

Estabelecimento de um Método "In Vitro" de Controle Biológico de Agentes Antineoplásicos em Uso no Instituto Nacional de Câncer

VERA MARIA MARQUES SILVA¹, ROBERTO ALFONSO ARCURI², VIVIAN M. RUMJANEK³

Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método capaz de verificar a eficácia, a nível biológico, das drogas antineoplásicas, que não necessitem de metabolismo prévio para sua ação e que atualmente estão sendo usadas no Instituto Nacional de Câncer (INCa). O princípio do ensaio foi baseado na medida de inibição da proliferação celular da linhagem K562 e de células ativadas por fitohemaglutinina (PHA), usando-se como marcador a incorporação no DNA de timidina tritiada.

Conclui-se que esse ensaio não é adequado para testar a atividade antitumoral do Methotrexate, mas pode ser extremamente sensível para os estudos com derivados da Vinca.

Unitermos: vincristina, methotrexate, quimioterápicos antineoplásicos, drogas, alcalóides da vinca, análogos do ácido fólico

Introdução

Com o advento da aplicação de técnicas de cultura de tecidos, em meados de 1950, muitos investigadores têm tentado desenvolver testes "in vitro", a fim de prever a resposta tumoral à quimioterapia, visto que pacientes com o mesmo tipo histológico de câncer não respondem uniformemente aos agentes antineoplásicos^{1, 2, 3}.

Embora a metodologia mais comum seja a da eficácia da droga em relação a tumor animal "in vivo", o teste "in vitro" é simples, flexível e pode utilizar as próprias células do paciente, o que permite verificar com certo grau de precisão, a resistência e/ou a sensibilidade dessas células aos quimioterápicos utilizados no mesmo indivíduo^{4, 5, 6}.

Numerosos critérios têm sido utilizados para evidenciar a ação dos agentes antitumorais^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17}, sendo encontrado um grau de correlação entre atividade "in vivo" e "in vitro"^{2, 18, 19}. Vantagens e desvantagens têm sido associadas a cada um dos tipos de ensaios, existindo muita controvérsia na escolha da metodologia mais apropriada^{2, 20, 21}.

Procurou-se no presente trabalho desenvolver um método capaz de verificar a eficácia, a nível biológico, das drogas antineoplásicas que não necessitam ser metabolizadas para serem ativas. O nosso grupo optou pe-

lo teste "in vitro" de incorporação de timidina tritiada no DNA, que está diretamente ligado a multiplicação celular, usando-se a linhagem celular K562 (derivada de paciente com leucemia mielóide crônica) e células mononucleares normais ativadas por fitohemaglutinina (PHA).

Materiais e métodos

— Linhagem celular

A linhagem celular K562 foi mantida em cultura, usando-se meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, penicilina G potássica (60mg/l), estreptomomicina (100mg/l), ácido pirúvico (100mg/l), L-asparagina (300mg/l) e beta-mercaptoetanol (10^{-2} M/l). As células foram repicadas e usadas somente em fase exponencial numa concentração de 1×10^5 cel/ml. Todos os reagentes acima descritos foram obtidos de Sigma Chemical Company, com exceção do soro fetal bovino (Cultilab).

— Cultura de linfócitos

Células mononucleares humanas de sangue periférico, obtidas de doadores sãos, do Banco de Sangue do Instituto Nacional de Câncer (INCa), foram separadas por gradientes de Ficoll Hypaque e cultivadas no mesmo meio acima descrito, no qual foi adicionado fi-

tohemaglutinina (PHA-Sigma) na concentração final de $10\mu\text{g/ml}$.

As células foram cultivadas numa concentração de 1×10^6 cel/ml durante 72 horas a 37°C , numa atmosfera de 5% de CO_2 . A viabilidade foi constatada através de microscopia com contraste de fase.

Drogas

As drogas foram fornecidas pelo setor de Farmácia do INCa e preparadas imediatamente antes do ensaio nos diluentes correspondentes, sendo que as diluições finais foram feitas em RPMI. Numa primeira fase foram testadas as seguintes: Vincristina (CEME), Oncovin (Eli Lilly Toronto, Canadá) e Methotrexate (Cyanamid), usadas no tratamento de doenças malignas de acordo com os protocolos dos Serviços de Hematologia e Centro de Transplantes de Medula Óssea (CEMO) do INCa. As concentrações finais das drogas foram escolhidas de acordo com as correspondentes usadas "in vivo" (Tabela 1).

Ensaio

Após lavar três vezes, as células K562 e/ou linfócitos ativados, numa concentração de 1×10^5 cel/ml, foram incubadas durante vinte e quatro horas com as drogas, usando-se triplicatas. Após o tempo de incubação foram lavadas e centrifugadas três vezes, durante 10 min a 150g e expostas a $2,5\mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada (New England Nuclear, Mass. Boston), por mais vinte e quatro horas.

Controles foram realizados, também em triplicata, usando-se células não tratadas com os quimioterápicos.

Após o tempo de incubação o material foi recolhido em papel de filtro. Os papéis foram lavados três vezes, secados e a quantidade de radioatividade incorporada no DNA foi determinada num cintilador líquido (Beckman LS-100c).

A fim de acompanhar o ensaio foram feitas observações através de microscopia de contraste de fase, que propicia um resultado imediato das características morfológicas das células, sem necessidade de coloração

prévia, e com uso de citrocentrifugação e coloração, possibilitando maiores detalhes morfológicos das células.

