

**EFEITOS CITOTÓXICOS DO TENIPOSIDE, UM DERIVADO SEMI-SINTÉTICO
DAS EPIPODOFILOTOXINAS, SOBRE LINHAGENS CELULARES DE
CARCINOMA RENAL HUMANO**

Denise Heidrich Faria

Porto Alegre, 2000

**EFEITOS CITOTÓXICOS DO TENIPOSIDE, UM DERIVADO SEMI-SINTÉTICO
DAS EPIPODOFILOTOXINAS, SOBRE LINHAGENS CELULARES DE
CARCINOMA RENAL HUMANO**

Denise Heidrich Faria

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de mestre**

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Co-orientador: Dr. Dennis R. A. Mans

Porto Alegre, 2000

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Gilberto Schwartzmann pela orientação e oportunidade de realizar esta dissertação de Mestrado em seu laboratório;
- Ao Dr. Dennis R. A. Mans pela co-orientação, dedicação e interesse dispensados durante o desenvolvimento deste trabalho;
- À Prof^ª. Adriana Brondani da Rocha pelas idéias e colaboração no desenvolvimento deste estudo;
- À equipe do Prof^º. Dr. Radovan Borojevic, da UFRJ, especialmente à Prof^ª. Dra. Márcia Cury El-Cheikh pela colaboração na realização dos experimentos de citometria de fluxo;
- Ao Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à Farmacêutica Maira Graeff Burin pelo apoio técnico;
- Ao Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos Profs. Jarbas Oliveira e Augusto Barth, pelo apoio técnico;
- Aos Prof. Drs. Fátima Guma, Elena Bernard e José Cláudio Moreira pelo uso dos respectivos laboratórios e equipamentos no Departamento de Bioquímica da UFRGS;
- Aos colegas e amigos da Fundação SOAD de Pesquisas do Câncer– Ivana Grivicich, Cleber de Lima, Michael Barros, Rafael Lopes, Andréia Fernandes, Leonardo Almeida – pela ajuda na realização dos experimentos.

- Aos meus pais, pela paciência, apoio e amor sempre dispensados;
- Ao Frederico, pela paciência, colaboração e incentivo;
- Ao Frank pela ajuda nos computadores;
- Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pela oportunidade de realizar este trabalho;
- A CAPES e à Fundação SOAD de Pesquisas do Câncer pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O carcinoma renal	10
1.1.1 Características gerais.....	10
1.1.2 Dados epidemiológicos	11
1.1.3 Aspectos etiológicos.....	13
1.1.4 Características clínicas	14
1.1.5 Características moleculares	17
1.1.6 Considerações sobre o tratamento.....	19
1.1.6.1 Cirurgia	19
1.1.6.2 Radioterapia	21
1.1.6.3 Tratamentos sistêmicos	23
1.1.6.4 Tratamentos experimentais	27
1.2 O teniposide	29
1.2.1 Considerações gerais.....	29
1.2.2 Histórico do teniposide	30
1.2.3 Estrutura química e avaliação pré-clínica	31
1.2.4 Mecanismo de ação	33
1.2.5 Formulação e usos.....	35
1.2.6 Atividade antitumoral e toxicidade clínica	36
1.2.7 Teniposide em carcinoma renal	37
1.2.8 Justificativa do estudo	38
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAL & MÉTODOS.....	40
3.1 Drogas e produtos químicos.....	40
3.2 Linhagens celulares e manutenção das culturas.....	41
3.3 Determinação do tempo de duplicação celular	41
3.4 Tratamentos com drogas	42
3.5 Avaliação da proliferação celular.....	43
3.6 Determinação da atividade enzimática da topoisomerase II	44
3.7 Formação do complexo covalente DNA-topoisomerase II.....	45
3.8 Avaliação do dano ao DNA	47

3.9 Distribuição das células no ciclo celular.....	48
3.10 Análise estatística.....	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Características relevantes das linhagens celulares utilizadas neste estudo.....	50
4.2 Sensibilidade das células RXF-393, A-498 e TK-10 ao teniposide.....	53
4.3 Inibição do crescimento celular dependente de protocolo de administração do teniposide.....	55
4.4 Ausência de dependência de administração do teniposide na inibição da topoisomerase II.....	57
4.5 Ausência de dependência de administração do teniposide na formação de complexos DNA-topoisomerase II.....	59
4.6 Produção de dano ao DNA dependente de administração do teniposide.....	62
4.7 Efeito dos inibidores da glicoproteína P tamoxifeno, verapamil e ciclosporina A na citotoxicidade do teniposide	63
4.8 Efeito dos inibidores da síntese do DNA afidicolina glicinada e hidroxiuréia na citotoxicidade do teniposide	66
4.9 Efeito da afidicolina glicinada ou hidroxiuréia na indução de dano ao DNA pelo teniposide	68
4.10 Efeito da afidicolina glicinada e hidroxiuréia na distribuição das células no ciclo celular.....	69
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ABSTRACT	102

LISTA DAS ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão da média
DPC	Complexos DNA-proteína
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (β - amino etil éter)-N,N,N',N', tetracético)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADU	Fluorescence enhancement assay for DNA unwinding
FDA	<i>Food and Drug Administration (USA)</i>
HBSS	Solução salina tamponada de Hank (Hank's balanced salt solution)
IC₅₀	Concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento celular
LAK	Linfocinas ativadas para matar
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MHC	Complexo de maior histocompatibilidade
PBS	Solução salina fosfato tamponada (phosphate-buffered saline)
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
Rpm	Revoluções por minuto
RPMI	Meio de cultura desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>AIDS</i>)
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido tricloroacético

TIL	Linfócitos infiltrantes de tumor
TNM	Classificação de estadiamento tumoral baseada nas características do tumor, linfonodos e metástases
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V/v	Volume/volume
VEGF	Fatores de crescimento vasculares endoteliais
VHL	Síndrome autossômica <i>von Hippel-Lindau</i>
VM-26	Teniposide

