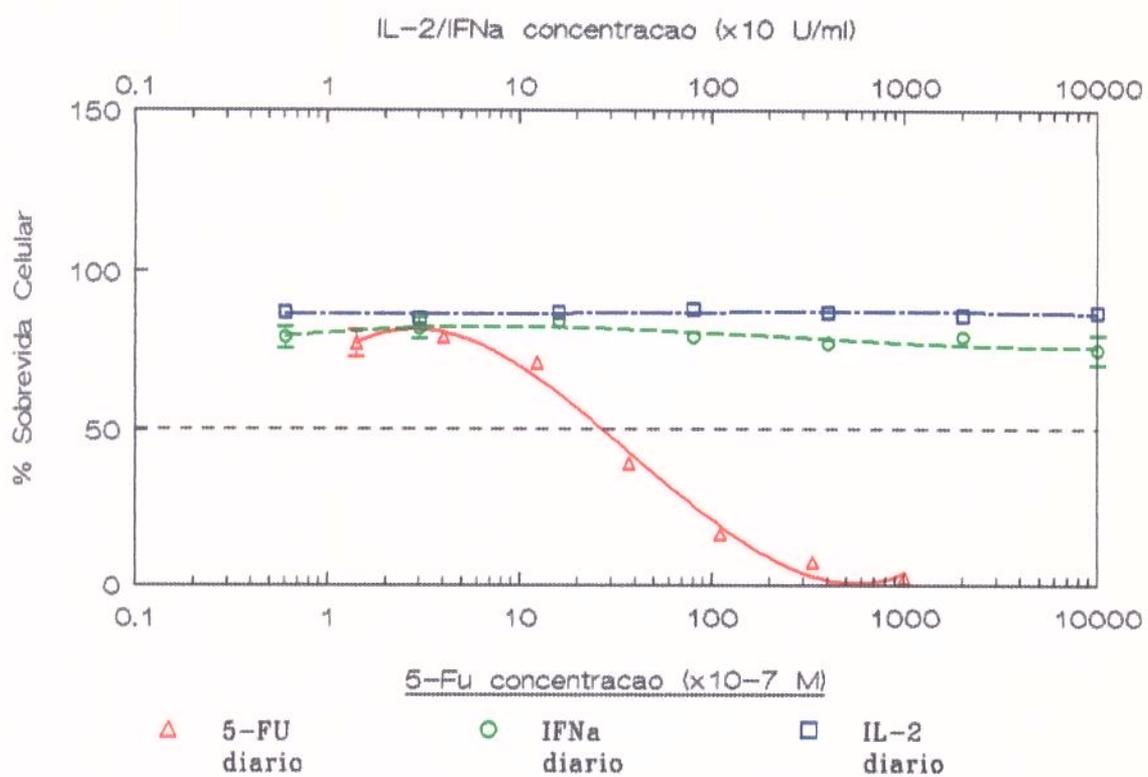
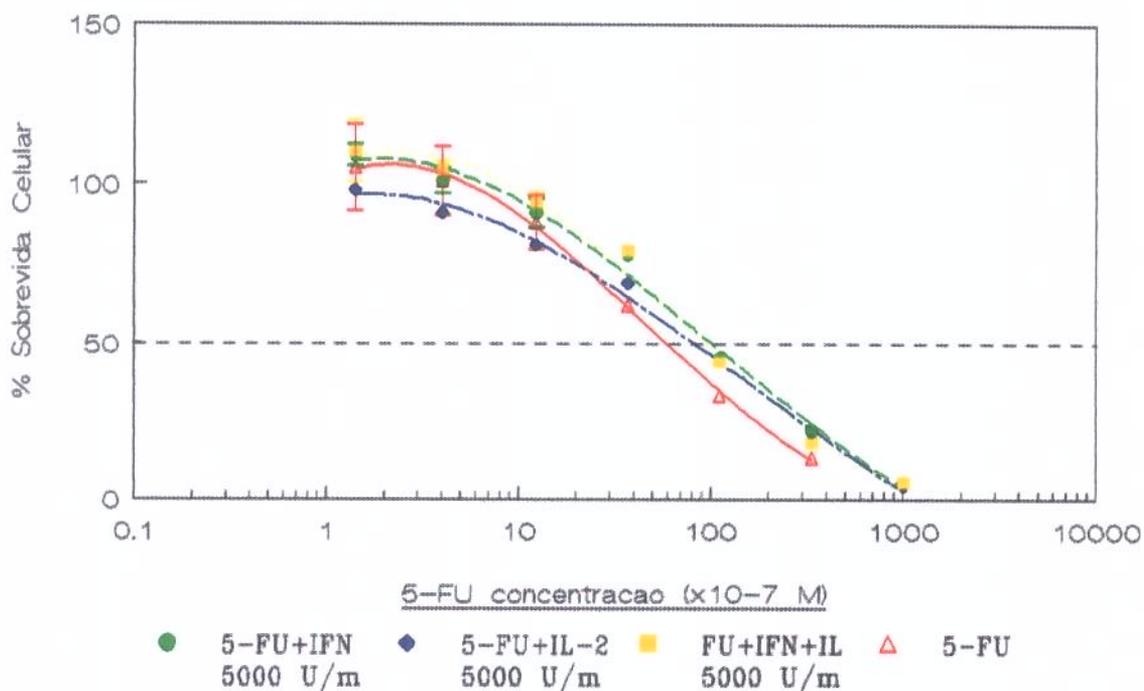


Figura 20 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem HCT116 - Combinações de Drogas



Não se observa toxicidade da interleucina-2 como droga isolada até a dose de 10.000 U/ml, com discreta ação citotóxica do INF nas maiores concentrações nesta linhagem. Não houve alteração do IC_{50} obtida com a adição do IFN e da IL-2 ao 5-FU.

(IFN) :interferon alfa - (IL-2): interleucina-2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 21 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem HCT8 - Drogas Isoladas

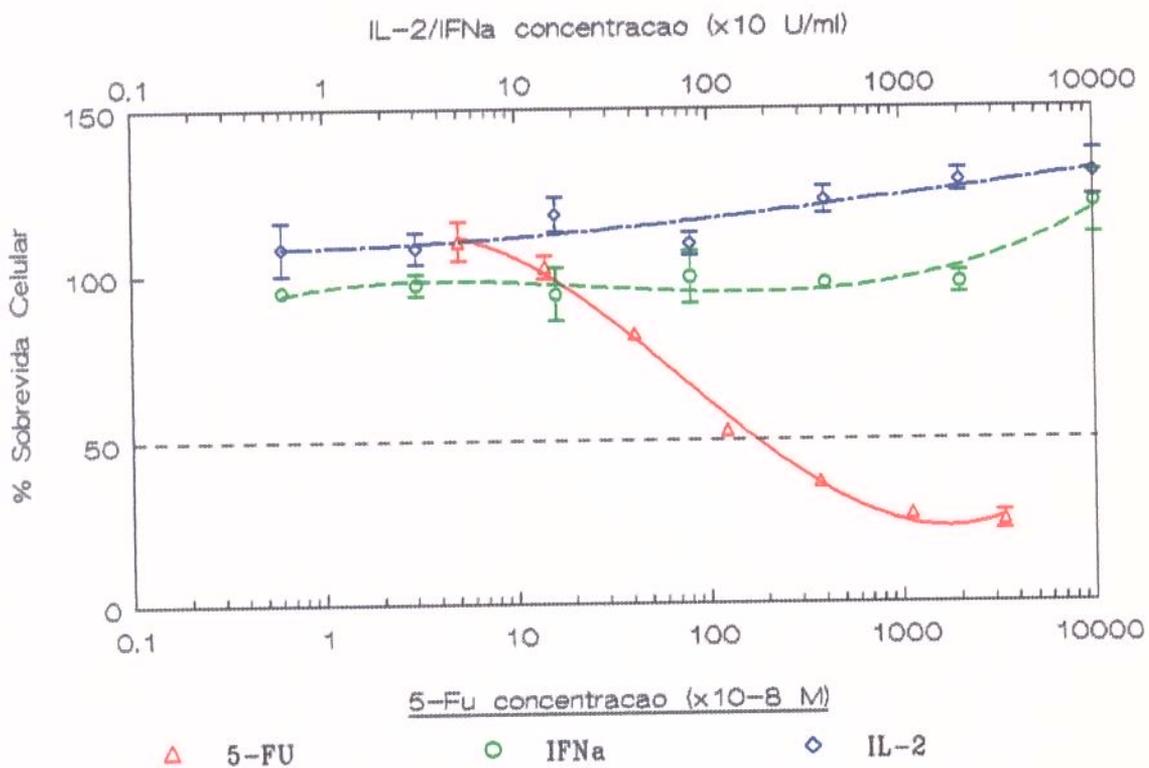
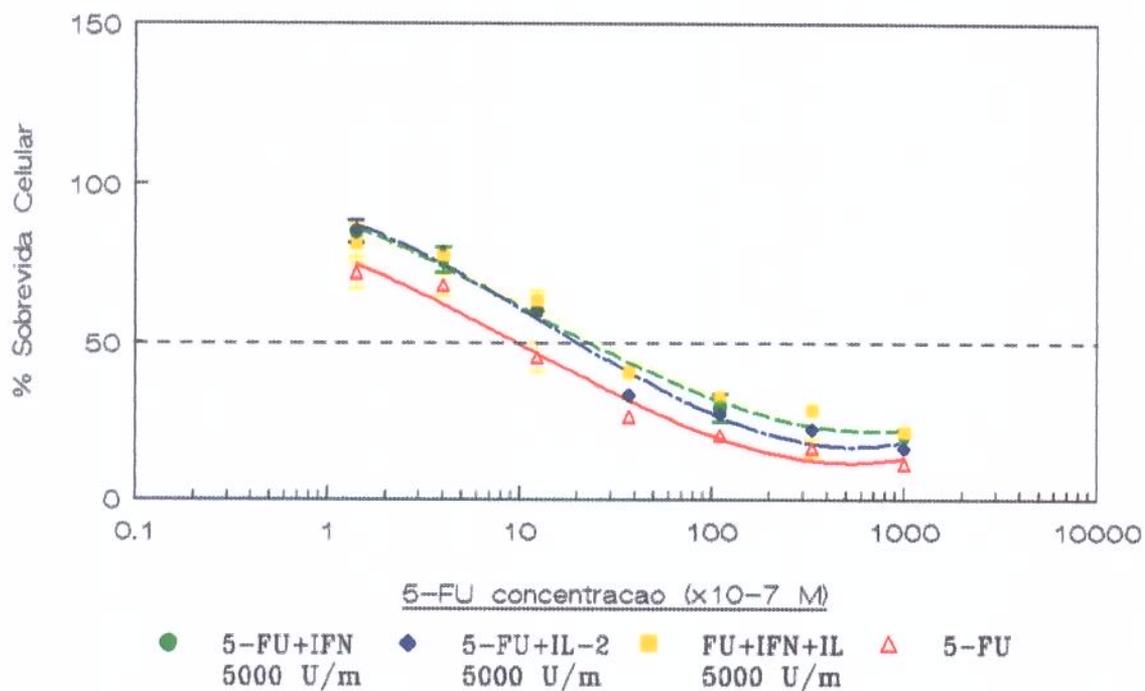
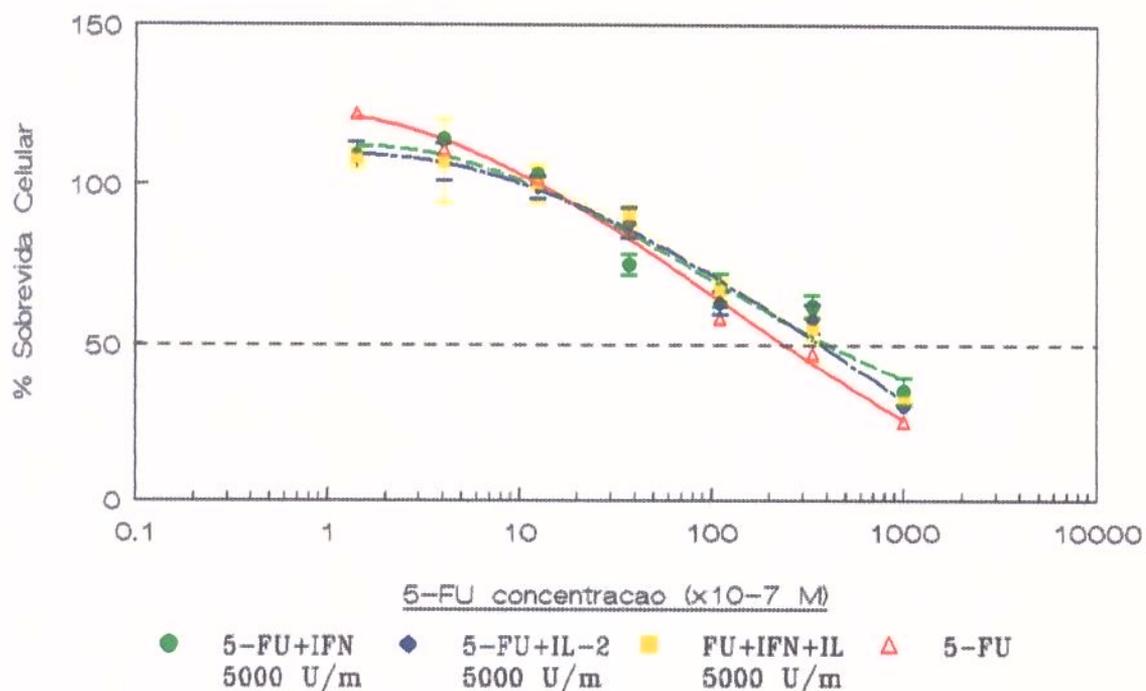


