

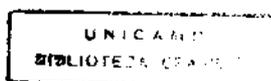
Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO "IN VIVO" E "IN VITRO" DA
RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS**

Ludmila Siqueira Medina da Cunha *12/03/94*

1994



12/03/94

Sempre temos sido nossos próprios precursores, e sempre o seremos. E tudo o que temos colhido e o que vamos colher não serão senão sementes para campos ainda não lavrados. Nós somos os campos e os lavradores, os colhedores e a colheita.

G. Khalil Gibran

Esta tese é dedicada com carinho: a meus pais, pelo apoio irrestrito e entusiasmo a cada pequena vitória alcançada. A meus filhos, pelas inúmeras vezes que ouviram: "agora tenho que trabalhar na tese" e por sua carinhosa compreensão. Ao Fernando, que mais do que esposo tem sido companheiro e amigo; por ter acreditado em mim e sem cujo incentivo contínuo este trabalho não teria sido concluído.

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP -
para obtenção do Título de Doutor em Medicina Interna**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Zollner 

Este Trabalho foi desenvolvido na Free University, Amsterdam, Holanda, sob a orientação do Prof. Dr. Herbert Pinedo e supervisão dos doutores Epic Boven (MD, PhD) e Hidde Haisma (PhD).

Indice

Abreviaturas	07
Introdução	12
Dados históricos sobre resistência as drogas antineoplásicas	13
Resistência a múltiplas drogas	15
Agentes reversores	23
Modelos para o estudo da MDR	25
Objetivos	27
Material e Métodos	29
Linhagens celulares	32
Cultura de tecido	33
Animais	34
Drogas	35
Xeno-enxertos	36
Anticorpos monoclonais	37
Imunocitoquímica	38
Teste de quimiosensibilidade	40
Quantificação celular da 170-Pgp	41
citometria de fluxo	41
teste de imunocompetição	41
Avaliação dos agentes reversores da MDR	43
avaliação "in vitro"	43
avaliação "in vivo"	43
Avaliação da radiosensibilidade das linhagens celulares	45
Emprego de anticorpos monoclonais ligados a radioisótopos	
para eliminação de clones celulares com fenótipo MDR	46
Estatística	48

Resultados	49
Avaliação do xeno-enxertos de BRO e BRO mdr1.1	51
histopatologia	51
comportamento biológico	53
avaliação da resistência a múltiplas drogas	
"in vivo"	54
Imunocitoquímica	59
Quimiosensibilidade	63
Quantificação celular da 170-Pgp	71
Avaliação dos agentes reversores da MDR	77
avaliação "in vitro"	77
avaliação "in vivo"	83
Avaliação da radiosensibilidade das linhagens celulares	88
Eliminação dos clones celulares com fenótipo MDR com	
anticorpos monoclonais ligados a radioisótopos	91
Discussão	95
Sumário e Conclusões	103
Summary	106
Bibliografia	108

Abreviaturas Utilizadas no Texto, Gráficos e Tabelas

A2780	linhagem celular estabelecida a partir de tumor ovariano humano
2780 AD	linhagem celular resistente estabelecida por exposição das células A2780 a doses crescentes de doxorubicina
B	Bound: fração dos radioisótopos ligados aos monoclonais que apresentou ligação específica com as células testadas.
B/F	Bound/Free: fração dos radioisótopos ligados aos monoclonais com ligação específica dividido pela porção que permaneceu livre, sem reação com as células testadas.
bep	bepiridil = Cordium
BRO	linhagem celular estabelecida a partir de metástase hepática de melanoma humano
BROmdr1.1	linhagem celular resistente criada por transfecção do gene humano MDR1 da resistência a múltiplas drogas nas células da linhagem BRO
BSA	bovine serum albumine: albumina sérica bovina
^{14}C	isótopo radioativo do carbono. Emite partícula beta -. Meia vida: 5760 anos.
cGy	centésima parte do Gray (Gy)
uCi	milésima parte do Ci (Curie), sendo esta, unidade de radioatividade equivalente a 3.7×10^{10} desintegrações por segundo
cpm	counts per minute: número de emissões radioativas da amostra testada por minuto

D ₀	dose de irradiação que causa uma redução da população celular irradiada para 37% da população inicial
dox	doxorubicina = Adriamicina
EDTA	sal dissódico de ácido etilenodiaminotetraacético
FACS	fluorescent activated cell sorter: citometria de fluxo
Gy	Gray: unidade de dose absorvida de irradiação = 1 J/kg
HPLC	high-performance liquid chromatography: Cromatografia líquida de alta resolução
¹²⁵ I	isótopo radioativo do Iodo. Energia média de 28 keV. Meia vida: 59 dias
¹³¹ I	isótopo radioativo do Iodo. Energia média de 364 keV. Meia vida: 8 dias
IC ₅₀	index of cytotoxicity 50: concentração de citostático com a qual se obtém a morte de 50% das células testadas
% ID/g	percentage of injected dose per gram: percentagem da dose injetada de conjugado radioativo por grama de peso do tecido em análise
i.p.	administração intra peritoneal
i.v.	administração intra venosa
LD ₅₀	letal dose 50 : dose de citostático com a qual ocorre a morte de 50% dos animais injetados

MDR	multidrug resistance: resistência a múltiplas drogas										
MTD	maximum tolerated dose: dose máxima tolerada, definida como a dose que causa a perda de 10% do peso inicial do animal na semana que sucede ao tratamento										
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolio. Composto que forma precipitado de cristais de cor violeta por redução do composto na presença de enzimas mitocondriais										
p	passagem: cada sucessivo transplante subcutâneo feito do tumor resultante de uma inoculação de células tumorais em animais. A inoculação é considerada a primeira passagem										
PBS	phosphate buffer solution: <table> <tr> <td>NaCl</td> <td>8.0gr/l</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td>10.0gr/l</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄.2H₂O</td> <td>1.44 gr/l</td> </tr> <tr> <td>NaH₂PO₂.H₂O</td> <td>0.203 gr/l</td> </tr> <tr> <td>PH</td> <td>6.8-7.2</td> </tr> </table>	NaCl	8.0gr/l	KCl	10.0gr/l	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1.44 gr/l	NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	0.203 gr/l	PH	6.8-7.2
NaCl	8.0gr/l										
KCl	10.0gr/l										
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1.44 gr/l										
NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	0.203 gr/l										
PH	6.8-7.2										
170-Pgp	glicoproteína de 170.000 Daltons relacionada à resistência a múltiplas drogas.										
s.c.	subcutâneo										
sem	standard error mean: erro padrão da média; razão entre o desvio padrão e a raiz quadrada do número do total de eventos analisados										
SRB	sulforodamina B. Substância corante das proteínas componentes da membrana celular										
T _{1/2}	meia vida										

TCA	ácido tricloro acético
Tris	(tri[hidroximetil]aminometano)
VCR	vincristina = Oncovin

Introdução ao Fenômeno da Resistência a Múltiplas Drogas

Dados Históricos sobre Resistência às Drogas Antineoplásicas

Em 1948, Faber descreveu o desaparecimento dos sintomas clínicos da leucemia em crianças tratadas com aminopterina, como sendo efeito temporário seguido de recidiva não mais responsiva à quimioterapia. Relatos semelhantes se repetem desde os primórdios da quimioterapia até a atualidade, pois a capacidade das células neoplásicas de desenvolverem resistência às drogas utilizadas nesta modalidade terapêutica vem acompanhando todos os progressos da área.

Esforços contínuos para superar tal obstáculo incluíram o desenvolvimento de novas drogas e o estabelecimento de melhores esquemas combinados de quimioterápicos. Estes esforços, na última década, vêm propiciando a cura e o aumento da sobrevida de pacientes portadores de várias neoplasias agressivas e rapidamente proliferativas, como leucemias, tumores de testículo e linfomas. Contudo, a resistência inicial ou a remissão temporária, seguida de exarcebação do tumor, persiste como o principal problema na terapêutica de pacientes portadores de neoplasias de origem epitelial, as quais situam-se entre os que mais frequentemente acometem a humanidade.

Moscow (1980), dividiu a resistência a drogas antineoplásicas em duas categorias:

1. resistência intrínseca, definida como aquela que ocorre no momento da transformação maligna das células, sendo estes tumores não responsivos ao tratamento, como, por exemplo, os tumores de pulmão e cólon.
2. resistência adquirida, associada a tumores sensíveis ao tratamento, após a exposição das células neoplásicas a algum agente citotóxico. Esta categoria de resistência a drogas ocorre com frequência em neoplasia de mama e leucemias da infância.

A resistência adquirida pode surgir devido a fatores ligados à droga ou ao tumor. Quanto às drogas, as características cuja alteração podem causar resistência são: a farmacocinética, a circulação no organismo, o metabolismo, e a sua capacidade de atingir o alvo celular, causando sua morte. Quanto ao tumor, sua localização e tamanho são fatores importantes. Além disso, outra variável a ser considerada é a heterogeneidade da resposta das células neoplásicas ao quimioterápico utilizado. Esta heterogeneidade celular deve-se não apenas a desigualdades na vascularização e oxigenação, como também a diferenças fenotípicas de origem genética. A situação de cada célula neoplásica dentro do ciclo mitótico também é um fator de interferência, alterando sua resposta aos quimioterápicos, pois na sua maioria, só atingem células em fase de duplicação de DNA.

O fenômeno de resistência, avaliado do ponto de vista intracelular, mostra uma série de alternativas compensatórias, elaboradas pelas células, com o objetivo de reparar os danos causados pelo tratamento. Ferguson (1989) e Teeter (1989) colocam entre estas alternativas as seguintes:

1. alterações na expressão do alvo específico de cada agente citotóxico por amplificação do gene que o codifica, como no caso da dihidrofolato redutase, alvo da droga metotrexate.
2. aumento da atividade das enzimas de reparação do dano celular causado pela terapia, como ocorre com os tratamentos que utilizam 5-fluouracil e adriamicina.
3. aumento das enzimas do sistema catabólico celular, glutathione-S-transferase e glutathione-peroxidase, associadas à resistência ao arabinosídeo C e aos agentes alquilantes.
4. modificação no transporte de membrana da droga provavelmente responsável pela resistência à cisplatina, 6-mercaptopurina e arabinosídeo C.
5. alteração na enzima DNA topoisomerase II, processo que ocorre na resistência à etoposide e adriamicina.

De um modo geral, o fenômeno da resistência apresenta uma ou mais alterações específicas para cada droga, ou seja, a célula torna-se resistente a um único agente citotóxico, ou a um grupo de agentes que apresentem o mesmo mecanismo de ação.

Resistência a Múltiplas Drogas

Biedler e Riehn (1970) descreveram pela primeira vez um fenômeno não específico de resistência adquirida. Os autores estudavam a resistência adquirida utilizando linhagem celular de leucemia P388 e células pulmonares de Hamster da linhagem "Chinesa", tornadas resistentes por exposição contínua a crescentes doses de dactinomicina. A observação foi de que estas células adquiriam resistência não só à dactinomicina, como também à daunomicina e à vimblastina. O fato mais marcante relacionado a este fenômeno foi a inexistência de semelhanças, tanto estruturais quanto relativas ao mecanismo de ação destas drogas, que justificassem o desenvolvimento desta resistência cruzada. Esse achado experimental foi denominado resistência pleiotrópica ou resistência a múltiplas drogas (MDR: multidrug resistance) e se incorporou à nomenclatura oncológica.

O número de compostos, não relacionados estrutural e funcionalmente, que hoje fazem parte do grupo de drogas envolvidas na resistência múltipla, é extenso. Neste conjunto se incluem agentes amplamente utilizados no tratamento de neoplasias, como Doxorubicina, Vincristina, etc. (tabela 1, página 18). Em geral, estas substâncias apresentam como característica comum a origem em produtos naturais (derivados de plantas ou fungos), e a tendência hidrofóbica, pelo fato de apresentarem anéis aromáticos na sua estrutura (Teeter, 1989).

Bech-Hanson (1976) e Juliano (1976), utilizando células de ovário de Hamster da linhagem "Chinesa", tornadas resistentes à colchicina, demonstraram que a resistência a múltiplas drogas estava relacionada à redução da concentração intracelular do citostático, e que esta modalidade de resistência associava-se à presença de uma glicoproteína na membrana das células. Por outro lado, verificaram a ausência desta glicoproteína nas linhagens celulares parenterais, originalmente sensíveis à colchicina. Esta molécula foi denominada 170 P-glicoproteína, por parecer na época relacionar-se à permeabilidade da membrana celular (P), e devido ao seu peso molecular de aproximadamente 170.000 daltons.

Dois genes codificadores de P-glicoproteínas foram isolados de células humanas e denominados "mdr1 e mdr3" (Ueda, 1987; Van der Bliek, 1987 e Shen, 1986). Destes dois genes, somente o primeiro tem sido comprovadamente associado à resistência a múltiplas drogas. O estudo da sequência de aminoácidos da P-glicoproteína mostra que ela se compõe de duas porções semelhantes, com um total de 1276 a 1280 aminoácidos e apresenta 12 regiões hidrofóbicas, que preenchem a condição de áreas transmembrânicas. Na porção externa da molécula existe região com potencial de glicosilação e, nos terminais carboxílicos intracelulares, encontram-se áreas de ligações nucleotídicas com provável afinidade por ATP (Deuchars, 1989). Assim, o modelo deduzido a partir destas

informações, e baseado na homologia encontrada entre esta sequência e o sistema de transporte de bactérias (Chen, 1986; Gerlach, 1986), mostra a 170 P-glicoproteína (fig. 1, página 19) como uma bomba de efluxo, dependente de energia (Fojo, 1989).

As informações disponíveis que confirmam a associação da 170 P-glicoproteína com MDR foram enumeradas por Deuchars (1989):

1. o aumento da expressão desta glicoproteína está persistentemente associado à resistência múltipla.

2. o gene da 170 P-glicoproteína encontra-se amplificado nas linhagens celulares que apresentam MDR.

3. a transfecção do DNA genômico de linhagens MDR em linhagens sensíveis produz mutantes, que apresentam amplificação do gene da 170 Pgp e expressam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Classicamente, o fenótipo MDR consiste na diminuição da concentração intracelular da droga citotóxica, e na presença da 170 P-glicoproteína na superfície das células.

No intuito de verificarem a presença da 170-Pgp em tecidos normais e em tumores humanos, Fojo (1987), Goldstein (1989), Broxterman (1989) e Volm (1989) realizaram pesquisas que resultaram na identificação de tecidos e tumores onde se pode detectar a 170-Pglicoproteína. As técnicas utilizadas incluíram imunoperoxidase com anticorpos monoclonais e quantificação de MDR1 RNA pela técnica de slot blot, apesar das críticas ao último método quando empregado em tecidos heterogêneos por não permitir uma correlação do fenótipo estudado com detalhes microanatomicos (Cordon, 1991)(tabela 2, páginas 20 e 21).

Em alguns tumores foi possível comprovar o aumento de MDR1 RNA após o emprego de quimioterápicos (Pastan, 1988). É interessante observar que os tumores e tecidos onde se detectam níveis elevados de MDR1 RNA fazem parte do grupo de neoplasias mais resistentes aos citotóxicos normalmente empregados (DeVita, 1989), ou órgãos tidos como santuários ou impenetráveis aos quimioterápicos (Thiebaut, 1987; 1989) (tabela 3, página 22). A real associação entre a detecção da 170-Pgp e a resistência clínica encontrada nos pacientes portadores de neoplasias, alterando prognóstico e sobrevida, começa agora a mostrar os primeiros dados na literatura com os trabalhos de Kanamaru (1989), Bourhis (1989), Chan (1990, 1991), Lyttelton (1991), Tishler (1992) e Michieli (1992). Os trabalhos citados permitem antever a importância clínica desta forma de resistência, ainda em início de avaliação, devido à associação entre a presença da 170 P-glicoproteína nas células tumorais e menor sobrevida somada a respostas de curta duração ao tratamento.

Até o presente, o único modelo experimental já estruturado para o estudo da resistência a múltiplas drogas é, sem dúvida, o da 170 p-glicoproteína. Contudo, alguns achados laboratoriais não podem ser explicados por este modelo, como por exemplo: determinadas linhagens celulares resistentes, expressando o fenótipo MDR, apresentam redução da atividade da enzima aril-hidrocarbono-hidroxilase, cuja ação é converter algumas drogas em suas formas ativas, adicionando oxigênio e grupos hidroxila à sua estrutura, tornando-as mais hidrofílicas e eletrofílicas. Também as enzimas do sistema glutatona de detoxificação, como glutatona-S-transferase(GST) e glutatona-peroxidase, aparecem elevadas em certas linhagens celulares com resistência a múltiplas drogas e tumores de cólon (Ferguson, 1989). A ação destas enzimas consiste em transformar produtos tóxicos em conjugados menos agressivos e de mais fácil excreção. A detecção de linhagens celulares com características de MDR, mas sem a expressão da 170 Pgp, constitui outro achado não esclarecido pelo modelo. Até agora conhecido como resistência atípica a múltiplas drogas, este novo fenômeno parece envolver alterações qualitativas e quantitativas na topoisomerase II (Glisson, 1989; Moscow, 1991; Friche, 1992) responsável pela clivagem reversível das hélices do DNA durante sua duplicação.

Tabela 1

Agentes Envolvidos na Resistência a Múltiplas Drogas

Colchicina	
Vincristina	(Oncovin)
Vimblastina	(Velban)
Plicamicina	(Mitramicina)
Etoposide	(Vepesid, VP-16)
Daunorrubicina	(Daunoblastina)
Dactinomicina	(Actinomicina-D)
Teniposide	(Vumon, VM-26)
Mitoxantrona	(Novantrone)
Doxorrubicina	(Adriamicina)
Mitomicina C	(Mitocin)
Paclitaxel	(Taxol)

Traduzida e Modificada de Teeter LD. Cancer Bull
1989;41:14-20

Figura 1

Representação da Molécula de P-glicoproteína na Membrana Celular



Modelo proposto para a molécula da 170-P glicoproteína com 12 áreas transmembrânicas, formando um poro na membrana celular. As duas porções intracelulares apresentam regiões com afinidade ao ATP. Externamente à membrana há área com potencial de glicosilação. A estrutura funcionaria como uma bomba de excreção celular dependente de energia. (Scientific American; março 1989)

Tabela 2

Quantificação de MDR1 RNA pela Técnica de "Slot Blot"

2 a.

Tecidos Normais

<u>Elevados</u>	<u>Baixos</u>
Fígado	Medula Óssea
Colom	Baço
Rim	Ovário
Pulmão	Músculo Estriado
Intestino Delgado	Músculo Cardíaco
Adrenal	Próstata
Capilares Cerebrais	Estômago

Traduzida e Modificada de Fojo AT et al. Proc Natl Acad Sci(USA) 1987;84:265-269.

Quantificação de MDR1 RNA pela Técnica de "Slot Blot"

2 b. Tecidos Tumorais sem Tratamento Prévio

Elevados

Adenocarcinoma de Colom
Adenocarcinoma de Rim
Carcinoma de Suprarenal
Feocromocitoma

Baixos

Câncer de Mama
Neuroblastoma
Leucemias
Câncer de Ovário
Sarcoma de Ewing
"Oat Cell" Pulmonar
Linfoma Hodgkin
Linfoma Burkitt
Câncer de Próstata
Câncer de Bexiga
Tumor de Willms
Melanoma

Traduzida e Modificada de Golstein LJ. J Natl Cancer
Inst 1989;81:116-124

Tabela 3

Resposta Tumoral à Quimioterapia

Tumores Curáveis Inclusive em Estádios Avançados

Coriocarcinoma
Leucemia Linfocítica Aguda
Linfoma de Hodgkin
Linfoma Difuso de Grandes Células
Linfoma Linfoblástico
Linfoma Folicular Misto
Câncer de Testículo
Leucemia Mielocítica Aguda
Tumor de Willms
Linfoma de Burkitt
Rabdomiossarcoma Embrionário
Sarcoma de Ewing
Neuroblastoma e Neuroepitelioma
Câncer de Ovário

Tumores Curáveis com Quimioterapia Adjuvante

Câncer de Mama
Sarcoma Osteogênico
Sarcoma de Partes Moles
Câncer Coloretal

Tumores Responsíveis em Estádios Avançados

Câncer de Bexiga e Próstata
Leucemia Mielóide Crônica
Leucemia Linfocítica Crônica
Linfoma Folicular
Câncer Gástrico
Câncer de Colo e Corpo de Útero
Sarcoma de Partes Moles
Câncer de Cabeça e Pescoço
Câncer Adenocortical
Meduloblastoma
Glioblastoma Multiforme
Câncer de Mama
Tumores Carcinóides

Tumores não Responsíveis em Estádios Avançados

Sarcoma Osteogênico
Câncer de Pâncreas
Câncer Renal
Câncer de Tireóide
Câncer de Vulva e Pênis
Câncer Coloretal
Câncer Hepatocelular
Melanoma
"Oat Cell" Pulmonar

Traduzida e Modificada de DeVita. Cancer: Principles and Practice of Oncology 1989, 3 ed.

Agentes Reversores

As primeiras descrições de compostos reversores da resistência a adriamicina e vincristina são de Ganapathi (1981), Tsuruo (1982, 1983) e Rogan (1984), utilizando os bloqueadores de cálcio e inibidores de calmodulina. Desde então, uma série de substâncias (tabela 4, página 24) têm-se mostrado úteis na reversão da MDR "in vitro", sendo algumas já testadas "in vivo". Neste grupo incluem-se antibióticos, antiarrítmicos, anestésicos, detergentes, imunossuppressores, anticorpos monoclonais e até análogos não citotóxicos (Schuurhuis, 1987; Teeter, 1989; Pastan, 1988; Silbermann, 1989; Shinoda, 1989; Gosland, 1989; Warrington, 1989; Sebold, 1989; Nasioulas, 1990; Mickisch GH, 1990; Gu F, 1991; Pearson, 1991; Keller RP, 1992; Naito M, 1992). Para justificar a semelhança na ação de drogas tão diferentes, propõe-se sua interação ao nível da membrana plasmática, caracterizando-os como agentes moduladores do transporte de membrana (Silbermann, 1989), mas o mecanismo definitivo ainda está para ser definido e parece envolver a modulação da amplificação gênica (Biedler, 1993) com deleção do gene MDRI.

Os compostos mais bem estudados são os bloqueadores de cálcio, dos quais existem em andamento estudos clínicos (Figueredo, 1988; Weeler, 1988; Gore, 1988; Colozza, 1990; Wampler, 1993), sugerindo melhor resposta à quimioterapia, quando associada a um reversor, nos casos de tumores resistentes. Em todos estes estudos um problema persiste: a dose elevada necessária para atingir reversão da MDR propicia o aparecimento de efeitos colaterais graves. Apesar das observações promissoras de melhor resposta terapêutica nos tumores resistentes, com o uso combinado dos reversores, as informações disponíveis hoje, na literatura, ainda não definiram a droga ideal a ser utilizada em pacientes visando a reversão clínica da resistência a múltiplas drogas.

Tabela 4

Agentes que Revertem a Resistência a Múltiplas Drogas

Antagonistas do Cálcio

Verapamil
Carovenina
Bepridil
Nifedipina

Inibidores de Calmodulina

Prenilamina
Trifluoroperazina
Clomipramina
Clorpromazina

Outros

TWEEN 80
Quinidina
Cloroquina
Lidocaina
Propranolol
Tamoxifen
Ciclosporina A
Cefalosporina
Anfotericina B
Progesterona

Traduzida e Modificada de Teeter LD. Cancer Bull
1989;41:14-20

Modelos para o Estudo da MDR

A maioria dos trabalhos na literatura sobre a resistência a múltiplas drogas utiliza modelos "in vitro". Inúmeras linhagens celulares ao serem expostas a crescentes concentrações de citotóxicos passam a expressar o fenótipo MDR tornando-se sublinhagens resistentes. Tanto células originárias de tumores humanos (Deffie, 1988; Twentyman, 1988; Gosland, 1989; Coley, 1989; Yoshimura, 1990; Chambers, 1990), como de origem animal (Sebolt, 1989; Daoud, 1989; Hofslí, 1990) têm sido empregadas como modelos no estudo dos mecanismos da resistência múltipla e na busca de métodos para contorná-la.

Lincke (1990) conseguiu estabelecer uma linhagem resistente, não a partir da exposição das células às drogas, mas, sim, da transfecção do gene *mdr1* isolado de células hepáticas humanas para uma linhagem de melanoma humano. Outro método de obter células resistentes foi descrito por Belli (1990), que realizou a fusão da 170 P-glicoproteína com a membrana plasmática de células sensíveis, empregando fitohemaglutinina e polietilenoglicol. Estes modelos, por apresentarem como única alteração a presença da 170-Pgp na membrana celular, mostraram-se instrumentos úteis no estudo da correlação entre a intensidade da expressão da glicoproteína e a resistência apresentada, haja visto que neles não se espera alterações metabólicas, previamente descritas (no subtítulo Resistência a Múltiplas Drogas), detectadas em linhagens tornadas resistentes por exposição contínua a citotóxicos.

A grande diferença das condições existentes entre o modelo de cultura celular "in vitro" e a aplicação clínica de uma droga na terapêutica tumoral exige o estabelecimento de uma escala intermediária onde se possa avaliar a administração, a distribuição, o metabolismo, e a toxicidade do novo agente. Neste ponto surge o modelo animal, mais adequado, para preencher estas exigências.

Os modelos "in vivo" para MDR, já descritos na literatura, são poucos. Na sua maioria, são linhagens de leucemia ou sarcomas crescendo em cavidade peritoneal e recebendo o tratamento por via intraperitoneal (Inaba, 1979; Bieder, 1983; Shinoda, 1989; Kiue, 1990). A situação destes modelos é comparável à condição criada "in vitro", afastando influências importantes como a farmacocinética e o metabolismo, permitindo contato direto e constante das drogas empregadas com as células neoplásicas o que não condiz com a situação real de resistência clínica. O primeiro modelo "in vivo" de tumor sólido aplicável ao estudo da resistência a múltiplas drogas foi descrito por Formelli (1986), utilizando a linhagem celular de melanoma B16 e sua sublinhagem resistente, obtida após exposição a crescentes doses de doxorubicina. Neste estudo, detectou-se uma perda do fenótipo MDR após a

quinta passagem nos camundongos. Tsuruo (1989) é autor do segundo trabalho utilizando um modelo "in vivo " com tumores sólidos de origem humana. As células empregadas neste estudo foram originárias de tumor ovariano, sendo que a linhagem sensível (A2780) foi transformada em resistente, por exposição à doxorubicina. Outros modelos descritos (Scott, 1993; Abe, 1993; Bellamy, 1993) para tumores sólidos sempre utilizam linhagens celulares tornadas resistentes por exposição aos citotóxicos.