RESUMO

O câncer renal corresponde a aproximadamente 3% dos tumores malignos do adulto, sendo a terceira malignidade urológica mais comum. Os tratamentos sistêmicos disponíveis para pacientes portadores de carcinoma renal avançado são, via de regra, pouco eficazes e sem um impacto definido na sobrevida. Portanto, torna-se imperioso que novos agentes e/ou estratégias terapêuticas para esta enfermidade sejam desenvolvidas. O derivado das epipodolofilotoxinas, etoposide, tem sido utilizado com sucesso no tratamento de vários tipos de tumores sólidos e hematológicos. Este agente exerce a sua ação antitumoral através da inibição da enzima nuclear topoisomerase II. Estudos recentes demonstraram que o efeito citotóxico *in vitro* deste agente é bem mais pronunciado quando as linhagens tumorais são expostas à droga por um tempo mais prolongado. Isto vem sendo confirmado em estudos clínicos, nos quais foi documentado um aumento significativo no percentual de respostas tumorais objetivas em pacientes com câncer avançado tratados com etoposide em doses repetidas diárias de forma continuada, comparativamente a pacientes que receberam pulsos de doses altas da droga a intervalos mais longos. Infelizmente, estudos iniciais com etoposide não revelaram uma atividade antitumoral significativa em pacientes com câncer renal avançado. Por esta razão, os estudos preliminares explorando o potencial terapêutico de seu análogo teniposide nesta doença também não receberam a devida atenção na literatura. Entretanto, este análogo possui potenciais vantagens terapêuticas em relação ao etoposide, uma vez que apresenta um tempo de retenção intracelular mais prolongado em linhagens de tumores sólidos *in vitro*. Estas observações nos estimularam a reconsiderar o estudo do potencial citotóxico do teniposide em modelos experimentais de câncer renal avançado. Nesta dissertação, foram estudados vários protocolos de administração de teniposide em linhagens de câncer renal humano, uma vez que esta neoplasia carece de drogas ativas disponíveis no armamentário terapêutico. Foram utilizadas as linhagens celulares RXF-393, A-498 e TK-10, as quais foram incubadas com teniposide em concentrações pré-determinadas e tempos de incubação variáveis. Além disto, foram feitos experimentos em que protocolos de administração de teniposide como agente único foram comparados a protocolos em que o mesmo foi combinado com agentes que bloqueiam a ação da glicoproteína P, responsável pelo efluxo ativo da droga do interior da célula tumoral. Além disso, foram também estudados protocolos incluindo a associação de teniposide com agentes que interferem com a síntese do DNA. Para os estudos de avaliação de citotoxicidade dos agentes quimioterápicos, os mesmos foram pré-incubados por 24 h na ausência ou presença do inibidor da DNA polimerase α afidicolina glicinada (0,2 μ M) ou do inibidor da ribonucleotídeo redutase hidroxauréia (200

μM) e após incubados por diferentes tempos de exposição com diluições seriadas de teniposide. Os efeitos citotóxicos foram avaliados através do método colorimétrico com sulforodamina B (SRB). Os protocolos de exposição prolongada das células ao teniposide mostraram um aumento significativo na sua citotoxicidade nas linhagens RXF-393, A-498 e TK-10, sugerindo que a citotoxicidade do teniposide é dependente de tempo de administração. Neste sentido, uma maior taxa de dano no DNA foi observada nas células expostas ao teniposide por tempos de administração mais prolongados. Curiosamente, os diferentes tempos de exposição ao teniposide não influenciaram de forma clara na formação de complexos DNA-topoisomerase II, nem nas medidas da atividade desta enzima. O uso concomitante de agentes moduladores da glicoproteína P como o verapamil, a ciclosporina A e o tamoxifeno não produziu potencialização do efeito antiproliferativo do teniposide. Por sua vez, os tratamentos com agentes que interferem na síntese de DNA, como a afidicolina glicinada ou a hidroxiuréia, potencializaram a citotoxicidade do teniposide em todas as linhagens estudadas, seguindo as características intrínsecas de cada linhagem. Em conclusão, os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que o teniposide apresenta um maior efeito citotóxico em protocolos de administração prolongada em combinação com agentes inibidores da síntese de DNA. Frente a estes resultados iniciais, o teniposide será testado nos protocolos de administração acima mencionados em um painel contendo um maior número de linhagens tumorais *in vitro*. Uma vez confirmadas as observações acima descritas, serão iniciados estudos em modelos tumorais *in vivo*. Estes estudos servirão de base nas decisões quanto à reavaliação clínica do teniposide em ensaios de fase I em pacientes com neoplasias avançadas refratárias.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carcinoma renal

1.1.1 Características gerais

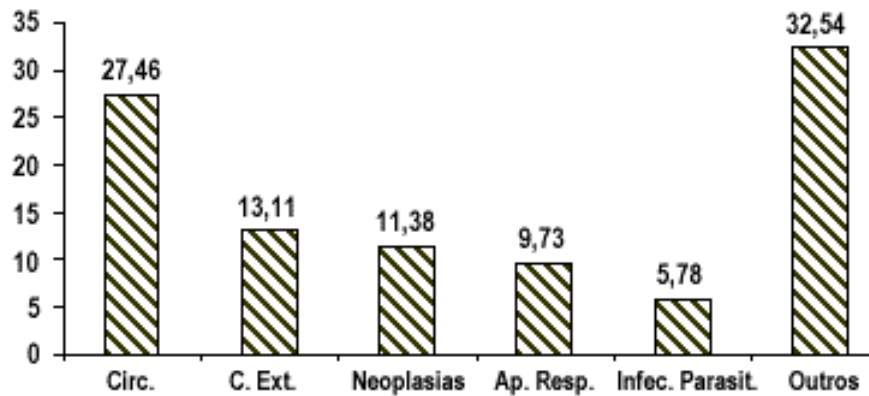
O carcinoma renal corresponde a aproximadamente 3% dos tumores malignos do adulto, sendo a terceira malignidade urológica mais comum (Linehan et al., 1997). Foi descrito pela primeira vez em 1826 por König e alguns anos depois (1855) Robin sugeriu que este tipo de câncer originava-se provavelmente a partir do epitélio tubular renal, observação que foi confirmada por Waldeyer em 1867 (Carson, 1928). Esta neoplasia pode ser dividida em dois tipos distintos: o carcinoma de células claras do rim, que corresponde a 85% de todos os carcinomas renais, e o câncer da pelve renal, que reúne os 15% restantes (Linehan et al., 1997). No entanto, todos os tipos de câncer renais estão reunidos nas estatísticas de incidência e mortalidade (Trichopoulos et al., 1997).