Figura 22 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem HCT8 - Combinações de Drogas



Não se observa toxicidade do interferon alfa e da interleucina-2 como drogas isoladas nesta linhagem, ocorrendo mesmo uma discreta tendência a estimular o crescimento. Não houve alteração da citotoxicidade ao se acrescentar IFN ao 5-FU. A combinação de 5-FU e IL-2 foi altamente sinérgica com IC₅₀ aproximadamente a 50% do 5-FU isolado.
 (IFN) :interferon alfa - (IL-2) :interleucina-2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 24 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem SW48 - Combinações de Drogas



Observa-se toxicidade muito discreta do interferon alfa, sem inibição do crescimento com interleucina-2 como drogas isoladas até a dose de 10.000 U/ml nesta linhagem. Não houve alteração da citotoxicidade ao se acrescentar IL-2 ou IFN ao 5-FU .
 (IFN) :interferon alfa - (IL-2):interleucina-2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 25 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem SW403 - Drogas Isoladas

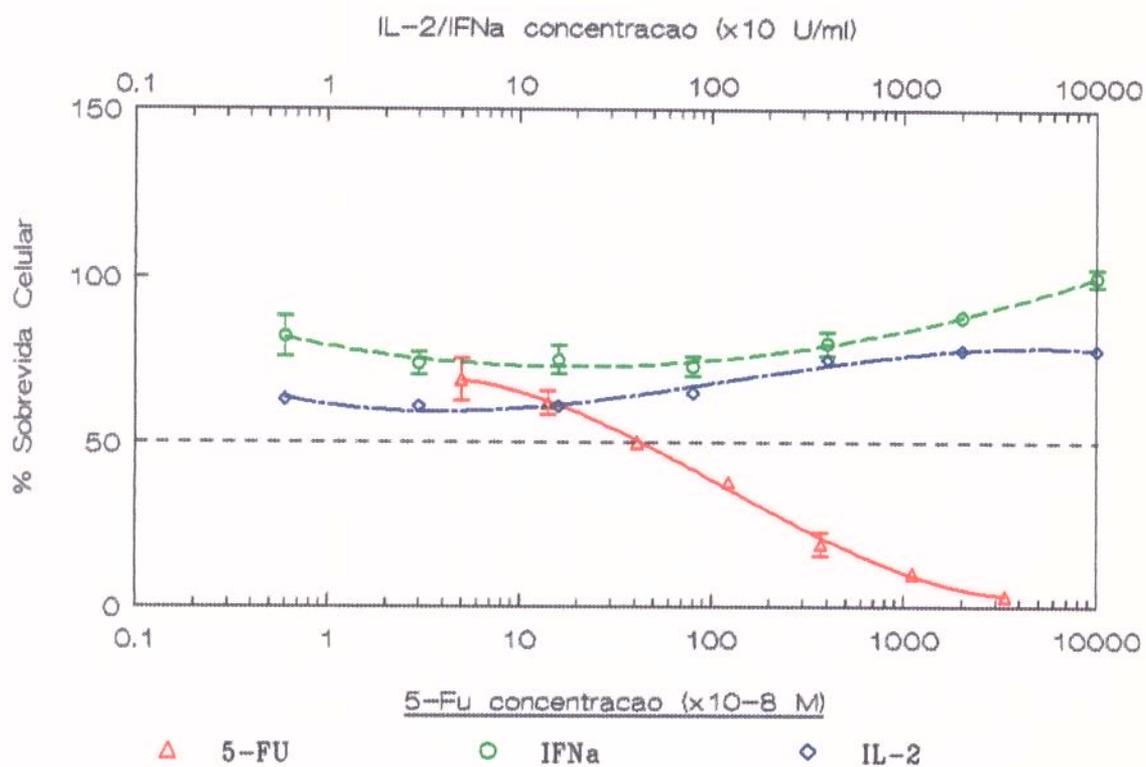
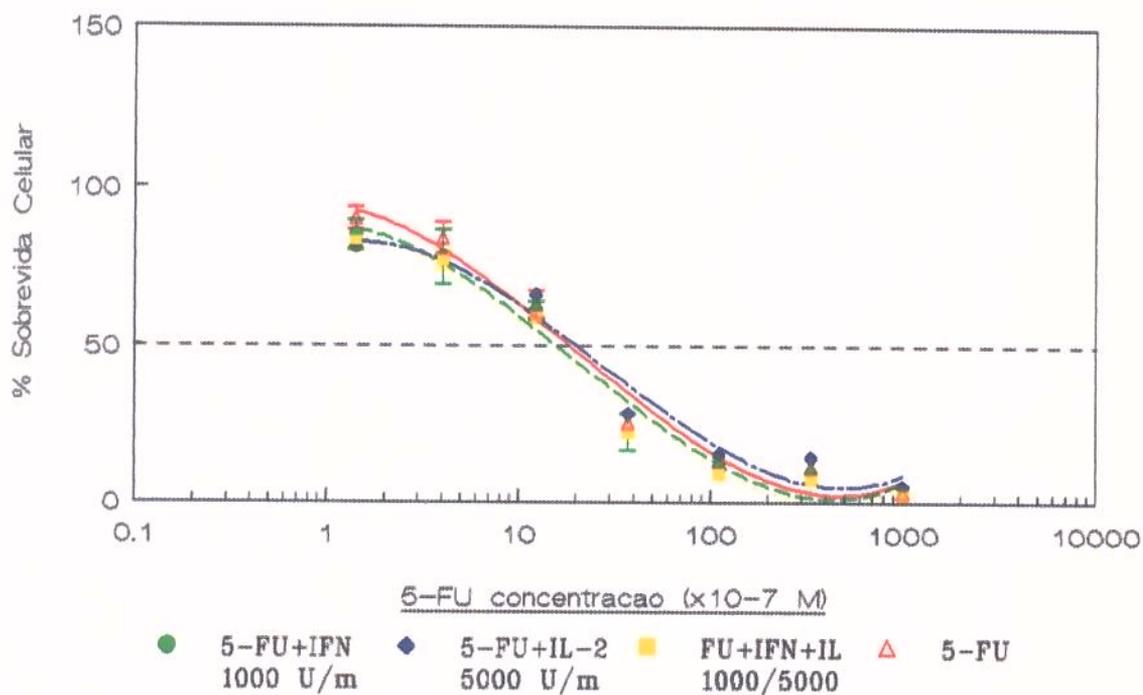


Figura 26 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem SW403 - Combinações de Droga



Não se observa citotoxicidade do interferon alfa e da interleucina-2 como drogas isoladas nesta linhagem. Não houve alteração da citotoxicidade ao se acrescentar a IL-2 ou INF.
 (IFN) :interferon alfa - (IL-2) : interleucina 2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 27 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem LoVo - Drogas Isoladas

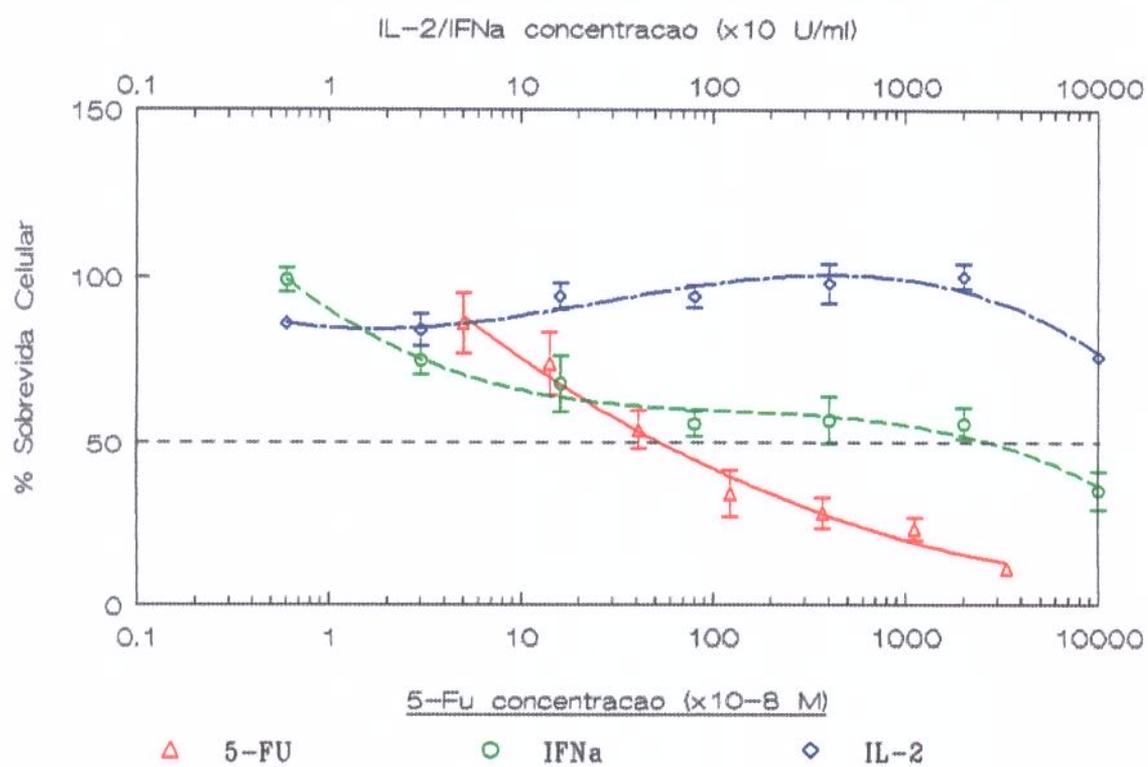
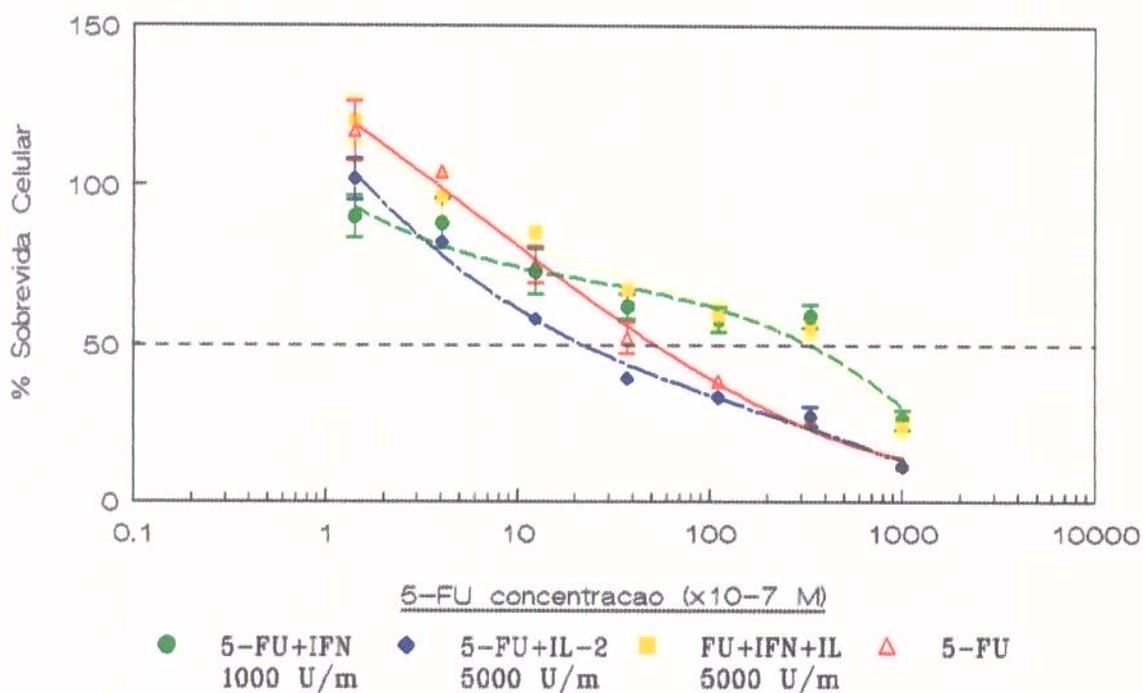


Figura 28 Curva de Inibição de Crescimento para Linhagem LoVo - Combinações de Droga



Observa-se importante citotoxicidade do interferon alfa e nenhuma alteração à interleucina-2 como drogas isoladas até a dose de 10.000 U/ml nesta linhagem. Não houve alteração da citotoxicidade ao se combinarem as drogas. A combinação de 5-FU e IL-2 foi altamente sinérgica com o IC₅₀ correspondendo aproximadamente a metade do 5-FU isolado (IFN) :interferon alfa - (IL-2):interleucina-2 - (5-FU):5-fluorouracil

Figura 29 Curva de inibição de Crescimento para a Linhagem Colo201 - Drogas Isoladas