A revisão dos modelos anteriormente descritos leva a questionamentos:

1. como um tumor que fosse transfetado com o gene *mdr1* se comportaria "in vivo"?
2. como seria a expressão da 170-Pgp nesta situação?
3. como seria a comparação de uma linhagem transfetada mantida em situações diferentes, que sejam, "in vivo" e "in vitro" quanto a manutenção da expressão do gene?

No caso da MDR, um modelo que preencha as lacunas deixadas sem esclarecimento, se faz necessário, pois a importância da 170-Pgp, dentro do contexto da resistência aos agentes antineoplásicos, tem-se ampliado com os resultados de pesquisas clínicas (Kanamaru, 1989; Bourhis, 1989; Chan, 1990; Verrelle, 1991; Chevillard, 1993; Pozza, 1993). Estas análises relacionam cada vez mais a presença do fenótipo MDR à piores respostas e sobrevidas em vários tumores.

Estas informações demonstram a necessidade de um melhor estudo da resistência a múltiplas drogas, assim como da contínua avaliação "in vivo" do potencial reversor de novas drogas, e também da pesquisa de outras possibilidades de se contornar o fenômeno, como o emprego de anticorpos monoclonais e imunoconjugados.

Um modelo "in vivo", utilizando linhagens celulares humanas tornadas resistentes por transfecção do gene *mdr1*, apresenta algumas características interessantes:

1. originalidade do modelo;
2. possibilidade de um estudo totalmente centrado na expressão da 170-Pgp, partindo do princípio de que outros mecanismos de resistência celular não devam ter sido ativados;
3. permite a comparação do modelo transfetado com os já descritos e criados através de exposição das células a citotóxicos por longos períodos.

Objetivos

O principal objetivo deste estudo é a criação de modelo em animal para o estudo da resistência a múltiplas drogas "in vivo", empregando células transfectadas com o gene *MDR1*", que permita avaliar: 1. A expressão da 170-Pgp "in vivo", até a segunda passagens nos animais, e sua correlação com a manutenção do fenótipo da resistência a múltiplas drogas;

2. O potencial de reversão de novos compostos selecionados pelos estudos "in vitro", avaliando a relação entre a dose necessária e a toxicidade, assim como a farmacocinética "in vivo";

. O emprego de anticorpos monoclonais (direcionados contra a 170-Pgp) ligados a radioisótopos, no diagnóstico, ou mesmo na tentativa terapêutica contra tumor sólido portador do fenótipo MDR.

Material e Métodos

O estudo do modelo BRO em resistência a múltiplas drogas desenvolveu-se conforme os diagramas que se seguem.

Centrou-se na verificação da conservação do fenótipo MDR da linhagem transfectada BRO *mdr1.1* (diagrama 1, página 31), avaliando a resistência e a expressão da P-glicoproteína em cultura de tecido e em xenoinxertos por duas passagens sucessivas. As possibilidades de ultrapassar este mecanismo de resistência "in vitro" e "in vivo" constituíram a seqüência natural do estudo (diagrama 2, página 31), tendo em vista a importância clínica deste resultado na conduta de pacientes em uso de quimioterápicos relacionados com a MDR.

Diagrama 1

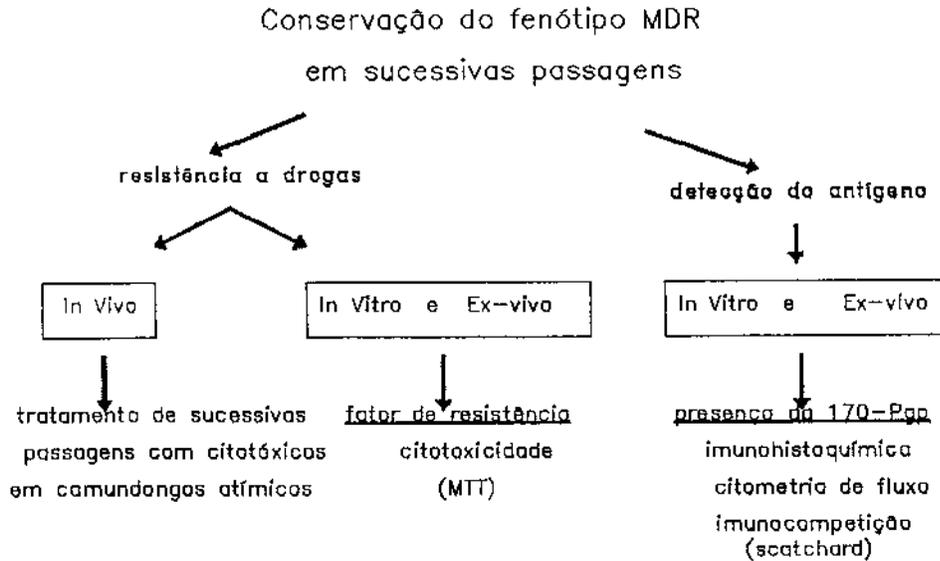
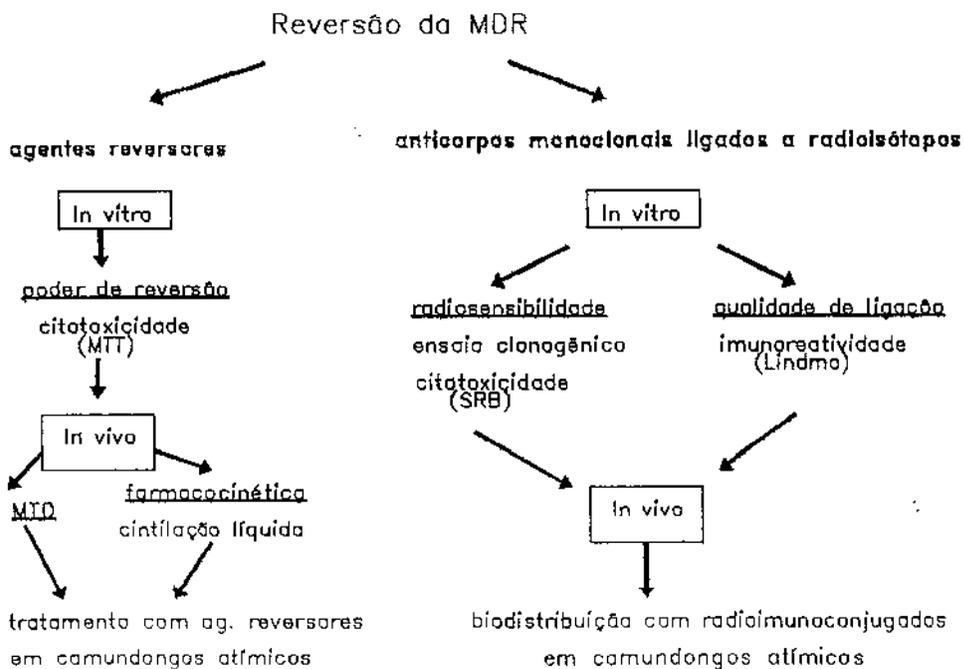


Diagrama 2



1. Linhagens Celulares:

BRO: estabelecida por Lockshin em 1985, derivou de material de biópsia de lesão primária de melanoma com características clínicas muito agressivas. Neste estudo, ela foi utilizada como linhagem controle na avaliação do efeito citotóxico ou efeito reversor das drogas testadas em comparação com a linhagem portadora do fenótipo MDR.

BRO mdr 1.1: resistente, foi obtida através da transfecção do *mdr1* complementar isolado de células hepáticas humanas normais nas células BRO (Van der Blik, 1988; Linke, 1990).

As duas citadas linhagens (BRO e BRO mdr1.1) foram gentilmente cedidas pelo Prof.Dr P. Borst (Netherlands Cancer Institute, Holanda).

A2780 e 2780AD: estabelecidas a partir de tumor de ovário humano, tiveram a linhagem resistente (2780AD) transformada por exposição contínua das células sensíveis A2780 a doses crescentes de doxorubicina (Silberman, 1989). Estas células foram gentilmente cedidas pelo Prof.Dr R.F.Ozols (NCI, EUA). Sua utilização restringiu-se a algumas fases deste projeto, como controles para quantificar a expressão da 170 P-gp e comparar com as linhagens referenciais: BRO e BRO mdr1.1.

2. Cultura de Tecido:

As linhagens celulares eram mantidas, utilizando-se como meio de cultura o Meio Essencial Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 2 mM de l-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina (todos obtidos do laboratório Flow, Escócia), e soro bovino fetal 10% (laboratório PAA, Áustria). As células permaneciam a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Suas colheitas (utilizando-se solução de EDTA a 0.2% e tripsina a 0.25% em PBS) e replicações eram, sistematicamente, realizadas duas vezes por semana, devido ao seu curto tempo de duplicação celular (2.3 dias) e rápido crescimento da cultura. O material plástico para a cultura era fornecido pelo laboratório Greiner (Alemanha).

Vincristina e doxorubicina eram empregadas, respectivamente, como agentes seletivos nas linhagens BRO *mdr1.1* e 2780AD. As doses de 10 nM de vincristina e 2µM de doxorubicina adicionadas à cultura original, objetivavam a eliminação de clones mutantes sensíveis, que, teoricamente, poderiam ocorrer durante a manutenção destas linhagens em cultura por longos períodos. No período de 36 a 48 horas que precedessem qualquer experimento, as células tinham o meio renovado sem a adição de qualquer citostático. Parte das células BRO *mdr1.1* foram cultivadas sem a adição de agentes seletivos na tentativa de simular "in vitro" a situação dos xeno-enxertos que cresciam durante os mesmos períodos de tempo sem o contato com as drogas e possibilitar a comparação destas situações nos resultados.

A preparação das linhagens celulares a serem inoculadas nos camundongos atímicos seguia o seguinte protocolo: as células eram retiradas dos frascos de cultura de tecido (T175, laboratório Greiner, USA), após colheita com solução a 10% de tripsina e EDTA (laboratórios Flow, Escócia). A seguir, eram lavadas 2 vezes com PBS estéril (laboratórios Flow, Escócia) em volumes de 5 a 8 ml. No intuito de obter-se precipitação celular, esta preparação era centrifugada a 2000 rpm por 3 minutos. Uma suspensão de 10⁷ células em 150-200 µl de PBS estéril era a concentração ideal por inoculação.

3. Animais, Inoculação de Células Neoplásicas e Transplantes de Tumores:

Camundongos atímicos, da linhagem NMRI, fêmeas, com 8 semanas de idade, eram obtidos do laboratório Harlan (Holanda). Cada animal recebia dois tumores, um em cada flanco, por inoculação de células neoplásicas ou por transplante de fragmentos de tumor.

A inoculação da suspensão de células neoplásicas era realizada com seringa e agulha de insulina, estéreis, por via subcutânea, em cada flanco, no volume máximo de 200 μ l por local inoculado.

Os transplantes eram realizados sob anestesia com éter, através de pequena incisão da pele com bisturi. O descolamento do subcutâneo local, com delicada pinça hemostática, permitia a criação de "bolsa" onde era colocado fragmento do tumor com aproximadamente 2-3 mm^3 . A abertura da pele era fechada com clip cirúrgico metálico. O animal era mantido em observação até completa recuperação da anestesia. Os clips eram retirados uma semana após os transplantes, com instrumental apropriado, sem a necessidade de analgesia.

4. Drogas Utilizadas:

Doxorubicina: droga antineoplásica do grupo dos antibióticos. Sua atuação consiste em intercalar os pares de bases do DNA. A apresentação comercial utilizada nos experimentos era do laboratório Specia (França), com a concentração de 2 mg/ml. O peso molecular de 543.53 fornecia a molaridade de 3.3 mM para o produto. Os recipientes originais eram alicotados em frascos de 1 ml e conservados a -20°C. A LD₅₀ em camundongos é de 21.1 mg/kg, i.v. (Index Merck) e apresentou MTD de 8 mg/kg, por via endovenosa, em experimentos prévios realizados com os camundongos atímicos, no laboratório de Terapia Experimental e Imunologia da Free University (Holanda).

Vincristina: alcalóide da Vinca com intensa ação antineoplásica por bloquear os microtúbulos do fuso mitótico. Atua também inibindo a síntese de RNA alterando as RNA-polimerases. Era fornecida pelo laboratório Lilly (Holanda) na concentração de 1 mg/ml, peso molecular de 824.94 e molaridade de 1.2 mM. A droga original, depois de distribuída em recipientes de 2 ml, era mantida a -20°C até a utilização nos experimentos. A LD₅₀ em camundongos é 5.2 mg/kg, i.p. (Index Merck). Dados do laboratório de Terapia Experimental e Imunologia da Free University (Holanda) definiram como MTD para os camundongos atímicos a dose de 1 mg/kg, i.v..

Bepridil: Bloqueador de cálcio cujo potencial de ação como agente reversor da resistência a múltiplas drogas está sob investigação. A droga era obtida do laboratório Organon (Holanda) na apresentação de 4 mg/ml. O peso molecular é 366.54 e molaridade 10.91 mM. Os frascos originais eram alicotados em tubos de 1 ml e conservados a 25°C, no escuro. Para camundongos, a LD₅₀ é 23.5 mg/kg, i.v. (Index Merk), porém com meia vida e MTD em camundongos atímicos não definidas.

Cremofor: Óleo de castor polioxietilénico, amplamente utilizado como solvente de vitaminas e drogas imunossupressoras. Spoelstra (1991) e Speeg (1992), encontraram ação reversora intensa do fenótipo MDR 1 "in vitro". A substância era fornecida pelo laboratório Sandoz (Suíça), na concentração de 65% em etanol. O recipiente original era diluído 1:5 em PBS e conservado a -20°C, após ser aliquoteado em tubos de 1 ml.

5. Avaliação dos xeno-enxertos BRO e BRO mdr1.1:

A primeira passagem era obtida por inoculação subcutânea de células das linhagens mantidas em cultura. Cada camundongo recebia 10^7 células em cada flanco. A segunda passagem era conseguida por transplante de fragmentos do tumor na passagem precedente. O crescimento tumoral dos xeno-enxertos era avaliado 3 vezes por semana, verificando-se as 3 dimensões. O volume era expresso através da fórmula: $0.5 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{espessura}$, e o tempo de duplicação tumoral era calculado em dias como o tempo necessário para o tumor crescer de 100 a 200 mm^3 . O volume tumoral maior que 50 mm^3 era definido como tumor estabelecido para a inclusão de cada enxerto nos diversos experimentos.

A avaliação da inibição do crescimento tumoral era realizada com 6 camundongos atímicos em cada grupo. Os animais portavam tumores com volume de 130 mm^3 em ambos os flancos. Sempre era utilizada a segunda passagem (primeiro transplante de fragmentos dos tumores originários da inoculação subcutânea das células) na qual a estrutura tumoral apresentava-se melhor estabelecida. Os grupos tratados recebiam a dose máxima tolerada de Vincristina (1 mg/kg) ou de Doxorubicina (8 mg/kg), ambas i.v., nos dias 0 e 7. As medidas dos tumores eram realizadas conforme já descrito. Os grupos-controles eram formados com idêntico número de animais, portando tumores transplantados ao mesmo tempo dos animais tratados e mantidos nas mesmas condições ambientais. Em todos os procedimentos que incluíam remoção de tumores, fragmentos destes eram examinados no serviço de patologia da Free University para avaliação da morfologia com verificação da preservação histológica.

6. Anticorpos Monoclonais:

C219: gentilmente cedido pelo Laboratório Centocor (Bélgica), sendo produzido em camundongos por injeção i.p. e s.c. de membranas plasmáticas de células CHO (chinese hamster ovary) resistentes a múltiplas drogas e de linhagens celulares humanas (Kartner, 1985). É uma imunoglobulina do isotipo IgG2b tendo como alvo epitopo localizado na porção intracitoplasmática da molécula 170 Pgp. Volm (1989) e Chan (1990) demonstraram a especificidade e estabilidade deste anticorpo na detecção da MDR por imunohistoquímica.

JSB1: imunoglobulina do isotipo IgG1, obtido em resposta a injeção i.p. e s.c. de células CHrC5 (chinese hamster ovary, resistentes à colchicina) em camundongos. É dirigido a epitopo da porção intracelular da p-glicoproteína mas independente do alvo do C219 (Scheper, 1988). Broxterman (1989) e Van der Valk (1990) demonstram o seu emprego em imunohistoquímica com resultados satisfatórios quanto à sua especificidade. Por ter sido desenvolvido em conjunto com os departamentos de patologia e oncologia da Free University, tínhamos acesso livre a este anticorpo monoclonal.

MRK16: gentilmente oferecido pelo Prof. T.Tsuruo (Japanese Foundation for Cancer Research, Japão) para nossos estudos. Trata-se de uma imunoglobulina do isotipo IgG2a, resultante da sensibilização de camundongos por via i.p. e s.c. com células K-562/ADM (leucemia mielóide humana resistente a doxorubicina) (Hamada, 1986). É dirigido a epitopo da porção extracelular da 170 Pgp, demonstrando boa especificidade com descrição do seu emprego com sucesso na localização da 170-Pgp em tecidos normais e em tecidos neoplásicos (Sugawara, 1988).

T101: imunoglobulina do isotipo IgG2a dirigido contra o antígeno T26, presente na superfície de linfócitos T normais ou neoplásicos, já utilizado isoladamente ou conjugado a radioisótopos na abordagem de leucemias e linfomas (Boven, 1986). Fornecido pela Hybritech Inc (EUA), era utilizado nos experimentos de imunohistoquímica e citometria de fluxo como controle negativo para as células de melanoma.

9.2.27: anticorpo monoclonal de origem murina do isotipo IgG2a direcionado contra antígeno associado a células de melanoma. Testado quanto à especificidade tanto "in vitro" quanto "in vivo" (Lindmo, 1985). Era empregado como controle positivo em imunohistoquímica e citometria de fluxo, sendo fornecido pela Hybritech Inc (EUA).

Todos os anticorpos monoclonais empregados eram estocados em pequenos volumes de 10-20 μ l e mantidos a -20°C até o uso.

7. Imunocitoquímica, detecção da 170-Pgp:

A técnica era realizada em citospins elaborados a partir de suspensões celulares da cultura de tecido e dos xenoinxertos.

A suspensão celular era obtida da cultura de tecido por colheita com solução de EDTA a 0.2% em PBS (laboratório Flow, Escócia) com período de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. A suspensão de células isoladas era lavada com meio de cultura Essencial Modificado por Dulbecco e centrifugada a 1.200 rpm durante 3 minutos.

Para os xeno- enxertos, o processo exigia a remoção estéril dos tumores, seguida de ruptura mecânica dos mesmos através de redes de malhas progressivamente menores, até se obter uma suspensão de células isoladas. Como o número de células íntegras e viáveis obtido era pequeno, impunha-se o cultivo das células em meio Essencial modificado por Dulbecco enriquecido com 20% de soro bovino fetal e renovação diária do meio, durante 3 dias, antes da realização dos experimentos.

As suspensões de células isoladas eram avaliadas quanto à viabilidade pelo teste de exclusão com azul de tripano, sendo utilizadas as que apresentavam mais de 85% das células viáveis. As células eram contadas em câmara de contagem Burker ($0.0025\text{mm}^2 \times 0.04\text{mm}^2$) e colocadas na concentração de 4×10^5 células/ml.

Os citospins eram preparados (Cytospin Shandon, Inglaterra) com 100 μl da suspensão celular na velocidade de 350 rpm, em baixa aceleração, por 10 minutos. A duração da secagem das lâminas era no mínimo de 6 horas em temperatura ambiente, seguida de fixação em acetona a 0°C por 10 minutos. Se a coloração não era feita em 15 dias, os citospins ficavam conservados a -20°C , devendo ser refixados em acetona por 1 minuto ao serem descongelados.

Os anticorpos monoclonais foram descritos no item 6. Os controles consistiam sempre de dois anticorpos monoclonais: T101 como controle negativo e 9.2.27 como controle positivo para as linhagens de melanoma. As concentrações utilizadas eram as seguintes: JSB1 (ascite) no título de 1/100; C219 era utilizado na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$; MRK16, em estoque a 16,5 mg/ml , na concentração de 4,125 $\mu\text{g/ml}$; e T101 originalmente a 3,95 mg/ml , era diluído a 3,95 $\mu\text{g/ml}$. 9.2.27, em estoque a 2,65 mg/ml , era utilizado na imunocitoquímica a 2,65 $\mu\text{g/ml}$. O procedimento empregava o kit de Histostain-SP (laboratório Zimed, EUA). Todos os monoclonais eram diluídos em BSA a 1%. Os citospins eram incubados em câmara úmida, durante 60 minutos,

com os anticorpos monoclonais, à temperatura ambiente. Após este período eram lavados por 5 minutos, três vezes, em PBS e incubados com o anticorpo secundário ligado a biotina durante 10 minutos, mantendo-se as condições de ambiente e temperatura. Nova lavagem em PBS era seguida da incubação por 5 minutos com o conjugado enzimático. A incubação com o substrato cromogênico era o passo final, sendo realizado no período de 15 minutos, em ausência de luz, seguido de nova lavagem em PBS. A coloração de fundo era realizada com hematoxilina de Mayer por 45 segundos e a intensidade da coloração era comparada com o controle positivo do anticorpo monoclonal 9.2.27. Para a quantificação padronizava-se a contagem de 100 células por campo (em 3 diferentes campos) de microscopia óptica.

8. Teste de quimiosensibilidade em microcultura com tetrazolium (MTT):

Células obtidas dos xeno-enxertos BRO e BRO *mdr1.1*, das linhagens originais em cultura e as passagens de BRO *mdr1.1* cultivadas sem a adição de agente seletivo, vincristina (vide obtenção das suspensões no item 7), eram testadas com MTT. As células eram coletadas dos frascos de cultura com solução de tripsina a 0.2% e EDTA a 0.25% em PBS. Após serem lavadas e resuspensas com meio de cultura, eram semeadas em placas estéreis de 96 cavidades, na concentração de 2500 células por cavidade em 100 μ l de meio de cultura, suplementado com l-glutamina, soro fetal bovino e antibióticos (item 2). 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 ao fundo da cavidade, adicionavam-se as drogas vincristina e doxorubicina, em várias concentrações, no volume de 100 μ l por cavidade. 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 tempo as cavidades de controle atingiam 90% de confluência das células. Os resultados eram lidos como descrito por Alley (1988). O meio sobrenadante era desprezado, adicionando-se MTT (Sigma Chemical Company, EUA) na concentração de 0.4 mg/ml no volume total de 50 μ l/cavidade. Seguia-se incubação a 37°C por um período de 2 a 4 horas, suficiente para a precipitação dos cristais de formazam. Depois de desprezado o sobrenadante, estes cristais eram dissolvidos adicionando-se 150 μ l por cavidade de DMSO (Bakker, Alemanha) e lidos em Multiscanner Titertek no comprimento de onda de 540 nm. A leitura era realizada na primeira hora após a adição do DMSO. As concentrações das drogas eram testadas em quadruplicata para cada experimento, os resultados eram expressos em curvas de % de crescimento X concentração da droga, e a dose necessária para conseguir 50% de inibição de crescimento (IC₅₀) era utilizada para as comparações.

9. Quantificação celular da 170-Pgp:

Duas técnicas eram empregadas na quantificação da 170 Pgp presente nas linhagens portadoras do fenótipo da MDR: a citometria de fluxo (FACS) e a imunocompetição (Scatcher, 1946). As linhagens BRO, BRO mdr1.1, 2780AD eram comparadas entre si quanto à quantidade de 170-Pgp que expressavam.

9.1 Citometria de fluxo

As células eram colhidas da cultura com solução de EDTA a 0.2%, lavadas em PBS, e a viabilidade avaliada através do teste de exclusão com azul de tripano, utilizando-se 10^6 células viáveis por exemplar a ser testado. A incubação com 50 μ l do anticorpo monoclonal primário durava 45 minutos a 0°C. Seguiu-se 2 lavagens em PBS, e resuspensão com 50 μ l do conjugado fluorescente-FITC (Dakopatts, Dinamarca), no título de 1/40 em PBS, por 45 minutos a temperatura de 0°C, sendo a leitura obtida com FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, EUA). As linhagens eram testadas com MRK16, na mesma diluição descrita para a imunoperoxidase, utilizando-se como controle positivo o anticorpo monoclonal anti- HLA classe I (Dakopatts, Dinamarca), diluído a 1/100 em BSA a 1%, devido à sua fácil aquisição. As comparações eram realizadas utilizando-se a leitura dos valores de fluorescência média de cada exemplar e dos controles.

9.2 Teste de Imunocompetição

Células colhidas da cultura com solução de EDTA a 0.2% eram lavadas 2 vezes com PBS. O processo de fixação com glutaraldeído (Sigma Chemical Corp, EUA) diluído a 0.2% em PBS, durava 45 minutos a 0°C com movimentação contínua da solução. Após 3 lavagens com PBS as células eram suspensas na concentração de 10^7 células/ml em BSA a 1%. O teste de imunocompetição (Scatchard, 1949), para a determinação do número de epítopos presentes por célula, era montado utilizando-se 10 diluições sucessivas de 1:2, iniciando-se com a concentração de 25 μ g/ml para cada anticorpo monoclonal a ser testado e sempre em duplicata. Todos os exemplares recebiam 10^6 células fixadas em glutaraldeído, e 10 μ l do mesmo anticorpo marcado com o radioisótopo 125 I o que equivalia a aproximadamente 15.000 cpm (vide técnica de marcação no item 12). A ligação inespecífica era determinada adicionando-se, a um dos exemplares, excesso de anticorpo não marcado com o radioisótopo. O tempo de

incubação de 24 horas em rotação contínua era seguido de centrifugação a 5000 rpm por 1 minuto e separação em tubos distintos de metade do sobrenadante e das células depositadas com o líquido restante. A contagem das emissões radioativas era feita individualmente para cada tubo (em cpm) utilizando contador de raios gama (Beckman, EUA). A ligação específica (Bound) de cada amostra era determinada subtraindo-se as emissões obtidas nas células depositadas das emissões do sobrenadante do mesmo exemplar. A quantidade de irradiação livre (Free) era resultante do cálculo de subtração da irradiação total de cada amostra (sobrenadante + depósito de células) da contagem de irradiação da ligação específica. O número de epitopos presentes por célula era calculado a partir de curva padrão: $B/F(\text{bound/free})$ X concentração do anticorpo monoclonal ligado (em μM), após a correção da quantidade de ligação inespecífica.