1.1.2 Dados epidemiológicos

No mundo todo, 150.000 novos casos de carcinoma renal humano são diagnosticados por ano e 78.000 mortes relacionadas a esta doença são relatadas (Parkin et al., 1999). A incidência de tumores malignos do rim cresceu drasticamente nos últimos anos, algo em torno de 54% entre 1975 e 1990 (Mulders et al., 1997; Walther et al., 1995; Kreger et al., 1991). Esta neoplasia ocupa a sétima colocação no ranking de incidência e mortalidade de câncer nos EUA, onde estima-se o diagnóstico do carcinoma renal em 30.000 pessoas ao ano, das quais aproximadamente um terço desenvolve metástases e 12.000 vem a morrer pela doença (Landis et al, 1999; Mulders et al., 1997) .

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano o câncer atinge aproximadamente 9 milhões de pessoas e mata cerca de 5 milhões, sendo atualmente a segunda causa de morte por doença na maioria dos países, logo atrás das doenças cardiovasculares (Ministério da Saúde, 1999). No Brasil, em 1994, as neoplasias foram responsáveis por 10,9% dos quase um milhão de óbitos atestados, sendo que 53,8% foram entre os homens e 46% entre as mulheres. Na região Nordeste, ao contrário do resto do país, as neoplasias representaram a terceira causa de morte com aproximadamente 6,3% dos casos de óbito, depois das doenças infecciosas e parasitárias. Nas demais regiões, se desconsiderarmos as causas externas, permanecem como a segunda causa de mortalidade (Figura 1), aumentando proporcionalmente à medida que se deslocam para a Região Sul (15,2%) (Ministério da Saúde, 1999).

Figura 1: Distribuição proporcional das principais causas de morte no Brasil – 1996.



Fonte: Ministério da Saúde: DataSus, SIM

O carcinoma renal ocorre principalmente entre os 50 e 70 anos de vida, também podendo ser encontrado em crianças com menos de 3 anos de idade (Stenzl & deKernion, 1989; Linehan et al., 1997) e mostra uma predominância dos homens para as mulheres de 1,5-1 (Linehan et al., 1997). A incidência deste tipo de câncer é geralmente maior entre a população urbana do que entre a rural. É maior nos países da Europa e dos EUA do que na Ásia e na América Latina (Parkin & Muir, 1992), apesar de que a incidência tenha aumentado recentemente em todas as partes do mundo (Pyrhönen et al., 1999; McCredie, 1994).

1.1.3 Aspectos etiológicos

Existe uma base multifatorial para o desenvolvimento do câncer renal, incluindo aspectos genéticos, ambientais e hormonais (Bagley, 1991; Trichopoulos et al., 1997; Mulders et al., 1997). Dois fatores de risco já foram sugeridos: o consumo de cigarros e a obesidade. O cigarro aumenta em 40% o risco de câncer renal, na razão direta do número de cigarros fumados e da duração deste hábito, tendendo a diminuir após o abandono do tabagismo pelo fumante (Trichopoulos et al., 1997; McLaughlin et al., 1995; Mulders et al., 1997).

A obesidade tem sido insistentemente associada ao alto risco de desenvolvimento do carcinoma renal em mulheres devido ao aumento do nível de estrogênio no organismo (Paganini-Hill et al., 1983; McLaughlin & Schuman, 1983). Interessantemente, estudos laboratoriais com vários modelos *in vivo* também sugeriram que níveis elevados de certos esteróides poderiam aumentar a predisposição ao câncer renal (Weisz et al., 1998; Kumar et al., 1993; Goldfarb & Pugh, 1990). Além disso, o uso de pílulas para emagrecimento contendo anfetaminas também estaria relacionado com o aparecimento deste tipo de câncer, embora não seja possível determinar se este é um fato isolado ou tem relação com a obesidade (Chow et al., 2000; Lindblad et al., 1994; Mellempgaard et al., 1995; Yuan et al., 1998).

Há um efeito sinérgico entre o fumo e a exposição ao cádmio ou arsênio, podendo aumentar ainda mais o risco de carcinoma renal (Bagley, 1991), além de certos fatores ocupacionais como trabalho em usinas de fundição de coque e aço (Maclure, 1987). A exposição ao tório, cádmio, radiação ionizante, asbestos e produtos do petróleo, além do

consumo de café, são também possíveis agentes causadores desta neoplasia (Walther et al., 1995; Linehan et al., 1997). Também, o uso de diuréticos e anti-hipertensivos, assim como de alguns analgésicos, também tem sido relacionado com o aparecimento de carcinoma renal (Gago-Dominguez et al., 1999; McLaughlin et al., 1995).

1.1.4 Características clínicas

Esta neoplasia costuma crescer como uma massa única no córtex renal, provavelmente a partir do epitélio do túbulo contorcido proximal e, em 85% dos casos, é altamente vascularizada (Bennington, 1973; Linehan et al., 1993; Vogelzang, 1992; Gospodarowicz et al., 1994). O local de crescimento é normalmente bem definido e o tumor é envolvido pelo parênquima renal ou tecido perinéfrico fibroso. A invasão na veia renal é comum. Além disso, o tumor possui uma propensão a crescer dentro da veia renal com subsequente expansão para a veia cava (Gospodarowicz et al., 1994; Fleming, 1999). Os sintomas associados com o câncer renal são variados e, em geral, inespecíficos, como perda de peso, febre, suor noturno e fadiga, o que dificulta o diagnóstico precoce. A tríade clássica de sintomas: hematuria, dor na região lombar e presença de uma massa tumoral palpável, comum quando os pacientes já apresentam a doença em estágio avançado, o que ocorre com aproximadamente 19% dos casos (Belldegrun & deKernion, 1998; Linehan et al., 1997). Aproximadamente 10% dos pacientes com metástases sobrevive 1 ano, a maioria têm em média uma sobrevida de apenas 4 meses (deKernion et al., 1978).