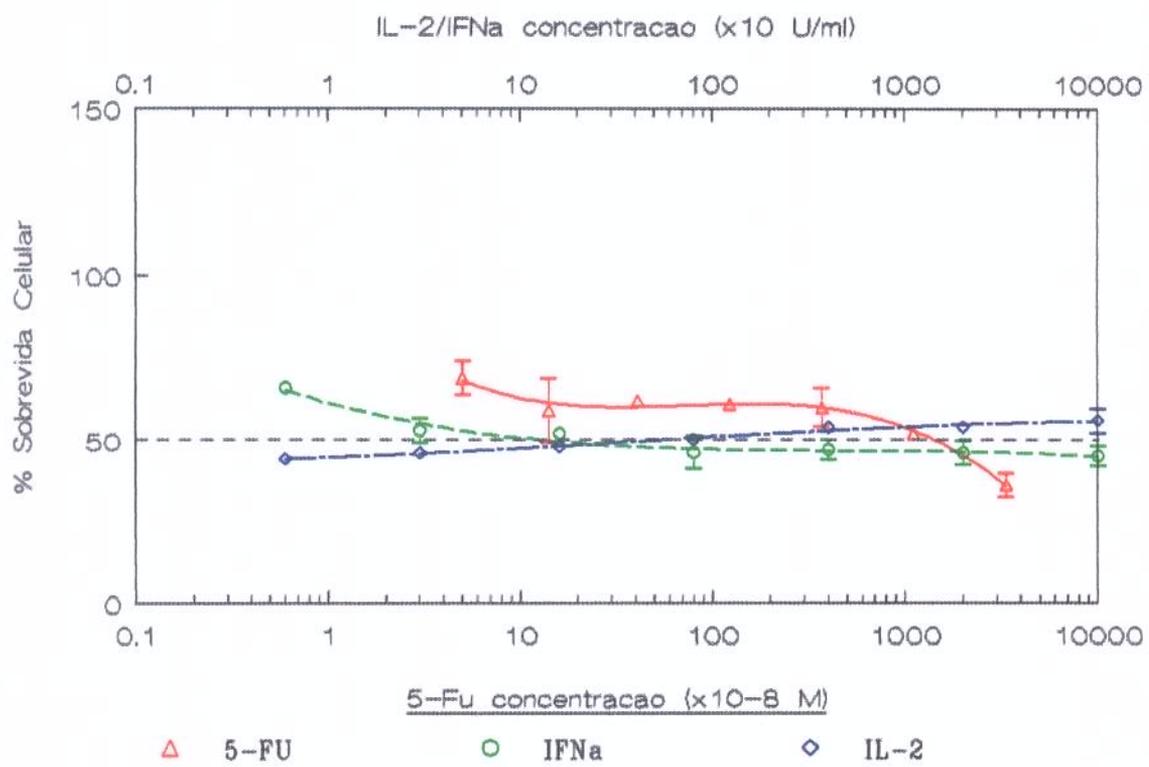
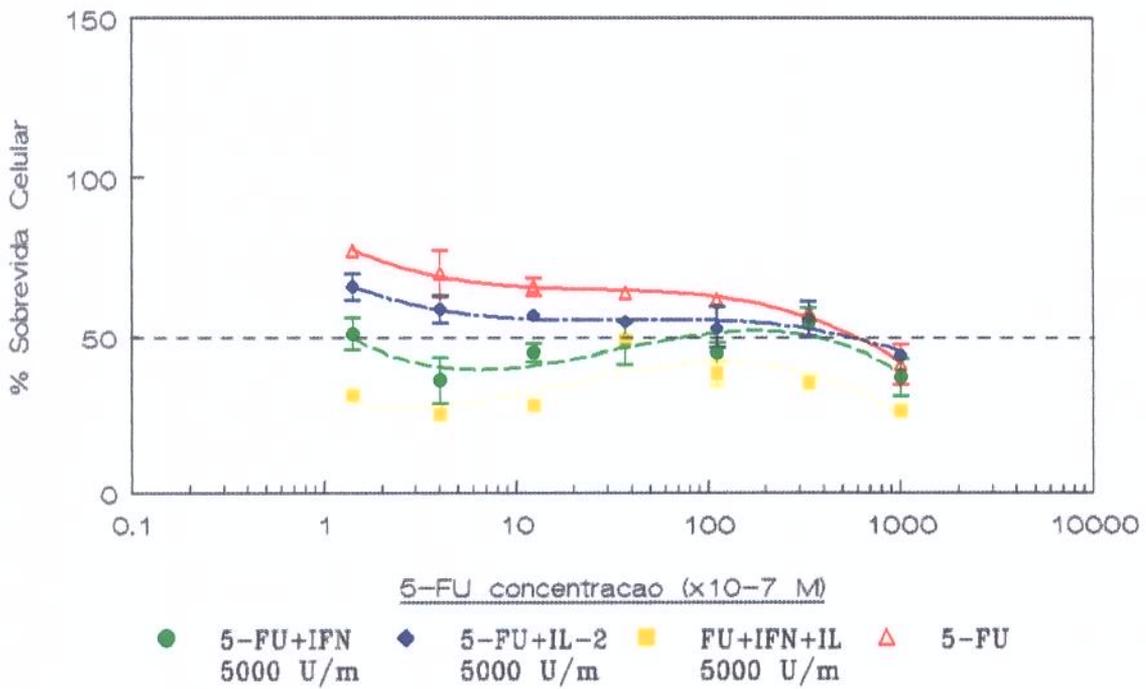


Figura 30 Curva de Inibição de Crescimento para a Linhagem Colo201 - Combinações de Drogas



Observa-se padrão de toxicidade atípico para as drogas isoladas até a dose de 10.000 U/ml nesta linhagem e a não alteração do IC₅₀ obtida com a adição do IFN e IL-2 ao 5-FU.
 (IFN) :interferon alfa - (IL-2) :interleucina 2 - (5-FU):5-fluorouracil

4.2 Radiosensibilidade

Estes experimentos foram realizados através de duas técnicas diferentes: A técnica de citotoxicidade com sulforodamina (SRB) e com ensaio clonogênico.

O teste de radiosensibilidade por SRB, nas várias linhagens celulares de câncer de cólon, mostrou um D0 de aproximadamente 5 Gy sendo as linhagens mais radiosensíveis: LoVo com um D0 de 4 Gy e LS174T com um D0 2 Gy. (Fig 31 e 32)(pag 75, 76)

O ensaio clonogênico realizado nas linhagens LS174T, WiDr e HT29 mostrou um D0 de 13 Gy para WiDr, a linhagem HT29 com D0 de 5 Gy e 1 Gy para a linhagem LS174T. Concomitantemente, realizamos o teste de SRB com as mesmas linhagens. As linhagens WiDr e HT29 apresentaram um D0 igual a 7 Gy, enquanto a LS174T, um D0 igual a 1.5 Gy (Figuras 33 e 34)(pag 77).

Para avaliar a alteração na radiosensibilidade causada pela adição de 5-fluorouracil, utilizamos as linhagens WiDr e LS174T por serem, respectivamente, a mais resistente e a mais sensível. Foi utilizado o teste de SRB. Na concentração de 0.5 ug/ml (3.8 uM) de 5- fluorouracil, expondo as células WiDr, apenas 27% permaneciam viáveis. Na concentração de 0.1 ug/ml (0.8 uM) 82% permaneciam viáveis, enquanto a concentração de 1 ug/ml (7.7 uM) permitia uma sobrevivência de apenas 13% das células. Este experimento serviu para o cálculo da dose do 5-fluorouracil que seria utilizada como dose de citotoxicidade mínima mas, que pudesse alterar a radiosensibilidade.

Utilizando a técnica de SRB, com adição de 5-Fluorouracil na dose de 0.1 g/ml na linhagem celular WiDr, os resultados da radiosensibilidade não mostraram alterações do D0 e na concentração de 0.5 ug/ml acusaram um aumento da radioresistência com D0 igual 12 Gy (Figura 35)(pag 78). Os resultados mostraram, através do teste de SRB, que não houve diferença na sensibilidade da linhagem da LS174T com 5- fluorouracil nas concentrações de 0.01 ug/ml a

0.05 ug/ml. Os controles mostraram que a dose de 5-fluorouracil 0.01 ug/ml não era citotóxica (124%).

A dose de 0.05 ug/ml acusou uma sobrevida celular de 68% nos controles. A dose de 0.1 ug/ml mostrou uma sobrevida celular de 42%. Foram usadas as duas primeiras concentrações (Figura 36)(pag 79).

A influência do 5-fluorouracil na radiosensibilidade foi testada, concomitantemente, pela técnica do SRB e ensaio Clonogênico para as linhagens celulares HT29 e LS174T. O resultado foi que as linhagens LS174T não mostrou diferenças significativas entre os dois ensaios e a HT29 mostrou comportamento semelhante ao da WiDr no experimento anterior, com aumento da radioresistência detectada nos dois métodos, sendo que aumento do D0 foi notado em maior escala no ensaio clonogênico cujo valor foi de 11 Gy, com a dose de 0.5 ug/ml de 5-fluorouracil (Figura 37 e 38)(pag 80, 81).

A maioria das linhagens testadas apresentou D0 igual a 5 Gy, sobressaindo-se as linhagens LS174T e LOVO como mais sensíveis.

Nos testes realizados no mesmo dia, com as mesmas linhagens celulares para comparação das técnicas de SRB e ensaio clonogênico, somente a linhagem WiDR apresentou variação importante. Na avaliação da radiosensibilidade da linhagem WiDR após a adição de 5-fluorouracil em diferentes concentrações, estudada pelo teste de SRB não foi possível determinar o aumento da radiosensibilidade. Também a linhagem LS174T após a adição de 5-fluorouracil em diferentes concentrações, estudada pelo teste de SRB não mostrou aumento da radiosensibilidade.

Utilizando métodos diferentes não definimos uma maior sensibilidade à irradiação ao acrescentarmos 5-FU às linhagens HT29 e LS174T.

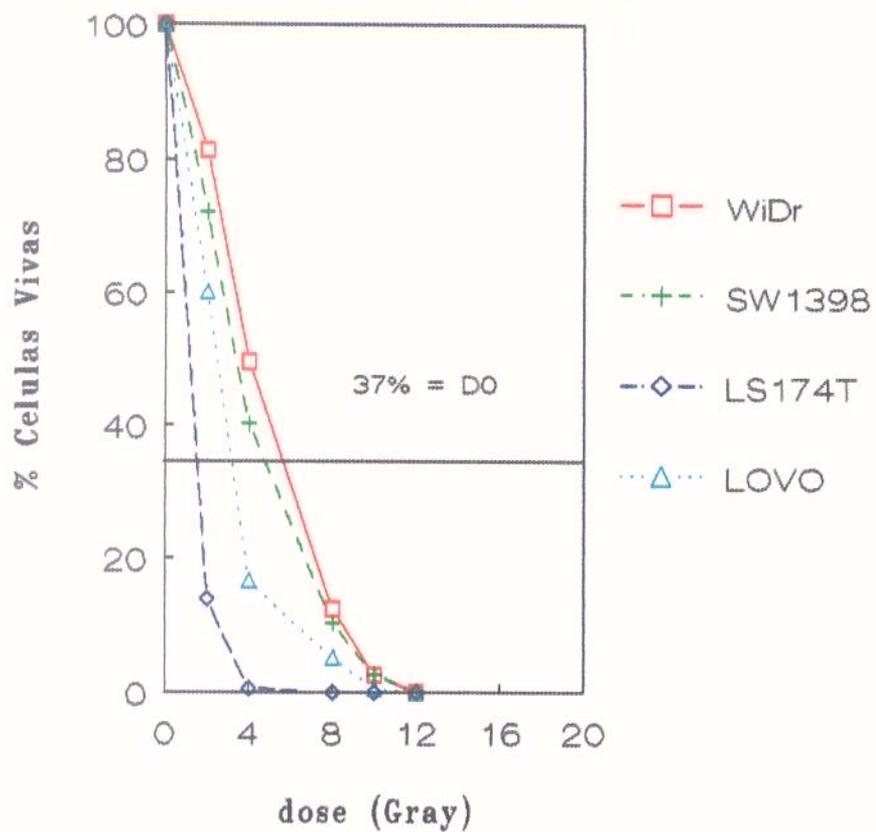


Fig 31. Teste de Radiosensibilidade pelo Ensaio SRB nas Linhagens WiDr, SW1398, LS174T, LoVo.

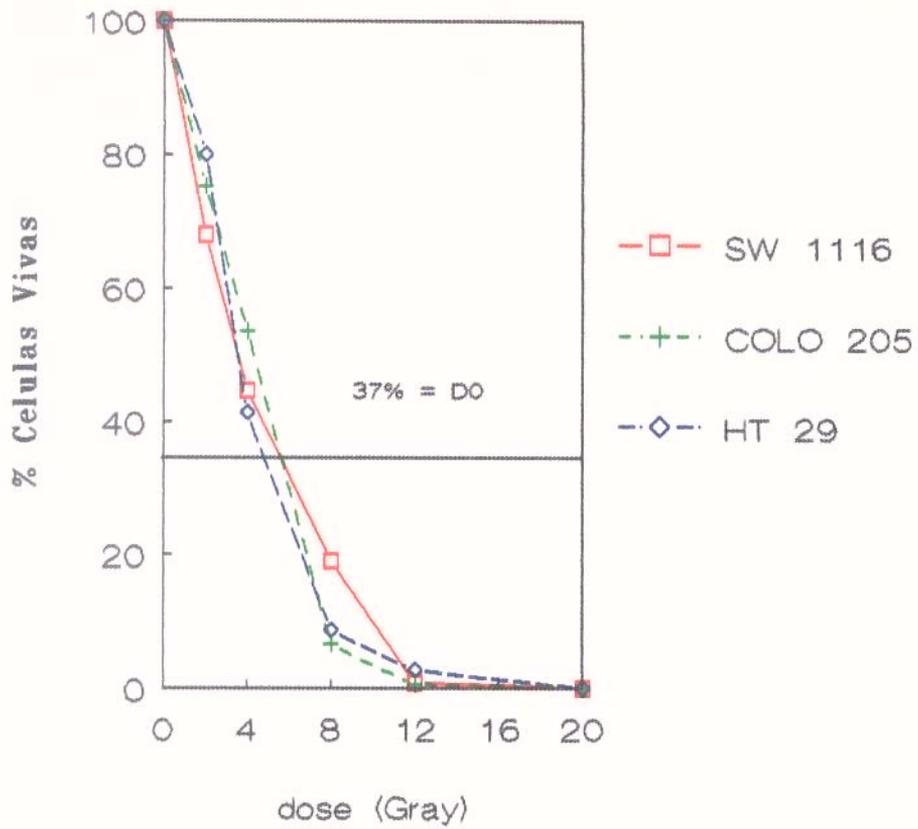


Figura 32. Teste de Radiosensibilidade pelo Ensaio SRB nas Linhagens SW1116, COLO205 e HT29.