10. Avaliação dos agentes reversores da MDR:

10.1 Avaliação "in vitro"

Os testes de quimiosensibilidade eram realizados utilizando-se a técnica básica de MTT descrita no item 8, para as células BRO, BRO *mdr1.1* e em duas sucessivas passagens de BRO *mdr1.1* cultivadas na ausência do agente seletivo vincristina. As suspensões celulares dos xeno-enxertos eram submetidas à mesma avaliação. O agente reversor bepridil foi testado nas doses de 4 μM e 8 μM . Cremofor foi avaliado quanto à citotoxicidade usando a técnica de MTT empregando-se 8 diluições sucessivas de 1:2, iniciando-se com 137.8 $\mu\text{g/ml}$. Sua ação reversora era verificada pela técnica de MTT na dose de 34,5 $\mu\text{g/ml}$, pela baixa citotoxicidade apresentada nesta concentração quando associada à vincristina 0.1 μM .

10.2 Avaliação "in vivo"

A farmacocinética da droga bepridil em camundongos foi estabelecida pelas vias peritoneal e oral, empregando fêmeas C75 B1. Por via intraperitoneal, 36 animais, receberam a dose de 60 mg/kg. Três animais eram sacrificados em cada tempo escolhido previamente, obtendo-se amostras de sangue que eram mantidos isolados da luz e congelados imediatamente a -20°C . Os tempos foram de: 1, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.

Por via oral eram fornecidas as doses de 10 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia de bepridil, diluídas em 120 ml de glicose a 5%. A medicação era adicionada à água e, para cada concentração, utilizava-se um grupo de 8 animais. As amostras de sangue eram colhidas após uma semana de exposição contínua, mantidas sem contato com luz e congelados a -20°C . A farmacocinética foi realizada pelo laboratório Organon utilizando cromatografia gasosa com equipamento Hewlett Packard 5880 A.

Utilizando-se bepridil marcado com o radioisótopo ^{14}C determinamos a farmacocinética para camundongos atímicos na dose de 30 mg/kg i.p., nos tempos de 15, 30, 60, 240 e 480 minutos. Em cada grupo eram utilizados 2 camundongos atímicos portando tumores BRO *mdr1.1*. O acúmulo da droga no tumor com repetidas injeções, era avaliado em grupo de 8 animais injetados a cada 8 horas, durante 24 horas; a última dose era administrada 1 hora antes da análise. A determinação da concentração de ^{14}C -bepridil era realizada através

de cintilação líquida. Dos animais sacrificados retiravam-se amostras de tecido de vários órgãos que eram dissolvidos em 1 ml de Soluene-350 (Packard, EUA) e incubados a 60°C por 12-18 horas. Após a dissolução do material, adicionava-se 200 ul de Isopropanol, 200 ul de H₂O₂ e 7 ml de solução para contagem de cintilação líquida "Ultima Gold" (Packard, EUA). A leitura era realizada em contador de cintilação líquida (Packard, EUA). O agente reversor bepridil teve sua dose máxima tolerada (MTD) determinada nos camundongos atímicos, utilizando-se grupos de 3 animais recebendo 3 aplicações i.p., com intervalo de 30 minutos (baseado na farmacocinética), empregando-se as concentrações de 30, 40, 50 e 60 mg/kg/injeção. A MTD da associação de bepridil com vincristina era estabelecida empregando-se grupos de 6 camundongos usando 40 e 50 mg/kg/injeção de bepridil, i.p., em 3 aplicações, com intervalo de 1 hora. Vincristina (1 mg/kg) era aplicada i.v. ao mesmo tempo que a primeira injeção de bepridil. O esquema era repetido após 1 semana. Sempre um grupo controle de animais era injetado com soro fisiológico nos mesmos volumes.

Com a definição da dose máxima tolerada da associação entre vincristina e bepridil e sua farmacocinética, para camundongos atímicos, foi proposta a abordagem terapêutica visando a reversão da resistência em tumores BRO mdrl.1 "in vivo". Três grupos de 6 animais, portadores da segunda passagem deste tumor, recebiam respectivamente:

1- vincristina 1 mg/kg, i.v. (t₀), dias 1 e 7; bepridil 40 mg/kg, i.p., 3 doses com intervalo de 1 hora (t₀, t₁, t₂), dias 1 e 7.

2- bepridil 40 mg/kg, i.p., 3 doses com intervalo de 1 hora (t₀, t₁, t₂), dias 1 e 7.

3- soro fisiológico no mesmo esquema e volume (grupo-controle).

Os animais eram acompanhados com mensurações dos tumores três vezes por semana e os resultados eram expressos em curvas de crescimento tumoral relativo. Os tumores que atingiam um volume maior que 3000 mm³ indicavam o sacrifício do animal portador.

11. Avaliação da radiosensibilidade das linhagens celulares em relação com o fenótipo MDR:

Estes testes eram realizados com as linhagens BRO, BRO mdr1.1, 2780S e 2780AD.

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 de 2000 células/100 ul. As amostras eram irradiadas com o aparelho Gamma Cell 200 (Atomic Energy of Canada Limited, Canada) com rendimento de 7.8 cGy por segundo. Oito diferentes doses de irradiação eram utilizadas na faixa entre 0 e 5000 cGy (0-50 Gy), e testadas em quadruplicata, num mesmo experimento.

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 (Sigma Chemical Company, EUA); este último ainda não descrito na literatura como um 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. Adicionava-se 5×10^3 células irradiadas/ml à agarose a 0.3% e eram 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%. As colônias contendo mais que 20 células eram contadas no sétimo dia de incubação. Os experimentos eram realizados em duplicatas.

Para os testes de citotoxicidade com SRB, as suspensões celulares irradiadas eram transferidas para placas de 96 cavidades na concentração de 1000 células por cavidade (volume total de 200 ul/cavidade) em quadruplicata para cada dose de irradiação, 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% (Bakker, EUA) durante 1 hora a 4°C. A adição de 50 ul/cavidade de SRB a 0.4% (em ácido acético 1%), com 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, era seguida de secagem e dissolução dos cristais com solução de Tris (Sigma, EUA). Procedia-se à leitura em Multiscanner Titertek (EUA), no comprimento de onda de 540 nm e o resultado analisado comparando-se ao crescimento dos controles. Subtraía-se do valor total da leitura a coloração de fundo, a qual era obtida através da leitura da coloração realizada logo após a semeadura das células em placa de 96 cavidades preparada especificamente com este objetivo.

12. O emprego de anticorpos monoclonais ligados a radioisótopos para eliminação de clones celulares com fenótipo MDR:

O anticorpo monoclonal MRK16 foi escolhido por reconhecer epitopo localizado na porção externa da molécula de 170-Pgp. Sua ligação com ^{131}I e ^{125}I seguiu a técnica de iodogênio (Salacinski, 1981), modificada por Haisma (1986). Em recipiente contendo 100 ug de iodogênio, adicionava-se o anticorpo monoclonal e 1 mCi do radioisótopo acrescidos de soluções tampão fosfato nas concentrações de 0.5 M e 0.05 M para neutralizar o pH ácido do veículo do radioisótopo. Seguia-se incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos. A passagem do produto através de filtro de 0.22 Micra resultava em solução estéril pronta para uso "in vitro" e "in vivo". A qualidade (atividade específica) e especificidade (imunoreatividade) do anticorpo marcado eram testadas em células vivas ou fixadas em glutaraldeído, segundo a técnica de Lindmo (1984). Nesta técnica, a mesma concentração de anticorpo marcado era testado em 6 diluições progressivamente maiores de células, e o resultado expresso em gráfico de total aplicado / ligação específica X inverso da concentração de células, o que fornecia a imunoreatividade para cada ligação efetuada ou seja, sua capacidade de se ligar especificamente as células estudadas. Durante o procedimento era determinada a atividade específica, ou seja, a quantidade de irradiação (uCi) captada por ug do anticorpo em teste e este dado era utilizado para comparar a atividade de cada monoclonal empregado no experimento. Nestes experimentos usava-se células BRO, ou o monoclonal T101 como controles negativos (ligação inespecífica).

O monoclonal MRK16 marcado como radioisótopo ^{131}I foi estudado quanto à sua cinética de acúmulo e excreção em duas biodistribuições, método que consistia na quantificação do anticorpo monoclonal presente em cada órgão do animal, em diversos períodos de tempo.

Para a primeira biodistribuição os camundongos atímicos foram transplantados com o tumor BRO no flanco direito e o tumor BRO mdr1.1 no flanco esquerdo, ambos na segunda passagem. O tumor sensível funcionaria como controle, quantificando a captação inespecífica. Na segunda biodistribuição, optou-se por transplantes de dois tumores BRO mdr1.1 na segunda passagem em cada animal e o controle de captação inespecífica foi realizado com a administração do anticorpo monoclonal T101 ligado ao radioisótopo ^{125}I , diferente do usado no monoclonal específico MRK16. Os animais recebiam as doses de 10 ug e 2.5 ug de MRK16 marcado nas duas distribuições realizadas, respectivamente, sendo que na segunda adicionava-se 2.5 ug de T101 marcado. Três camundongos eram utilizados na avaliação de cada tempo. No primeiro experimento, os tempos escolhidos foram 24, 72, 196 horas pós-injeção. Já na segunda biodistribuição, na tentativa de se obter uma curva completa de

biodistribuição, foram escolhidos os tempos: 1, 6, 15, 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a administração. Todos os órgãos eram coletados e a radioatividade medida em contador de raios gama (Beckman, EUA). A captação de cada órgão era estudada em relação à dose injetada e o resultado expresso em porcentagem da dose injetada.

13. Estatística:

A análise estatística de comparação de curvas, quando necessária, utilizou o teste "t" de Student para pequenas amostras.

Resultados

Os resultados são apresentados seguindo o fluxograma do estudo,

basicamente dividido em duas partes:

1- a avaliação do modelo quanto a conservação do fenótipo MDR por duas sucessivas passagens "in vitro" e "in vivo".

2- a avaliação da perspectiva de utilização do modelo no teste das várias possibilidades de ultrapassar este tipo de resistência "in vitro" e "in vivo".

1. Avaliação dos xeno-enxertos de BRO e BRO mdr1.1

Os xeno-enxertos desenvolveram-se rapidamente, mantendo-se circunscritos e facilmente mensurados nas três dimensões. Excetuando-se casos raros de invasão de pele, os tumores, por não infiltrar tecidos circunvizinhos, foram removidos facilmente. Os tumores com volume maior que 1000mm^3 geralmente apresentavam áreas de necrose extensas.

1.a Histopatologia

A avaliação histopatológica dos xeno-enxertos (fig. 2 e 3, página 52) mostrou manutenção da morfologia tumoral nas sucessivas passagens. As células da linhagem BRO mdr1.1, quando comparadas com as BRO, apresentaram dismorfismo maior, núcleos mais aberrantes e estrutura mais desorganizada. A segunda passagem apresentou algumas células gigantes, mas o fenômeno não se manteve quando estes tumores foram avaliados em passagens subseqüentes.

Figura 2

**BRO mdr1.1
Primeira Passagem
em Xeno-enxerto**

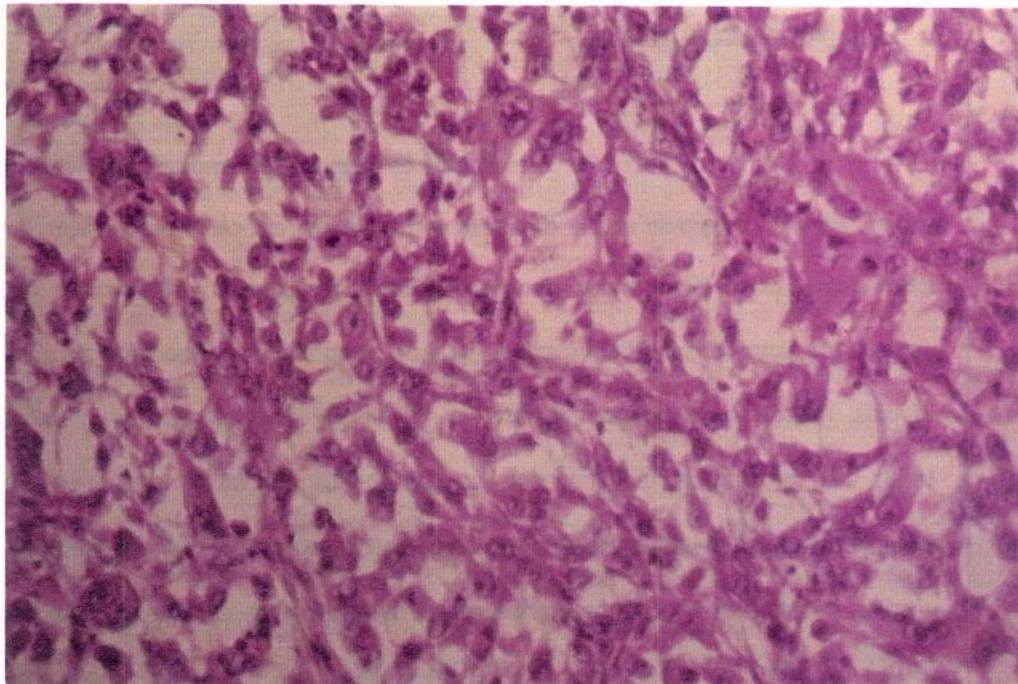
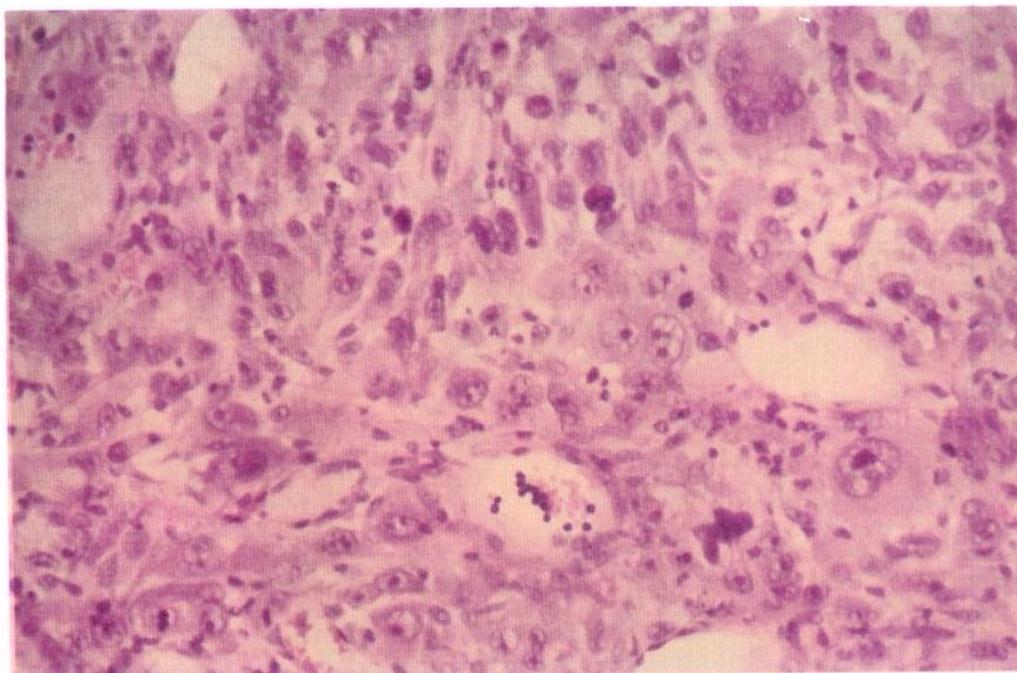


Figura 3

**BRO mdr1.1
Segunda Passagem
em Xeno-enxerto**



Fotomicrografias de xeno-enxertos de BRO mdr1.1 em sucessivas passagens com coloração hematoxilina-eosina. Aumento original de 200X. Notamos o padrão de indiferenciação das células em todas as passagens, com núcleos grandes, bizarros, e ausência de estruturação organizada do tecido. Não há alteração do aspecto histológico geral nas diferentes amostras.

1.b Comportamento biológico

Nos gráficos de curva de crescimento relativo (gráficos 1 a 4, páginas 55-58), o volume tumoral detectado no dia do início do tratamento era considerado valor 1. Os volumes obtidos nas medidas subsequentes eram relacionados ao valor inicial e apresentados como frações da unidade. Os animais tinham os tumores mensurados nas três dimensões (largura, comprimento e espessura) durante um período de tempo mínimo de 15 dias. As curvas de crescimento tumoral relativo seguiram os padrões da literatura (Rygaard, 1969; Giovanella, 1978), com uma fase inicial exponencial seguida de uma redução do ritmo de crescimento nas fases mais tardias. Este fenômeno provavelmente deveu-se à redução do aporte nutricional nas grandes massas provocando extensas áreas de necrose, constatadas durante os procedimentos de transplante. O tempo de duplicação tumoral foi de 2.8 dias para BRO e 3.3 dias para BRO *mdr1.1*, não sendo detectadas diferenças, numa mesma linhagem, entre as sucessivas passagens. Em cultura de tecido, as linhagens BRO e BRO *mdr1.1* apresentaram tempo de duplicação celular de 2.3 dias.

1.c Avaliação da resistência a múltiplas drogas "in vivo"

O tratamento dos camundongos atímicos, portando a segunda passagem de tumores BRO, com doxorubicina, apresentou uma inibição de crescimento de 87% (no dia 12) ao passo que na linhagem BRO mdrl.1 a inibição no mesmo tempo foi de 48.6%. A análise estatística destes dados, fazendo a comparação entre os grupos-controles e os grupos tratados, apresentou diferenças que foram significativas para BRO com $p < 0.002$ mas nos tumores BRO mdrl.1 os valores foram de $0.05 < P > 0.02$ (gráficos 1 e 2, páginas 55 e 56).

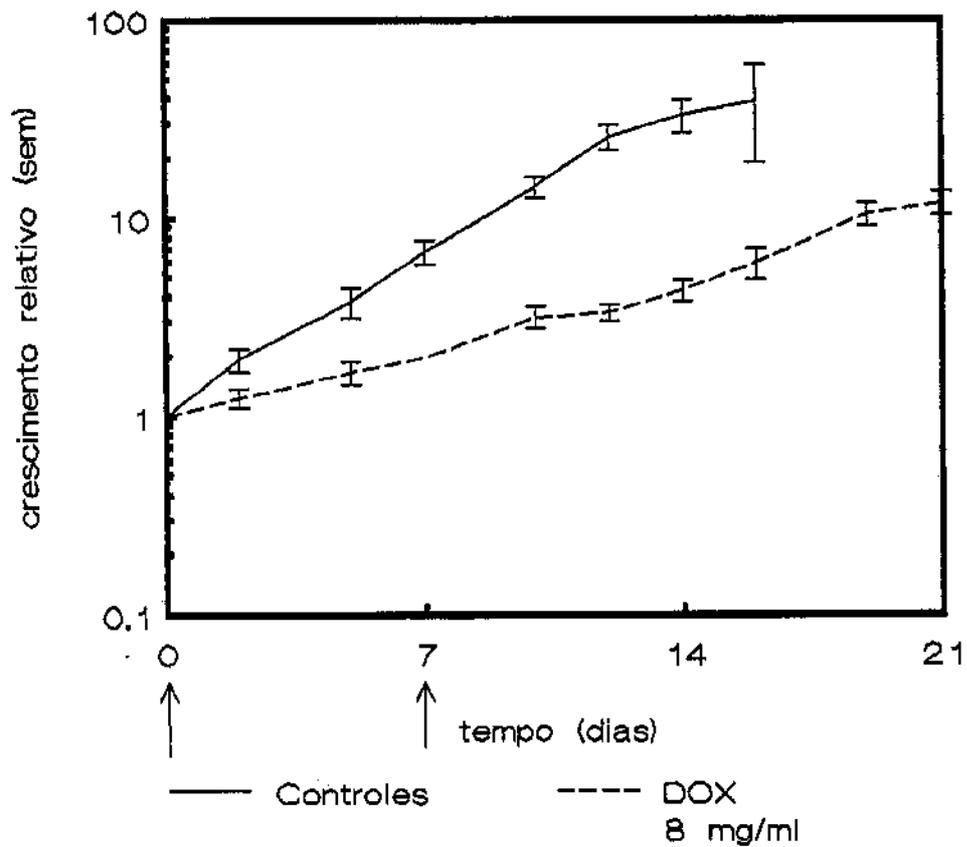
A vincristina mostrou efeitos ainda mais relevantes com uma inibição de crescimento de 92.9% no dia 9 para os tumores da linhagem BRO (gráfico 3, página 57) e somente 27.4% para os BRO mdrl.1 (gráfico 4, página 58).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de inibição de crescimento dos tumores BRO mdrl.1 controles e dos submetidos a tratamento com vincristina (gráfico 4, página 58). Por outro lado, a análise do grupo com tumores BRO submetido a quimioterapia comparado com o controle demonstra uma diferença na inibição de crescimento que foi significativa (gráfico 3, página 57), com $p < 0.001$.

Na comparação das curvas de resposta dos tumores BRO e BRO mdrl.1 ao tratamento com vincristina (gráficos 3 e 4, páginas 57 e 58), encontra-se diferença estatisticamente significativa entre os tumores sensíveis e os resistentes, com valor de $p < 0.001$.

Gráfico 1

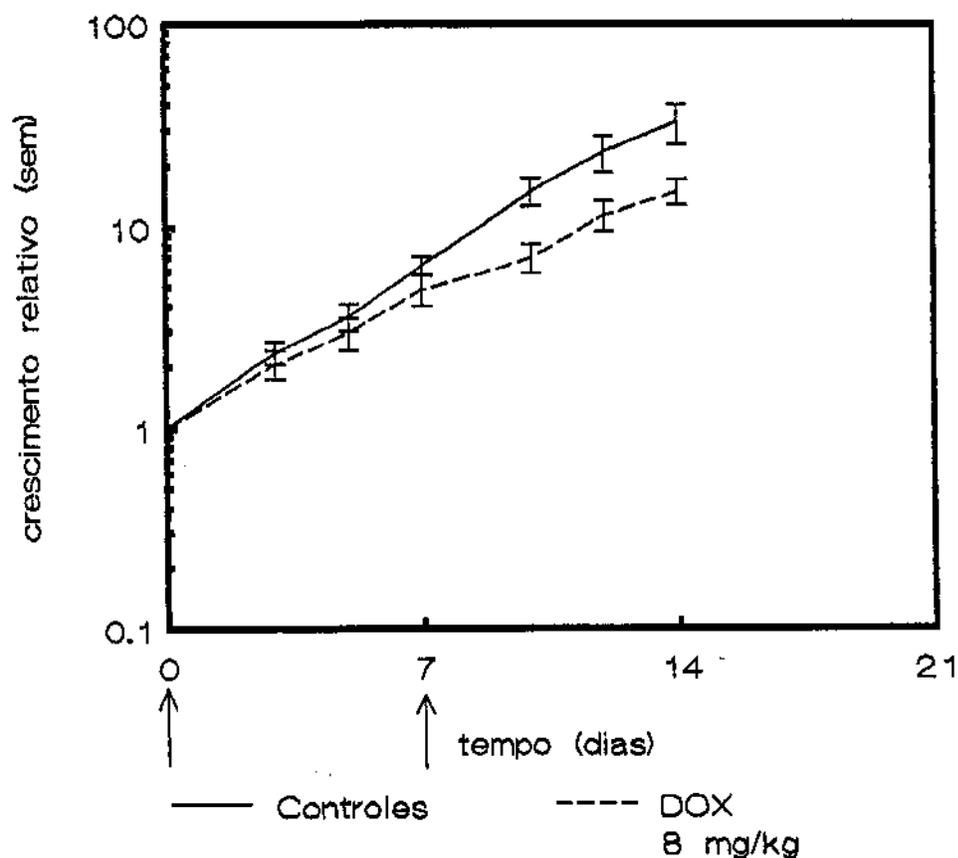
Curva de Crescimento da Linhagem BRO como Xeno-enxertos
Tratamento com Doxorubicina (DOX)



Curva de crescimento relativo de xeno-enxertos na segunda passagem utilizando como valor 1, o volume do tumor no primeiro dia de tratamento. Compara-se a inibição de crescimento dos tumores sensíveis (BRO) ao tratamento com a dose máxima tolerada de doxorubicina em relação ao crescimento dos mesmos tumores não tratados (controles). O desvio de cada ponto foi calculado como erro padrão da média (sem).

Gráfico 2

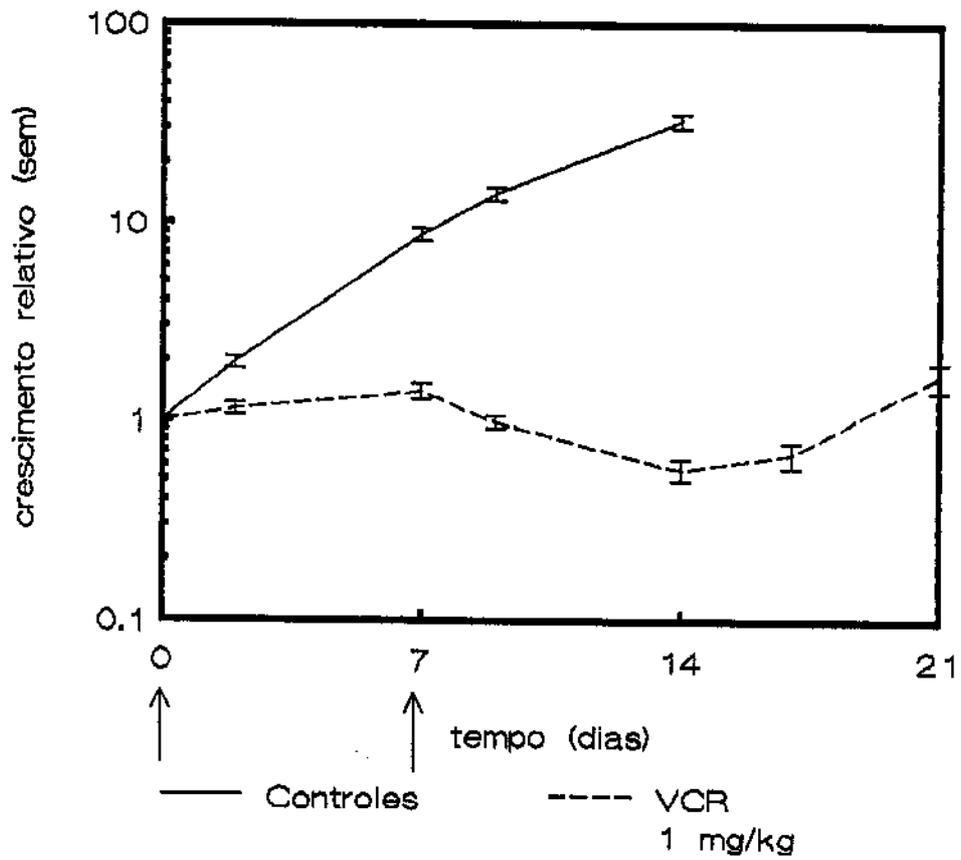
Curva de Crescimento da Linhagem BRO mdr1.1 como Xeno-enxertos.
Tratamento com Doxorubicina (DOX)



Curva de crescimento relativo de xeno-enxertos na segunda passagem utilizando como valor 1, o volume do tumor no primeiro dia de tratamento. Compara-se a inibição de crescimento dos tumores resistentes (BRO mdr1.1) ao tratamento com a dose máxima tolerada de doxorubicina em relação ao crescimento dos mesmos tumores não tratados (controles). O desvio de cada ponto foi calculado como erro padrão da média (sem).