Resultados

Comparando-se dois sulfatos de Vincristina (Oncovin, Lilly e Vincristina, CEME) verificou-se que a análise da curva-resposta de células K562, em relação ao Oncovin, mostrou um aspecto trifásico (Figura 1), havendo queda acelerada na dose $0,5\mu\text{g/ml}$ (30% de inibição), um "plateau" entre $0,5\mu\text{g/ml}$ e $15\mu\text{g/ml}$ e nova queda acelerada entre 15 e $25\mu\text{g/ml}$ (83% de inibição). Uma curva semelhante foi observada com Vincristina em células K562, com inibição de 33% na dose $0,5\mu\text{g/ml}$ e 87% na dose de $25\mu\text{g/ml}$, num total de 5 ensaios em triplicatas (Figura 2).

A análise da curva-resposta utilizando-se linfócitos periféricos ativados com PHA mostrou uma sensibilidade muito mais acentuada, com uma inibição de 93%, a partir da dose $0,5\mu\text{g/ml}$ (Figura 3). Quando diluições maiores foram testadas, a dose de $0,005\mu\text{g/ml}$ causou uma inibição de 83% (Figura 4).

Esta grande sensibilidade ao Oncovin dos linfócitos ativados com PHA não se compara com os resultados obtidos com a linhagem celular K562. No entanto é interessante observar que no ensaio com linhagem K562, a inibição de 30%, na concentração $0,5\mu\text{g/ml}$ é mantida, mesmo utilizando-se uma quantidade de quimioterápico 10 vezes maior ($5\mu\text{g/ml}$ -pico plasmático).

Com relação ao Methotrexate, o uso de incorporação de timidina como medida da ação do quimioterápico, não obteve resultados de sensibilidade comparáveis aos obtidos com Oncovin/Vincristina.

A análise da curva-resposta de células K562 evidenciou uma redução de 22% na dose $500\mu\text{g/ml}$ (pico plasmático) (Figura 5). Com a utilização de linfócitos ativados com PHA, a redução foi de 42% (Figura 6).

Em relação ao aspecto morfológico das células da linhagem K562 observado com uso de microscopia óptica, os seguintes tipos de alterações puderam ser visualizados: formação de agregados celulares com membranas bem delineadas nos frascos controles (Figura 7); formas alongadas após tratamento com Oncovin ($5\mu\text{g/ml}$) (Figura 8); e células arrebatadas com membranas mal delineadas na concentração de $50\mu\text{g/ml}$ (Figura 9).

Discussão

No presente trabalho a inibição de incorporação de timidina tritiada no DNA de células em divisão foi utilizada como critério para medir a eficácia da ação de quimioterápicos. A escolha desse método baseou-se no princípio de que a quimioterapia antitumoral é orien-

Tabela 1 — Concentrações das drogas

Drogas	Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)								
Vincristina	50	30	25	15	10	5	1	0,5	
Oncovin	50	30	25	15	10	5	0,5	0,05	0,005
Methotrexate	50	500	1000	2000	2500				