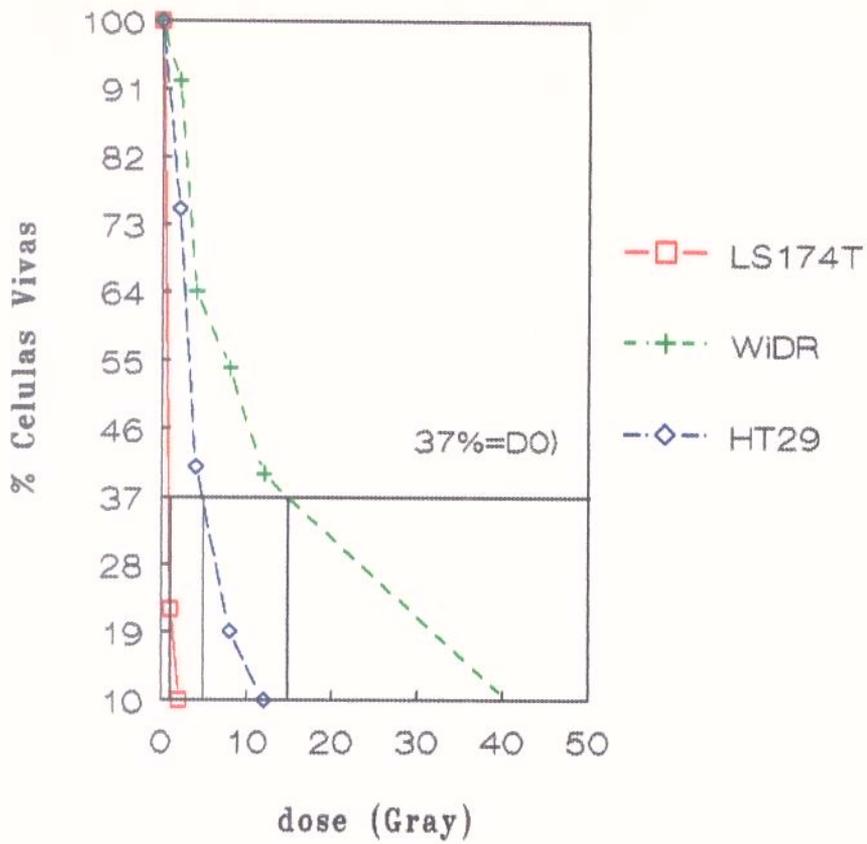


Figura 33 Teste de Radiosensibilidade para Linhagens LS174T, WiDr, Ht29 por Ensaio clonogênico

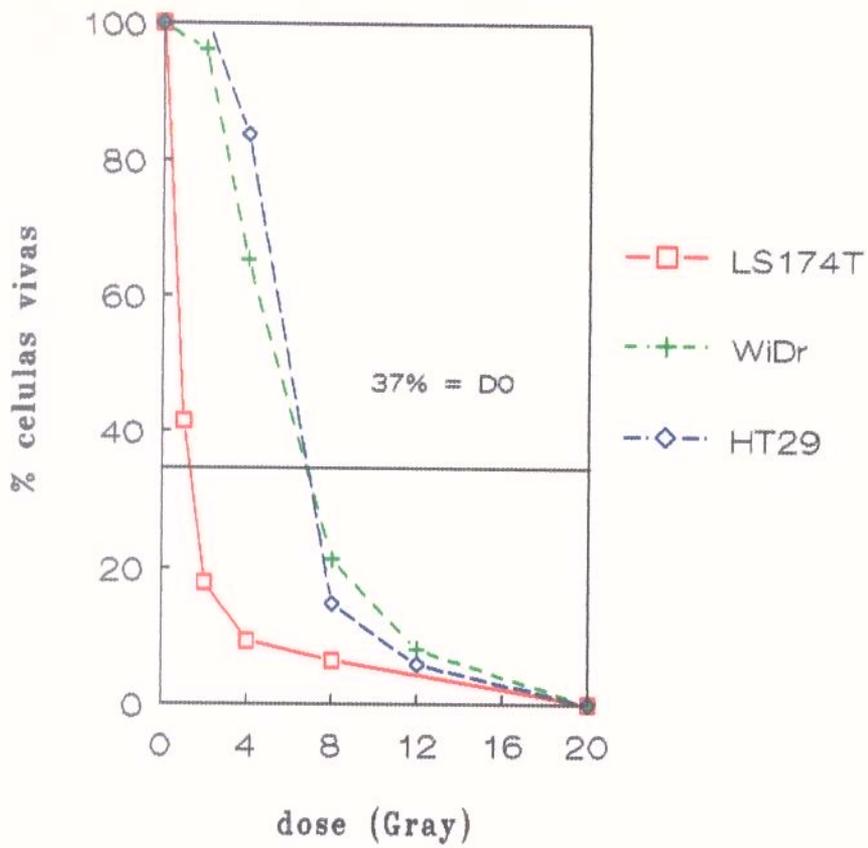


Figura 34 : Teste de Radiosensibilidade para Linhagens LS174T, WiDR, Ht29 por Ensaio SRB

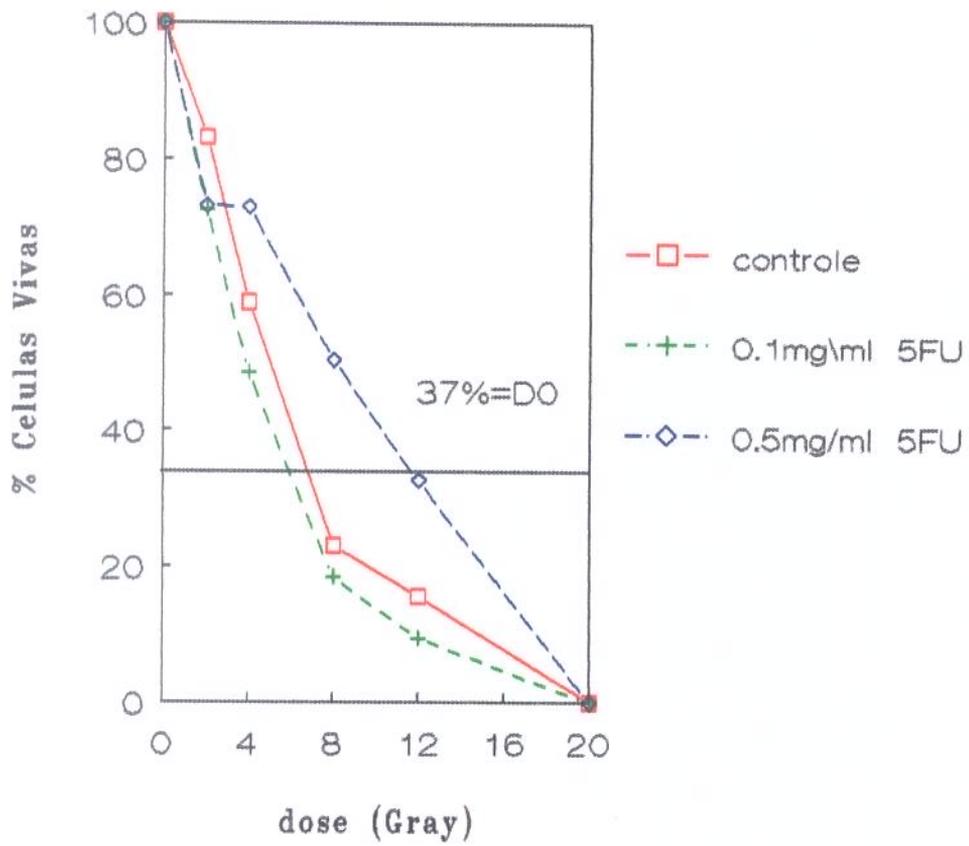


Figura 35. Teste de Radiosensibilidade para a Linhagem WiDr pelo Ensaio SRB

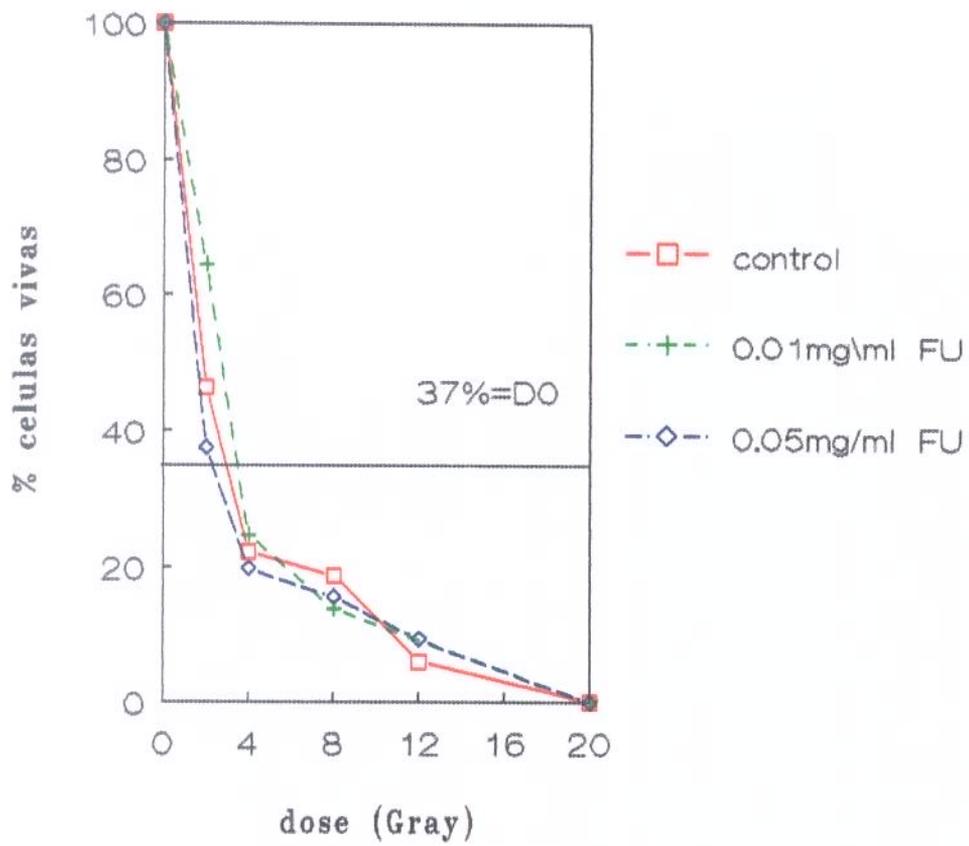


Figura 36. Teste de Radiosensibilidade para a Linhagem LS174T pelo Ensaio SRB.

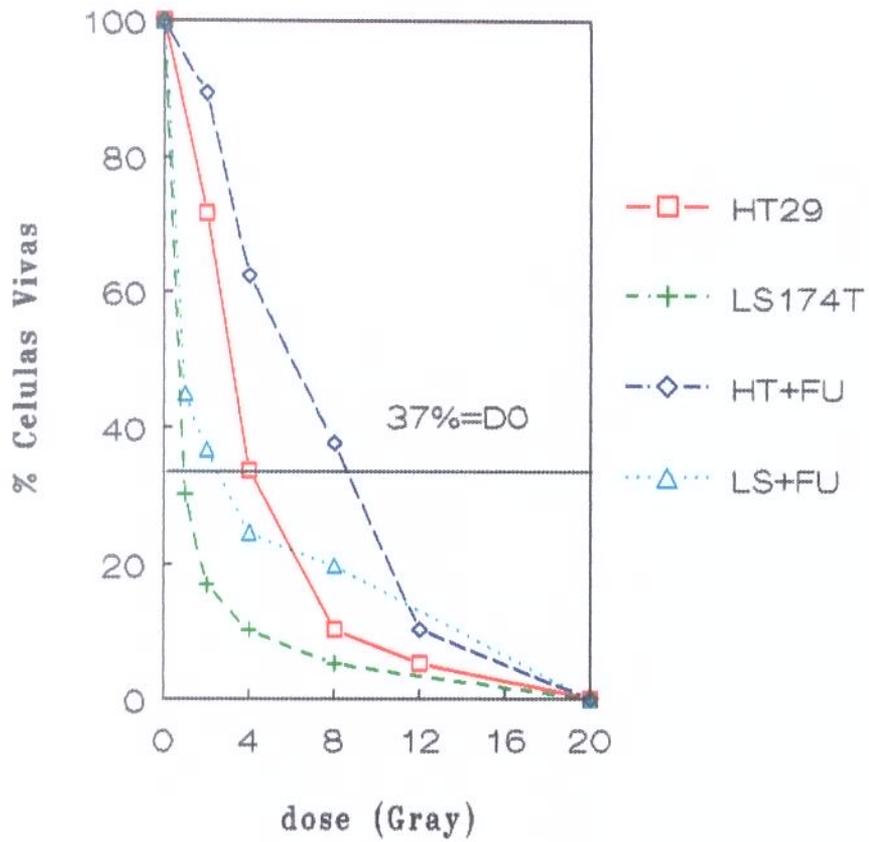


Figura 37. Radiosensibilidade das Linhagens HT29 e LS174T com 0.5 ug/ml de 5-fluorouracil pelo o Ensaio SRB.