Gráfico 3

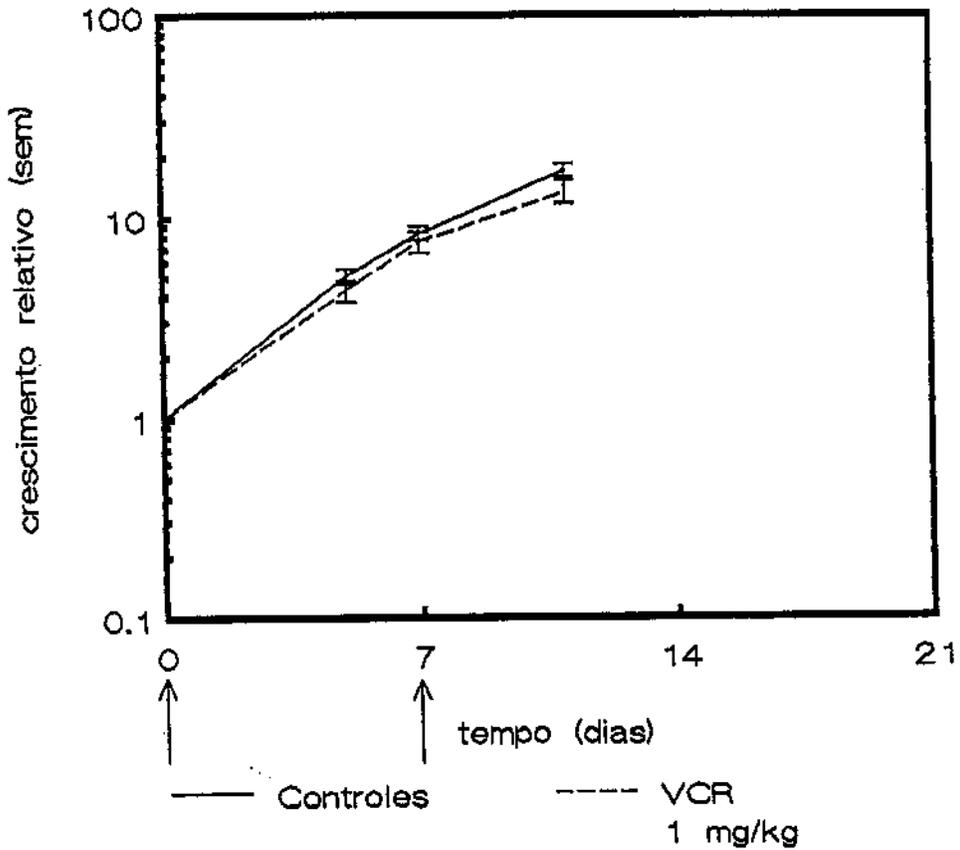
Curva de crescimento da Linhagem BRO como Xeno-enxertos
Tratamento com Vincristina (VCR)



Curva de crescimento relativo de xeno-enxertos na segunda passagem utilizando como valor 1, o volume do tumor no primeiro dia de tratamento. Compara-se a inibição de crescimento dos tumores sensíveis (BRO) ao tratamento com a dose máxima tolerada de vincristina em relação ao crescimento dos mesmos tumores não tratados (controles). O desvio de cada ponto foi calculado como erro padrão da média (sem).

Gráfico 4

Curva de Crescimento da Linhagem BRO mdr1.1 como Xeno- enxertos
Tratamento com Vincristina (VCR)



Curva de crescimento relativo de xeno- enxertos na segunda passagem utilizando como valor 1, o volume do tumor no primeiro dia de tratamento. Compara-se a inibição de crescimento dos tumores resistentes (BRO mdr1.1) ao tratamento com a dose máxima tolerada de vincristina em relação ao crescimento dos mesmos tumores não tratados (controles). O desvio de cada ponto foi calculado como erro padrão da média (sem).

2. Imunocitoquímica

Os controles realizados nas sucessivas passagens, com a utilização dos anticorpos monoclonais T101 e 9.2.27, não apresentaram modificações no padrão de coloração, além das variações de intensidade próprias a cada procedimento. Os monoclonais dirigidos contra a 170-Pgp apresentaram padrão heterogêneo de coloração, algumas células com grande intensidade e outras com imunoreação discreta ou mesmo ausente. Tal fenômeno apresentou-se tanto para células provenientes de cultura de tecido (sem a adição de vincristina) (fig. 5, página 60) quanto para as células dos xeno-enxertos (fig. 6, página 60). O ensaio com o monoclonal JSB1 mostrou 80% de positividade tanto em membrana como em citoplasma das células das linhagens resistentes nas passagens da cultura de tecido na ausência do agente seletivo. Para os monoclonais MRK16 e C219, a coloração foi evidenciada principalmente ao nível da membrana, e foi possível reconhecer a manutenção do número de células positivas e do padrão de coloração durante as passagens na cultura sob as mesmas condições (tabela 5, página 61). Na avaliação das células obtidas das passagens como xeno-enxertos, os 3 monoclonais foram detectados até a segunda passagem, que corresponde ao período de tempo de 6 semanas (tabela 6, página 62), apresentando durante este período de observação variação no padrão de localização do monoclonal. O JSB1 na segunda passagem se concentrou só no citoplasma, enquanto o C219 apresentou-se positivo somente na membrana celular.

Figura 5

**Células Originárias BRO mdr1.1 em Cultura de Tecido
Coloração de Imunoperoxidase com C219**

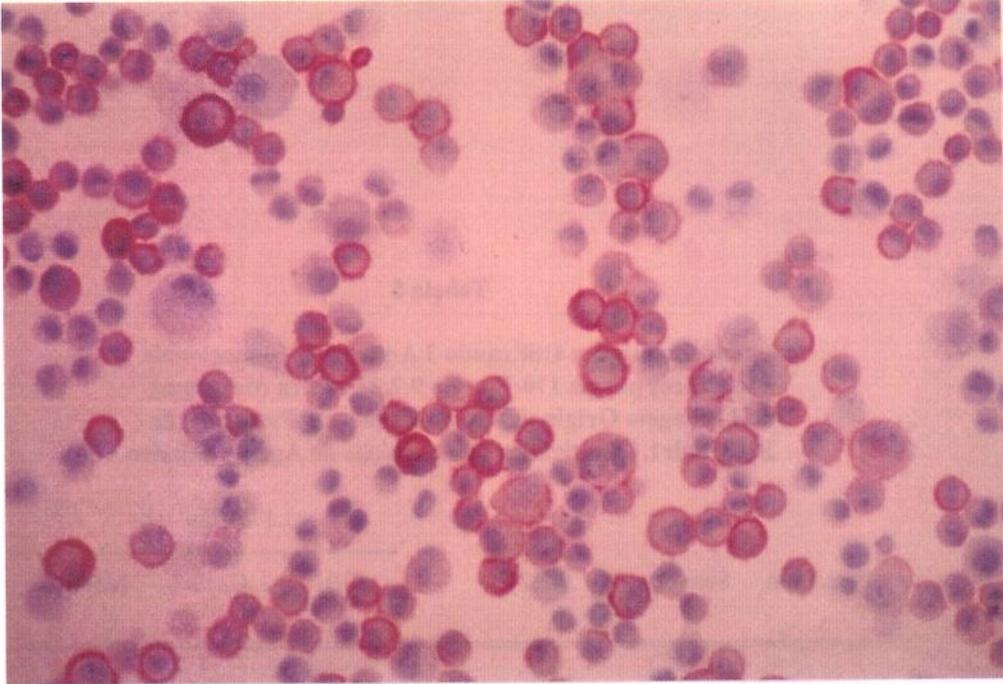
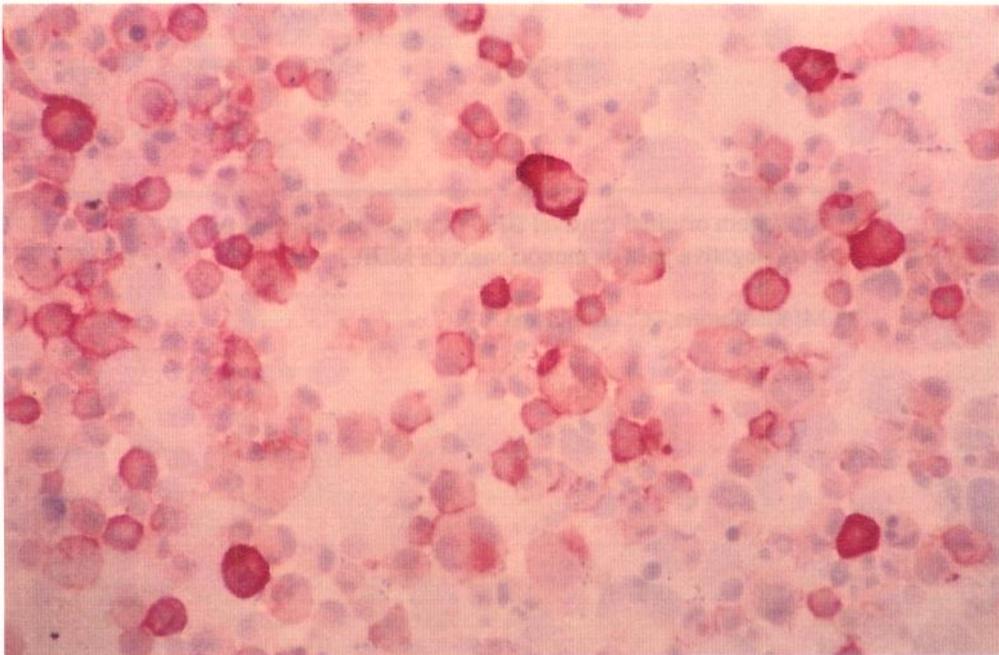


Figura 6

**Células da Primeira Passagem do Tumor BRO mdr1.1 em Xenó- enxerto
Coloração de Imunoperoxidase com C219**



Fotomicrografias de células BRO mdr1.1 submetidas a imunocitoquímica com o anticorpo monoclonal específico para a P-glicoproteína, C219. A figura 5 mostra células originárias da cultura de tecido e a figura 6 apresenta células obtidas de tumores na primeira passagem como xenó-enxertos. Ambas as lâminas foram preparadas pela técnica de citopins e documentadas com aumento original de 200 vezes. Em ambas as situações é bem evidente o caráter heterogêneo da coloração, com discreta positividade em citoplasma, mas maior concentração do monoclonal na membrana celular.

Tabela 5

Imunocitoquímica Utilizando 3 Anticorpos Monoclonais Específicos para a 170-Pgp e o 9.2.27 contra Melanoma na Linhagem Original e em Subseqüentes Passagens de BRO mdr1.1 Cultivadas sem a Adição de Agente Seletivo *

Passagem	Semanas	9.2.27	170-Pgp		
			JSB1	C219	MRK16
		**			
8	0	+++M	+M/C 80%	++M 80%	++M 80%
22	4	+++M/C	+M/C 80%	++M 80%	++M 80%
29	6	+++M	+M/C 80%	++M 80%	++M 80%

* Linhagem original sensível BRO mostrou positividade para 9.2.27 e foi negativa para os monoclonais da MDR.

** M: membrana; C: citoplasma

Tabela 6

Imunocitoquímica para Antígenos de Melanoma e 170-Pgp em Citospins de Suspensões Celulares Obtidas de Xenoxertos de BRO mdr1.1 em Sucessivas Passagens (1e2)

Passagem	Semanas	9.2.27	170-Pgp		
			JSB1	C219	MRK16
1	3	+++M/C	+++M/C*	+++M/C	+++M/C
2	6	++M	+C	++M	+M/C

* M: membrana; C: citoplasma

3. Quimiosensibilidade (MTT)

A comparação entre os IC_{50} das células transfectadas com o gene MDR1 e das linhagens originais, demonstrou serem as células portadoras do fenótipo MDR 8,5 vezes mais resistentes à doxorubicina. A mesma análise demonstrou uma resistência 403 vezes maior para a vincristina na linhagem transfectada do que as células originais (gráfico 5, página 64).

A avaliação da quimiosensibilidade das células, cultivadas por 6 semanas, em ausência de agente seletivo, mostrou uma redução da resistência para doxorubicina e vincristina quando comparadas à resistência inicial a estas drogas (tabela 7, página 65). No gráfico 6 (página 66) podemos visualizar os dados da tabela 7. Nos testes realizados com células obtidas das sucessivas passagens como xeno-enxerto, no mesmo intervalo de tempo (6 semanas), detectamos o mesmo resultado (tabela 8, página 67). No gráfico 7 (página 68) figuram os resultados da tabela 8. A comparação da perda de resistência, entre as células mantidas em cultura e as células provenientes dos xeno-enxertos, avaliando-se os mesmos períodos de tempo, está representada no gráfico 8 (página 69) onde verificamos as diferenças entre as células mantidas em cultura e as derivadas de xenoenxetos ambas na 3ª semana.

A definição do Fator de Resistência, como sendo a relação entre o IC_{50} de determinada passagem e o IC_{50} da linhagem original BRO, permitiu uma melhor visualização da variação da resistência detectada nos testes de quimiosensibilidade (tabela 9, página 76). Verifica-se a redução da resistência na sexta semana mas, principalmente para a vincristina há a persistência de valores significativamente maiores.

Tabela 7

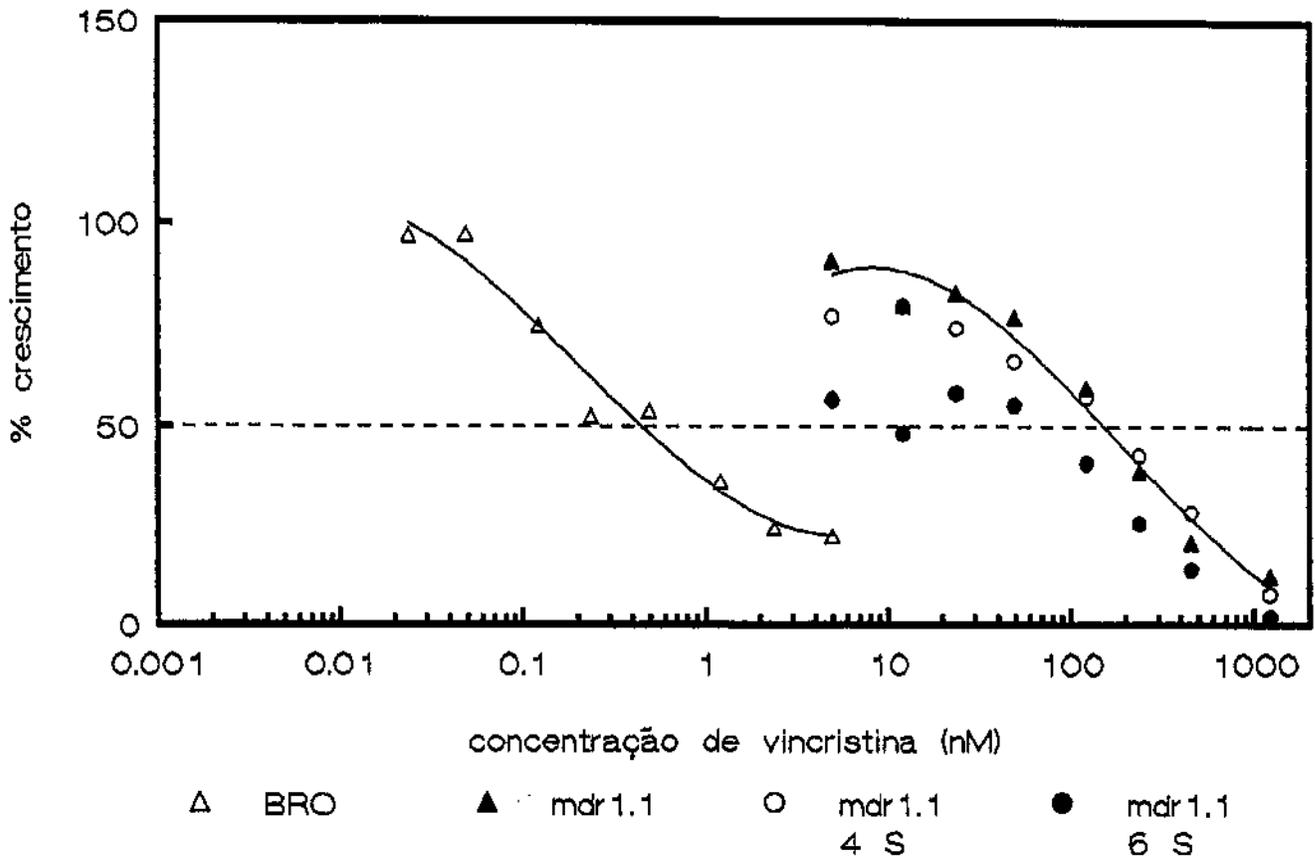
**IC₅₀ das Células Originais e das Sucessivas Passagens
Cultivadas na Ausência do Agente Seletivo por Períodos
Correspondentes às Passagens dos Xeno-enxertos**

Intervalo (semanas)	Doxorubicina(M)*	Vincristina(M)*
0 (BRO)	1.0×10^{-7}	3.6×10^{-10}
0 (BRO mdr)	8.5×10^{-7}	1.5×10^{-7}
4 (BRO mdr)	6.0×10^{-7}	1.6×10^{-7}
6 (BRO mdr)	3.2×10^{-7}	7.3×10^{-8}

* concentração expressa em molaridade.

Gráfico 6

Curva de Inibição de Crescimento com Vincristina das Células BRO mdr1.1 de Cultura Tecido sem a Adição de Agente Seletivo



As curvas comparam a inibição de crescimento com vincristina entre as linhagens originais, BRO e BRO mdr1.1, e as células BRO mdr1.1 cultivadas sem a adição de agente seletivo por sucessivas passagens. O período de tempo estudado foi de até 6 semanas(s) e utiliza-se como base de comparação a IC₅₀.

Tabela 8

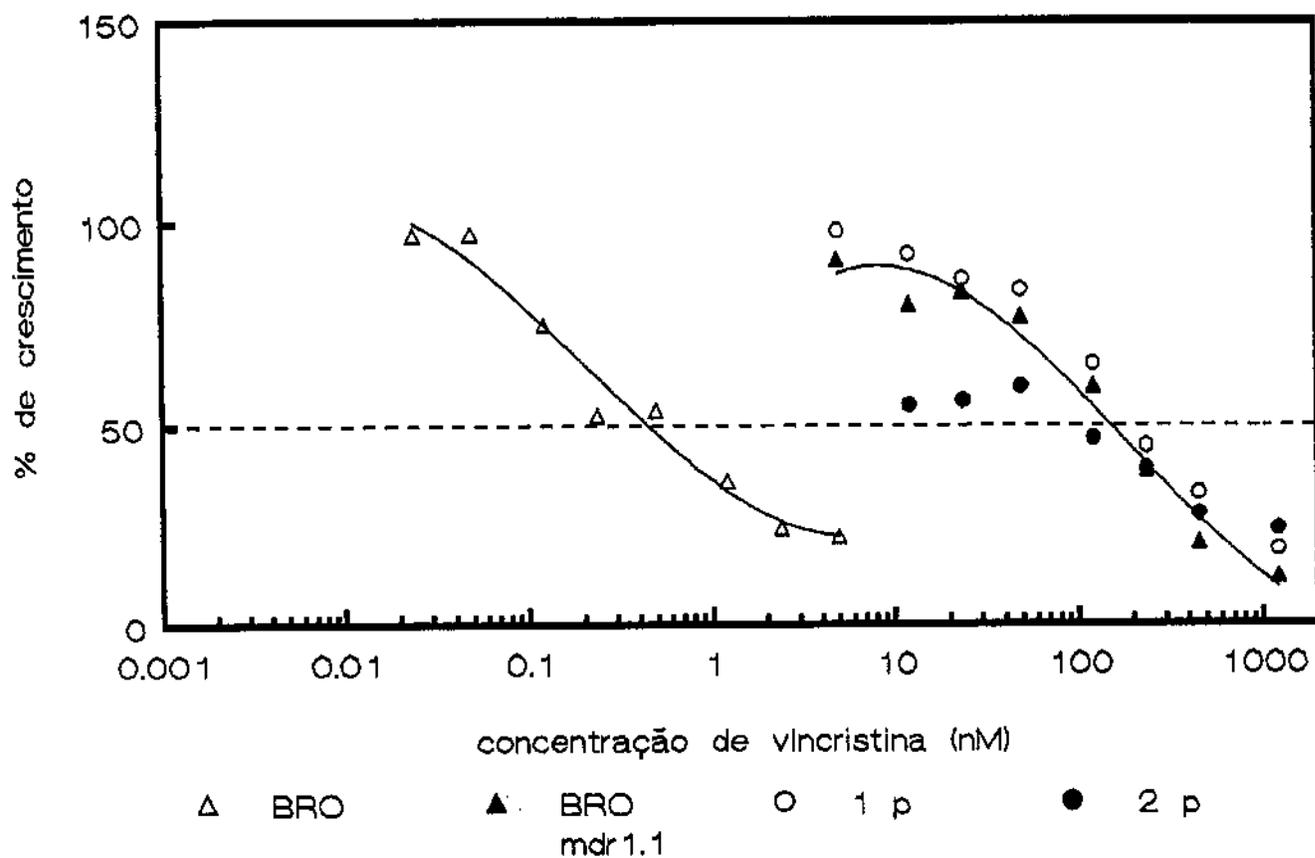
IC₅₀ das Células BROmdr1.1 Originais e Obtidas de Sucessivas Passagens como Xeno-enxertos

Passagem (semanas)	Intervalo	Doxorubicina(M)*	Vincristina(M)*
0	0	8.5×10^{-7}	1.5×10^{-7}
1	3	9.0×10^{-7}	1.6×10^{-7}
2	6	2.0×10^{-7}	9.0×10^{-8}

* concentração expressa em molaridade

Gráfico 7

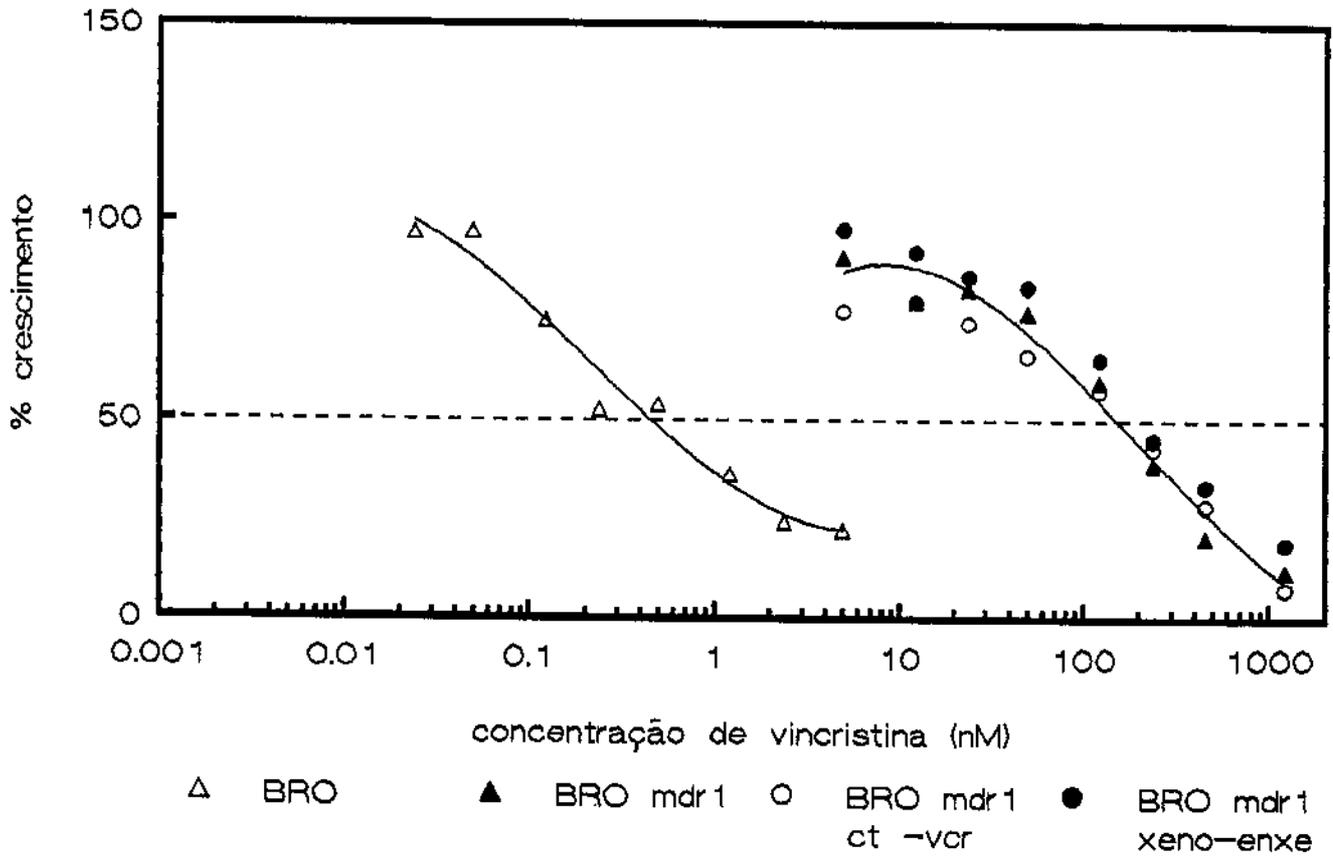
Curva de Inibição de Crescimento com Vincristina,
em Células BRO mdr1.1 de Xeno-enxertos



As curvas comparam a inibição de crescimento com vincristina entre as linhagens originais, BRO e BRO mdr1.1, e as células BRO mdr1.1 provenientes de xeno-enxertos por sucessivas passagens(p) em camundongos atímicos. O período de tempo estudado foi de 6 semanas e utiliza-se como base de comparação a IC₅₀.