O câncer renal pode crescer no retroperitônio sem ser notado até que apareça uma metástase. Aproximadamente 45% dos pacientes com câncer renal apresentam a doença localizada (estágio I); 25%, a doença localmente avançada (estágios II ou III) e 30%, possui metástases à distância (estágio IV) (Tabela 1; Mulders et al., 1997). Cerca de 75% dos pacientes com a doença avançada têm metástases nos pulmões. Metástases nos tecidos moles ocorrem em um terço dos casos. Eventualmente, metástases de esqueleto, pele, fígado e de sistema nervoso central são também descritas. Na verdade, qualquer órgão pode ser alvo de metástases do câncer de rim, incluindo a tireóide, o pâncreas e os músculos esqueléticos (Linehan et al., 1997).

Tabela 1: Classificação TNM dos tumores malignos renais.

Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor com < 2,5 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim
T2	Tumor com > 2,5 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim
T3	Tumor estende-se às maiores veias ou invade a glândula adrenal ou os tecidos periféricos, mas não através da fáscia de Gerota
T3_A	Tumor invade a glândula adrenal ou o tecido periférico, mas não através da fáscia de Gerota
T3_B	Tumor invade agressivamente a veia renal ou cava abaixo do diafragma

Adaptado de Linehan et al., 1997.

1.1.5 Características moleculares

Assim como os carcinomas de cólon, mama e retinoblastoma, o câncer renal pode ocorrer tanto de forma esporádica quanto hereditária, sendo estimada a ocorrência de mais de 4% deste último tipo. Foi observado um aumento na incidência do carcinoma renal em pacientes com a doença de rins policísticos com dominância autossômica, assim como naqueles que apresentam uma história familiar. Quando ocorre nas síndromes hereditárias, o câncer renal tem uma grande tendência a ser bilateral (Linehan et al., 1997).

O desenvolvimento do câncer renal, tanto esporádico quanto hereditário, está freqüentemente associado à síndrome autossômica dominante de von Hippel – Lindau (VHL) (Fleming, 1999). Esta síndrome está relacionada a inativações funcionais do gene *VHL* situado no braço curto do cromossomo 3 (Figura 2) (Latif et al., 1993; Kovacs et al., 1988; Seizinger et al., 1988; Zbar et al., 1987). Apesar da sua função específica ainda não ter sido estabelecida, informações atuais sugerem que ele possa funcionar como um gene supressor tumoral (Foster et al., 1994; Gnarra et al., 1994; Shuin et al., 1994). Deste modo, a perda da sua função pode contribuir para a tumorigênese. Estas alterações genéticas são detectadas em até 97% dos tumores renais (Gnarra et al., 1994; Foster et al., 1994). Os indivíduos afetados desenvolvem tumores em vários órgãos, incluindo o rim, cerebelo, olhos, pâncreas e epidídimo (Maher et al., 1990), além de apresentarem freqüentemente carcinoma renal bilateral desde o começo e múltiplos cistos renais, no interior dos quais a neoplasia normalmente cresce (Linehan et al., 1997; Poston et al., 1995).

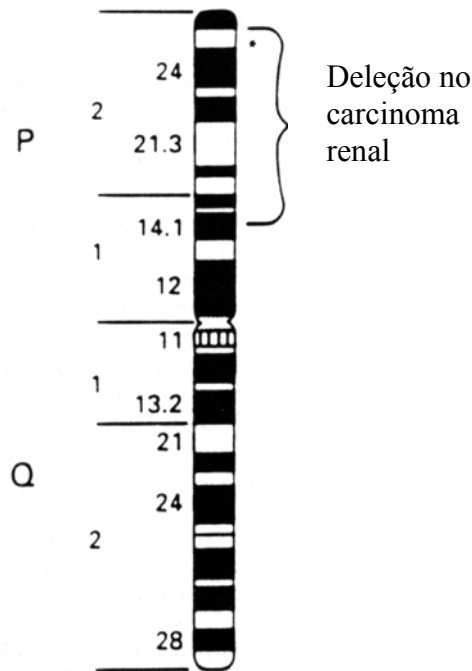


Figura 2: Ilustração do cromossomo 3 indicando a localização aproximada do gene von Hippel-Lindau (*) e a região onde normalmente ocorre deleção no carcinoma renal. (Reproduzido de Linehan et al, 1993).

Outras mutações relacionadas com esta neoplasia podem afetar o proto-oncogene *MET*, o qual codifica receptores de fatores de crescimento (Zbar et al., 1995; Schmidt et al., 1997), o *c-myc*, que codifica um fator de transcrição (Drabkin et al., 1985), o *c-Ha-ras*, que codifica a atividade de uma tirosina quinase associada à membrana (Peehl, 1987), e o gene *WT1* (associado ao tumor de Wilms'), que codifica um fator de transcrição (Pathak et al., 1982; Kovacs et al., 1987).

1.1.6 Considerações sobre o tratamento

1.1.6.1 Cirurgia

A primeira nefrectomia feita com sucesso em um paciente com câncer renal ocorreu em 1883 e, ainda hoje, este é o único tratamento com intenção curativa para o carcinoma renal localizado (Motzer et al., 1996). Como tratamento de primeira linha para a doença localizada, a nefrectomia produz taxas de sobrevida em 5 anos que variam de 60-82% para pacientes com tumores no estágio I e de 47-80% no estágio II (Tabela 2) (Robson et al., 1968; Skinner et al., 1972; McNichols et al., 1981; Guinan et al., 1995). Em pacientes com carcinoma renal metastático, os resultados da nefrectomia são modestos, produzindo sobrevida de 5 anos em menos de 20% dos pacientes (Sandock et al., 1995; Rabinovitch et al., 1994; Couillard & deVere White, 1993).