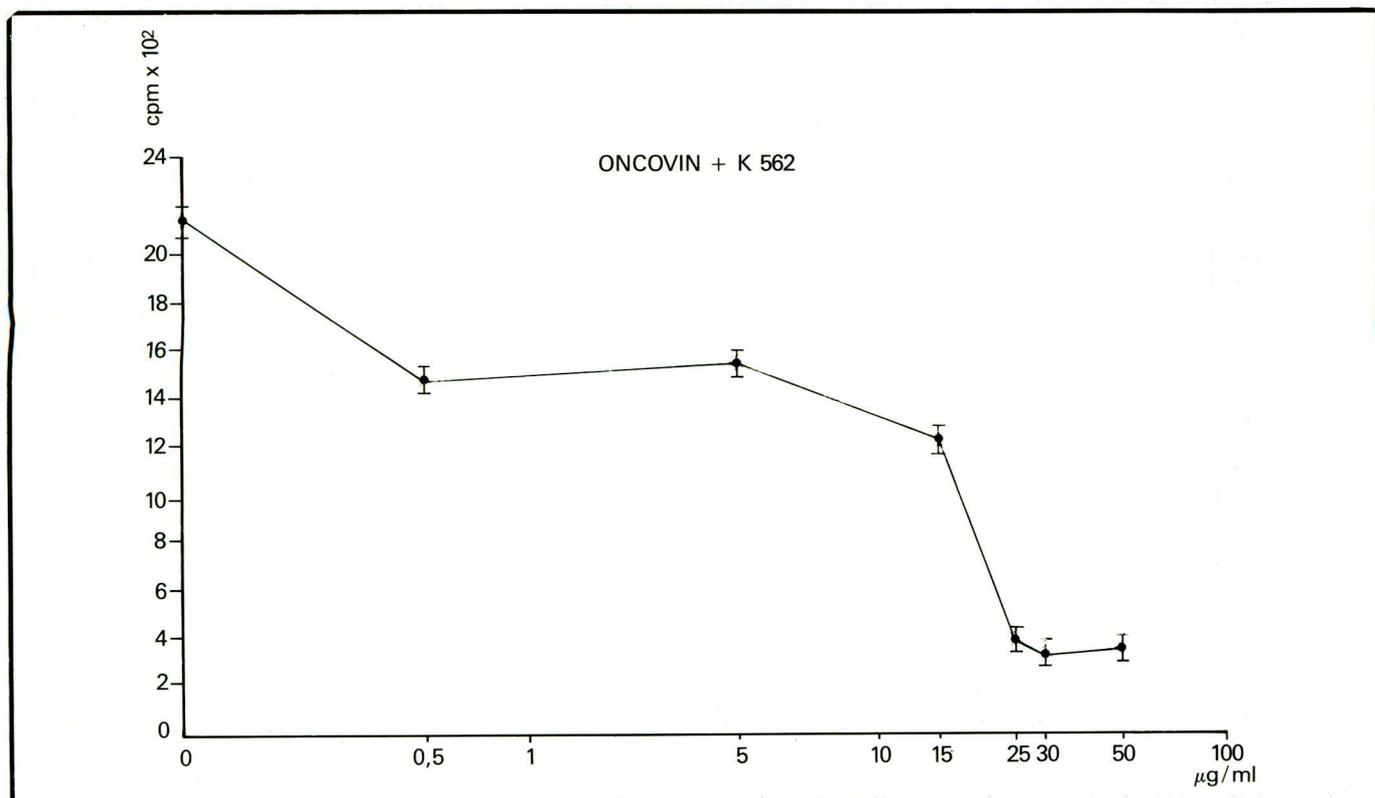


Figura 1 — Curva dose-resposta de células da linhagem K562 (1×10^5 cel/ml) expostas por 24 horas ao Oncovin e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

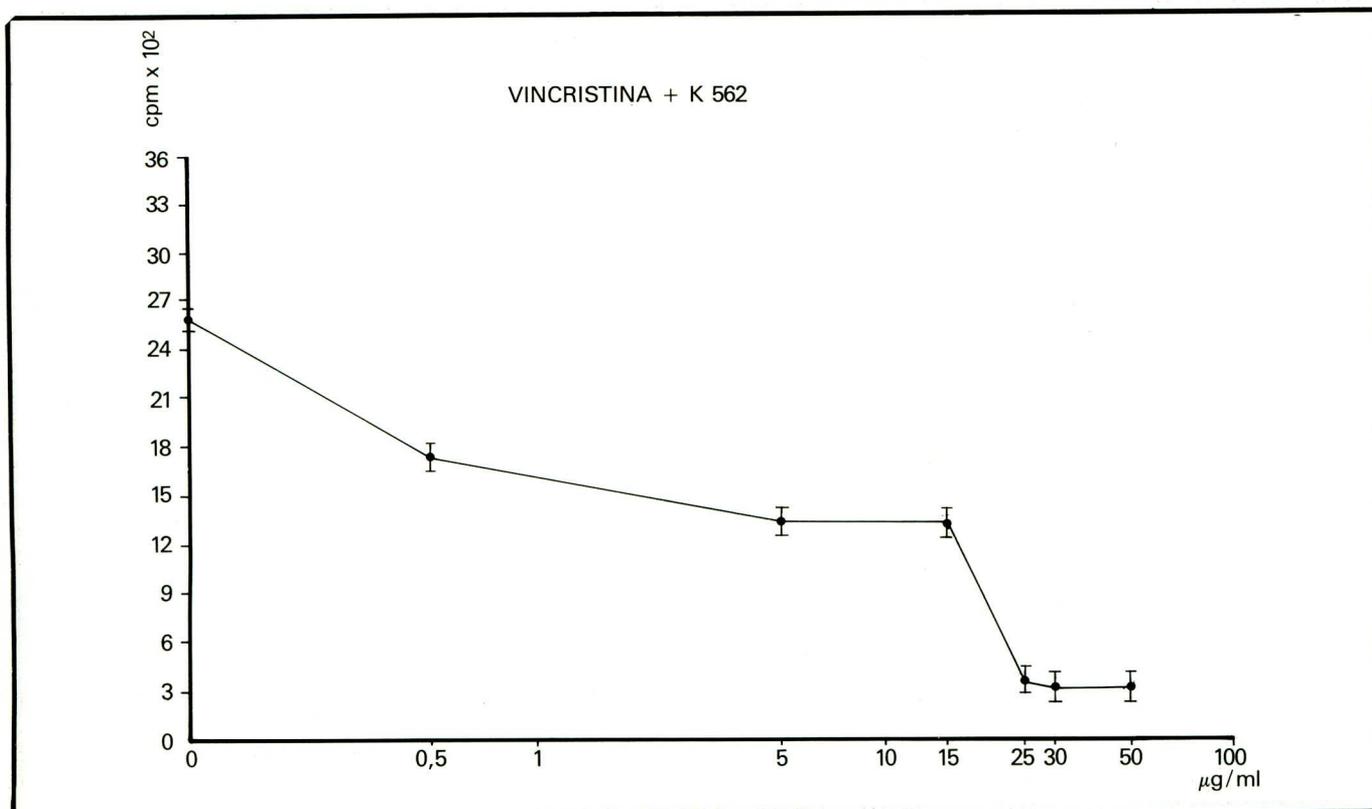


Figura 2 — Curva dose-resposta de células de linhagem K562 (1×10^5 cel/ml) expostas por 24 horas à Vincristina e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