Gráfico 8

Curva de Inibição de Crescimento com Vincristina nas Células BRO mdr1.1



As curvas de inibição de crescimento com vincristina das células BRO mdr1.1 cultivadas 3 semanas sem a adição do agente seletivo (ct-vcr) e em xeno-enxertos(xeno-enxe) pelo mesmo período de tempo superpõem-se à curva das células BRO mdr1.1 originais, demonstrando uma manutenção do fenótipo MDR.

Tabela 9

Fatores de Resistência (FR) para Vincristina (VCR) e Doxorubicina (DOX) em Células BRO mdr1.1 Cultivadas sem Agente Seletivo e Células Obtidas de Xeno-enxertos, Avaliados Simultaneamente e Comparados com a Linhagem Resistente Original. Período de Tempo em semanas

Passagem	VCR	Tempo	FR DOX	FR VCR	Passagem	Tempo	FR DOX	FR VCR
In Vitro				xeno-enxerto				
0	(+)		8.5	403				
24	(-)	4	6.0	444	1	3	9.0	444
29	(-)	6	3.2	201	2	6	2.0	250

4. Quantificação celular da 170-Pgp

Devido ao fato de a citometria de fluxo mostrar uma grande diferença nos valores absolutos de fluorescência média quando comparados experimentos independentes, optou-se pela análise destes resultados utilizando controles positivos e negativos intra-ensaio. Para a obtenção dos valores reais em cada experimento, subtraímos das médias de fluorescência o valor da reação de fundo, definida pela fluorescência obtida com o anticorpo monoclonal T101 (inespecífico). A avaliação entre as diferenças de fluorescências médias reais das linhagens BRO mdrl.1 original e BRO mdrl.1 cultivada na ausência de vincristina, durante 12 semanas (tabela 10 e gráfico 9, página 72), não demonstrou diferença na quantificação do antígeno pesquisado, a 170-Pgp.

A citometria de fluxo quantificou a expressão de 170-Pgp presente nas células BRO mdrl.1 e 2780 AD. Os dados de fluorescência real média em dois experimentos padronizados (tabela 11, página 73) permitem observarmos expressão 4.4 e 5.8 vezes menor para a linhagem BRO mdrl.1 em relação a 2780 AD. Estes resultados aparecem nos gráficos 10 e 11 (página 73), onde a diferença entre os picos de fluorescência máxima das linhagens 2780 AD e BRO mdrl.1 apresenta variação aproximada de 10 vezes em ambos os experimentos.

O emprego do teste de Scatchard possibilitou determinar, em dois experimentos independentes, o número de epitopos da 170-Pgp presentes por célula nas linhagens BRO mdrl.1 e 2780 AD. As células 2780 AD apresentaram, nas duas oportunidades, número maior de epitopos, detectados pelo anticorpo monoclonal MRK16 ligado ao radioisótopo ^{125}I como se pode verificar na tabela 12 (página 74), e gráficos 12 e 13 (páginas 75 e 76), que representam os dados do experimento 1 da tabela 12.

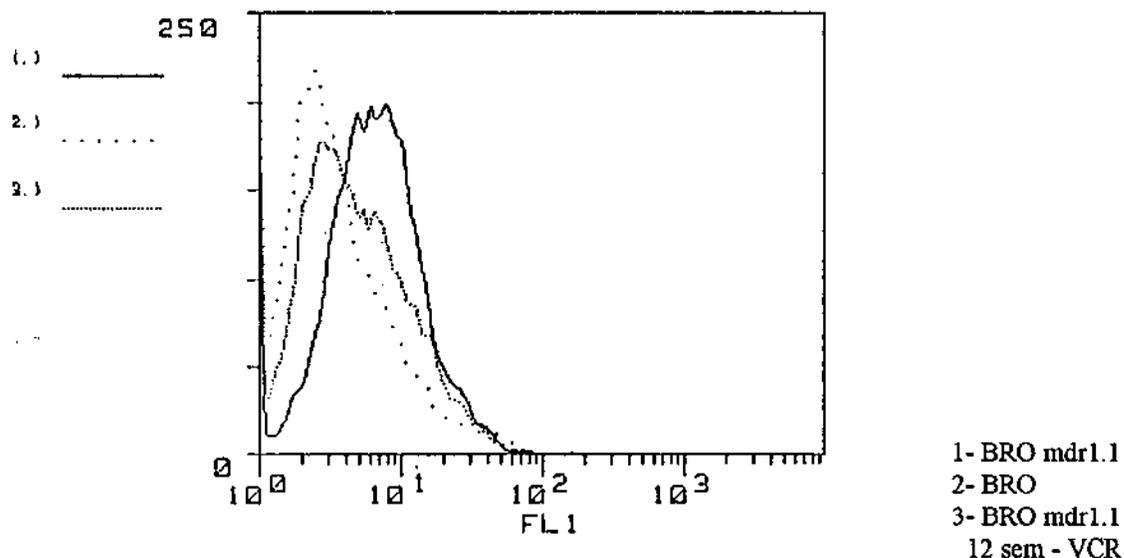
Tabela 10

Valores de Fluorescência Média Obtidos por Citometria de Fluxo

Linhagens	Monoclonais	
	9.2.27	MRK16
BRO mdr1.1	48.68	4.3
BRO mdr1.1 12 sem -VCR	49.11	4.38

Gráfico 9

Representação Gráfica da Tabela 10 para o Anticorpo Monoclonal MRK16.



Com a citometria de fluxo não se definiu uma diferença na expressão da P-glicoproteína, mensurada pela fluorescência média com o monoclonal MRK16, entre as células BRO mdr1.1 originais e as mantidas em cultura na ausência do agente seletivo por 12 semanas (12 sem - VCR). O controle negativo foi feito com as células BRO. Nota-se ainda que é pequeno o número de epitopos positivos nas linhagens resistentes em relação à linhagem sensível.

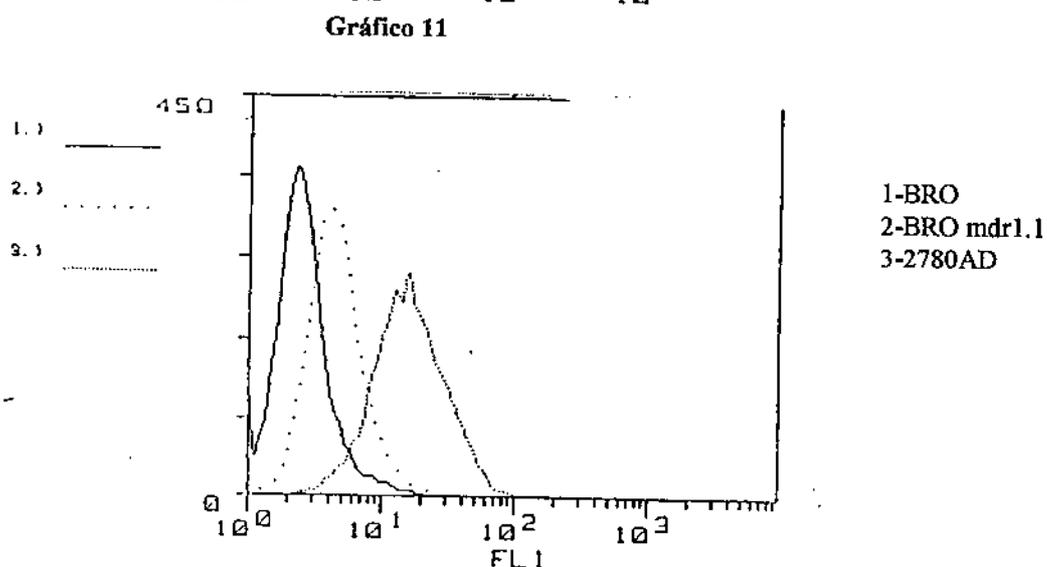
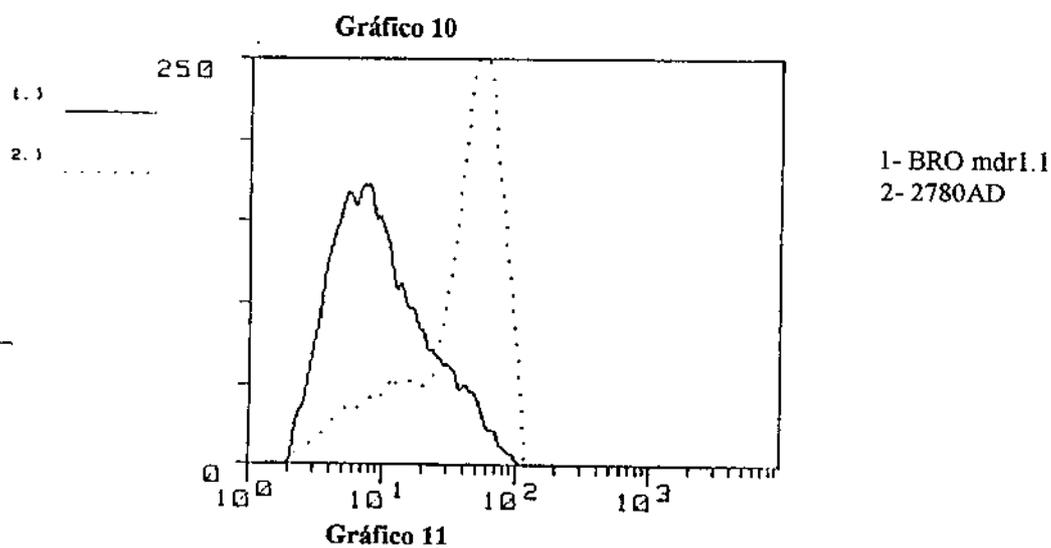
Tabela 11

Valores de Fluorescência Média Obtida por Citometria de Fluxo

	Experimento 1	Experimento 2
BRO	2.71 *	1.54
BRO mdr1.1	10.2	3.12
2780 AD	45.06	18.01

* dado não representado graficamente

Os gráficos referentes à tabela 11 estão representados a seguir:



Em distintos experimentos demonstrou-se, por citometria de fluxo, a diferente expressão da P-glicoproteína ao monoclonal MRK16 nas linhagens BRO mdr1.1 e 2780AD (gráfico 10) diferença esta que persiste no gráfico 11 onde comparou-se as linhagens BRO, BRO mdr1.1 e 2780AD.

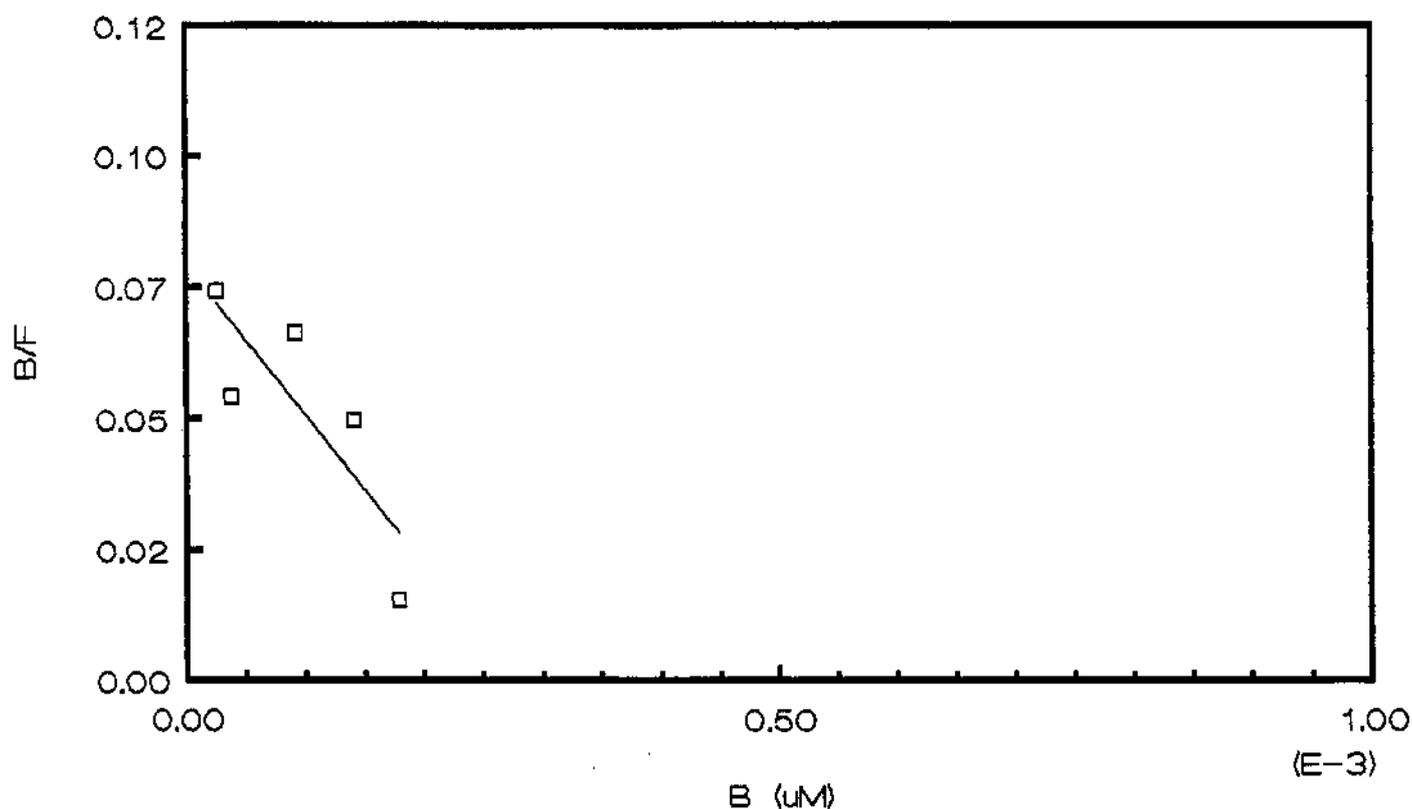
Tabela 12

Número de Epítopos por Célula Detectados pelo Método de Scatchard nas Linhagens BRO mdr1.1 e 2780 AD

	experimento 1	experimento 2
BRO mdr1.1	6.6×10^4	2.3×10^5
2780 AD	1.6×10^6	1.7×10^6

Gráfico 12

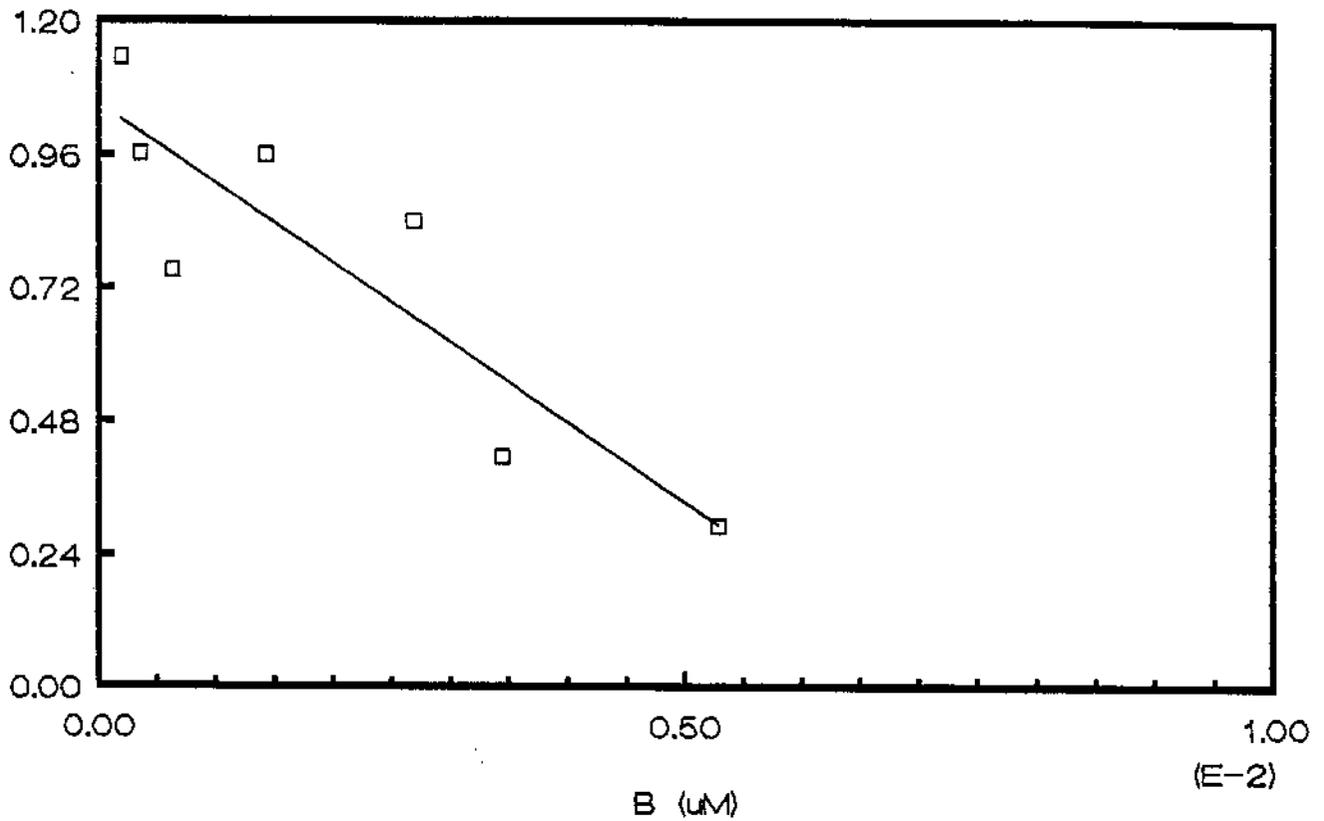
Teste de Imunocompetição de Scatchard com Células
BRO mdr1.1 Originais e Anticorpo Monoclonal MRK16
Marcado com ^{125}I



A representação gráfica do teste de imunocompetição com células BRO mdr1.1 originais e anticorpo monoclonal MRK16 marcado com ^{125}I permite extrapolar a reta obtida para o ponto de ligação específica total ou diluição infinita do monoclonal ($B/F = 0$) fornecendo a concentração de $0.275 \times 10^{-3} \text{ uM/L}$ do anticorpo. Conhecendo o número de células presentes temos como resultado a determinação de 6.6×10^4 epitopos por célula da linhagem BRO mdr1.1.

Gráfico 13

Teste de Imunocompetição de Scatchard com Células
2780AD Originais e Anticorpo Monoclonal MRK16 Marcado
com ^{125}I



A representação gráfica do teste de imunocompetição de Scatchard com células 2780AD originais e anticorpo monoclonal MRK16 marcado com ^{125}I permite a extrapolação da curva de imunocompetição de Scatchard para o ponto de ligação específica total ($B/F = 0$) resultando na concentração de $0.725 \times 10^{-2} \text{uM/L}$ e a determinação de 1.6×10^6 epitopos por célula.

5. Avaliação dos agentes reversores da MDR

5.1 Avaliação "in vitro"

A definição de um Fator de Reversão, obtido a partir da divisão do IC_{50} da passagem avaliada pelo IC_{50} da linhagem BRO original para a droga citotóxica em estudo, possibilitou uma comparação mais clara da ação dos agentes reversores.

A adição do agente bepridil aos testes de quimiosensibilidade por MTT, demonstrou o efeito de reversão da resistência múltipla desta droga. As passagens foram testadas com 4 μ M de bepridil. O fenômeno de reversão pode ser detectado tanto nas linhagens cultivadas sem a adição do agente seletivo (tabela 13 e gráfico 14, páginas 78 e 79) quanto em suspensões de células das passagens nos camundongos atímicos (tabela 14 e gráfico 15, páginas 80 e 81).

O potencial reversor do solvente Cremofor foi testado com as células BRO mdr1.1 "in vitro" e mostrou ser tóxico em doses acima de 35 μ g/ml. As concentrações testadas com toxicidade aceitável apresentaram um efeito reversor acentuadamente menor que o bepridil (gráfico 16, página 82). Com este resultado, somente a droga Bepridil foi selecionada para ser testada no modelo BRO "in vivo".

Tabela 13

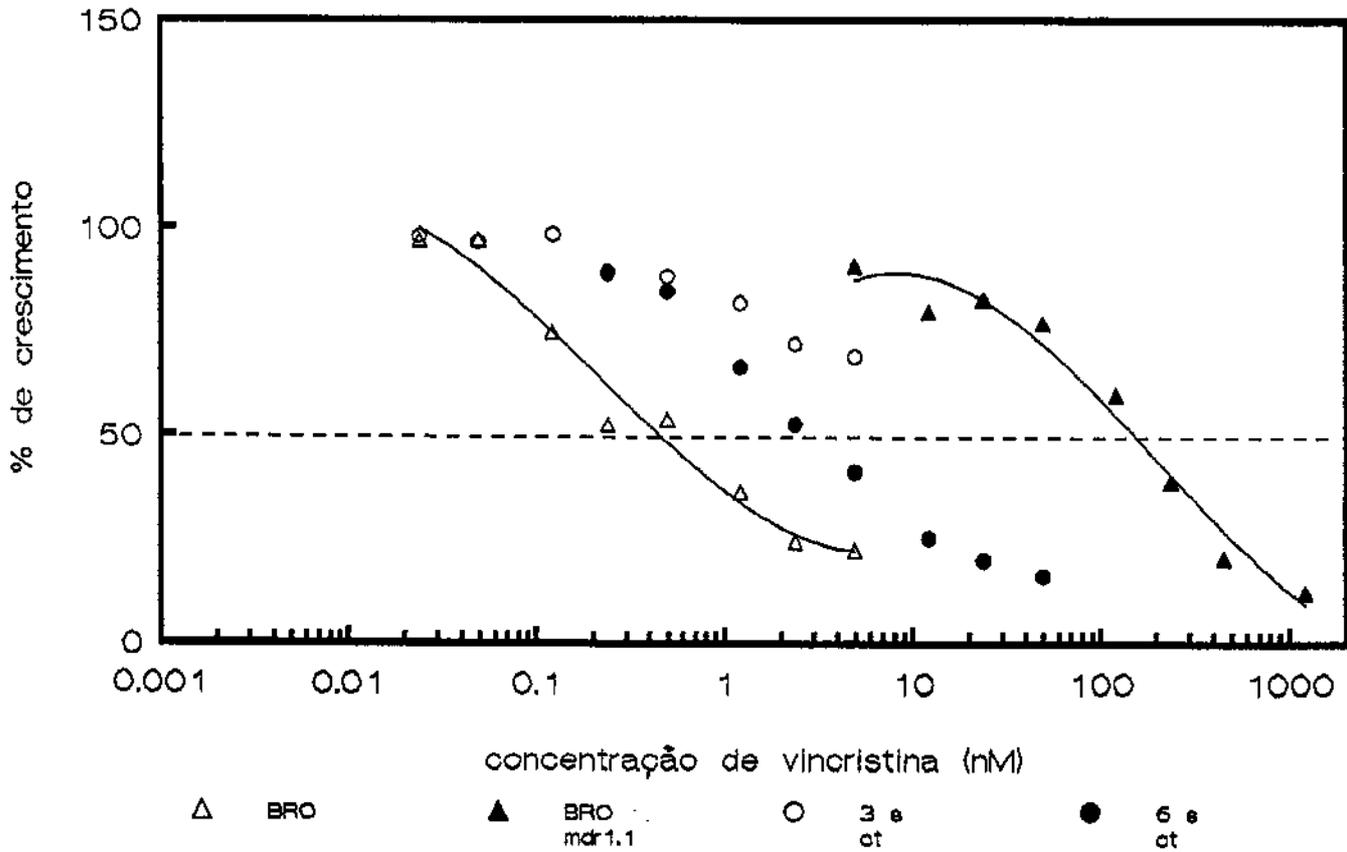
Fatores de Resistência à Doxorubicina (DOX) e Vincristina (VCR) e a Reversão Obtida com Bepridil (BEP) em Suspensões Celulares de BRO *mdr1.1* Cultivadas sem a Adição de Vincristina ao Meio

Passagem	Tempo Semanas	DOX	DOX + BEP	VCR	VCR + BEP
24	4	6.0	2.4*	444	14*
29	6	3.2	1.4*	201	44*

* bepridil na concentração de 4 μ M.

Gráfico 14

Curva de Inibição de Crescimento para Avaliação do Efeito Reversor nas Células BRO mdr1.1



Curva de inibição de crescimento com vincristina e bepridil, para avaliação do efeito reversor nas células BRO mdr1.1 em cultura de tecido (CT) sem a adição de agente seletivo, por períodos de tempo (em semanas)(S) correspondentes as passagens nos xeno-enxertos, comparadas com às curvas das linhagens originais BRO e BRO mdr1.1. A dose de bepridil foi de 4 μ M.