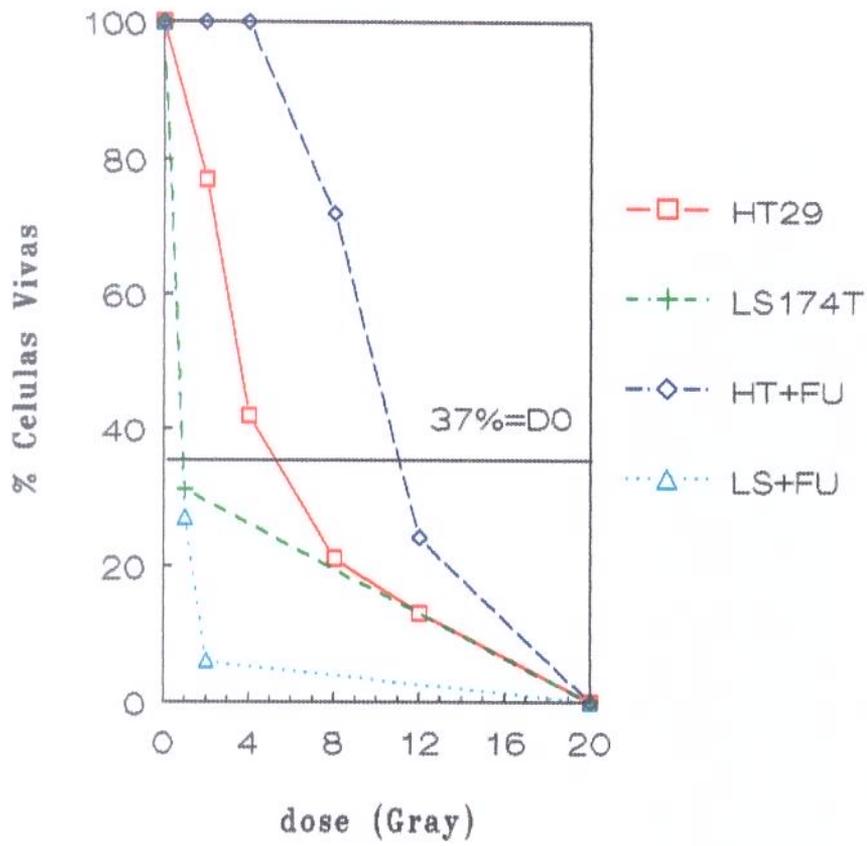


Figura 38. Radiosensibilidade das Linhagens HT29 e LS174T com 0.5 ug/ml de 5-Fluorouracil pelo Ensaio Clonogênico

5. Discussão:

Devido a sua inconstável importância epidemiológica dentre as neoplasias, os tumores colorretais sempre têm merecido especial atenção dos clínicos e cientistas envolvidos na pesquisa oncológica por maiores índices de resposta. Sua abordagem terapêutica clínica atual se restringe ao citotóxico 5-fluorouracil, que, desde a sua síntese por Heidelberger, em 1957, tornou-se a droga "standard" no tratamento do câncer coloretal avançado. Esquemas e doses originais envolviam altas concentrações, administração venosa rápida, semanal ou diariamente, com toxicidade importante. Recentemente, experimentos clínicos, utilizando mais rigor nas definições de resposta, têm sugerido que 10% deve ser a mais real taxa de resposta ao 5-fluorouracil isolado no câncer de cólon e reto, o que significa uma resposta marginal sem impacto na sobrevida dos pacientes

Após uma década de falhas persistentes e de completo pessimismo no tratamento do câncer de cólon, houve um rápido aumento no número de novas abordagens terapêuticas bem fundamentadas sob o ponto de vista bioquímico, além da associação com imunomoduladores. Tal evolução tem sido possível devido ao avanço da técnica de cultura celular de tumores, dos testes de citotoxicidade, do emprego de anticorpos monoclonais no diagnóstico e tratamento desta neoplasia, abrindo-se um campo enorme para pesquisa na busca de melhores resultados na sobrevida.

Diante destas possibilidades deve-se lembrar que o desenvolvimento no tratamento do câncer depende de identificar e explorar as diferenças entre o hospedeiro e o tumor. Estas diferenças podem ser anatômicas (tratamento cirúrgico e radioterápico), metabólicas (quimioterapia), cinética celular (radioterapia e quimioterapia) e antigênicas entre as células normais e do tumor (imunoterapia).

Nos últimos anos, um novo grupo de drogas vem sendo estudado e gradativamente incorporado na indicação de tratamento do câncer: os Modificadores da Resposta Biológica.

Fazem parte deste grupo os interferons, as interleucinas, os fatores de necrose tumoral e muitas outras substâncias que têm a capacidade de alterar a resposta imunológica do hospedeiro.

Combinações de quimioterapia e imunoterapia empregando produtos derivados de bactérias ou imunomoduladores não específicos foram empregadas extensivamente na década de 70, especialmente em trabalhos clínicos envolvendo câncer colorretal. Hoje, uma combinação de quimioterapia e imunoterapia, 5-fluorouracil e levamisole, tornou-se o tratamento adjuvante básico para o câncer de cólon. Com a possibilidade de purificar moléculas recombinantes em grande escala, combinações de quimioterapia com agentes específicos têm sido estudadas com maior frequência abrindo as fronteiras no tratamento do câncer colorretal. A citocina mais bem estudada, sem dúvida, é o interferon alfa, tanto como agente isolado quanto em combinação com drogas citotóxicas (Wadler S, 1993).

Na clínica, combinações de 5-fluorouracil e interferon alfa têm atividade em câncer colorretal avançado, câncer de esôfago e câncer de bexiga. Estudos farmacocinéticos têm mostrado que o tratamento com interferon resulta em diminuição do clearance e aumento plasmático do 5-fluorouracil. Além disso, estudos bioquímicos detalhados demonstraram que o interferon aumenta o anabolismo do 5-fluorouracil por aumentar a expressão da enzima timidina fosforilase, inibindo a resistência ao 5-fluorouracil e diminuindo a tradução da enzima alvo, a timidilato sintetase.

A principal falha ao tratamento com 5-fluorouracil é, sem dúvida, a resistência das células do tumor à droga. A resistência as fluoropirimidinas têm sido atribuída a várias alterações no metabolismo celular submetidos a estes agentes. O nível intracelular de timidilato sintetase têm sido associado à sensibilidade à droga em sistemas "in vitro". Recentes evidências clínicas, usando-se a combinação de 5-fluorouracil com ácido folínico, sugerem que a timidilato sintetase é, clinicamente, alvo importante para quimioterapia e que a capacidade de inibição desta enzima está associada ao prognóstico do paciente (Allegra C, 1992).

Dados experimentais mostram que a exposição ao 5-fluorouracil resulta em expressão 3 a 4 vezes maior da timidilato sintetase em sistemas “in vitro” obtidos de espécimes de tumores de pacientes. A demonstração de que os níveis de timidilato sintetase aumentam enquanto o mRNA da timidilato sintetase permanece estável, com exposição da célula ao 5-fluorouracil, sugere que a expressão da timidilato sintetase é controlada após a transcrição. Alguns experimentos usando [35S]metionina, demonstraram um aumento na síntese de proteína sem mudança na meia vida da timidilato sintetase, consistente com a regulação da expressão da timidilato sintetase com eficiente tradução. Ainda este mesmo trabalho “in vitro” mostrou que a eficiente tradução em humanos do mRNA da timidilato sintetase foi negativamente regulada. Assim sendo, o efeito inibitório da timidilato sintetase foi dependente da presença da enzima e do substrato fisiológico ou fluorouridinamono-fosfato (FdUMP). Experimentos em gel confirmam a interação específica da timidilato sintetase humana com o seu mRNA. A enorme e aguda expressão da timidilato sintetase associada à exposição das células ao 5-fluorouracil parece ser um mecanismo de resistência ao 5-fluorouracil clinicamente relevante.

Este trabalho se propôs a estudar “in vitro” as possibilidades terapêuticas para os tumores colorretais, empregando 10 diferentes linhagens de tumores humanos colorretais, incluindo a avaliação da citotoxicidade do 5-fluorouracil e de suas combinações aos agentes biomoduladores dando ênfase, principalmente, à introdução da interleucina-2 como possível droga sinérgica à conhecida combinação de 5-fluorouracil e interferon alfa (Wadler S, 1990), além de avaliar a ação do 5-fluorouracil como radiosensibilizador na tentativa de abrir novos caminhos no tratamento do câncer colorretal avançado.

Apesar do IC₅₀ para o citotóxico 5-fluorouracil nas células originárias de tumores colorretais ter sido definido como próximo de 2.5 uM nestes experimentos, compatíveis com a literatura (Aschele, 1992), vários fatores influenciaram nos testes de citotoxicidade. Era muito importante realizar o estudo com a cultura na fase S de crescimento logarítmico, pois as fases de

menor duplicação celular, mais quiescentes por estarem ainda se readaptando a cultura depois do congelamento, ou por terem atingido confluência suficiente para sofrerem a reação de "inibição de contato", apresentam maior número de células nas fases resistentes aos antimetabólicos como o 5-fluorouracil (como por exemplo G0). O problema com algumas linhagens como COLO201 e SW48 é que parte significativa da população celular cresce flutuando no meio de cultura, tornando muito difícil a definição da sua fase de crescimento logarítmico. Como se pode visualizar na tabela 3, estas são exatamente as linhagens que fogem um pouco dos padrões de citotoxicidade para as células de tumores coloretais. A grande variação do IC₅₀ que detectamos entre as várias repetições dos experimentos justifica o grande erro encontrado para estas linhagens.

A adição diária de 5-fluorouracil às culturas das linhagens WiDr, HCT8, e HCT116 não mostrou efeito acumulativo com aumento do efeito citotóxico, assim como o acréscimo de timidina à cultura de WiDr e HCT8 não mudou os IC₅₀ destas linhagens. Levando-se em conta que as doses de timidina utilizadas foram suficientes de acordo com a experiência prévia do "Biomolecular Childrens' Mercy Laboratories", podemos deduzir que além do bloqueio da enzima alvo, timidilato sintetase, existem outros mecanismos de ação do 5-fluorouracil não dependente da enzima nas linhagens citadas. A adição da timidina permitiria ultrapassar o bloqueio imposto pelo 5-fluorouracil e tal efeito seria detectado, se ocorresse, como um aumento no IC₅₀ indicando uma maior resistência à ação do antimetabólito. É provável que o bloqueio enzimático nestas linhagens celulares seja menos importante. Por outro lado, a não resposta à maior dose de 5-fluorouracil (dose diária) pode ser vista como uma situação diferente da observada na clínica, onde os trabalhos demonstram uma maior eficácia nos regimes de infusão contínua, pois aqui não ocorre a metabolização do citostático por todo o organismo, sua metabolização e ação estão restritas às células tumorais, sua meia vida é prolongada e todas as possíveis vias metabólicas já estão bloqueadas, não havendo melhora da ação citotóxica à repetição da dose diariamente. Outro ponto que vale discutir é a demonstração de que algumas células de câncer de cólon humano são

capazes de expressar alguma diferenciação como células epiteliais normais. Dados experimentais sugerem que estas células, em particular, são espontaneamente resistentes e adaptadas à droga citotóxica. Estes conceitos de diferenciação são baseados por observações feitas com linhagens de células em cultura, Caco-2 e HT-29 (Zweibaum A, 1993) e podem ser a justificativa para pouca resposta e IC_{50} elevados em algumas linhagens usadas como SW48 e Colo201.

Para o modificador de resposta biológica, interferon alfa, o comportamento celular variou mais, não sendo possível definir um IC_{50} das linhagens com exceção da linhagem LOVO onde seu valor foi de 20.000 UI/ml. A linhagem Sw403 demonstrou, inclusive, uma tendência ao estímulo da divisão celular com aumento da sobrevivência nas doses mais altas testadas (acima de 10.000 UI/ml). As linhagens HTC116 e COLO201 e HCT8 não tiveram suas curvas alteradas pelo IFN, enquanto as WiDr e SW48 tiveram discreta reação de inibição de crescimento com doses acima de 5.000 UI/ml.

A interleucina-2 isolada não modificou as curvas das linhagens COLO201, WiDr, HCT116 e houve tendência ao estímulo de crescimento da cultura nas linhagens HCT8, SW48, SW403. A linhagem LOVO demonstrou uma fase de crescimento estimulado entre as doses de 100 e 5.000 UI/ml, sendo que em doses mais elevadas detectamos uma discreta inibição do crescimento, não se chegando ao IC_{50} até a dose máxima testada de 100.000UI/ml. A impressão derivada da experiência clínica de que a interleucina-2 teria ação citotóxica independente do sistema imunológico não foi demonstrada nestes experimentos, se levarmos em consideração que a dosagem sérica durante uma infusão de 24hs de 9 milhões UI em adulto jovem com 5 litros de sangue não deve ultrapassar 1.800 UI/ml. Tal efeito talvez ocorra como na linhagem LOVO, mas em doses inviáveis para o uso clínico (100.000 UI/ml).