Tabela 2: Número de pacientes (%) com sobrevida de 5 anos quando tratados com nefrectomia.

Nº total de pacientes	Nº de Pacientes (%)				Referências
	I	II	III	IV	
88	32 (66)	14 (64)	24 (42)	9 (11)	Robson et al., 1969
309	91 (65)	17 (47)	100 (51)	77 (8)	Skinner et al., 1971
506	177 (67)	57 (51)	209 (34)	56 (14)	McNichols et al., 1981
115	(93)	(63)	(80)	(13)	Selli et al., 1983
326	52 (88)	39 (67)	73 (40)	88 (2)	Golimbu et al., 1986
314	(73)	(68)	(51)	(20)	Dinney et al., 1992
2473	1048 (75)	473 (63)	511 (38)	441 (11)	Guinan et al., 1995

Modificado de Beldegrun & deKernion, 1998.

A classificação tumoral está de acordo com Robson, 1968.

1.1.6.2 Radioterapia

A radioterapia pré- ou pós-operatória não é indicada rotineiramente em pacientes com carcinoma renal localizado submetidos à nefrectomia radical. Como indicado na Tabela 3, os resultados são insignificantes e inconclusivos. Esta modalidade terapêutica é usualmente reservada para tratamento paliativo de metástases ósseas ou cerebrais, podendo aliviar as dores ósseas provocadas pelas mesmas (Halperin & Harisiadis, 1983). Isto apresenta bons resultados em aproximadamente 50-70% dos pacientes, embora o tempo de duração seja muito curto (Fossa et al., 1982).

Tabela 3: Resultado dos tratamentos com ou sem radioterapia adjuvante no carcinoma renal.

Estudo	Pacientes	Tratamento local	Taxa de sobrevivência por 5 anos (%)	Recorrências locais	Comentários
Peeling et al., 1969	96	Nefrectomia	52	-	Não-randomizado; dose RT
	68	Nefrectomia + RT	25	-	
Rafla, 1970	96	Nefrectomia	37	25	Não-randomizado; dose RT
	94	Nefrectomia + RT	56	7	
Finney, 1973	44	Nefrectomia	44	-	Randomizado; dose RT de 5500 cGy
	49	Nefrectomia + RT	36	-	
Van der Werf-Messing, 1973	85	Nefrectomia	63	-	Randomizado; 37% dos pacientes tiveram tumores pequenos (pT1-2)
	89	RT (3000 cGy) + nefrectomia	47	-	
Juusela et al., 1977	44	Nefrectomia	63	-	Randomizado; 70% dos pacientes tiveram tumores pequenos (pT1-2)
	38	RT (3600 cGy) + nefrectomia			
Kjaer et al., 1987	33	Nefrectomia	62	3	Randomizado; grupo da RT com grande taxa de complicações – 44% sérias, 19% letais
	32	Nefrectomia + RT (5000 cGy); 20 frações	38	0	

RT, radioterapia

Adaptado de Linehan et al., 1997.

1.1.6.3 Tratamentos sistêmicos

O carcinoma renal humano é considerado um dos mais tumores humanos mais refratários à quimioterapia (Motzer & Russo, 2000; Mulders et al., 1997; Gigante et al., 1995). A vimblastina é a droga mais utilizada no tratamento sistêmico paliativo desta doença, em dosagens de 1,4 a 1,6 mg/m²/dia em infusão contínua por 5 dias. Entretanto, aproximadamente 10% dos pacientes apresentam respostas objetivas e sem um impacto claro na sobrevida (Yagoda et al., 1995).

A interleucina-2 (IL-2), em conjunto com linfocinas ativadas (células *LAK*) ou linfócitos infiltrantes de tumor (células *TIL*) ativados *ex vivo*, foi avaliada em triagens clínicas com pacientes portadores do carcinoma renal avançado (Rosenberg et al., 1993; Fyfe et al., 1995). No entanto, apesar das respostas iniciais apresentarem índices superiores a 30% e algumas respostas terem durado mais de 23 meses (Rosenberg et al., 1994), testes subsequentes mostraram respostas de apenas 15-20% (Tabela 2), sem aparente aumento na sobrevida mediana dos pacientes (Law et al., 1995; Motzer et al., 1996). Entretanto, a partir destes resultados, o FDA aprovou o uso destes agentes no tratamento sistêmico contra o câncer renal metastático.

Na verdade, dos mais de 100 agentes testados nesta neoplasia nenhum deles apresentou eficácia antitumoral relevante (Mickish & Word, 1994; Yagoda et al., 1995). Na Tabela 4, estão resumidos os experimentos de fase II realizados de 1990 a 1998 com agentes quimioterápicos contra o carcinoma renal.

Tabela 4: resultados de estudos de fase II com agentes novos contra o carcinoma renal de 1990 a 1998.

	Nº de pacientes	Nº de respostas completas + parciais (%)
Quimioterapia:		
<i>Altretamine</i>	30	0
<i>Amonafide</i>	26, 17	0, 0
<i>Caracemide</i>	17	0
<i>Carboplatin</i>	18	0
<i>13-cis-retinoic acid</i>	25	0
<i>Cystemustine</i>	54	1 + 0 (2)
<i>Dexniguldipine</i>	29	0 + 4 (14)
<i>4' Deoxydoxorubicin</i>	15	0 + 1 (7)
<i>Deoxycoformycin</i>	19, 25	0, 0
<i>Didemnin B</i>	21	0 + 1 (5)
<i>Doxetaxel</i>	31	0 + 1 (3)
<i>Echinomycin</i>	47,17	0 + 1 (2), 0
<i>Edatrexate</i>	37	0 + 2 (11) (4)
5-Fluorouracil	35, 61	0 + 4, 1 + 2 (5)
Floxuridina: infusão circadiana	56, 42, 14, 40, 26, 30,50	4+7(20), 3+3(14), 0, 0+4(10), 0+2(8), 0+4(14), 1+5(11)
Infusão fixa	29, 15	1 + 5(21), 0 + 2 (13)
<i>Fotemustine</i>	16	0
<i>Tegafur + uracil</i>	14	0
Gemcitabina	18, 37	0 + 1(6), 1 + 2 (8)
<i>Homoharringtonine</i>	14	0
<i>Irinotecan</i>	17	0 + 2 (11)
<i>Liposomal encapsulated doxorubicin</i>	14	0
<i>Mafosfamide</i>	16	1 + 0 (6)
<i>Menogaril</i>	56, 15	0 + 3(5), 0
<i>Merbarone</i>	36	0 + 1 (3)
<i>Navelbine</i>	14, 24	0,1 + 0 (4)
<i>Paclitaxel</i>	18	0
<i>Piroxantrone</i>	32, 31	0, 0 + 1 (3)
<i>Pyrazine</i>	15	0
<i>Sulofenar (LY186641)</i>	18, 16	0, 1 + 0 (6)
<i>Suramin</i>	12, 26	0, 0 + 1 (4)
<i>6-Thioguanine</i>	14	0
<i>Topotecan</i>	14	0