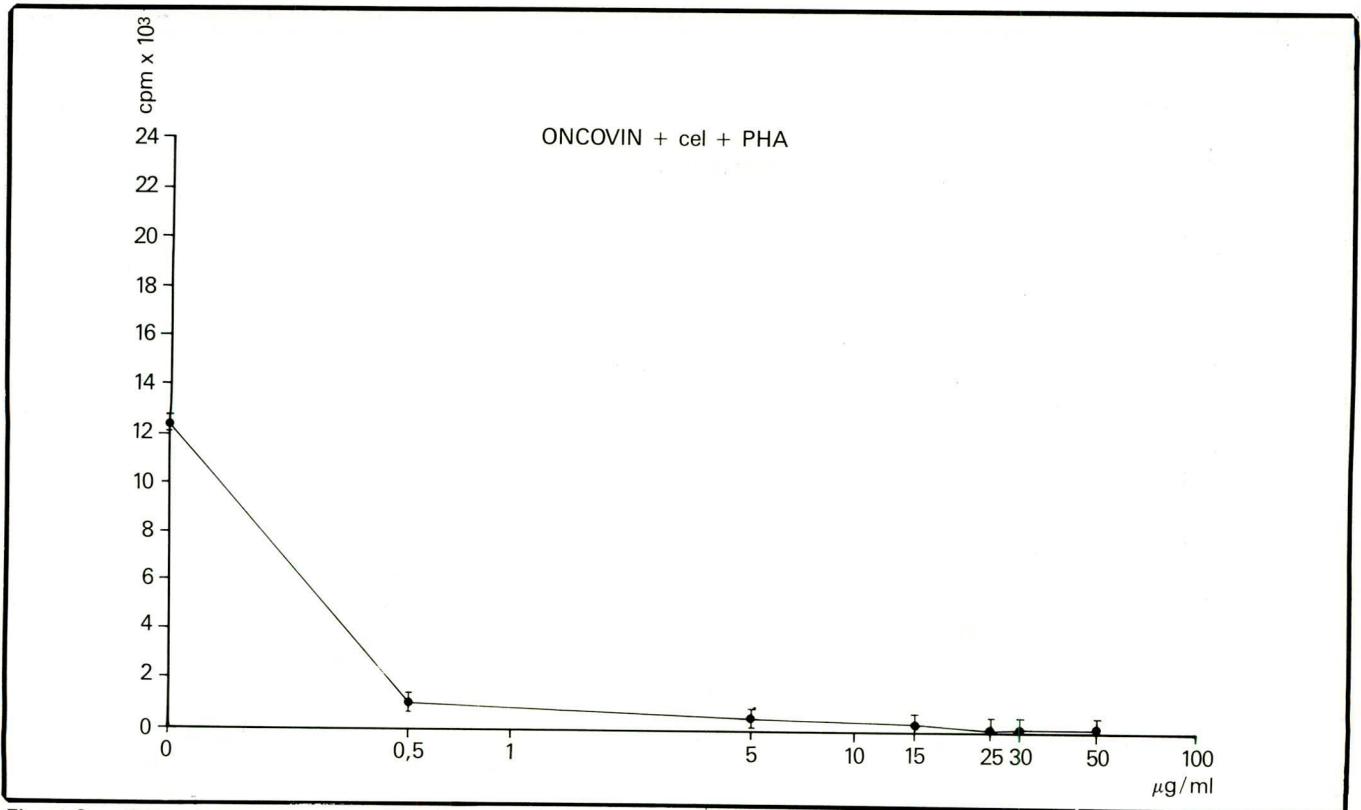


Figura 3 — Curva dose-resposta de células mononucleares humanas (1×10^5 cel/ml) ativadas com PHA expostas por 24 horas ao Oncovin e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