Tabela 14

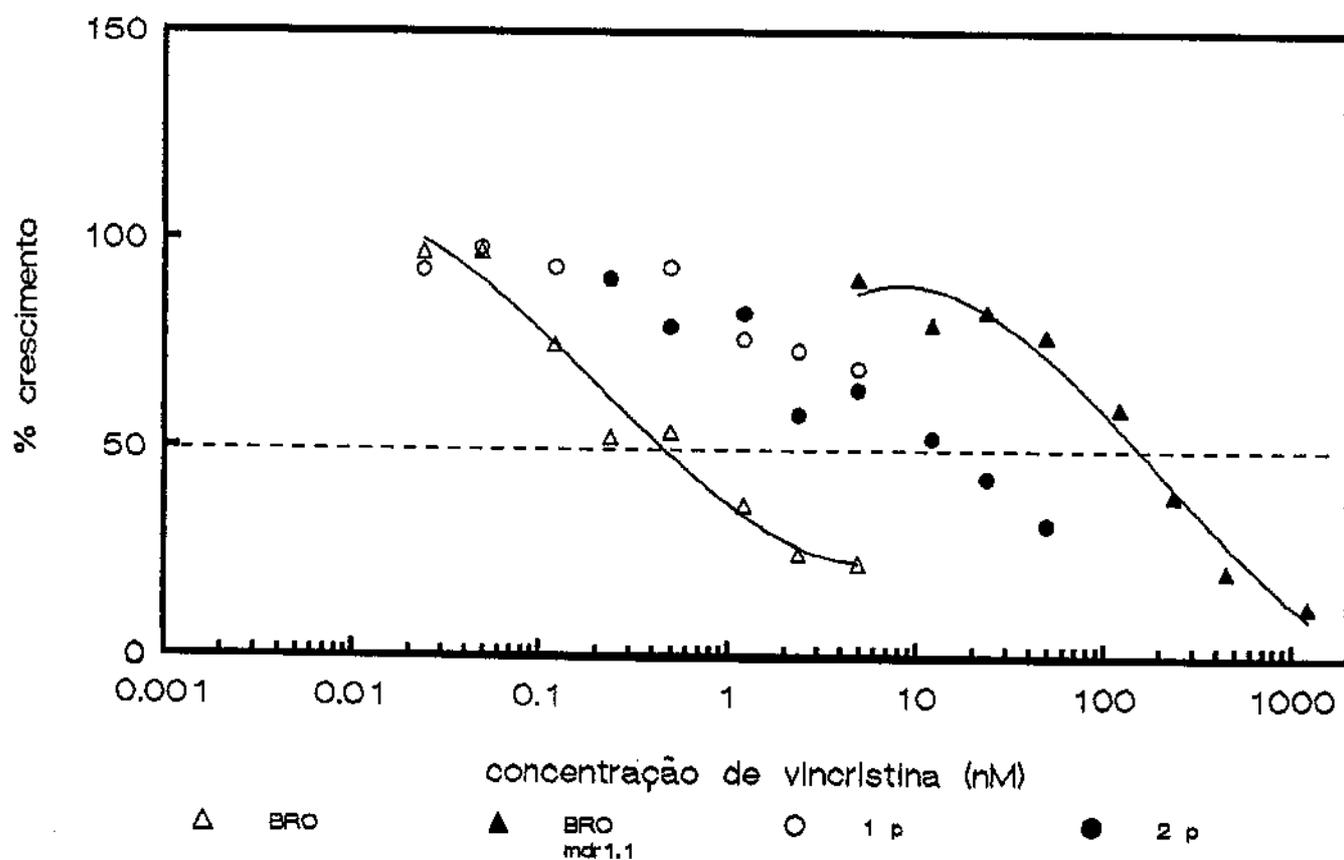
Fator de Resistência à Doxorubicina (DOX) e Vincristina (VCR) e a Reversão Obtida com Bepridil (BEP) em Suspensões Celulares de Xeno-enxertos de BRO mdr1.1 em Sucessivas Passagens

Passagem	Tempo Semanas	DOX	DOX + BEP	VCR	VCR + BEP
1	3	9.0	3.2*	444	14*
2	6	2.0	0*	250	35*

* bepridil na concentração de 4 uM.

Gráfico 15

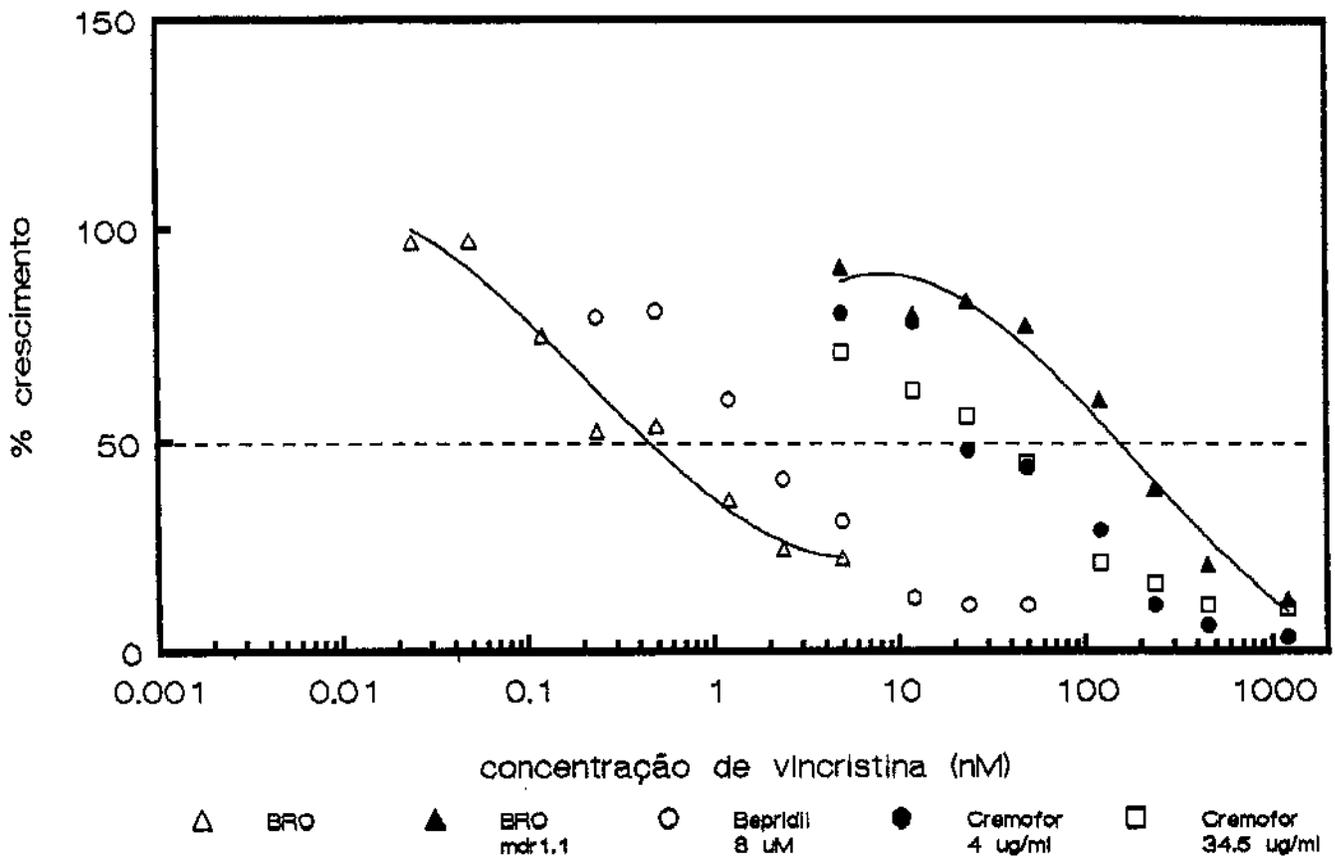
Curva de Inibição de Crescimento para Avaliação do Efeito Reversor nas Células BRO mdr1.1 de Xeno-enzertos



Curva de inibição de crescimento com vincristina e bepridil, para avaliar o efeito reversor nas células BRO mdr1.1 de sucessivas passagens (p) em xeno-enzertos, comparadas com as curvas das linhagens originais BRO e BRO mdr1.1. A dose de bepridil foi de 4 μ M de bepridil.

Gráfico 16

Comparação do Efeito Reversor nas Células BRO mdr1.1



Curva de inibição de crescimento com vincristina, bepridil e cremofor, para avaliação de efeito reversor nas células BRO mdr1.1, comparadas com as curvas originais das células BRO e BRO mdr1.1. O agente cremofor apresentou um efeito reversor da resistência a múltiplas drogas muito inferior ao agente bepridil nos testes de citotoxicidade, mesmo quando utilizado em altas concentrações.

5.2 Avaliação "in vivo"

Através do método de cromatografia gasosa não foi possível a detecção dos níveis plasmáticos atingidos após a administração oral de bepridil. Tal fato se justifica pelas baixas doses da droga aceitas pelos animais, permanecendo indeterminada a sua farmacocinética por via oral em camundongos atímicos. Na administração por via intraperitoneal foi possível a dosagem plasmática do bepridil, obtendo-se a farmacocinética por cromatografia gasosa para administração única na concentração de 60 mg/kg (tabela 15, página 84) com meia vida de eliminação muito rápida, sendo $T_{1/2}$ alfa = 6.79 min e $T_{1/2}$ beta = 179.34 min. A farmacocinética obtida na dose de 30 mg/kg de bepridil marcado com o radioisótopo ^{14}C mostrou o mesmo comportamento (gráfico 17, página 85). Neste estudo, comparamos as concentrações de bepridil presentes no fígado, rim e tumores BRO mdr1.1. A farmacocinética nos tumores acompanhou os níveis séricos não ocorrendo retenção da droga nas massas neoplásicas (gráfico 18, página 86). Rins e fígado foram os órgãos que apresentaram maiores concentrações.

A tentativa de obter maiores doses do reversor no tumor empregando administrações repetidas de bepridil é visualizada no gráfico 18 (página 86) como pontos isolados no tempo de uma hora. Ao analisar as concentrações obtidas nos diversos tecidos, observa-se uma concentração renal extremamente alta, não sendo detectado acúmulo do agente reversor nos tumores BRO mdr1.1.

O esquema de 3 injeções de 30 mg/kg de bepridil, com intervalos de 1 hora entre cada aplicação, sendo a primeira administrada em associação com vincristina, foi proposto baseado na rápida eliminação da droga nos camundongos e na tentativa de obter-se no tumor a presença concomitante do agente reversor da resistência e do agente citotóxico, por um período de tempo mais prolongado. A dose máxima tolerada para a combinação proposta foi de 40 mg/kg i.p. de bepridil por injeção e 1 mg/kg i.v. de vincristina. A diferença entre as curvas de inibição de crescimento dos grupos-controle, tratados com soro fisiológico ou bepridil, e do grupo tratado com agente reversor e vincristina não foi estatisticamente significativa (gráfico 19, página 87), exceto no ponto correspondente a 11 dias pós - tratamento.

Tabela 15

**Níveis Plasmáticos Médios de Bepridil em Camunongos após
Administração Intraperitoneal (60 mg/ml)**

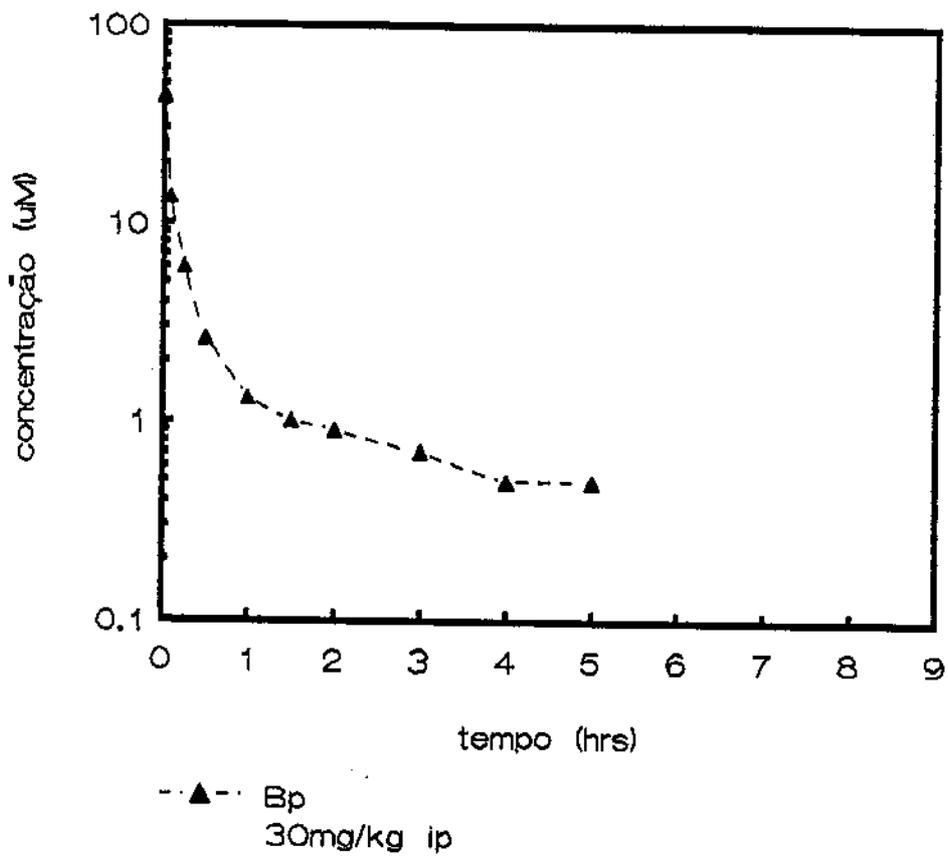
Tempo (min)	Concentração de Bepridil por exemplar (ug/ml)			média
5	4,7	9,2*	5,0	4,9
15	5,0*	2,1	2,2	2,2
30	0,79	1,3	0,75	0,95
45	1,0	0,85	-!	
60	0,37	0,56	-	0,47
90	0,36	0,33	0,37	0,35
120	0,32	0,35	0,35	0,34
180	0,65	0,28	0,21	0,25
240	0,19	0,36*	-	0,19
300	0,16	0,17	0,29	0,17
360	0,20	0,24	0,23	

* valor não usado no cálculo da mediana.

! valor não usado na curva de farmacocinética.

Gráfico 17

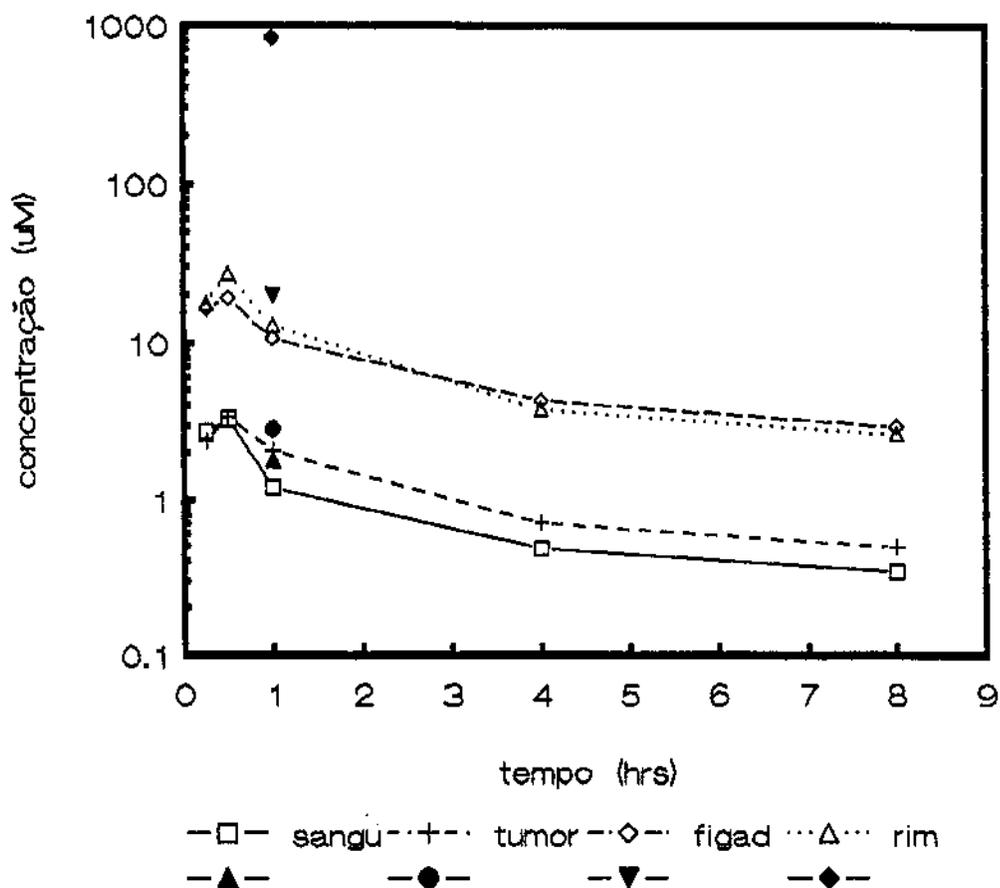
Farmacocinética do Bepridil Marcado com ^{14}C
no Sangue



Injeção intraperitoneal de 30 mg/kg de bepridil marcado com ^{14}C em camundongos atímicos. A curva de eliminação foi determinada por cintilação líquida. Notar o padrão rápido de eliminação plasmática.

Gráfico 18

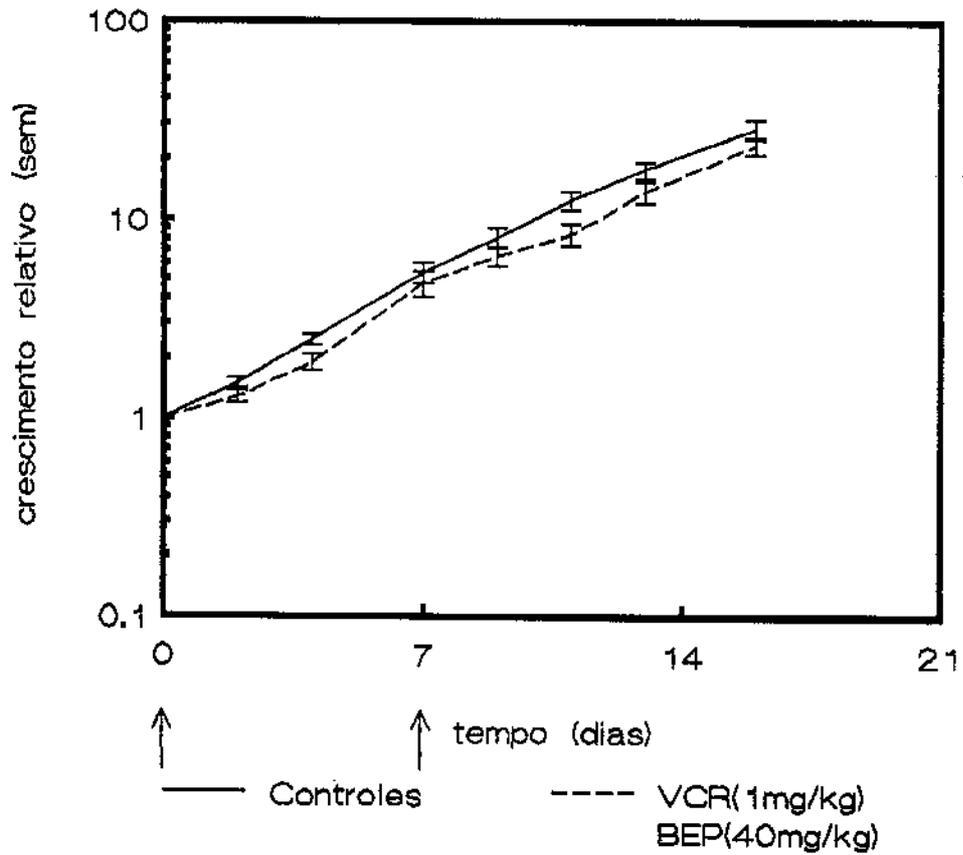
Farmacocinética do Bepridil Marcado com ^{14}C
em Sangue, Tumor BRO mdr1.1, Fígado e Rim



A curva de eliminação foi obtida por cintilação líquida com a injeção intraperitoneal de 30 mg/kg de bepridil em camundongos atímicos em dose única. Não se denota acúmulo diferencial nos tumores. Também não se demonstrou melhora na retenção da droga a nível de tumor quando se analisa, no tempo de 1 hora após a administração de doses repetidas de bepridil (pontos isolados no gráfico). Nesta situação encontra-se concentrações muito elevadas de bepridil apenas em tecido renal.

Gráfico 19

Curva de Crescimento de Xeno-enxertos BRO *mdr1.1* na Segunda Passagem, Tratados com a Associação de Vincristina e Bepridil



A comparação entre as curvas de crescimento dos tumores BRO *mdr1.1* controles e os tratados com duas doses da associação de vincristina e bepridil, ambas na MTD, com intervalo de uma semana, não denota redução importante da resistência na dose máxima tolerada do reversor.

6. Avaliação da radiosensibilidade das linhagens celulares em relação ao fenótipo MDR

Os testes de citotoxicidade com SRB e os testes clonogênicos foram comparados baseando-se na D_0 , classicamente definida nos estudos de radiosensibilidade como sendo a dose de irradiação responsável pela redução da população celular para 37% da população inicial (Johns, 1980). Estes resultados da citotoxicidade com SRB demonstram variações na radiosensibilidade entre as linhagens estudadas, sendo as originárias de tumor ovariano (2780S e 2780AD) mais sensíveis que as de melanoma (BRO e BRO *mdr1.1*) (gráfico 20, página 89). Por outro lado, a análise da radiosensibilidade, avaliada através dos testes clonogênicos nestas mesmas linhagens, permitiu verificar a tendência de maior resistência a irradiação nas linhagens portadoras do fenótipo MDR (2780AD e BRO *mdr1.1*) (gráfico 21, página 89). As diferenças de dose em D_0 nos dois testes, sumarizadas na tabela 16 (página 90), possibilita a observação de uma mesma faixa de sensibilidade para a irradiação em todas as linhagens, apesar das pequenas variações detectadas.

Gráfico 20

Teste de Radiosensibilidade com Sulfurodamina B (SRB).
Comparação em D_0

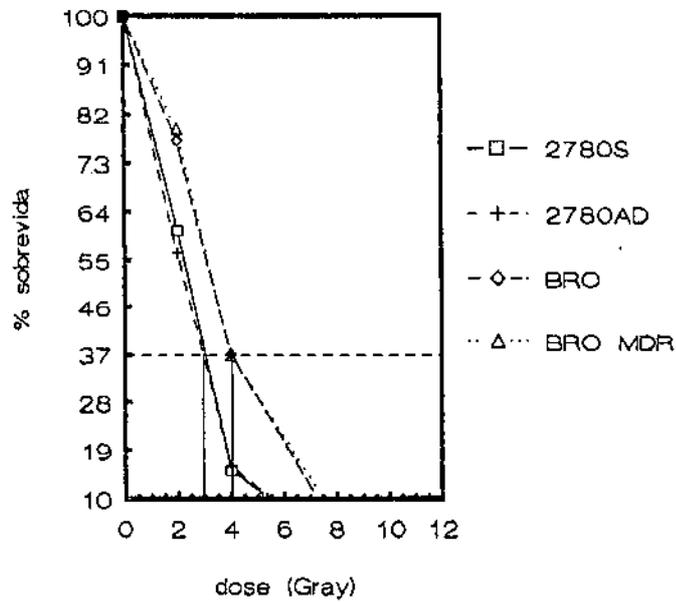
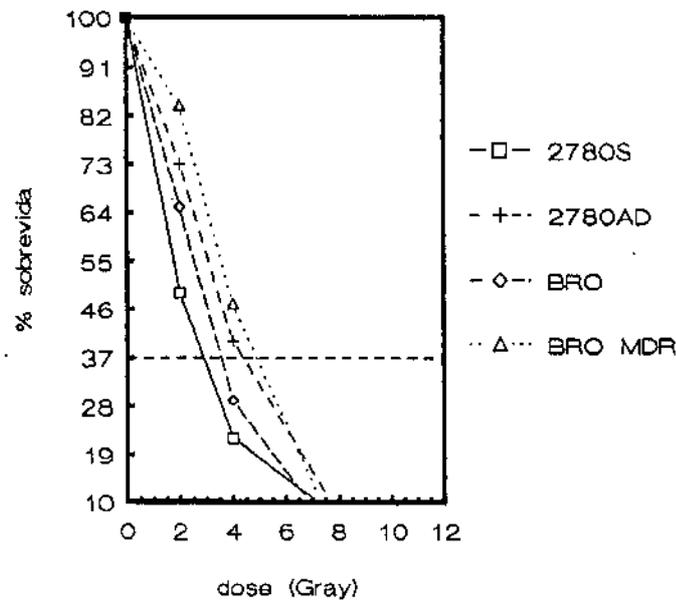


Gráfico 21

Teste de Radiosensibilidade com Ensaio Clonogênico.
Comparação em D_0



A comparação da radiosensibilidade de linhagens tornadas resistentes por processos diferentes (BRO *mdr1.1* por transfecção e 2780AD por exposição a concentrações progressivamente maiores de doxorubicina) com suas linhagens originais sensíveis não demonstrou ser diferente ao nível de D_0 , tanto no teste com sulfurodamina B (gráfico 20), quanto no teste clonogênico clássico para radiosensibilidade (gráfico 21).