<i>Trimetrexate</i>	34	0 + 1 (4)
Quimioterapia + moduladores de drogas:		
Vimblastina sozinha	26	0 + 1 (4)
Vimblastina + <i>acrivastine</i>	15	0
Vimblastina + <i>dexverapamil</i>	12, 23, 18	0, 0, 0 + 1 (8)
Vimblastina + <i>dipyridamole</i>	15	0
Vimblastina + ciclosporina	16, 33	0, 0
Vimblastina + nifedipina	14	0
Vimblastina + PSC 833	29	2 + 1 (10)
Vimblastina + quinidina	23	1 + 0 (4)
Vimblastina + tamoxifeno	35	1 + 0 (3)
Vimblastina + toremifeno	18	2 + 0 (11)
Doxorubicina + <i>dexniguldipine</i>	20	0
Doxorubicina	11	0 + 1 (9)
Terapia hormonal:		
Tamoxifeno	25, 34, 59	2 + 1(12), 1 + 3(12), 0 + 1 (2)
Toremifeno	36	1 + 5 (17)
Imunoterapia:		
<i>Cimetidine</i>	42	2 + 0 (5)
<i>Granulocyte-macrophage colony-</i>	24	0
<i>IL-1</i>	16	0
<i>IL-4</i>	18, 50	0, 0 + 1 (2)
<i>IL-6</i>	40, 12	0 + 2(5), 0
<i>IL-12</i>	20, 51, 30	0 + 1(5), 1 + 0(2), 0 + 2 (7)
<i>Lanreotide</i>	30	0
<i>Levamisole</i>	15	0
<i>Linomide</i>	63, 29	1 + 2, 0
<i>Lonidamine</i>	19	1 + 1 (10)
<i>Ranitidine</i>	16	1 + 2 (16)
Inibidores da angiogênese:		
<i>Razoxane</i>	31	0
<i>TNP-470</i>	20	0 + 1 (5)

Adaptado de Motzer & Russo, 2000.

Um dos mecanismos de resistência do carcinoma renal à quimioterapia é a chamada resistência a múltiplas drogas (MDR), na qual ocorre resistência a diversos agentes antineoplásicos de origem natural, com estrutura e mecanismo de ação distintos. Esta resistência a múltiplas drogas parece estar relacionada à alta expressão da glicoproteína P, uma proteína transmembranosa de 170-kD que está presente tanto em células normais (Thiebaut et al., 1987; Sugawara et al., 1988) quanto em células tumorais (Chapman & Goldstein, 1995). A glicoproteína P é codificada pelo gene *mdr1* (Gigante et al., 1995; Mickisch et al., 1991) e funciona como uma bomba que exporta ativamente para fora das células vários tipos de drogas, principalmente as derivadas de produtos naturais como os alcalóides da *Vinca* e as epipodofilotoxinas (Fojo et al., 1987; Kakehi et al., 1988).

Como a maioria dos tumores renais apresenta alta expressão do gene *mdr1* (Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989), várias tentativas foram feitas para inibir o funcionamento da glicoproteína P e, assim, aumentar a retenção intracelular da droga. Dentre elas, destacamos o uso de inibidores competitivos da glicoproteína P, tais como a ciclosporina A, agente imunossupressor, o verapamil, bloqueador dos canais de cálcio e o tamoxifeno, hormônio antagonista aos esteróides (Judson, 1990). Apesar dos resultados promissores em estudos pré-clínicos, estas estratégias tiveram de ser abandonadas na clínica devido à excessiva toxicidade causada aos tecidos normais que também expressam a glicoproteína P (Chapman & Goldstein, 1995).

1.1.6.4 Tratamentos experimentais

Os resultados pobres obtidos com as formas convencionais de tratamento demonstraram a necessidade da descoberta de novas e potencialmente mais eficazes terapias contra o carcinoma renal. Os aspectos biológicos, moleculares e imunológicos do carcinoma renal ainda hoje estão sendo estudados, fazendo com que este tumor continue a ser um modelo clássico para a avaliação clínica de novas formas com potencial terapêutico.

Como o câncer renal pode apresentar regressão espontânea em aproximadamente 1% dos pacientes (Katz & Schapira, 1982) e há a sugestão de que este fenômeno é mediado pelo sistema imune, estudos foram feitos para avaliar o interferon nesta doença. No entanto, apesar das respostas iniciais terem sido entre 12-14% (Tabela 2) (Wirth, 1993; Garnick et al., 1988), os resultados dos estudos subsequentes variaram muito, a toxicidade foi alta, as respostas completas foram poucas e o tempo de sobrevivência não foi aumentado significativamente. Deste modo, o melhor uso e o tipo de interferon ainda têm de ser determinados (Minasian, 1993; Negrier, 1998).