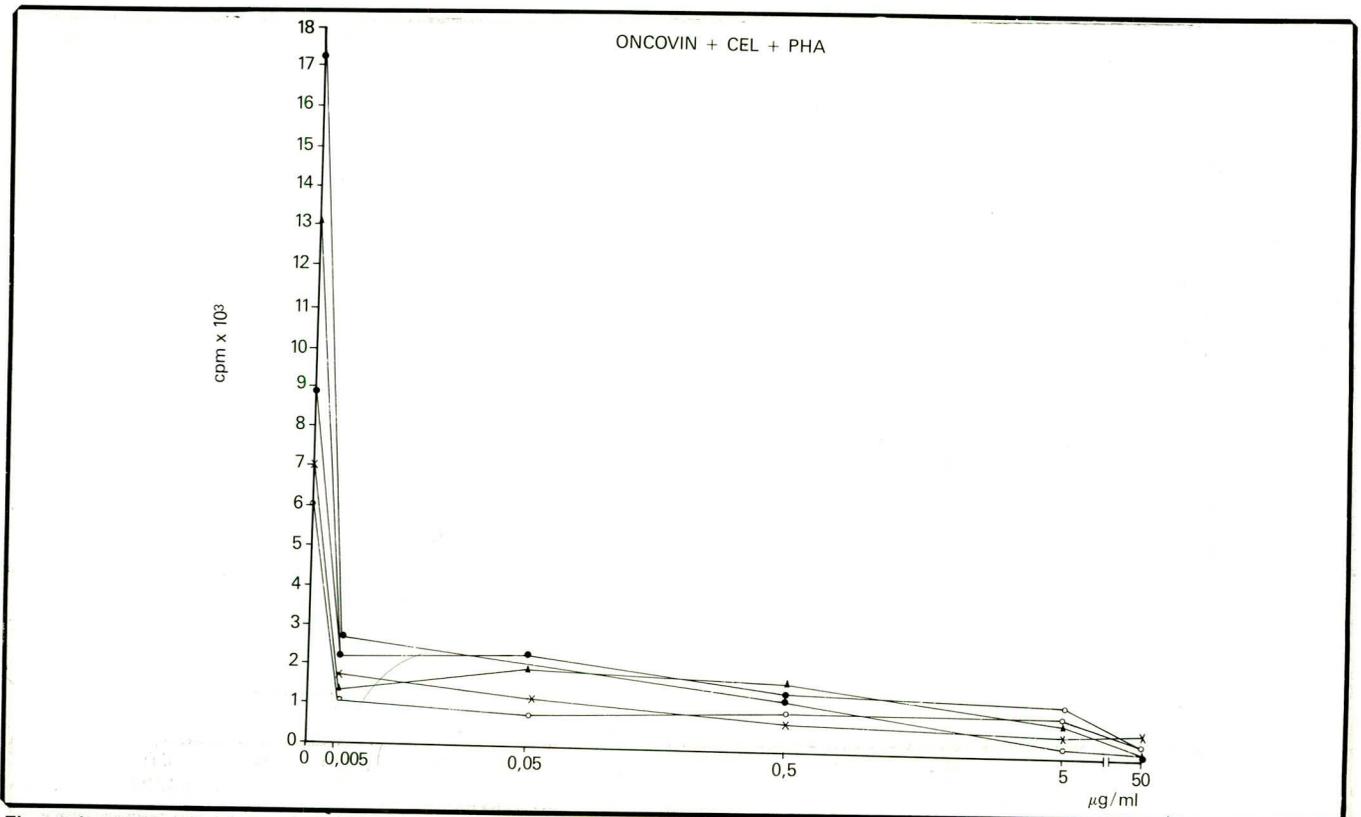


Figura 4 — Curva dose-resposta de células mononucleares humanas (1×10^5 cel/ml) ativadas com PHA expostas por 24 horas ao Oncovin (diluições maiores da Figura 3), e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

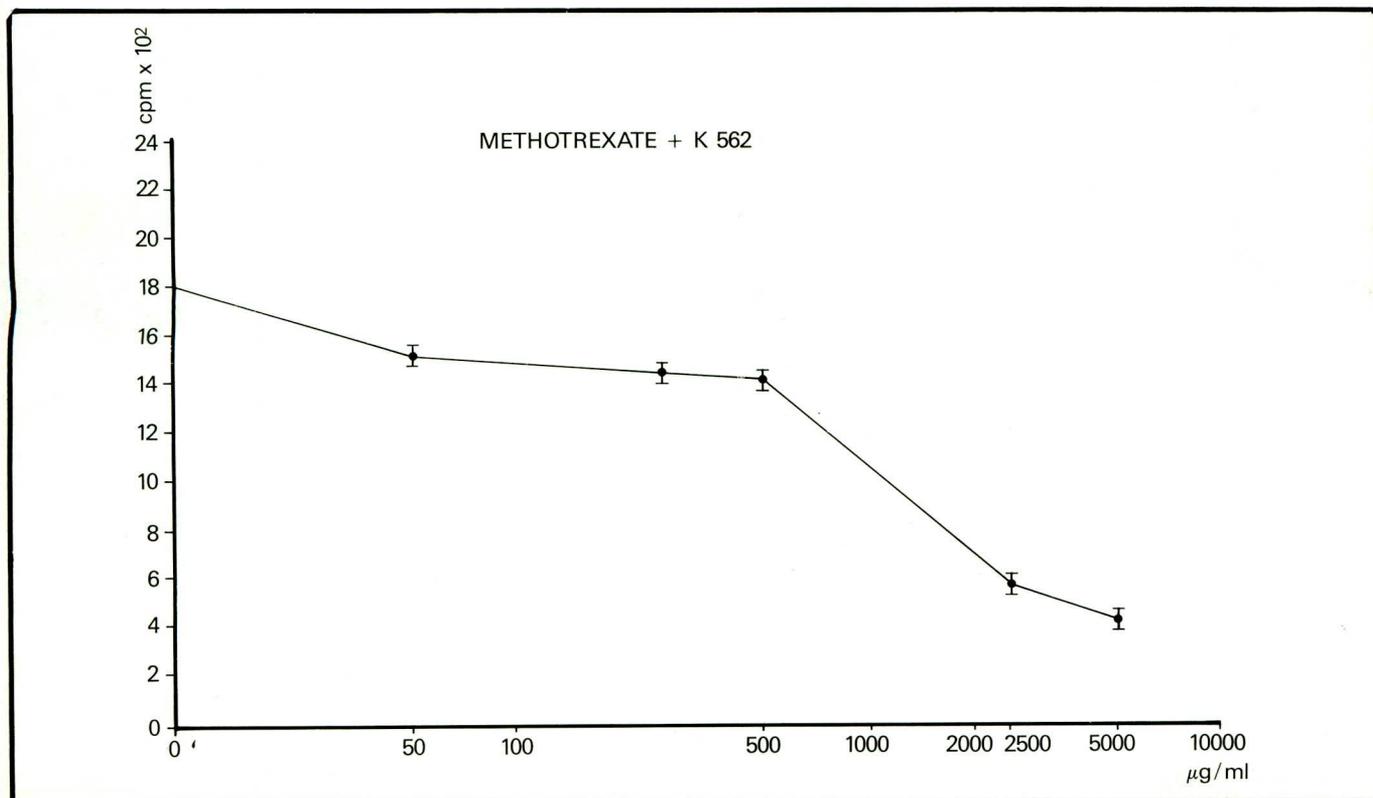


Figura 5 — Curva dose-resposta de células de linhagem K562 (1×10^5 cel/ml) expostas por 24 horas ao Methotrexate e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