Apesar dos experimentos realizados não terem permitido identificar os mecanismos de ação, pois para tal não foram desenhados, foi possível escolher as doses ideais para

cada linhagem celular na associação de agentes terapêuticos, de modo a evitar doses citotóxicas, por si só, dos modificadores de resposta biológica.

Ficou bem claro, nos experimentos, que as citoquinas estudadas não têm efeito citotóxico direto nas doses e condições usadas e nas linhagens de câncer de cólon que foram utilizadas, exceto a linhagem LoVo como mostra a figura 27, que mostra uma ação citotóxica importante ao alfa interferon.

A associação do 5-fluorouracil com interferon alfa e com interleucina-2 na busca de possível sinergismo quanto à citotoxicidade por biomodulação dupla, foi frustrante em todas as linhagens estudadas.

A linhagem COLO201, devido a suas peculiaridades de crescimento, apresentou curvas que não permitiram conclusões sobre a ação de cada agente terapêutico.

Este estudo demonstrou que o sinergismo do interferon alfa e 5-fluorouracil é seletivo a algumas linhagens celulares de câncer de cólon humano, como WiDr, sendo dose dependentes, mas outras linhagens HCT116, SW48 e LoVo mostraram uma tendência a maior resistência ao 5-fluorouracil quando adicionava-se o interferon alfa. O mecanismo de interação do 5-fluorouracil e os interferons permanece desconhecido. A ausência de efeitos citocinéticos conhecidos do interferon alfa fala contra a possibilidade deste agente de elevar o efeito de citotoxicidade do 5-fluorouracil por aumento da proporção de células do tumor em fase S, assim tornando-as acessíveis à ação do 5-fluorouracil no ciclo celular. Todavia, é possível que efeitos citocinéticos tardios possam exercer um papel importante na citotoxicidade do 5-fluorouracil. Dados recentes sugerem que o interferon alfa pode aumentar os níveis de metabólitos ativos do 5-fluorouracil, fluorodesoxiurilato, 10 vezes nas células HL-60 (Elias L, 1989). Assim, é aceitável que o interferon alfa possa alterar o anabolismo do 5-fluorouracil, resultando em mais uma via de inibição de sua enzima alvo, a timidilato sintetase.

A interleucina-2 isolada não mostrou em nenhuma das linhagens estudadas, uma ação citotóxica direta, não sendo possível calcular o seu IC₅₀.

A combinação de interleucina-2 mais fluorouracil mostrou um intenso sinergismo nas linhagens HCT8, LoVo e Colo201 (3 de 7 linhagens testadas), aproximadamente 50% do valor do IC₅₀ do fluorouracil. Este resultado é extremamente relevante pois abre a possibilidade de modulação do 5-fluorouracil pela interleucina-2 em níveis superiores ao interferon alfa. Este estudo demonstrou que a interleucina-2 modula o efeito citotóxico fluorouracil, contra 3 de 7 linhagens de câncer de colon, de forma dose dependente. O inverso, que o 5-fluorouracil estivesse modulando o efeito citotóxico da interleucina-2 é menos provável, desde que este efeito foi encontrado na concentração da interleucina-2 não citotóxica com observada nos experimentos anteriores. A concentração do 5-fluorouracil foi de 10 a 40 vezes mais baixa que o pico de concentração clinicamente utilizada após administração de 750 mg/m² por “bolus” intravenoso. Analisando os resultados da combinação das três drogas nestas mesmas linhagens encontramos um resultado inesperado que foi um aumento da resistência a citotoxicidade. Algum mecanismo antagônico se faz possível diante destes resultados. Provavelmente algum antagonismo na modulação do alfa interferon e da interleucina-2. O mesmo não aconteceu com a linhagem WiDr que mostrou intenso sinergismo ao interferon alfa e 5-fluorouracil mantendo este sinergismo com a adição da interleucina-2.

Novos experimentos são necessários para melhor avaliar o mecanismo diferente da modulação do interferon e da interleucina-2 e buscar uma correlação biológica entre estas linhagens. O mecanismo de modulação do interferon não é totalmente conhecido, mas pelas evidências destes experimentos é provável que o mecanismo de modulação da interleucina-2 não seja o mesmo que o do alfa interferon e que não são sinérgicos.

Vários são os fatores que dificultam o desenvolvimento de uma estratégia racional de associação dos modificadores de resposta biológica aos citostáticos convencionais. Entre estes

fatores podemos lembrar: desconhecimento do seu preciso mecanismo de ação, sua ação citotóxica relativamente fraca ou ausente, seu novo espectro de toxicidade, sua ampla faixa de dose com atividade biológica e uma ausência de correlação entre dose máxima tolerada e ótimo efeito terapêutico (Wadler, 1990). Somado a estes, está o fato de que os modificadores da resposta biológica parecem necessitar da expressão de receptores específicos na superfície da membrana celular, para ter sua ação completada; a expressão destes receptores varia com cada linhagem celular.

Na grande gama de linhagens celulares disponíveis, a literatura mostra uma ação sinérgica ou aditiva do 5-fluorouracil com os interferons (Wadler, 1990). Das linhagens humanas de adenocarcinoma de cólon só foram avaliadas as linhagens HT-29, SW-480, COLO 205 e KM12 na associação com 5 fluorouracil. O fato de só termos detectado efeito sinérgico na linhagem WiDr, dentre as sete testadas, vem demonstrar que um estudo mais amplo, envolvendo o maior número possível de linhagens de adenocarcinomas de cólon e reto se faz necessário para expandir o conhecimento atual sobre a citotoxicidade neste tipo celular e a associação de 5-fluorouracil com modificadores de resposta biológica. Vale lembrar ainda que, num tumor, existem variáveis absolutamente sem controle clínico que acabam formando uma população celular heterogênea com respostas diferentes às drogas expostas.

Na avaliação da radiosensibilidade com o emprego concomitante de 5-fluorouracil, o fato de as duas técnicas estudadas (ensaio clonogênico e sulforodamina) terem apresentado resultados equivalentes facilita em muito a realização de futuros estudos devido à maior simplicidade da técnica de SRB. Foi possível observar uma faixa média de D_{50} para todas as linhagens de adenocarcinomas de cólon e reto (entre 5 e 7 Gy) com duas exceções: LS 174T muito sensível e HT-29 mais resistente. Pelos dados fornecidos pelo ATCC (American Tissue Cell Culture) verificamos que a linhagem HT-29 provém de tumor adenocarcinomatoso

bem/moderadamente diferenciado, fato que poderia explicar seu comportamento diante da irradiação.

As concentrações de 5- fluorouracil foram escolhidas dentro da faixa de citotoxicidade mínima, de tal forma que sua adição, por si só, não alterasse os resultados. É possível que estas concentrações estejam muito aquém das alcançadas nos protocolos clínicos de tratamentos combinando radioterapia e 5-fluorouracil onde se detectou um sinergismo. O tempo da irradiação em relação à administração da quimioterapia e à maneira de aplicação da mesma também diverge pois, nos estudos clínicos, o 5-fluorouracil é administrado após o início da radioterapia e feito por "bolus" uma vez por semana enquanto na cultura de tecido ambas as terapias foram aplicadas simultaneamente, sendo o citostático adicionado à cultura, de forma contínua, por 4 dias. A literatura têm demonstrado que o "timing", ou seja, a maneira de se combinarem os tempos dos diversos tratamentos nas associações de drogas (modificadores da resposta biológica e citostáticos) pode alterar em muito o resultado final. Apesar de não termos um estudo definitivo no caso da associação de radioterapia com 5-fluorouracil nos adenocarcinomas de cólon e reto, esta passa a ser uma suposição razoável para futuros estudos.

6. Conclusões

Novas opções de tratamento para o câncer colorretal são possíveis combinando imunoterapia e quimioterapia quando avaliados “in vitro” e, seguramente podemos afirmar que:

- O 5-fluorouracil é uma droga ativa contra linhagens celulares de câncer de colon na dose correspondente a utilização clínica.
- O alfa interferon isoladamente tem pouca ação de citotoxicidade às linhagens celulares de câncer de colon, porém modula positivamente o 5-fluorouracil e, pode ser utilizado em trabalhos clínicos tipo fase I/II.
- A interleucina-2 isoladamente não tem ação de citotoxicidade porém modula positivamente o 5-fluorouracil de maneira intensa, provavelmente mais que o próprio alfa interferon e, esta combinação deve ser estudada “in vivo”.
- O mecanismo de modulação do alfa interferon é diferente da interleucina-2 e, provavelmente antagonicos. A combinação de 5-fluorouracil, alfa interferon e interleucina-2 não apresentou citotoxicidade maior que do 5-fluorouracil isolado.
- Não ficou provado que o 5-fluorouracil na dose e nas linhagens celulares utilizadas possa ser um radiosensibilizador muito efetivo.

7. Sumário

O câncer colorretal é uma doença muito freqüente. Estima-se que nos Estados Unidos da América 11.500 novos casos ocorram em 1992 e que 51.000 pessoas morreram em consequência a esta neoplasia. Muitos progressos tem sido realizado no campo da gênese desta neoplasia. Estudos genéticos tem propostos modelo seqüencial de eventos moleculares genéticos coincidentes com o desenvolvimento e progressão do câncer colorretal. O resultado destes estudos é que num futuro próximo poderemos prever com segurança como vão evoluir os pacientes portadores desta neoplasia. Apesar da evolução no diagnóstico precoce, no entendimento da gênese da neoplasia, no conhecimento dos fatores prognósticos, a taxa de sobrevida obtida com o tratamento cirúrgico não mudou significativamente nos últimos 40 anos. 38% de todos os pacientes com câncer de colon que são operados tem doença metastática em linfonodos regionais; 21% tem metastases à distância e não mais que 20 a 30% destes sobrevivem a 5 anos. A recidiva do tumor é a outra causa de óbito, sendo que 2/3 ocorrem nos 2 primeiros anos após a cirurgia e 90% dentro dos primeiros 5 anos. Estes números significam que a aproximadamente 55% dos pacientes com câncer colorretal morrem em consequência à neoplasia com doença disseminada. O tratamento sistêmico é baseado em uma única droga, 5-fluorouracil, há mais de 40 anos. Avanços tem sido realizado no tratamento adjuvante do câncer de colon estágio C de Dukes com a combinação de 5-fluorouracil e levamisole. Trabalhos clínicos confirmam um decréscimo no número de recidivas após a cirurgia neste grupo de pacientes, enquanto os pacientes com doença metastática respondem ao 5-fluorouracil clássico em menos de 10% das vezes. A radioterapia tem sua indicação restrita aos pacientes portadores de câncer de reto com alto risco de disseminação locoregional. Sua atuação não tem mudado a sobrevida, mas tem valor na redução das recidivas locais. Justifica-se plenamente a busca de novas opções de tratamento para pacientes avançados portadores de neoplasia colorectal. Os modificadores da resposta biológica são novos agentes com

capacidade de lise tumoral desenvolvidos nos últimos anos. A maneira de atuação destas substâncias ainda não é totalmente conhecida. Além de uma possível citotoxicidade direta, atua estimulando o sistema imunológico e proporciona sinergismo na citotoxicidade de alguns quimioterápicos. O interferon alfa tem sido empregado no tratamento de várias neoplasias hematológicas e em alguns tumores sólidos. Sua combinação com 5-fluorouracil tem mostrado sinergismo tanto “in vitro” quanto em trabalhos clínicos fase I e II em câncer colorretal avançado, com índice de resposta que variam de 35 a 70%. A interleucina-2 é uma glicoproteína produzida por linfócitos T tem a capacidade de ativação das células “NK” e, também, das células T citotóxicas. Trabalhos clínicos fase I, para tratar câncer colorretal avançado tem sido realizado porém, com respostas ocasionais sem impacto na sobrevida.

Este trabalho tem como objetivo estudar “in vitro” a combinação do quimioterápico antimetabólito 5-fluorouracil com interferon alfa para confirmar seu sinergismo e adicionar interleucina-2 como provável agente sinérgico realizando dupla modulação na tentativa de aumentar a citotoxicidade. Além disto, estudar o possível sinergismo entre 5-fluorouracil e a radioterapia “in vitro”. Para o estudo com interferon, interleucina e 5-fluorouracil foram utilizadas sete linhagens celulares de câncer colorretal : SW403, WiDr, HCT1116, HCT8, SW48, LoVo e Colo201. O teste de citotoxicidade empregado foi o MTT. O IC_{50} do 5-FU encontrado foi , em média, 2,5 μ M. O interferon alfa apresentou citotoxicidade muito variável não sendo possível definir o IC_{50} a não ser para a linhagem LoVo onde seu valor foi de 20.000 UI/ml. A interleucina-2 não mostrou citotoxicidade direta às linhagens celulares estudadas. A interação sinérgica do 5-fluorouracil e interferon foi vista em apenas uma linhagem : WiDr ($IC_{50} = 2.11 / 1.1$). A interação sinérgica entre 5-fluorouracil e IL-2 foi vista em três linhagens : HCT8($IC_{50} = 2.45/1.3$), LoVo ($IC_{50} = 2.25/1.2$) e Colo201 ($IC_{50} = 10.7/5.2$). Não houve interação sinérgica quando foi combinado 5-fluorouracil, interferon alfa e interleucina-2, nas linhagens celulares estudadas.