A maior incidência de carcinoma renal em homens do que em mulheres (1,5-1) (Linehan et al., 1997), a descoberta de receptores hormonais nas células renais malignas (Linehan et al., 1997), e os efeitos antitumorais da progesterona observados em ratos enxertados com células tumorais renais (Kirkman & Bacon, 1952; Bloom et al., 1963) sugeriram a avaliação da terapia hormonal nesta doença. Infelizmente, o uso da flutamida

(Niijima et al., 1988; Ahmed et al., 1984), do tamoxifeno (Stahl et al., 1991; Papac & Keohane, 1993; Schomburg et al., 1993) e do toremifeno (Gershanovich et al., 1993) não trouxeram benefícios clínicos, produzindo índices de respostas de apenas 4,0%, 6,5% e 12%, respectivamente.

Mais recentemente, vários esforços têm sido feitos para aumentar a eficácia da imunoterapia no carcinoma renal humano. Estes incluem, dentre outros, transferência *ex vivo* de genes de citocinas para dentro de células tumorais; transferência *ex vivo* de genes suicidas para dentro de células tumorais com subsequente ativação de mecanismos suicidas *in vivo*; transferência *ex vivo* de genes de citocinas para linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) para produzir células T mais potentes para posterior transplante; e transferência *in vivo* de moléculas do complexo de maior histocompatibilidade (MHC) classe I através de injeção direta do gene a uma massa tumoral acessível (Mulders et al., 1997; Jaffee & Pardoll, 1995). Os resultados destas novas estratégias têm de ser aguardados (Belldegrun & deKernion, 1998).

A inibição da angiogênese foi descrita pela primeira vez como estratégia antitumoral por Judah Folkman (1971). Desde a descoberta dos fatores angiogênicos, seus receptores e reguladores negativos, este fenômeno tem revolucionado o entendimento sobre a neovascularização. Estudos realizados em carcinoma renal demonstraram que a expressão de fatores de crescimento vasculares endoteliais (*vascular endothelial growth factor – VEGF*) está aumentada nestes tumores, estimulando a angiogênese (Nicol et al., 1997). A ativação negativa deste VEGF parece estar relacionada com o alto nível molecular protéico do gene

VHL mutado (Siemeister et al., 1996), constituindo o evento mais importante na angiogênese tumoral do câncer renal. Alguns marcadores biológicos já mostraram ser muito promissores no prognóstico do carcinoma renal (Gelb, 1997), entretanto não foi visualizado nenhum benefício na taxa de sobrevivência dos pacientes com níveis de fatores angiogênicos elevados ou não (Wechsel et al., 1999).

1.2 O teniposide

1.2.1 Considerações gerais

O estudo do potencial citotóxico do teniposide em linhagens de carcinoma renal humano é o objeto central desta dissertação. Este agente é um análogo do etoposide com um perfil pré-clínico mais favorável. Contudo, o teniposide não foi avaliado de forma detalhada em estudos iniciais realizados no passado, provavelmente devido ao fato, freqüente no desenvolvimento de drogas anticâncer, de que uma maior atenção tenha sido dada ao outro representante desta classe, o etoposide, cuja avaliação clínica precedeu a do teniposide no tempo. Em conseqüência, a sua testagem ficou condicionada aos resultados anteriormente observados com etoposide. Dessa forma, o teniposide não foi adequadamente testado em alguns tipos de tumores tradicionalmente refratários à terapêutica, como por exemplo o câncer renal avançado. Entretanto, o teniposide se mostrou 10 vezes mais potente que o etoposide *in vitro*, possuindo uma maior retenção em células tumorais quando comparado a células

normais (Roed et al., 1987; Stähelin, 1970 e 1973; Muggia, 1994). Esta foi a principal motivação para que o nosso interesse neste agente fosse renovado.

1.2.2 Histórico do teniposide

O teniposide (4 – dimetil – epipodofilotoxina – 9 - (4,6 – O – 2 – tenilidene - β - D - glucopiranosídeo); NSC 122819; VM-26) é um derivado semi-sintético do princípio ativo vegetal podofilotoxina (Stähelin & von Wartburg, 1989), que é extraído dos rizomas de *Podophyllum emodi* Wall. e *P. peltatum* L.. Estas plantas pertencentes à família Berberidaceae são originadas da região do Himalaia e América do Norte, onde começaram a ser utilizadas pelos nativos há muitos séculos atrás como agentes catárticos (purgativos) e anti-helmínticos. Sinais de atividade antitumoral de extratos alcoólicos de raízes de *Podophyllum* surgiram há séculos em diferentes continentes. No século 10, o livro medieval inglês “*The Leech Book of Bald*” mencionou tratamento de câncer com raízes de *P. emodi* Wall (Cockayne, 1961) e os índios norte-americanos da tribo Penobscot usavam o *P. peltatum* L. contra o câncer desde o século 17 (Lombard, 1952).

O caminho para o desenvolvimento das epipodofilotoxinas teniposide e etoposide começou em 1820 com a inclusão de espécies de extratos de *Podophyllum* na Farmacoteca dos EUA. Data de 1880 o primeiro relato científico documentado de podofilotoxina, feito por Podwysstzky. A primeira indicação clara de um possível efeito antiproliferativo foi

observada na década de 40, quando a podofilotoxina mostrou eficácia contra papilas venéreas de *Condylomata acuminata* (Kaplan, 1942), através da sua capacidade de inibir a formação de microtúbulos, mecanismo similar ao da colchicina (King & Sullivan, 1946; Hartwell & Schrecker, 1951; Stähelin, 1973).

1.2.3 Estrutura química e avaliação pré-clínica

A estrutura química do teniposide foi proposta em 1951 por Hartwell e Schrecker sendo mais tarde confirmada por vários investigadores (Figura 3) (Stähelin & von Wartburg, 1989). A molécula de teniposide é constituída por um D-glucopiranosídeo, um esqueleto policíclico (anéis A, B, C, e D) e um anel dimetoxifenol (E) pendente. O teniposide tem peso molecular de 656,7 D, sendo um composto neutro lipofílico praticamente insolúvel em água. Deve ser dissolvido em solventes orgânicos tais como etanol, clorofórmio ou DMSO e administrado por infusão intravenosa após a diluição em veículo injetável apropriado.