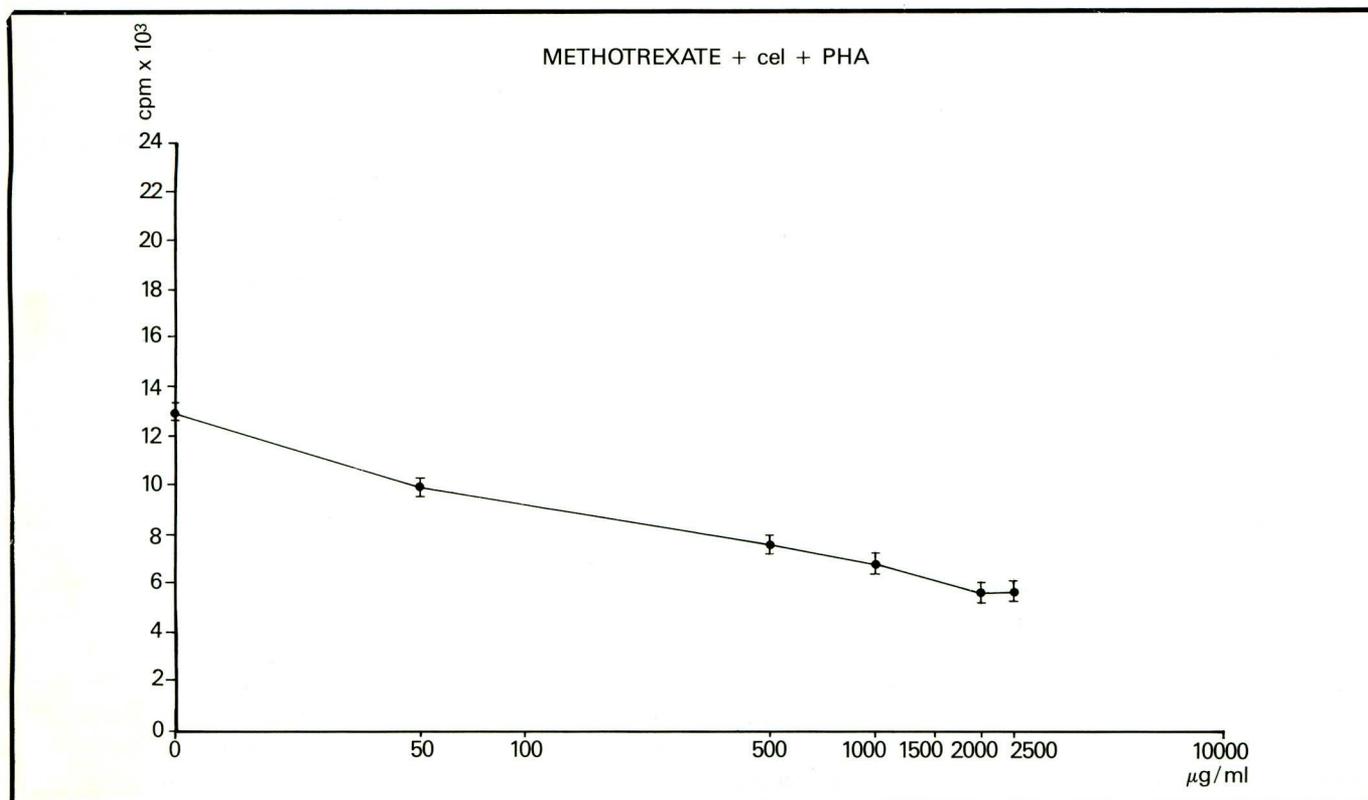


Figura 6 — Curva dose-resposta de células mononucleares humanas (1×10^5 cel/ml) ativadas com PHA expostas por 24 horas ao Methotrexate e pulsadas nas 24 horas seguintes com timidina tritiada. Cada ponto representa a média \pm média do desvio-padrão de no mínimo 12 avaliações.