No estudo da radiosensibilidade foram utilizadas os testes de citotoxicidade por Ensaio Clonogênico e o SRB e as seguintes linhagens celulares : LS174T, WiDr, HT29, SW1398, LoVo, SW116 e Colo205. O teste de radiosensibilidade pelo SRB mostrou um D0 de aproximadamente 5 Gy sendo as linhagens mais radiosensíveis a LoVo (4 Gy) e LS174T (2 Gy). O ensaio clonogênico foi realizado mostrou que a linhagem LS174T foi a mais sensível com um D0 igual 1.5 Gy. Utilizando-se doses citotóxicas mínimas do 5-FU (0.01mg/ml a 0.05mg/ml) para testar sua radiosensibilidade nas linhagens celulares, o resultado foi que em ambos os testes não houve mudança significativa na radiosensibilidade.

Concluimos que as linhagens celulares de câncer colorretal são muito heterogêneas com relação a resposta a imunomodulação e a radiosensibilidade "in vitro". O sinergismo entre 5-fluorouracil e as citoquinas são dose dependentes e existem tanto com alfa interferon quanto com a interleucina-2, porém não existe sinergismo para dupla modulação. O mecanismo de modulação do alfa interferon é diferente do mecanismo da interleucina-2 e provavelmente antagônicos.

8. Summary

Colorectal cancer is one of the most frequent tumor in adults. Despite all knowledge on molecular biology, risk factors and prevention of these tumors, survivals with surgery haven't changed during last 40 years. 38% of patients presenting colon cancers have positive lymphonods at time of surgery. About 55% of them will dye of disseminated disease. Systemic treatment is based on 5-Fluouracil monochemotherapy for more than 40 years. Some better results are possible on stage Dukes C by combining 5-FU with levamisole.

Radiotherapy reduces local recurrence but does not change overall survival

This study evaluated combinations of 5-FU with Alfa interferon and interleukin-2, biological responses modifiers, and also the impact of adding 5-FU to treatment with irradiation. We used 10 colon cell lines with MTT, SRB and clonogenic assays. We could detect synergism in one cell line (WiDr) with association of 5-FU with Alfa Interferon. and in 3 cell lines (LoVo, Colo 201, HCT8) with 5-FU plus interleukin-2. We could not detect any synergism by combining the 3 drugs in same experiment in any cell line.

All cell lines did not present any improved response to radiotherapy by adding 5-Fluorouracil.

7.Referências

Allegra C, Chu E. Autoregulatory translational control of thymidylate synthase (TS). *Ann Ocol* 3(Suppl 1):162, 1992

Alley, M. C., Scudiero, D. A., and Monks, A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48: 589-601, 1988.

American Joint Committee on Cancer: Manual for Staging of Cancer, 2nd ed Philadelphia, JB Lippincott, 1983.

Ansfield F, Schroeder JM, Currier AR: Five years experience with 5-fluorouracil. *J Am Med Assoc* 181:295-299, 1962.

Aobo K, Pedersen H, Kjaer M: Carcinoembryonic antigen (CEA) and alkaline phosphatase in progressive colorectal cancer with special reference to patient survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22:211-217, 1986.

Appel MF, Spjut HJ, Estroda RG: The significance of villous component in colonic polyps. *Am J Surg* 134:770-771, 1977.

Arnaud JP, Buyse M, Nordlinger B, e cols. Adjuvant therapy of poor prognosis colon cancer with levamisole: results of EORTC double-blind randomized clinical trial. *Br J Surg.*;76:284-289, 1989

Baron S, Merigan TC, McKerlie ML. Effect of crude and purified interferon on the growth of infected cells in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:50, 1966

Beahrs OH, Sanfelippo PM: Factors in the prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer* 28:213-217, 1971.

Bedikian AY, Valdivieso M, Mavligit GM, e cols. Sequential chemoimmunotherapy of colorectal cancer. *cancer*. 42:2169-2176, 1978

Belardelli F, Gresser I, Maury C, Maunoury M-T. Antitumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant friend leukemia cells. *Int J Cancer* 30:813, 1982

Bonnem, E. M., and Oldham, R.K. Gamma Interferon: Physiology and speculation on its role in medicine. *J.Biol.Response Modif.*, 6: 275-301, 1987

Borden EC, Davis TE, Crowley JJ, e cols. Interim analysis of trial of levamisole and 5-fluorouracil in metastatic colorectal carcinoma. In: Terry WD, Rosenberg SA, eds. *Immunotherapy of Human Cancer*. New York, NY: Excerpta Medica, 231-235, 1982

Brouty-Boye D. Inhibitory effects of interferons on cell multiplication. In: Pick E, ed. *Lymphokines*, vol. 1. New York: Academic Press; 99. 1980

Brown CE, Warren S: Visceral metastases from rectal carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 66:611-621, 1938.

Bruce WR, Dion PW: Studies relating to a fecal mutagen. *Am J Clin Nutr* 33:2511-2512, 1980.

Bruckner H, Cohen J: MTX, 5-FU trials in gastrointestinal and other cancers. *Semin Oncol* 10:32-39, 1983.

Bulow S: Colorectal cancer in Patients less than 40 years old in Denmark, 1943-1967. *Dis Colon Rectum* 23:327-336, 1980.

Burkitt DP, Walker ARP, Painter NS: Dietary fiber and disease. *JAMA* 229:1063-1074, 1974.

Buroker TR, Moertel CG, Fleming TR, et cols. A controlled evaluation of recent approaches to biochemical modulation or enhancement of 5-fluorouracil therapy in colorectal carcinoma. *J Clin Oncol.*; 3:1624-1631, 1985

Buyse M, Zeleniuch-Jacquotte A, Chalmers TC. Adjuvant therapy of colon cancer: why we still don't know. *JAMA.*; 259:3571-3578, 1988

Cancer Facts and Figure; American Cancer Society, 1992.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdor, A. F., Minna, J. D., and Mitchell J. B. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47: 936-942, 1987.

Carter SK: Large Bowel Cancer: The current status of treatment. *JNCI* 56:3-10, 1976.

Chapuis PH, Dent OF, Fisher R et al: A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 72:698-702, 1985.

Clark, J. W., and Longo, D. L. Interferons in cancer therapy. *Cancer Principles Practice Oncol. Updates*, 1 (No. 4): 1-16, 1987.

Cole PP: The intramural spread of rectum carcinoma. *Br Med J* 1:431-433, 1913
colon and rectum. *Cancer* 36:2251-2270, 1975.

Copeland EM, Miller LD, Jones RS: Prognostic factors in carcinoma of the colon and rectum. *Cancer Chemother, Pharmacol.*, 10:161-166, 1983.

Corman J, Arnoux R, Peloquin A et al: Blood transfusion and survival after colectomy for colorectal cancer. *Can J Surg* 29:325-329, 1986.

Creekmores SP, Harris Je, Ellis TM, cols. A phase I clinical trial of recombinant interleukin-2 by periodic 24-hour intravenous infusions. *J Clin Oncol* 7:276-284, 1989

Der CJ, Cooper GM: Altered gene products are associated with activation of cellular ras genes in human lung and colon cancer. *Cell* 32:201-208, 1983

Dukes CE, Bussey HJR: The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12:309-320, 1958.

Dukes CE: Cancer of the rectum: An analysis of 1000 cases. J Pathol Bacteriol 50:527-539, 1940.

Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. J Pathol 35:323-332, 1932.

Dwight RW, Higgins GA, Keehn RJ: Factors influencing survival after resection in cancer of the colon and rectum. Am J Surg 117:512-522, 1969.

Dwight RW, Humphrey EW, Higgins GA e cols. FUdR as an adjuvant to surgery in cancer of the large bowel. J Surg Oncol. 5:243-249, 1973

Edwards FC, Truelove SC: The course and prognosis of ulcerative colitis. Gut 5:1-22, 1964.

Eisemberg B, DeCosse JJ, Harford F et al: Carcinoma of the colon and rectum: The natural history reviewed in 1704 patients. Cancer 49:1131-1134, 1982.

Elias L, Sandoval JM. Interferon effects upon fluorouracil metabolism by HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun. 163:867-874, 1989.

Fielding LP, Phillips RKS, Fry JS et al: Prediction of outcome after curative resection for large bowel cancer. Lancet 2:904-907, 1986.

Foulds L: The natural history of cancer. J Chron Dis 8:2-37, 1958

Gabriel WB, Dukes C, Bussey HJR: Lymphatic spread in cancer of the rectum. *Br J Surg* 23:395-413, 1935.

Gallick GE, Kurzrock R, Kloetzer WS et al: Expression of p21ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1795-1799, 1985.

Gardner EJ: Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am J Hum Genet* 14:376-390, 1962.

Gastrointestinal Tumor Study Groups. Adjuvant therapy of colon cancer: results of a prospectively randomized trial. *N Engl J Med.* 310:737-743, 1984

Gilbert SG: Symptomatic local tumor failure following abdomino-perineal resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 4:801-807, 1978.

Godwin JD, Brown CC: Some prognostic factors in survival of patients with cancer of the cancer and rectum. *J Chronic Dis* 28:441-454, 1975.

Goslin R, Steele G, MacIntyre et al: The use of pre-operative plasma CEA levels for stratification of patients after curative resection of colorectal cancer. *Ann Surg* 192:747-751, 1980.

Grage TB, Moss SE. Adjuvant chemotherapy in cancer of the colon and rectum: demonstration of effectiveness of prolonged 5-FU chemotherapy in a prospective controlled randomized trial. *Surg Clin North Am.* 61:1321-1329, 1981.

Grem JL, Hoth DF, Hamilton M, e cols. Overview of current status and future directions of clinical trials with 5-fluorouracil in combination with folinic acid. *Cancer Treat Rep* 71:1249-1264, 1987.

Grinnell RS: The lymphatic and venous spread of carcinoma of the rectum. *Ann Surg* 116:200-215, 1942.

Hamilton SR: Colorectal carcinoma in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 89:398-407, 1985.

Harmer MH(ed): *TNM Classification of Malignant Tumours*, pp 69-76. Geneva, International Union Against Cancer [Union Internationale Contrele Cancer], 1978

Heald RJ, Bussey HJR: Clinical experience at St. Mark's Hospital with multiple synchronous cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 18:6, 1975.

Hermanek P: Evolution and pathology of rectal cancer. *World J Surg* 6:502-509, 1982.

Hicks NJ, Morris AG, Burke DC. Partial reversion of the transformed phenotype of murine sarcoma virus-transformed cells in the presence of interferon: A possible mechanism for the anti-tumor effect of interferon. *J Cell Sci* 49:225, 1981

Higgins GA, Amadeo JH, McElhinney J e cols. Efficacy of prolonged intermittent therapy with combined 5-fluorouracil and me-CCNU following resection for carcinomas of the large bowel. *Cancer* 53:1-8, 1984

Higgins GA, Lee LE, Dwight RW e cols. The case for adjuvant 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Clin Trials* 1:35-41, 1978

Hoerner MT: Carcinoma of the colon and rectum in persons under twenty years of age. *Am J Surg* 96:47-53, 1958.

Hoff G, Foerster A, Vatn MH, e cols: Epidemiology of polyps in the rectum and colon. Recovery and evaluation of unresected polyps 2 years after detection. *Scand j Gastroenterol* 21:853-862, 1986

Hollingsworth RE, Lee WH: Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research, *J Natl Cancer Inst* 83:91-96, 1991

Huberman M, Bering H, Tessitore J, e cols. 5-fluorouracil plus recombinant alpha interferon (Roferon A) in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:116, 1990

Imai K, Ng A-K, Glassy MC, Ferrone S. Differential effect of interferon on the expression of tumor-associated antigens and histocompatibility antigens on human melanoma cells: Relationship to susceptibility to immune lysis mediated by monoclonal antibodies. *J Immunol* 127:505, 1981

Inoue, M., and Tan, Y.H. Enhancement of actinomycin D and cis-diaminedichloroplatinum(II)-induced killing of human fibroblasts by human beta-interferon. *Cancer Res.*, 43:5484-5488, 1992

Instituto Nacional de Cancer; Ministério da Saúde do Brasil, 1991.

Jackman RJ, Beahrs OH: Tumors of the Large Bowel. Philadelphia, WB Saunders, 1969.

Jassen PA. The levamisole story. *Prog Drug Res.* 20:347-383, 1976.

Jeghers H, McKusick VA, Katz KH: Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits. *N Engl J Med* 241: 993-1005, 1949.

Katzka I, Body RS, Morris E. et al: Assessment of colorectal cancer risk in patients with ulcerative colitis. Experience from a private practice. *Gastroenterology* 85:22-29, 1983.

Kelley WE Jr, Brown PW, Lawrence W Jr et al: Penetrating, obstructing, and perforating carcinomas of the colon and rectum. *Arch Surg* 116:381-384, 1981.

Kemeny N, Kelson D, Derby S, et cols. Combination of 5-fluorouracil plus recombinant alpha interferon in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:109, 1990.

Kewenter J, Ahman H, Hulten L: Cancer risk in extensive colitis. *Ann Surg* 188:828, 1978.

Kim US, Papatestas AE, Aufses AH Jr: Prognostic significance of peripheral lymphocytic counts and carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 8:257-262, 1976.