Tabela 16

D₀ (em Gray) para Radiosensibilidade das Linhagens MDR e Linhagens Sensíveis

	SRB	Teste Clonogênico
2780 S	3	3
2780 AD	3	4.5
BRO	4	3.5
BRO mdl.1	4	5

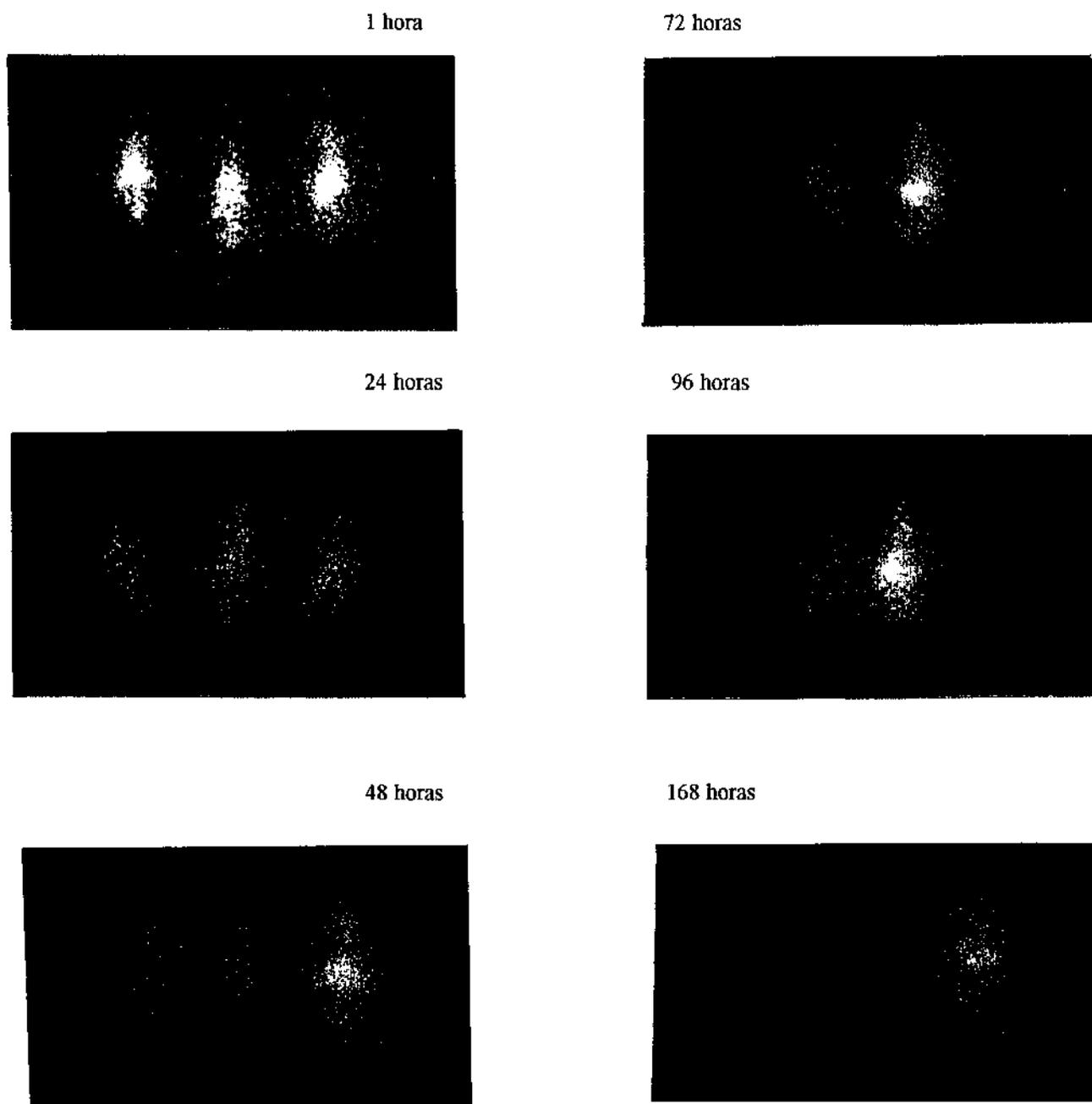
7. Eliminação dos Clones Celulares com Fenótipo MDR Utilizando-se Anticorpos Monoclonais Ligados a Radioisótopos

Para a primeira biodistribuição do anticorpo monoclonal MRK16 empregamos o radioisótopo ^{131}I . A ligação obtida mostrou 82,6% de incorporação do radioisótopo ao anticorpo monoclonal em atividade específica de 5,4 uCi/ug. O teste de qualidade de Lindmo (1984), utilizando células fixadas com glutaraldeído, mostrou imunoreatividade do ^{131}I -MRK16 para BRO de 14,3% e 32,4% para BRO mdr1.1. As imagens obtidas nos tempos de 1, 24, 48,72, 96 e 168 horas após a administração do monoclonal marcado (fig.7, página 92) não mostraram localização preferencial nos tumores localizados no flanco esquerdo, que eram da linhagem BRO mdr1.1 na segunda passagem. O mesmo ocorreu com os dados da biodistribuição, confirmando-se a ausência de captação específica nos tumores resistentes, em termos de percentagem da dose injetada (gráfico 22, página 93). Na segunda biodistribuição, empregou-se os monoclonais MRK16 (ligado a ^{131}I) e T101 (ligado a ^{125}I). A incorporação foi de 96,5% para MRK16 e 92,1% para T101. A atividade específica foi muito próxima para ambos os monoclonais, sendo 4 uCi/ug e 4.5 uCi/ug respectivamente. O teste de Lindmo com o anticorpo monoclonal MRK16 mostrou, neste experimento, uma imunoreatividade de 74% para BRO mdr1.1 e de 78% para 2780AD. O teste de controle negativo com o anticorpo monoclonal T101 não demonstrou imunoreatividade (3,08%) para as células BRO mdr1.1. Na biodistribuição, não foi possível detectar captação e retenção preferencial do monoclonal MRK16 no tumor em comparação com a captação do anticorpo monoclonal T101 (gráfico 23, página 94).

Os animais tratados foram acompanhados e mensurados durante o experimento não se detectando diferenças nas taxas de crescimento tumoral quando comparados aos controles.

Figura 7

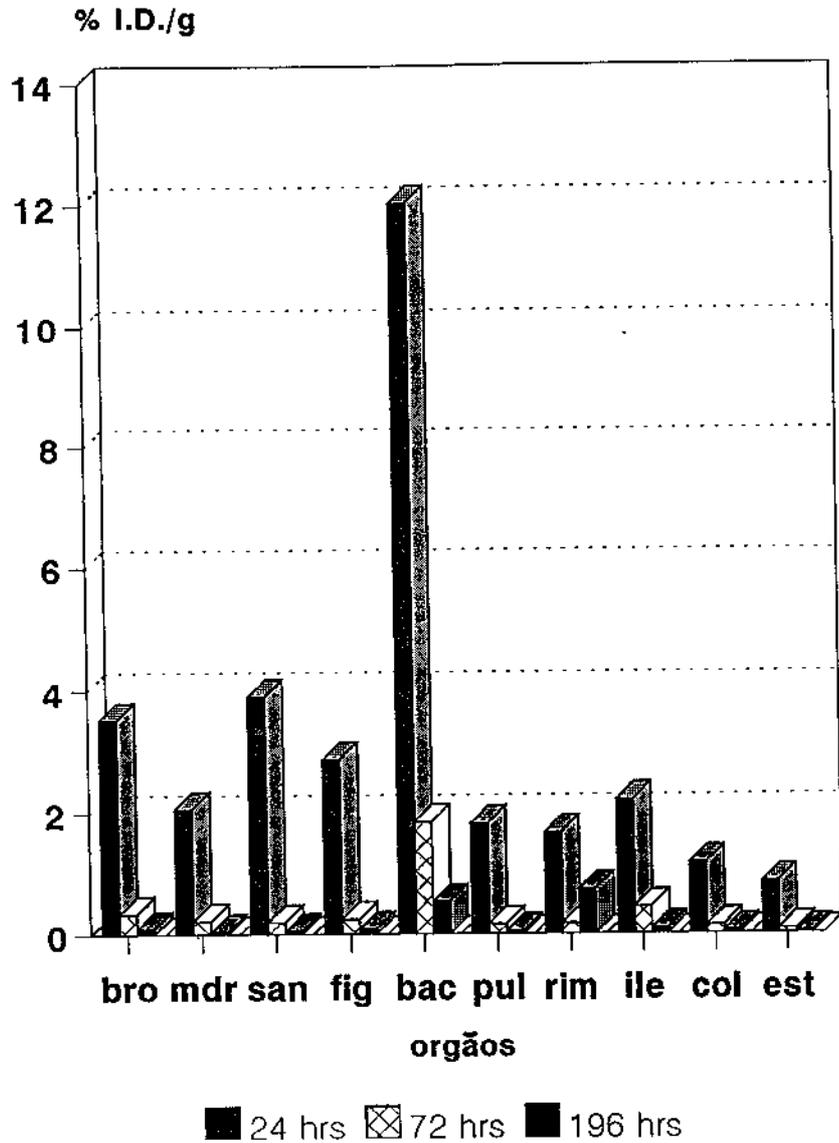
Controle Cintilográfico após a Injeção de 60 uCi/Camundongo do Monoclonal MRK16 Marcado com ^{131}I para Biodistribuição



Nas imagens cintilográficas dos camundongos atímicos, obtidas em sucessivos intervalos até 168 horas após a injeção do anticorpo monoclonal MRK16 marcado com ^{131}I , não houve localização preferencial do radioisótopo nos tumores resistentes (BRO *mdr1.1*) localizados no flanco esquerdo em comparação com os tumores sensíveis (BRO) localizados no flanco direito, ambos na segunda passagem.

Gráfico 22

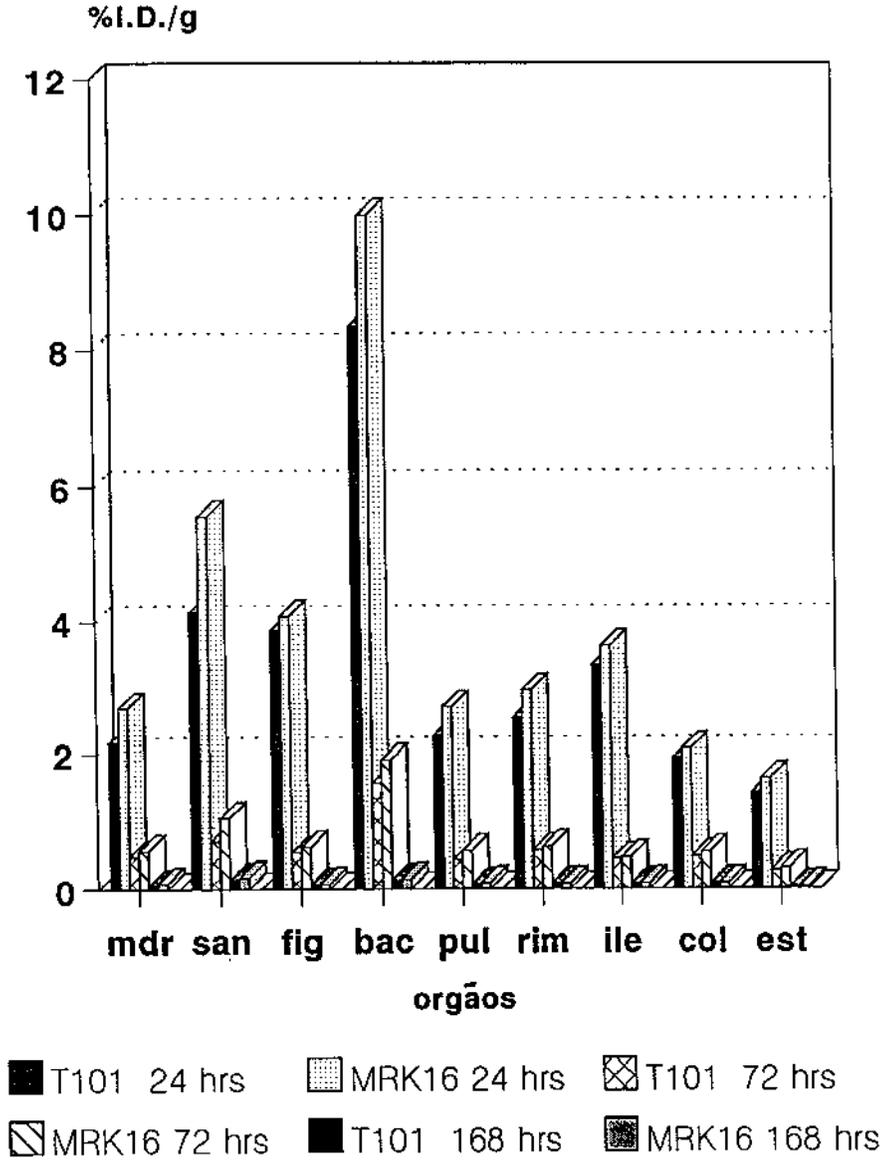
Biodistribuição do Anticorpo Monoclonal MRK16
 Marcado com ^{131}I em Camundongos Atômicos
 Portando tumores BRO e BRO mdr1.1



O gráfico de biodistribuição do monoclonal MRK16 marcado com ^{131}I em vários órgãos e diferentes tempos demonstra que a porcentagem de dose injetada por grama de tecido analisado não foi maior para o tumor BRO mdr1.1, não ocorrendo, portanto, uma localização preferencial do anticorpo "in vivo". O órgão que apresentou maior concentração do monoclonal foi o baço. Os animais apresentavam o tumor BRO mdr1.1 no flanco esquerdo e BRO no flanco direito, ambos na segunda passagem, sendo este utilizado como controle de captação.

Gráfico 23

Biodistribuição dos Anticorpos Monoclonais MRK16
Marcado com ^{131}I e T101 Marcado com ^{125}I em
Camundongos Atímicos Portando Tumores BRO mdr1.1



O gráfico mostra a biodistribuição de dois monoclonais, MRK16 marcado com ^{131}I e T101 marcado com ^{125}I , sendo este último utilizado como controle de captação inespecífica. Os animais portavam a segunda passagem de tumores BRO mdr1.1 em ambos os flancos. Na análise dos vários órgãos estudados conclue-se que não houve captação preferencial específica nos tumores e o baço reteve a maior parcela do anticorpo. Estes achados repetem-se nos 3 períodos de tempo estudados.

Discussão

A procura de novas drogas ou a síntese de compostos similares aos citotóxicos já existentes, mas que apresentem menor toxicidade sem redução da ação tumoricida, é um campo extremamente ativo na pesquisa oncológica atual visando melhorar os índices de cura do câncer. Nesta área, porém, deparamos com limitações, como o período médio de 12 a 15 anos de pesquisa, que são necessários para uma droga ultrapassar os limites dos testes de laboratório e alcançar o emprego terapêutico corriqueiro. Além disso, é muito reduzido o número de compostos que apresentam atividade antitumoral suficiente para o uso clínico. Cumpre lembrar que o serviço de "screening" do NCI (National Cancer Institute, EUA) testou, nos últimos 30 anos, cerca de 600.000 substâncias (Driscoll, 1984) e, hoje, temos como quimioterápicos disponíveis rotineiramente somente 36 compostos sendo que o último a ser incorporado à clínica foi o Taxol, cuja atividade antineoplásica foi determinada em 1967 (Wani, 1971) e só chegou ao oncologista clínico em 1992.

Outra frente de estudos focaliza as possibilidades de tornar as drogas já existentes mais efetivas, a partir do esclarecimento dos mecanismos de resistência que as células tumorais desenvolvem para cada quimioterápico e da definição de processos que permitam superá-los. Nesta área, a MDR apresenta-se como um dos campos de estudo mais ativos nos últimos anos devido a sua importância na clínica por envolver drogas básicas em vários esquemas de tratamento de primeira linha nos tumores mais frequentes. Apesar de todo o esforço, o mecanismo molecular envolvido na resistência a múltiplas drogas não está completamente estabelecido persistindo como um dos focos de intensa pesquisa com 251 trabalhos publicados em 1993 (MEDLINE, novembro 1993). Acrescente-se o fato de serem as fontes naturais as mais promissoras fornecedoras de novas drogas, e portanto com alta probabilidade de se enquadrarem no espectro da MDR, como no caso dos novos agentes, taxol e seus derivados, que já estão incluídos no grupo de antineoplásicos ligados à resistência a múltiplas drogas (Jachez, 1993).

Dados da literatura vêm continuamente indicando uma maior importância da resistência a múltiplas drogas na prática clínica. Os tumores de mama (Bittl, 1991; Castagna, 1991; Jackisch, 1991) tem mostrado níveis de positividade nos testes para 170-Pgp de 10% a 50% dos casos e relaciona-se com pior prognóstico destes casos. Devido a estes resultados, cada vez mais frequentes, há trabalhos sugerindo a possibilidade do emprego da 170-Pglicoproteína como marcador de resposta tumoral ao tratamento de tumores de mama, sarcomas de Ewing e neuroblastomas (Chevallard, 1993; Pozza, 1993; Chan, 1991, 1993) tendo em vista a perspectiva de já se iniciar a terapêutica com abordagens mais agressivas ou drogas que fugam do espectro da MDR nestes casos selecionados como pouco respondedores.

A pesquisa da MDR torna-se atrativa por várias outras possibilidades: sabe-se que o gene MDR1 além de se associar a presença da 170-Pgp nas células transfectadas e à maior resistência aos citotóxicos, provavelmente, associa-se à função normal de detoxificação do organismo, estando presente em órgãos com esta função (Fojo, 1987). A amplificação deste gene e o aumento na expressão de seu produto, a 170-Pgp, pode estar condicionada à presença constante e intensa de agentes agressores, abrindo uma perspectiva interessante no estudo da carcinogênese dos tumores conhecidos como intrinsecamente resistentes e originados nestes órgãos. Neste tópico, estudos "in vitro" com linhagens de tumores de colon tem demonstrado ser a 170-Pgp a única responsável pela maior resistência das linhagens selecionadas (Spoelstra, 1991). Relato da importância da expressão da 170-Pgp elevada na fase final da carcinogênese de carcinoma hepatocelular em ratos é descrita por Nakatsukasa (1992) e Kuo (1992). Outra perspectiva é a transfecção do gene MDR1 nas células progenitoras da medula óssea visando a redução da mielotoxicidade dos agentes quimioterápicos, pela presença da bomba de efluxo da 170 Pgp, permitindo o emprego de esquemas terapêuticos com altas doses, mais eficazes, mas, anteriormente inviáveis devido as mielossupressões fatais (Galski, 1989; Gottesman, 1992). E por último, a busca de agentes reversores que permitam ultrapassar o fenômeno da MDR, impõem-se como área prioritária na busca contínua de maiores índices de respostas e curas de neoplasias com resistência adquirida durante a terapia.

Neste setor da pesquisa incluímos este trabalho, cuja intenção foi estabelecer um modelo criado a partir de células transfectadas com o gene MDR1 que permitisse estudar o mecanismo da MDR ligada à expressão de 170-Pgp "in vivo" e que testasse propostas terapêuticas de reversão desta resistência, tanto utilizando-se associações de agentes reversores com quimioterapia convencional, como pela tentativa de abordagens ainda inéditas de radio-imunoterapia, empregando-se radioisótopos ligados a anticorpos monoclonais dirigidos contra a 170-Pgp.

Com estes objetivos optou-se pela linhagem celular BRO e a sublinhagem transformada em resistente por transfecção do gene MDR1, BRO *mdr1.1*, na expectativa de que neste modelo não ocorreriam interferências de outros mecanismos de resistência celular, descritos nas linhagens tornadas resistentes por exposição a doses crescentes de citotóxicos (Riordan, 1985; Fojo, 1985; Baas, 1990; Schuurhuis, 1991; Mirski, 1991; Marquardt, 1991).

No estudo do comportamento biológico dessas linhagens, nossos experimentos demonstraram não haver alteração na velocidade de duplicação celular quando comparadas as linhagens normais e as transfectadas com o gene MDR1, ambas mantidas em cultura de tecido, dados estes que confirmam a avaliação de

Lincke (1990). Nos xeno-enxertos a diferença detectada não é significativa e podemos considerar que ambos os tumores, BRO e BRO *mdr1.1*, apresentavam a mesma cinética celular, permitindo um estudo comparativo entre estas linhagens.

Os estudos de citotoxicidade "in vitro" com a linhagem BRO *mdr1.1* realizados por Lincke (1990) demonstraram resistência 300 vezes maior à gramicidina, 100 vezes à vincristina, 10 vezes à doxorubicina, colchicina e etoposide, quando comparada à linhagem original BRO. Os testes de citotoxicidade que realizamos nas células em cultura confirmaram os fatores de resistência da doxorubicina, mas demonstraram resistência à vincristina 4 vezes maior (fator de resistência = 400) em relação à descrita na literatura. Como o fator de resistência à doxorubicina manteve-se comparável aos níveis encontrados por Lincke, as diferenças da metodologia empregada nas duas situações não parecem justificar o achado. Este resultado surpreende se lembrarmos que estas células foram transfectadas com o gene *MDR1* já associado ao seu gene promotor. Esperava-se um único mecanismo de resistência: a presença invariável de 170-Pgp, expressando-se desta forma como resistência uniforme a todas as drogas. O fato das células BRO *mdr1.1* terem sido mantidas em cultura com a adição de vincristina desde sua transfecção permite aventar a possibilidade da seleção de clones mais resistentes a esta droga, por mutação na posição 185 da sequência de nucleotídeos (glicina por valina) da P-glicoproteína (Choi, 1988; Kioka, 1980); o desenvolvimento de outros mecanismos de resistência específicos para a vincristina, devidos ao estímulo da presença constante do citotóxico, é outra hipótese; ou mesmo a alterações de outras funções metabólicas celulares promovidas pelo gene *MDR1*, além da P-glicoproteína e ainda desconhecidas. Além dos fatores citados, não podemos descartar outros mecanismos de resistência não completamente determinados (Broxtermann, 1990), mas com provável alteração da topoisomerase II (Moscow, 1991).

No processo de estabelecer o modelo "in vivo", as respostas dos tumores BRO e BRO *mdr1.1* ao tratamento com doxorubicina e vincristina conservaram diferenças, estatisticamente significativas, na segunda passagem dos xeno-enxertos denotando uma nítida manutenção do fenótipo.

A análise da expressão da 170-Pgp presente nas células neoplásicas provenientes da cultura e dos xeno-enxertos, utilizando-se a técnica de imunoperoxidase em citospins com anticorpos monoclonais, demonstrou a presença de população heterogênea de células. Este padrão heterogêneo já foi descrito por Dalton (1989) e Broxterman (1989) em vários tumores humanos. O comportamento diferente de cada monoclonal não é relato isolado, tendo sido descrito na literatura em outros tecidos (Van der Valk, 1990), devendo-se levar em conta que cada um destes monoclonais apresenta atividade contra epítopos específicos e independentes. Houve, nas células

derivadas dos xeno-enxertos na segunda passagem, uma alteração no padrão de coloração quando comparados com a primeira passagem, onde todos os monoclonais apresentaram boa concentração tanto no citoplasma quanto na membrana. Esta modificação não pôde ser explicada por atividade do sistema imunológico dos animais portadores dos tumores sobre os enxertos, já que sendo os camundongos atímicos, só apresentam imunidade tipo B. Devido ao fato de se tratar de técnica extremamente sensível e susceptível de variações às mínimas modificações, esta alteração do padrão foi atribuído à técnica de coloração por imunocitoquímica, ficando no entanto fora de dúvidas a manutenção do fenotipo da MDR.

Devido ao achado de fator de resistência de 2.0 para doxorubicina e 250 para vincristina na segunda passagem nos experimentos "ex-vivos" com as células tumorais, a droga vincristina veio a se caracterizar como permitindo melhor avaliação de sua atuação "in vivo" nos testes de tratamentos combinados posteriores, onde por serem maiores os erros padrões, torna-se necessário maiores diferenças entre as respostas aos tratamentos.

A manutenção de resistência também foi demonstrada nos testes de citotoxicidade com MTT, e observada nos IC₅₀ tanto na segunda passagem de xeno-enxertos como nas células em cultura sem a adição de vincristina (Cunha, 1990). A mesma tendência a redução da resistência encontrada nos nossos resultados de citotoxicidade é descrita "in vitro" por Biedler (1993) em linhagens resistentes por exposição a doses crescentes de citotóxicos e ainda sem esclarecimento dos mecanismos envolvidos no processo. Por outro lado, o comportamento irregular de xeno-enxertos originados de linhagens resistentes foi detectado por Formelli (1986), cujos estudos "in vivo" demonstraram redução da resistência e perda da expressão da 170-Pgp nos seguimentos a longo prazo dos tumores. No nosso estudo este fenômeno foi de menor intensidade. Dentre as causas da diferença encontrada tanto na resistência, testada por citotoxicidade, quanto na expressão da 170 Pgp, avaliada com imunocitoquímica, entre as células mantidas em cultura e os xeno-enxertos na segunda passagem, deve-se considerar vários fatores inexistentes na cultura como a atuação do sistema imunológico, diferenças nutricionais e a atividade mitótica nem sempre havendo uma correlação linear entre a velocidade de duplicação das células e do volume do tumor (Boven, 1986). No entanto durante o período de seis semanas, até a segunda passagem dos xeno-enxertos, e também correspondente nas amostras provenientes da cultura de tecido, apresenta-se o modelo sem diferenças fenotípicas marcantes.

Segundo Linke, (comunicação pessoal) o fenótipo MDR das células BRO mdr1.1 é mantido e o MDR mRNA está presente, sendo detectado em todas as passagens examinadas e em quantidade similar

ao da linhagem celular BRO *mdr1.1* original, sendo que o gene transfectado MDR1 pôde ser detectado até na décima quarta semana nos xeno-enxertos.

A citometria de fluxo, na comparação das células originais com as cultivadas 12 semanas sem a adição de agente seletivo ao meio de cultura, não denotou redução na intensidade média de expressão da 170-Pgp nestas células nem uma redução do número de células positivas. Sendo um método com maior sensibilidade e precisão na quantificação do antígeno, podemos definir na avaliação global das várias abordagens do fenômeno, uma manutenção do fenótipo MDR durante o período estudado.

A grande resistência das células BRO *mdr1.1* à vincristina, tendo em contrapartida a sensibilidade das células BRO à esta droga, criou uma situação ideal para o estudo da resistência "in vivo". O efeito dos agentes reversores foi facilmente determinado e reproduzido, tanto nos estudos "in vitro" quanto "in vivo". A farmacocinética do bepridil em camundongos mostrou-se bem diferente dos dados em ratos (laboratório Organon) e em homens (Benet, 1985). Enquanto a meia vida no homem é de 33 a 54 horas, nos ratos está em torno de 60 a 80 minutos, variação esta justificada pela diferença nas velocidades metabólicas entre as espécies. Nossos dados definiram a meia vida em camundongos, após administração por via intraperitoneal, com a fase alfa de apenas 6,8 minutos e a fase beta de 3 horas. A rápida eliminação do agente reversor dificultou o estabelecimento de um esquema terapêutico factível no modelo com camundongos atímicos. Na tentativa de se acumular no tumor o agente reversor, utilizamos três aplicações consecutivas de bepridil na dose máxima tolerada definida por nossos experimentos (30 mg/kg ip), mas não obtivemos o resultado esperado. Também não detectamos efeito reversor importante, do ponto de vista de resposta tumoral, ao tratamento com o esquema proposto, empregando a associação de bepridil com vincristina, na dose máxima tolerada para o esquema, nos xeno-enxertos de tumores BRO *mdr1.1*. Estes resultados não chegam a surpreender quando verificamos que a dose máxima alcançada no sangue, durante a primeira hora após a administração desta associação, foi de 3.5 uM. A este fato associamos a evidência dos testes citotóxicos "in vitro" onde a reversão da resistência em cultura de tecido, com as células tumorais expostas diretamente a 4 uM da droga, foi somente parcial, sendo necessárias doses maiores (8 uM) para reverter de forma completa fatores de resistência variáveis entre 2 e 55. A soma destes resultados apresenta o agente bepridil com ação reversora apenas parcial no modelo BRO, se empregado nas concentrações plasmáticas possíveis de serem atingidas no ser humano (2 a 4 uM), pois doses maiores desencadeiam graves efeitos colaterais cardiotoxicos (Schuurhuis, 1987). Conseqüentemente, segundo este modelo, a possibilidade de emprego deste agente com sucesso na reversão da resistência a múltiplas drogas na prática clínica é mínima.

Os testes "in vitro" com o agente cremofor não detectaram atividade reversora da MDR que justificasse sua avaliação no modelo "in vivo" pois sua atividade foi sempre muito inferior a do bepridil.