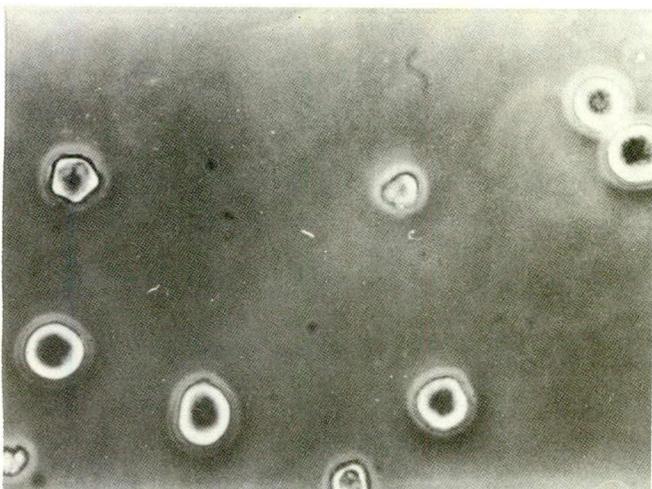


Figura 7

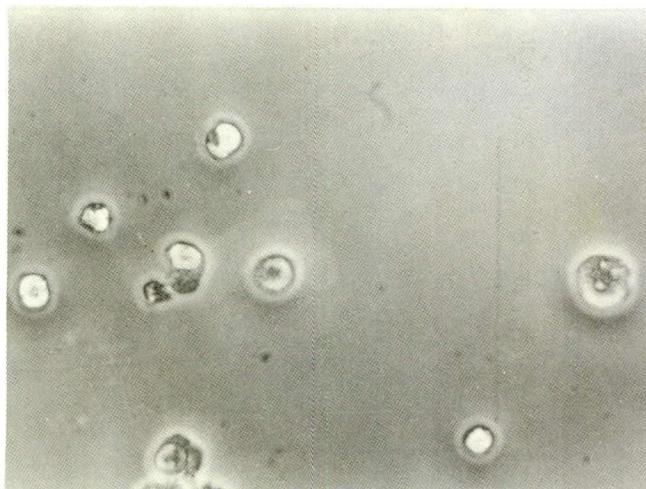


Figura 9

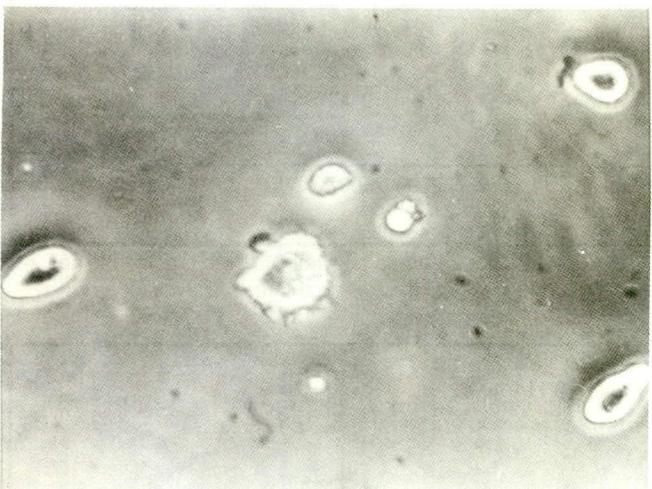


Figura 8

tada para destruir ou inibir células que estão proliferando de forma desordenada^{1, 2, 6, 22, 23, 24, 25} e que o outro método que leva esse fator em consideração (estudo da inibição de formação de colônias em agar semi-sólido), tem apresentado certas dificuldades^{15, 16, 19}. O questionamento do ensaio clonogênico, que se baseia na inabilidade de células normais para crescerem em agar, é devido ao insucesso na repetição de achados originais, à existência de tumores que não produzem colônias em agar, à dificuldade de produzir desagregação celular de certos tumores sólidos por técnicas mecânicas ou enzimáticas e ao consumo de muito tempo no desenvolvimento da técnica (7 a 10 dias de incubação)^{26, 27}.

Além desses testes outras metodologias menos usuais também foram descritas na literatura^{28, 29, 30, 31, 32}.

Comparou-se a utilização de células mononucleares normais ativadas por PHA e a linhagem celular K562. Essa seleção baseou-se no fato de que as células mononucleares, de certa forma, se assemelhariam ao ti-

po celular que seria utilizado nos testes de resistência ou não aos quimioterápicos, em pacientes com leucemias, linfomas etc. A linhagem K562, por outro lado, por ser uma linhagem transformada, se assemelharia à situação clínica em que as células-alvo à ação do quimioterápico são células tumorais. Ambos os tipos celulares permitiram estabelecer testes de rotina para estudar a atividade de quimioterápicos derivados da Vinca, sendo que a linhagem celular K562 apresentou sensibilidade extremamente reprodutível nos vários experimentos, ao passo que a resposta das células de diversos indivíduos a PHA, em dias diferentes, apresentou, como era de se esperar, maiores variações. No entanto, apesar de envolver maior trabalho e comportamento menos semelhante dia após dia, as células ativadas com PHA mostraram que o teste pode ser feito a qualquer momento e com qualquer doador, além de ser extremamente sensível à ação quimioterápica. A linhagem K562, surpreendentemente, apresentou uma sensibilidade mediana, ainda que reprodutível, o que talvez seja resultado de resistência adquirida devido a modificações ocorridas durante as passagens seriadas necessárias à manutenção da linhagem.

Apesar dessa menor sensibilidade, quando comparada a células ativadas por PHA, um tipo de curva similar ao obtido no presente trabalho ("plateau" entre 0,5µg/ml e 15µg/ml, queda acelerada após 15µg/ml) foi obtido em um trabalho recente em que a citotoxicidade por Vinca foi medida em células K562 utilizando-se um corante vital³³. Esses resultados demonstram que os níveis plasmáticos encontrados durante terapia com derivados da Vinca^{13, 34} mostraram-se satisfatórios quando utilizados no ensaio "in vitro". O mesmo não pode ser dito em relação ao Methotrexate, que só apresentou atividade "in vitro" com doses bem mais elevadas que as usadas na terapêutica, podendo isso ser resultado da reversão parcial do efeito do Methotrexate pelo uso de timidina^{35, 36}.

Concluiu-se, com os resultados obtidos no presente trabalho, que o método mais sensível para testar derivados da Vinca utilizando-se incorporação de $^3\text{H-T}$ seria o que usa células ativadas por PHA, como células-alvo da ação do quimioterápico. É possível que o mesmo tipo de ensaio possa ser estendido a outros quimioterápicos, ao passo que outras metodologias deverão ser elaboradas para estudar o teste ideal para o Methotrexate.

Summary

The aim of the present work was to develop an "in vitro" system capable of evaluating, at biological level, the efficacy of antineoplastic drugs that depend of previous metabolism for their action and are employed as part of treatment at the Instituto Nacional de Câncer.

The assay was based on inhibition of cellular proliferation (cultured cell line K562 and PHA-stimulated lymphocytes), measured using [^3H] thymidine uptake into cellular DNA.

This kind of assay proved not to be adequate to test the action of Methotrexate but could be extremely sensitive when used with Vinca derivatives such as Vincristine.