Knudson AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823, 1971

Koch M, McPherson TA, Egedahl RD: Effect of sex and reproductive history on the survival of patients with colorectal cancer. *J Chronic Dis* 35:69-72, 1982.

Kussin SZ, Lipkin M, Winawer SJ: Inherited colon cancer: Clinical implication. *Am J Gastroenterol* 72:443-457, 1979.

Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, et cols. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. *J Clin Oncol.* 7:1447-1456, 1989

Lee EY: Tumor suppressor genes: a new era for molecular genetic studies of cancer. *Breast Cancer Res Treat* 19:3-13, 1991;

Liao S-K, Kwong PC, Khosravi M, Dent PB. Enhanced expression of melanoma cells by interferon. *J Natl Cancer Inst* 68:19, 1981

Lipkin M: Phase 1 and Phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer. *Cancer* 34:878-888, 1974.

LoGerfo P, Herter FP: Carcinoembryonic antigen and prognosis in patient with colon cancer. *Ann Surg* 181:81-84, 1975.

Lynch HT, Lynch PM: Heredity and gastrointestinal tract cancer. In Lipkin M, Good RA (eds): *Gastrointestinal Tract Cancer*. New York, Plenum Press, 1978.

MacDougall PM: The cancer risk in ulcerative colitis. *Lancet* 2:655-658, 1966.

Machiavelli M, Leone B, Romero A, e cols: Advanced colorectal carcinoma: A prospective randomized trial of sequential methotrexate + 5-fluorouracil vs 5FU alone. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:102, 1990.

Mansour EG, MacIntyre JW, Johnson R, e cols. Adjuvant studies in colorectal carcinoma: experience of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) preliminary report. In: Gerald A, ed. *Progress and Prospective in the treatment of Gastrointestinal Tumors*. New York, NY: Pergamon Press; 68-75, 1981

Marsh JC, Bertino JR, Rome LS e cols. Sequential methotrexate, 5-fluorouracil and leucovorin in metastatic colorectal cancer: A controlled comparison of two intervals between drug administration. *Proc Am Soc Clin Oncol* 8:103, 1989.

Marshall CJ: Tumor suppressor genes. *Cell* 64:313-326, 1991

McDermitt FT, Hughes ESR, Pihl E et al: Comparative results of surgical management of single carcinoma of the colon and rectum: A serie of 1939 patients managed by on surgeon. *Br J Surg* 68:850-855, 1981.

McKusick VA: Genetics and large-bowel cancer. *Am J Dig Dis* 19:954-957, 1974.

Mello J, Struthers L, Turner R et al: Multivariate analysis as aides to diagnosis and assessment of prognosis in gastrointestinal cancer *BR J Cancer* 48:341-348, 1983.

Minton JP, Colon Cancer: Special Surgical Considerations. *Cancer* 50: 2624-2530, 1982.

Mir-Modjlessi SH, Farmer RG, Easley KA et al: Colorectal and extracolonic malignancy in ulcerative colitis. *Cancer* 58:1569-74, 1986.

Mittelman A, Savona S, Gafney E et cols. Treatment of patients with advanced cancer using multiple long-term cultures lymphokine-activated killer (LAK) cell infusions and recombinant human interleukin-2. *J Biol Response Mod* 8:468-478, 1989

Miyosshi, T., Ogawa, S., Kanamori, T., Nobuhara, M., and Namba, M. Interferon potentiates cytotoxic effects of 5-fluorouracil on cell proliferation of established human cell lines originating from neoplastic tissue. *Cancer Lett.*, 17:239-247, 1983.

Miyosshi, T., Ogawa, S., Kanamori, T., Nobuhara, M., and Namba, M. Interferon potentiates cytotoxic effects of 5-fluorouracil on cell proliferation of established human cell lines originating from neoplastic tissue. *Cancer Lett.*, 17:239-247, 1983.

Modan B: Dietary role in cancer etiology. *Cancer* 40:1887-1891, 1977.

Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL et al: The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 58:603-610, 1986.

Moertel CG, Reitemeyer RJ: *Advanced Gastrointestinal Cancer: Clinical Management and Chemotherapy*. New York, Harper & Row, 1969.

Moertel CG: Clinical management of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer* 36:675, 1975.

Moertel C, Fleming T, MacDonald J, e cols. The Intergroup study of fluorouracil (5-fu) plus levamisole (lev) and lev alone as adjuvant therapy for stage C colon cancer. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*, 11:A457, 1992.

Moertel CG, Fleming TR, MacDonald JS e cols. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 322:352-358, 1990.

Moran RG. Leucovorin enhancement of the effects of the fluoropyrimidines on thymidylate synthetase. *Cancer* 63:1008-1012, 1989.

Morson BC: Genesis of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol* 5(3):505-525, 1976.

Morson BC: Cancer and ulcerative colitis. *Gut* 7:425-426, 1966.

Morson BC: Evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 34:845-849, 1974.

Muto T, Bussey HJR, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36:2251-2276, 1975

Namba, M., Miyoshi, T., Kanamori, T., Nobuhara, M., Kimoto, T., and Ogawa, S. Combined effects of 5-fluorouracil and interferon on proliferation of human neoplastic cells culture. *Gann*, 73: 819-824, 1982.

Newland RC, Chapuis PH, Smyth EJ: The prognostic value of substaging colorectal carcinoma: A prognostic study of 1117 cases with standardized pathology. *Cancer* 60:852-857, 1987.

Odone V, Chang L, Caces J et al: The natural history of colorectal carcinoma in adolescents. *Cancer* 49:1716-1720, 1982.

Ohman U: Colorectal carcinoma in patients with ulcerative colitis. *Am J Surg* 144:344-349, 1982.

Oldfield MC: The association of familial polyposis of the colon with multiple sebaceous cysts. *Br J Surg* 41:534-541, 1954.

Paciucci PA, Holland JF, Glidewell O, et cols. Recombinant interleukin-2 by continuous infusions and adoptive transfer of recombinant interleukin-2 activated cells in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 7:869-878, 1989.

Painter NS, Burkitt DP: Diverticular disease of the colon: A deficiency disease of western civilization. *Br Med J* 12:450-454, 1971.

Palmer S, Bakshi K: Diet, nutrition, and cancer: I. Interim dietary guidelines. *JNCI* 70:1151-1170, 1983.

Pazdur R, Abbruzzese J, Faintuch J, et cols. Phase II study of recombinant interferon alpha and 5-fluorouracil in patients with advanced colorectal carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:117, 1990

Pescatori M, Maria G, Beltrani B et al: Site, emergency, and duration of symptoms in the prognosis of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 25:33-40, 1982.

Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K.C., and Samuel, C. E. Interferons and their actions. In: C.S. Richardson, P.D. Boyer, I.B. Dawid, and A. Meister (eds.), *Annu. Rev. Biochem.*, 56:727-778, 1987.

Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, et cols: Biochemical modulation of fluorouracil: Evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7:1407-1418, 1989.

Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, et cols. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement in survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J clin Oncol.* 7:1407-1418, 1989

Prior P, Gyde SN, Macartney JC et al: Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut* 23:490-497, 1982.

Reid JD: Intestinal carcinoma in the Peutz-Jeghers syndrome. *JAMA* 229:883-834, 1974.

Renoux G. The general immunopharmacology of levamisole. *Drug.* 19:89-90, 1980

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et cols. A program report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N Eng J Med* 316:889-897, 1987.

Safford KL, Spebar MJ, Rosenthal D: Review of colorectal cancer in patients under age 40 years. *Am J Surg* 142:767-769, 1981.

Schottenfeld D, Berg JW, Vitsky B: Incidence of multiple primary cancers:II. Index cancers arising in the stomach and lower digestive system. *JNCI* 43:77-86, 1969.

Seefeld PH, Barger JA: The spread of carcinoma of the rectum: Invasion of lymphatics, veins and nerves. *Ann Surg* 118:76-90, 1943.

Sikora K, Chan S, Evan G et al:c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 59:1289-1295, 1987.

Simstein NL, Kovalcik PJ, Cross GH: Colorectal carcinoma in patients less than 40 years old. *Dis Colon Rectum* 2:169-171, 1978.

Spandilos DA, Kerr IB: Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer* 49:681-688, 1984.

Spratt JS Jr, Spjut HJ: Prevalence and prognostic of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma. *Cancer* 20:1976-1985, 1967.

Steele G Jr, Ellenberg S, Ramming K et al: CEA monitoring among patients in multi-institutional adjuvant G.I. therapy protocols. *Ann Surg* 196:162-169, 1982.

Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS et al: Prognostic indicators of colon tumors: The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 57:1866-1870, 1986

Sterans MW, Deddish MR, Quan SHQ et al: Preoperative reontgen therapy for cancer of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet* 138:584-586, 1974.

Stewart J, Evan G, Watson JV, Sikora K: Detection of the c-myc oncogene product in colonic polyps and carcinoma. *Br j Cancer* 53:1-6, 1986.

Sugarbaker PH, MacDonald JS, Gunderson LL: Colorectal Cancer. In *Cancer Principles and Practice of Oncology*, VT DeVita, S Hellman and SA Rosenberg (eds) Philadelphia: JB Lippincot, p 643, 1982

Tabuchi Y, Deguchi H, Imanishi K et al: Comparison of carcinoembryonic antigen levels between portal and peripheral blood in patients with colorectal cancer: Correlation with histophologic variables. *Cancer* 59:1283-1288, 1987.

Thar A, Hand PH, Wunderlich D et al: Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. *Nature* 311:562-565, 1984.

The Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group: Superiority of sequential methotrexate, fluorouracil, and leucovorin to fluorouracil alone in advanced asymptomatic colorectal carcinoma: A randomized trial. *J Clin Oncol* 7:1437-1446, 1989

Thomas WH, Larson RA, Wright HK et al: An analysis of patients with carcinoma of right colon. Surg Gynecol Obstet 127:313-318, 1968.

Trimpi HD, Bacon HE: Mucoid carcinoma of the rectum. Cancer 4:597-609, 1951.

Turot J, Despres JP, St.Pierre F: Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: Report of two cases. Dis Colon Rectum 2:465-68, 1959.

Tyring S, Klimpel G, Brysk M et cols. Eradication of cultured human melanoma cells by immune interferon and leukocytes. J Natl Cancer Inst 73:1067, 1984.

Ulin AW, Ehrlich EW: Current views related to management of large bowel obstruction caused by carcinoma of the colon. Am J surg 104:463-467, 1962.

Verhaegen H. Postoperative levamisole in colorectal cancer. In: Rainer H, ed. Immunotherapy of malignant Diseases. Stuttgart, Germany: Schattauer-Verlag 94-101, 1978.

Veterans Administration Adjuvant Cancer Chemotherapy Cooperative Group. The use of 5-fluorodeoxyuridine (FUDR) as a surgical adjuvant in carcinoma of stomach and colorectum. Arch Surg. 86:926, 1963

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et cols.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319:313-326, 1988

Volgeltein B, Fearon ER, Kern SE e cols. Allelotype of colorectal carcinoma. *Science* 244, 207-221, 1989

Wadler S, Sewartz EL, Goldman M e cols: Flupruracil and recombinant alfa-2a-interferon; An active regimen against advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7:1769-1775, 1989.

Wadler S. Clinical progress combining BRMs and anticancer agents against solid tumors. *Biological Response Modifiers, 2nd International Congress.* 84, 1993.

Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM et al: Pre-operative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Eng J Med* 299:448-451, 1978.

Weisbuger JH, Wynder EL: Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Important Advances in Oncology 1987*, pp 197-221. Philadelphia, JB Lippincott, 1987.

Weiss L, Grundmann E, Torhorst J et al: Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: An analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 150:195-203, 1986.

Welch CE, Burke JF: Carcinoma of the colon and rectum. *N Engl J Med* 266:211-219, 1962.

Wiggers T, Arends JW, Volovics A: Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum* 31:33-41, 1988.

Willet NC, MacMahon B: Diet and cancer - an overview. *N Engl J Med* 310:697-703, 1984.

Willett C, Tepper JE, Cohen A et al: obstructive and perforative colonic carcinoma: Patterns of failure. *J Clin Oncol* 3:379-384, 1985.

Winchester DP, Shull JH, Scanlon EF et al: A mass screening program for colorectal cancer using chemical testing for occult blood in the stool. *Cancer* 45:2955-2958, 1987

Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE et al: The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Duke B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg* 198:743-752, 1983.

Wolmark J. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol.* 11:1879-1887, 1993.

Wolmark N, Fisher B, Rockette H, et cols. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst.* 80:30-36, 1988.

Yalavarthi P, Murthy S, Budd GT, et cols: Phase I/II trial of 5-FU, leucovorin and rhuifn-alpha-2a in metastatic colorectal cancer: Possible decrease in myelosuppression. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:125,1990

Yamamoto, S., Tanaka, H., Kanamori, T., Nobuhara, M., and Namba, M. "in vitro" studies of cytotoxic effects of anticancer drugs by interferon on a human neoplastic cell line(HeLa). *Cancer Lett.*, 20:131-138, 1983.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Roop DR, et cols: Consequences of exposure to initiating levels of carcinogens in vitro and in vivo: altered differentiation and growth, mutations, and transformation. *Prog clin Biol Res* 298:127-135, 1989

Ziegler RG, Devesa SS, Fraumeni JF Jr: Epidemiology pattern of colorectal cancer. In DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Important Advances in Oncology* 1986, pp 209-232. Philadelphia, JB Lipincott, 1986

Zweibaum A. Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer. *Bull Acad Natl Med* 177(1):63-71,1993