Outra alternativa para se ultrapassar a resistência a múltiplas drogas foi testada no modelo BRO e consistiu na radioimunoterapia. Há relatos de aumento na expressão da 170-Pgp em linhagens celulares expostas à radioterapia fracionada (Hill, 1989; 1990), mas a correlação entre a resistência aos quimioterápicos e a resistência à radioterapia não foi demonstrada (Mitchell, 1988; Hill, 1990). Diante destes dados ainda controversos, testamos a radiosensibilidade de nossas linhagens para afastar a possibilidade de não haver resposta dos tumores resistentes à abordagem de radioisótopos ligados aos anticorpos monoclonais. Para tanto, as linhagens celulares foram testadas quanto à sua radiosensibilidade em ensaio clonogênico, e os resultados comparados ao teste de citotoxicidade com SRB, de manipulação mais simples, baseado no emprego de testes de citotoxicidade com MTT na avaliação da radiosensibilidade (Price, 1990). Os resultados foram similares, não se detectando diferenças significativas entre os métodos empregados como também entre as radiosensibilidades de linhagens resistentes e sensíveis. A simplicidade técnica do teste com SRB e a correspondência de valores encontrada nas linhagens testadas com os resultados do ensaio clonogênico, classicamente utilizado, faz com que se torne muito interessante a avaliação mais extensa desta técnica de definição de radiosensibilidade em outras linhagens para a determinação de sua acuidade e verificação da possibilidade de emprego em radiobiologia no futuro.

A inexistência de resistência cruzada entre as duas terapêuticas permitiu a realização da biodistribuição do anticorpo monoclonal MRK16 após a marcação deste com o radioisótopo ^{131}I . Na primeira biodistribuição obtivemos baixa especificidade no teste de Lidmo (34% para as células BRO mdr1.1). Este dado pode justificar a não concentração do radioisótopo nos tumores resistentes. Na segunda biodistribuição a imunoreatividade para as células BRO mdr1.1 foi de 74% e mesmo assim não detectamos uma localização específica. O fato de as duas biodistribuições, realizadas com o monoclonal MRK16 ligado ao radioisótopo ^{131}I , não terem apresentado captação preferencial nos tumores BRO mdr1.1 pode ter explicação na quantificação da 170 P-gp obtida dos resultados da citometria de fluxo e da imunocompetição de Scatchard. Considerando-se os dois experimentos de imunocompetição determina-se a média de 1.48×10^5 epitopos por célula para as células BRO mdr1.1 e 1.65×10^6 para a linhagem 2780AD. O número reduzido de epitopos presentes por célula BRO mdr1.1 torna difícil a utilização deste modelo com sucesso em abordagens terapêuticas baseadas nos anticorpos monoclonais, pois situa-se no limite mínimo descrito para um antígeno ser acessível aos anticorpos monoclonais circulantes e ter aplicabilidade clínica (Larson, 1986).

Podemos aqui resaltar a origem diversa das duas linhagens resistentes. As células BRO *mdr1.1* receberam o gene MDR1 por transfecção e as células 2780AD foram expostas a doses crescentes de citostáticos. As especulações sobre estas diferenças e sua relação com o número de epitopos encontrados em cada linhagem ou mesmo divergências entre tumores com resistência adquirida ou intrínseca, permanece um campo aberto a novas pesquisas.

As perspectivas criadas pelo modelo estudado são muito atrativas. O fato das linhagens celulares BRO e BRO *mdr1.1* apresentarem sensibilidades muito diferentes para os agentes citotóxicos, serem facilmente mantidas em cultura com curto tempo de duplicação celular e excelente índice de crescimento como xeno-enxertos, torna o modelo de fácil manuseio, com rápidos resultados nos estudos das novas drogas reversoras.

Outro ponto importante foi a avaliação sobre o emprego do teste de SRB no estudo da radiosensibilidade, de mais fácil manipulação do que o teste clonogênico, abrindo a possibilidade da realização do mesmo para cada paciente em particular, o que antes se tornava inviável pelas dificuldades técnicas do ensaio clonogênico.

Uma sequência lógica deste trabalho seria um estudo que permitisse acompanhar o comportamento da linhagem transfectada BRO *mdr1.1* por um período de tempo longo, tanto em cultura celular como em xeno-enxertos, e compara-lo a literatura que demonstra uma perda da expressão da 170-Pgp a longo prazo em células tornadas resistentes por exposição a doses crescentes de citotóxicos. O achado de uma perda da MDR após certo período sem a exposição aos agentes citostáticos envolvidos, abriria o questionamento da ocorrência de tal fenômeno em pacientes, modificando toda a perspectiva de tratamento nestes casos.

A tendência da literatura, a nosso ver, vem indicando a 170 P-glicoproteína como um marcador celular clinicamente importante na avaliação de tratamento, prognóstico e evolução dos tumores. O seu fácil acesso através da imunoperoxidação, mesmo após inclusão em parafina, e a possibilidade do uso de cortes de tecidos normais como controles, permitem uma antecipação de seu amplo emprego na detecção de tumores intrinsecamente resistentes (Spoelstra, 1991) ou na detecção da resistência a múltiplas drogas em pacientes sob tratamento com os citostáticos envolvidos no fenômeno (Fojo, 1987; Goldstein, 1989).

Sumário e Conclusões

A primeira parte do estudo restringiu-se ao estabelecimento do modelo BRO "in vivo". Para isto, empregamos a linhagem de células BRO e sua sublinhagem transfectada BRO *mdr1.1*, utilizando a técnica de xeno-enxertos em camundongos atímicos. Estes animais foram observados por sucessivas passagens e avaliados quanto à resposta apresentada aos agentes citotóxicos vincristina e doxorubicina, sempre comparados com testes "in vitro" das mesmas células. Estas linhagens celulares também foram avaliadas "in vitro" e "ex-vivo" quanto à expressão da 170-Pgp e aos fatores de resistência empregando-se as técnicas de imunoperoxidase e citotoxicidade com MTT. A análise final destas informações permite afirmar que o modelo BRO pode ser utilizado no estudo da resistência a múltiplas drogas até a segunda passagem, o que corresponde ao período de tempo de 6 semanas como xeno-enxertos. A droga vincristina foi escolhida para os estudos "in vivo" devido ao elevado nível de resistência apresentado pelas células BRO *mdr1.1*.

A segunda parte do trabalho concentrou-se na avaliação do modelo no estudo de novos agentes reversores, bepridil e cremofor. Numa primeira fase verificou-se a efetividade da reversão destes agentes e sua citotoxicidade "in vitro". Foi possível estabelecer as doses ideais para a obtenção do efeito de reversão da MDR. As concentrações não citotóxicas de cremofor mostraram uma reversão da resistência marcadamente menor que as obtida com bepridil. Estes dados indicaram a realização de testes de reversão "in vivo" apenas com bepridil. A farmacocinética desta droga para camundongos foi estabelecida através de HPLC e cintilação líquida. Um esquema combinando vincristina e bepridil, utilizados na MTD, foi estabelecido e testado em camundongos atímicos portando tumores BRO *mdr1.1* sem um resultado efetivo de regressão tumoral, provavelmente devido aos baixos níveis plasmáticos do reversor alcançados, somados aos altos fatores de resistência presentes na segunda passagem.

A terceira parte do estudo consistiu na avaliação da radioimunoterapia como outra metodologia para se atingir as células portadoras do fenótipo MDR neste modelo. Para tanto, as linhagens celulares foram testadas quanto à sua radiosensibilidade em ensaio clonogênico e em teste de citotoxicidade com SRB. Os resultados foram similares, não se detectando diferenças significativas entre as radiosensibilidades de linhagens resistentes e sensíveis. A partir destes dados realizou-se a biodistribuição do anticorpo monoclonal MRK16 após a marcação deste com o radioisótopo ^{131}I , não havendo captação preferencial do monoclonal pelos tumores resistentes, como também não detectamos resposta tumoral à radioimunoterapia. O baixo número de epitopos de 170-Pgp encontrados na superfície das células BRO *mdr1.1* pelas técnicas de citometria de fluxo e imunocompetição de Scatchard justifica a falha desta abordagem terapêutica.

O modelo "in vivo" focalizado nesta pesquisa não poderá ser empregado na avaliação das modalidades terapêuticas que utilizem anticorpos monoclonais (isolados ou como imunoconjugados) de ultrapassar o fenômeno da resistência a múltiplas drogas, mas permanece útil na determinação do potencial de reversão e no estudo da toxicidade das drogas selecionadas pelos modelos "in vitro" como agentes reversores da MDR, criando condições mais seguras para o emprego clínico. O modelo desenvolvido abre, também, uma nova opção no estudo comparativo entre tumores intrinsecamente resistentes e os que apresentam resistência a múltiplas drogas adquirida, por se tratar de um tumor desenvolvido a partir de células transfectadas com o gene MDR1. Numa perspectiva otimista destes estudos antevemos uma solução definitiva para estes tumores até hoje sem possibilidade de tratamento eficaz com quimioterapia.

Summary

Multidrug resistance has been one of the most active research areas during last decade because its growing clinical importance. Expression of the MDR1 (170-Pglycoprotein) gene is an active efflux pump that decreases the intracellular accumulation of some of the major anticancer drugs such as anthracyclines, vinca alkaloids, and epipodophyllotoxins.

Our study established an "in vivo" model using BRO cell line and its transfected subline BROmdr1.1. The MDR phenotype was detected until the second passage as xenografts or 6 weeks in cell culture by cytotoxicity MTT test with vincristine and doxorubicin but also by immunostaining using 3 monoclonal antibodies (C219, JSB1 and MRK16).

We have studied antitumor activity of vincristine and doxorubicin in nude mice bearing the second passage of BRO and BROmdr1.1. It was possible to define resistant factors for each drug. New reversal agents, cremophor and bepridil, were tested "in vitro". Bepridil presented higher reversal effect and was selected to "in vivo" studies, but the doses needed to achieve complete reversal "in vitro" could not be reached "in vivo".

BROmdr1.1 xenografts were treated with monoclonal antibodies labelled with isotopes. The absence of response probably was because it was not possible to concentrate the isotope in the resistant tumours due to the small number of epitopes that this cell line presented at Scatchard test.

This model can be used to study new reversal agents for MDR phenotype "in vivo", its toxicity, pharmacokinetics and reversal activity, before going further on human trials.

Bibliografia

- Abe Y, Yoshimura M, Ohnishi Y, et al. The expression of the multidrug resistance gene(*mdr1*) in human lung xenografts and in vivo acquired drug resistance. *Proceedings AACR* 1993;34:1862
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48:589-601.
- Baas F, Jongsma APM, Broxterman HJ, et al. Non-P-glycoprotein mediated mechanism for multidrug resistance precedes P-glycoprotein expression during in vitro selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1990;50:5392-5398.
- Bech-Hanson NT, Till JE, Ling V. Pleiotropic phenotype of colchicine -resistant CHO cells: cross resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* 1976;88:23-32.
- Bellamy W, Odeleye A, Finley P, et al. An in vivo model of chemosensitization of multidrug resistant human myeloma cell line in SCID mice. *Proceedings AACR* 1993;34:1902
- Belli JA, Zhang Y, Fritz P. Transfer of adriamycin resistance by fusion of Mr 170,000 p-glycoprotein to the plasma membrane of sensitive cells. *Cancer Res* 1990;50:2191-2197.
- Benet LZ. Pharmacokinetics and metabolism of bepridil. *Am J Cardiol* 1985;55:8c-13c.
- Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970;30:1174-1184.
- Biedler JL, Chang T, Druskin H, et al. Modulation of multidrug resistance gene expression by chemosensitizing agents. *Proceedings AACR* 1993;34:578.

Bittl A, Nap M, Jager W, et al. Immunocytochemical determination of P-170 expression in malignant effusions of patients with breast or ovarian cancer using the three monoclonal antibodies JSB1, C219, and 265/F4. *J cancer Res Clin Oncol* 1991;117(suppl 3): S91.

Bourhis J, Benard J, Hartmann O, et al. Correlation of gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1401-1405.

Boven E, Lindmo T, Mitchell JB, et al. Selective cytotoxicity of ¹²⁵I-labelled monoclonal antibody T101 in human malignant T cell lines. *Blood* 1986;67:429-435.

Boven E. Human ovarian cancer xenografts in nude mice. Application of a new model in the selection of novel agents for ovarian cancer. Doctoral Thesis, 1986, Free University, Amsterdam.

Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, et al. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. *Int J Cancer* 1989;43:340-343.

Bumol TF, Reisfeld RA. Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1982;79:1245-1249.

Castagna M, Viacava P, Cianfriglia M, et al. Immunohistochemical localization of the P-glycoprotein by monoclonal antibody MAB 57 in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1991;117 (suppl 3):S92.

Chambers TC, McAvoy EM, Jacobs JW, et al. Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J Biol Chem* 1990;265:7679-7686.

Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, et al. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990;8:689-704.

Chan HSL, Haddad G, Thorner PS, et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for Ewing's sarcoma. *Proceedings AACR* 1993;34:1370.

Chan HS, Haddad G, Thorner PS, et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 1991;23:1608-1614.

Chen C, Chin JE, Ueda K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (p-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;53:519-529.

Chevillard S, Vielh Ph, Pouillart P. Tumor response of breast cancer patients treated by neoadjuvant chemotherapy may be predicted by measuring the early level of *MDR1* gene expression. *Proceedings ASCO* 1993;12:56.

Coley HM, Twentyman PR, Workman P. Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporin A. *Biochem Pharmacol* 1989;38:4467-4475.

Colozza M, Rossetti R, Anastasi P, et al. Chemotherapy of metastatic renal cell carcinoma with 4'epirubicin plus vinblastine and the calcium channel blocker nifedipine. *Proc ASCO* 1990;9:152.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP. The multidrug resistance phenotype in human cancer. in: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Important Advances in Oncology*, 1991, pp. 19-38. Philadelphia, JB Lippincott Company.

Cunha LSM, Haisma HJ, Pinedo HM, et al. Determination of multidrug resistance in vivo by monoclonal antibodies against P-glycoprotein in an *MDR.1* transfected melanoma cell line. *Proc Adv. in Applications of MAbs in Clin Onc*, 1990;7:47.

Dalton WS, Grogan TM, Rybski JA, et al. Immunohistochemical detection and quantification of P-glycoprotein in multiple drug resistant human myeloma cells: association with level of drug resistance and drug accumulation. *Blood* 1989;73:747-752.

Daoud SS, Juliano RL. Modulation of doxorubicin resistance by valinomycin (NSC122023) and liposomal valinomycin in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1989;49:2661-2667.

Deffie AM, Alam T, Seneviratne C, et al. Multifactorial resistance to adriamycin: relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux, and P-glycoprotein in cloned cell line of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia. *Cancer Res* 1988;48:3595-3602.

Deuchars KL, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Sem Oncology* 1989;16:156-165.

DeVita VT. Principles of chemotherapy. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 3 edition, pp.276-300. Philadelphia, JB Lippincott, 1989

Faber S, Diamond LK, Mercer RD, et al. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N Engl J Med* 1948;238:787-793.

Ferguson PJ, Cheng Y. Critical issues relating to clinical drug resistance. *Cancer Bull* 1989;41:7-13.

Figueredo AA, Arnold A, Findlaya B, et al. Pilot study of verapamil and tamoxifen added to chemotherapy of extensive small cell lung cancer. *Proc ASCO* 1988;7:208

Friche E, Danks MK, Schmidt CA, et al. Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1991;51:4213-4218.

Fojo AT, Whang-Peng J, Gottesmann MM, et al. Amplification of DNA sequences in human multidrug resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1985; 82:7661-7665.

Fojo AT. Multidrug resistance to chemotherapy. *Cancer Bull* 1989;41:26-30.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1987;84:265-269.

Formelli F, Rossi C, Supino R, et al. In vivo characterization of a doxorubicin resistant B16 melanoma cell line. *Br J Cancer* 1986;54:223-233.

Galski H, Sullivan M, Willingham MC, et al. Expression of a human multidrug resistance cDNA(MDR1) in the bone marrow of transgenic mice: resistance to daunomycin induced leucopenia. *Mol Cell Biol* 1989;9:4357-4363.

Ganapathi R, Grabowski D, Turinic R, et al. Correlation between potency of calmodulin inhibitors and effects on levels and cytotoxic activity of doxorubicin in resistant P388 mouse leukemia cells. *Eur J Cancer Oncol* 1981;20:799-806.

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, et al. Homology between p-glycoprotein and bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986;324:485-489.

Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJ, et al. Heterotransplantation of human cancers into nude mice. *Cancer* 1978;42:2269-2281.

Glisson BS. Multidrug resistance mediated through alterations in topoisomerase II. *Cancer Bull* 1989;41:37-40.

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:116-124.

Gore ME, Selby PJ, Millar B, et al. The use of verapamil to overcome drug resistance in myeloma. *Proc ASCO* 1988;7:228.

Gosland MP, Lum BL, Sikic BI. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res* 1989;49:6901-6905.

Gottesman MM. How cancers evade chemotherapy. *Proc AACR* 1992; extended abstracts;33:562-563.

Gu F, Qiu Q, Kiang DT. reversal of doxorubicin resistance by tamoxifen in human myeloma cells. *Proc ASCO* 1991;10:299.

Haisma HJ, Hilgers J, Zurawski VR. Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a convenient one vial method. *J Nucl Med* 1986;27:1890-1895.

Hamada H, Tsuruo T. Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986;83:7785-7789.

Hill BT, Deuchars K, Ling V, et al. Significant overexpression of P-glycoprotein by mammalian cells following in vitro exposure to fractionated x-irradiation. *Proc AACR* 1989;30:2067.

Hill BT, Deuchars K, Hosking LK, et al. Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:607-612.

Hofsli E, Nissen-Meuer J. Reversal of multidrug resistance by lipophilic drugs. *Cancer Res* 1990;50:3997-4002.

Jachez B, Nordmann R, Loor F. Restoration of taxol sensitivity of multidrug resistant cells by cyclosporine SDZ PSC 833 and the cyclopeptolide SDZ 280-446. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:478-483.

Jackisch C, Brandt B, Blum M. Detection of P-glycoprotein in breast cancer cells and consequences in therapeutics management. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991;117 (suppl 3):S113.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-162.

Johns HE, Cunningham JR. Radiobiology. in: *The Physics of radiology*. pp.674-728. Charles Thomas Publisher, third edition, sixth printing, 1980.

Kanamaru H, Kakehi Y, Yoshida O, et al. MDR1 RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor Explants. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:844-849.

Kartner N, Evernden-Porelle D, Ling V, et al. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell line by monoclonal antibodies. *Nature* 1985;316:820-823.

Keller RP, Altermatt HJ, Nooter K, et al. SDZ PSC 833, a non-immunosuppressive cyclosporine: its potency in overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of murine leukemia. *Int J Cancer* 1992;50:593-597.

Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, et al. P-glycoprotein gene (MDR1)cDNA from human adrenal normal P-glycoprotein carries ¹⁸⁵Gly with an altered pattern of resistance. *Biochem Biophys Res Comm* 1989;162:224-231.

Kiue A, Sano T, Suzuki K, et al. Activities of newly synthesized dihydropyridines in overcoming of vincristine resistance, calcium antagonism, and inhibition of photoaffinity labeling of p-glycoprotein in rodents. *Cancer Res* 1990;50:310-317.

Kuo MT, Zhao JY, Teeter LD et al. Activation of multidrug resistance (P-glycoprotein) *mdr3/mdr1a* gene during the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell Growth Differ* 1992;3:531-540.

Larson SM. Cancer imaging with monoclonal antibodies. in: De Vita, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Important Advances in Oncology*, 1986, pp. 233 - 249. Philadelphia, JB Lippincott Company.

Lincke CR, van der Blik AM, Schuurhuis GJ, et al. Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA. *Cancer Res* 1990;50:1779-1785.

Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Meth* 1984;72:77-89.

Lindmo T, Boven E, Mitchell JB, et al. Specific killing of human melanoma cells by ¹²⁵I-labeled 9.2.27 monoclonal antibody. *Cancer Res* 1985;45:5080-5087.

Lockshin A, Giovanella BC, DE Ipolyi PD, et al. Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. *Cancer Res* 1985;45:345-350.

Lyttelton MPA, Hart S, Ganeshaguru K, et al. Multidrug resistance in acute leukaemia: a comparative study of immunocytochemical and RNA slot blot detection of P-glycoprotein expression. *Leuk-Lymphoma* 1991;5:357-364.

Marquardt D, Center MS. Vacuolar H⁺-ATPase activity may contribute to multidrug resistance in HL60 cells. *Proc AACR* 1991;32:2202.

Michieli M, Damiani D, Geromin A, et al. Overexpression of multidrug resistance-associated p170-glycoprotein in acute non-lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1992;48:87-92.

Mickisch GH, Kossig J, Keilhauer G, et al. Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1990;50: 3670-3674.

Mirski SEL, Dicke FP, Cole SPC. Non-P-glycoprotein - mediated multidrug resistance in the small cell lung cancer cell line, H69AR. Proc AACR 1991;32:2196.

Mitchell JB, Russo A, Cowan KH, et al. Radiosensitivity assessment of chemotherapy drug resistant human cell lines. Proc AACR 1988;29:1194

Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. J Natl Cancer Inst 1988;80:14-20.

Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. in Pinedo HM, Longo DL, Chabner BA (eds): Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual 1991;12 pp 91-109. Elsevier Science Publishers BV.

Naito M, Oh-hara T, Yamazaki A, et al. Reversal of multidrug resistance by an immunosuppressive agent FK-506. Cancer Chem Pharmacol 1992;29:195-200.

Nakatsukasa H, Evarts RP, Burt RK, et al. Cellular pattern of multidrug-resistance gene expression during chemical hepatocarcinogenesis in rat. Mol Carcinog 1992;6:190-198.

Nasioulas G, Granzow C, Stohr M, et al. Sensitization of multidrug-resistant mouse ascites HD33 and chinese hamster ovary CHC5S3 cells by a photoreactive vinblastine derivative, NAPAVIN. Cancer Res 1990;50:403-408.

Pastan I, Gottesman MM. Molecular biology of multidrug resistance in human cells. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds): Important Advances in Oncology, 1988, pp.3-16. Philadelphia, JB Lippincott.

Pearson JW, Fogler WE, Volker K, et al. Reversal of drug resistance in a human colon cancer xenograft expressing MDR1 complementary DNA by in vivo administration of MRK-16 monoclonal antibody. J Natl Cancer Inst 1991;83:1386-1391.

Pozza F, Bevilacqua S, Cazzavillan S, et al. P-glycoprotein expression in advanced breast cancer. Proceedings ASCO 1993;12:65.

Price P, McMilan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res* 1990;50:1392-1396.

Riordan JR, Deuchars K, Katner N, et al. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 1985;316:817-819.

Rogan AM, Hamilton TC, Young RC. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 1984;224:994-996.

Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Path Microbiol Scand* 1969;77:758-760.

Salacinski PRP, McLean C, Sykes JEC, et al. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril(iodogen). *Anal Biochem* 1981;117:136-146.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660-672.

Scheper RJ, Bulte JWM, Pinedo HM, et al. Monoclonal antibody JSB1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multidrug-resistance. *Int J Cancer* 1988;42:389-394.

Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Pinedo HM, et al. Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by the calcium antagonist bepridil in anthracycline-resistant and sensitive cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;20:285-290.

Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, de Lange JH, et al. Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. *B J Cancer* 1991;64:857-861.

Scott AM, Rosa E, Carmichael N, et al. In vivo quantification of p-glycoprotein receptor expression with I-125 MRK-16 mAb. *Proceedings AACR* 1993;34:1866.

Sebolt J, Havlick M, Hamelehle K, et al. Activity of the Pyrazoloacridines against multidrug-resistant tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24:219-224.

Speeg KV, Maldonado AL, Liaci J, et al. Effect of cyclosporine on colchicine secretion by a liver canalicular transporter studied in vivo. *Hepatology* 1992;15:899-903.

Shen DW, Fojo A, Chin JE, et al. Human multidrug resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 1986;232:643-645.

Spoelstra EC, Dekker H, Schuurhuis GJ, et al. P-glycoprotein drug efflux pump involved in the mechanisms of intrinsic drug resistance in various colon cancer cell lines. Evidence for a saturation of active daunorubicin transport. *Biochem Pharmacol* 1991;1:349-359.

Shinoda H, Inaba M, Tsuruo T. In vivo circumvention of vincristine resistance in mice with P388 leukemia using a novel compound, AHC-52. *Cancer Res* 1989;49:1722-1726.

Silbermann MH, Boersma AWM, Jassen ALW et al. Effects of Cyclosporin A on the intracellular daunomycin accumulation in chinese hamster ovary cells with increasing levels of drug-resistance. *Int J Cancer* 1989;44:722-726.

Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, et al. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* 1988;48:1926-1929.

Teeter LD. Drug resistance and chemotherapy: a perspective. *Cancer Bull* 1989;41:14-20.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265-269.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 1989;37:159-164.

Tishler DM, Weinberg KI, Sender LS, et al. Multidrug resistance gene expression in pediatric primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *J Neurosurg* 1992;76:507-512.

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982;42:4730-4733.

Tsuruo T, Iida H, Nojiri M, et al. Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res* 1983;43:2905-2910.

Tsuruo T, Hamada H, Sato S, et al. Inhibition of multidrug-resistant human tumor growth in athymic mice by anti-p-glycoprotein monoclonal antibodies. *Jpn J Res* 1989;80:627-631.

Twentyman PR. Modification of cytotoxic drug resistance by non-immuno-suppressive cyclosporins. *Br J Cancer* 1988;57:254-258.

Ueda K, Clark DP, Chen C, et al. The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. *J Biocommun* 1987;262:505-508.

Van der Blik AM, Baas F, Ten Route de Lange T, et al. The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO* 1987;6:3325-3331.

Van der Blik AM, Kooiman PM, Borst P, et al. Sequence of *mdr3*cDNA, encoding a human P-glycoprotein. *Gene* 1988;71:401-411.

Van der Valk P, Van Kalken CK, Ketelaars H, et al. Distribution of multidrug associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. *Annals Oncol* 1990;1:56-64.

Verrelle P, Meissonnier F, Fonck Y, et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:111-116.

Volm M, Efferth T, Bak M, et al. Detection of the multidrug resistant phenotype in human tumors by monoclonal antibodies and streptavidin-biotinylated phycoerythrin complex method. *Eur J Clin Oncol* 1989;25:743-749.

Wampler GL, Schultz JJ, Gullo J, et al. Phase II study of oral etoposide and oral verapamil for refractory colorectal carcinoma. *Proceedings AACR* 1993;34:1268

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.

Warrington RC, Fang WD. Reversal of the multidrug-resistant phenotype of chinese hamster ovary cells by 1-histidinol. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:798-803.

Weeler H, Bell D, Levi J. A randomized study of doxorubicin, etoposide and vindesine with and without verapamil in small cell lung cancer. *Proc ASCO* 1988;7:208.

Yoshimura A, Shudo N, Ikeda I, et al. Novel screening method for agents that overcame classical multidrug resistance in human cell line. *Cancer Letters* 1990;50:45-51.