Uniterms: vincristine; methotrexate; cancer chemotherapy; drugs; cathartus roseus alkaloides; folic acid analogues

Referências Bibliográficas

- Group for Sensitivity Testing of Tumors (KSST) — "In vitro" short-term test to determine the resistance of human tumors to chemotherapy. *Cancer*, 1981; 48: 2127-2135.
- Hamburger AW — Use of "in vitro" tests in predictive cancer chemotherapy. *JNCI*, 1981; 66 (6): 981-988.
- Sobrero AF, Marsh JC — Chemosensitivity of human tumor clonogenic cells simultaneously assayed in agar diffusion chambers and in a two-layer agar culture system. *Cancer Treat Rep*, 1984; 68: 615-624.
- Holmes HL, Little JM — Tissue-culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. *Lancet*, 1974; 26: 985-987.
- Wilson AP, Ford CHJ, Newman CE, Howell A — A comparison of three assays used for the "in vitro" chemosensitivity testing of human tumours. *Br J Cancer*, 1984; 49: 57-63.
- Raich PC — Prediction of therapeutic response in acute leukemia. *Lancet*, 1978; 14: 74-76.
- Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK — A novel dye exclusion method for testing "in vitro" chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res*, 1983; 43: 749-757.
- Bosanquet AG, Bird MC, Price WJP, Gilby ED — An assessment of a short-term tumor chemosensitivity assay in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*, 1983; 47: 781-789.
- Phillips BJ — A simple, small scale cytotoxicity test, and its uses in drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol*, 1974; 23: 131-138.
- Buskirk HH, Crim GA, Van Giessen GJ, Paterling HG — Rapid "in vitro" method for determining cytotoxicity of antitumor agents. *JNCI*, 1973; 51: 135-138.
- Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ — Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res*, 1976; 97: 275-280.
- Livingston RB, Titus GA, Heilbrun LK — "In vitro" effects on DNA synthesis as a predictor of biological effect from chemotherapy. *Cancer Res*, 1980; 40: 2209-2212.
- Ferguson PJ, Phillips RJ, Selner M, Cass CE — Differential activity of Vincristine and Vinblastine against cultured cells. *Cancer Res*, 1984; 44: 3307-3312.
- Lengsfel AM, Dietrich J, Schultze Maurer B — Accumulation and release of Vinblastine and Vincristine by HeLa cells: light microscopic, cinematographic and biochemical study. *Cancer Res*, 1982; 42: 3798-3805.
- Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ et al. — Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res*, 1983; 43: 1926-1931.
- Von Hoff DD, Casper J, Bradley E et al. — Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar culture. *Cancer Res*, 1980; 40: 3591-3597.
- Bech-Hansen NT, Sarangi F, Sutherland DJ, Ling V — Rapid assays for evaluating the drug sensitivity of tumor cells. *JNCI*, 1977; 59: 21-27.
- Volm M, Wayss K, Kaufmann M, Mattern J — Pretherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy. *Eur J Cancer*, 1979; 15:983-993.
- Park CH, Amare M, Savin MA, Goodwin JW, Newcomb MM, Hoogstraten B — Prediction of chemotherapy response in human leukemia using an "in vitro" chemotherapy sensitivity test on the leukemic colony-forming cells. *Blood*, 1980; 55: 595-601.
- Tsukeda H, Mizuno S, Nitta K — Susceptibilities of normal and malignant human lung cells in culture to the cytotoxic action of antitumor agents. *Cancer Res*, 1978; 38: 2529-2532.
- Roper PR — Cell survival following treatment with antitumor drugs. *Cancer Res*, 1979; 39: 1428-1430.
- Roper PR, Drewinko B — Comparison of "in vitro" methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res*, 1976; 36: 2182-2188.
- Shrivastav S, Bonar RA, Stone KR, Paulsin DF — An "in vitro" assay procedure to test chemotherapeutic drugs on cells from human solid tumors. *Cancer Res*, 1980; 40: 4438-4442.
- Rozinkowa D, Stepień J, Rumpniewska Z — Different Methotrexate effects in cultures normal and leukaemic human leukocytes. *Experientia*, 1982; 38: 704-705.
- Mordoh J, Chacon RD, Filmus J — Isolation of tumor cells from patients with osteosarcoma and analysis of their sensitivity to Methotrexate. *Cancer Res*, 1981; 41: 3621-3626.
- Alley MC, Lieber MM — Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. *Br J Cancer*, 1984; 49: 225-233.
- Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, Sandbach J, Jones D, Makuch R — Association between human colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med*, 1981; 70: 1027-1032.
- Yataganas X, Strife A, Perez A, Clarkson BD — Microfluorimetric evaluation of cell kill kinetics with 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine. *Cancer Res*, 1974; 34: 2795-2806.
- Waters RL, Hofer KG — The "in vivo" reproductive potential of density separated cells. *Exp Cell Res*, 1974; 87: 143-151.
- Yuhás JM, Toya RE, Ramiño NH — Neuraminidase and cell viability: failure to detect cytotoxic effects with dye-exclusion techniques. *JNCI*, 1974; 53: 465-468.
- Black MM, Speer FD — Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the "in vitro" dehydrogenase activity of cancer tissue. *JNCI*, 1954; 14: 1147-1158.
- Gaffen JD, Bennett A, Barer MR — A new method for studying cell growth in suspension, and its use to show that indomethacin enhances cell killing by Methotrexate. *J Pharm Pharmacol*, 1985; 37: 261-263.
- Bird MC, Godwin VA Jr., Antrobis YH, Bosanquet AO — Comparison of "in vitro" drug sensitivity by the differential staining cytotoxicity (DiSC) and colony-forming assays. *By Cancer*, 1987; 55: 429-431.
- Mujagic H, Chen SS, Geist R et al. — Effects of Vincristine on cell survival, cell cycle progression and mitotic accumulation in asynchronously growing sarcoma 180 cells. *Cancer Res*, 1983; 43: 3591-3597.
- Schornagel JH, McVie JG — The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rev*, 1983; 10: 53-75.
- Tattersall MHN, Brown B, Frei E — The reversal of Methotrexate toxicity by thymidine with maintenance of antitumor effects. *Nature*, 1975; 253: 198-200.