A avaliação da atividade antitumoral da podofilotoxina nos anos 50 mostrou que tal substância constituía um potente agente citotóxico apresentando, porém, excessiva toxicidade. Na busca de análogos de maior eficácia e menor toxicidade, várias outras substâncias foram isoladas de extratos de *Podophylli* e uma série de análogos foi sintetizada da podofilotoxina (Hartwell & Schrecker, 1958). Estes esforços levaram à seleção de duas preparações para testes *in vitro*, em modelos animais e em humanos, ácido podofilínico etilhidrazida e um

produto da condensação do glicosídeo da molécula de *Podophyllum* com benzaldeído. Estas preparações foram comercializadas em 1963 como SP-I (Proresid intravenoso) e SP-G (Proresid oral).

Em 1964, foi descoberto que a atividade do SP-G era devida à ação de um composto então identificado como 4-dimetil-epipodofilotoxina benzilideno-1- β -D-glucopiranosídeo (von Wartburg et al., 1957) que também poderia ser isolado, em pequenas quantidades, de *P. emodi* Wall. A partir disso, numerosos análogos desta substância foram sintetizados com o objetivo de obter epipodofilotoxinas com maior índice terapêutico (Stähelin & Cerletti, 1964). Dos mais de 3.000 análogos sintetizados, dois compostos foram selecionados para avaliação farmacológica e testes clínicos: teniposide e etoposide, sintetizados em 1966 e 1965, respectivamente (Figura 3). Esta escolha foi baseada na capacidade apresentada por ambos de inibir células no final das fases S ou G₂, impedindo que as células entrem em mitose, e também no maior índice terapêutico quando comparados a outros agentes testados pré-clinicamente (Stähelin, 1970; Long et al., 1984).

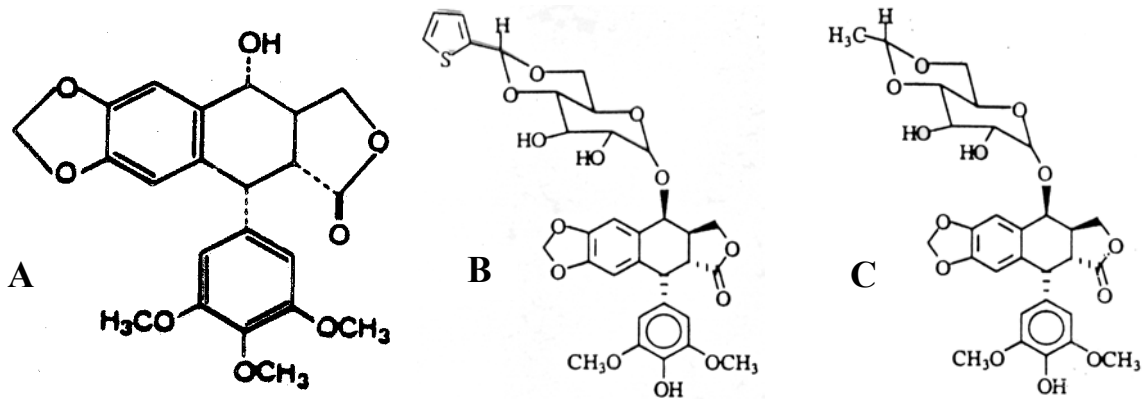


Figura 3: Fórmula estrutural da podofilotoxina (A) e das epipodofilotoxinas teniposide (B) e etoposide (C). Reproduzido de Chabner, BA & Longo, DL. Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1990: 264.

1.2.4 Mecanismo de ação

Embora o teniposide seja derivado da podofilotoxina, ambos têm mecanismos de ação distintos. Enquanto a podofilotoxina inibe a formação de microtúbulos, parando as células na fase M, o teniposide inibe a progressão do ciclo celular em fase de transição S/G₂. O bloqueio da metáfase pelo teniposide também foi observado *in vitro*, mas em concentrações muito altas para serem consideradas relevantes *in vivo*.

Estudos subseqüentes *in vitro* revelaram que o teniposide introduz quebras na fita do DNA, após a interferência na atividade da topoisomerase II (Ross et al., 1979; Ross & Bradley, 1981). A topoisomerase II é uma enzima nuclear com função crítica em replicação,

transcrição e recombinação de DNA (Beck, 1991; Hande, 1998). Com este propósito, a enzima tem a capacidade de introduzir quebras transitórias na fita dupla de DNA com subsequente translocação para após religá-la no ponto de junção, assim alterando a topologia do DNA (Figura 4A) (Stryer, 1996; Malonne & Atassi, 1997; Cummings & Smyth, 1993; Osheroff et al., 1991). Os intermediários essenciais destas reações são complexos DNA–topoisomerase II (Nelson et al., 1984). O teniposide estabiliza estes complexos (Figura 4B), que presumivelmente resultam na formação de quebras na fita do DNA associadas ao seu efeito citotóxico (Hsiang & Liu, 1989; Pommier & Bertrand, 1993; Pommier & Tanizawa, 1993).

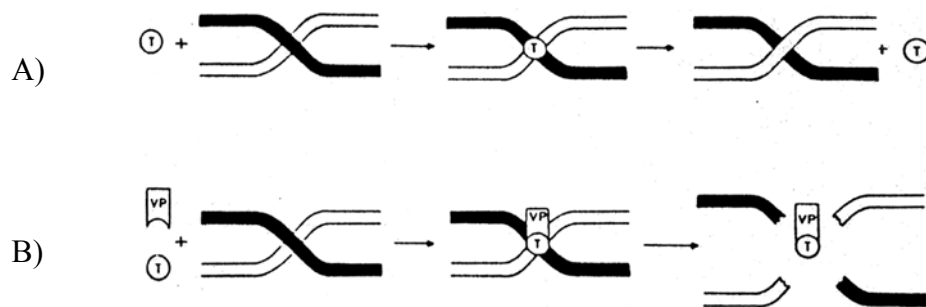


Figura 4: A) Mecanismo de ação da topoisomerase II (T); B) Estabilização do complexo clivado DNA–topoisomerase II (T) pela ação do etoposide (VP). Reproduzido de Chabner BA & Longo DL. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1990: 265.

1.2.5 Formulação e usos

O teniposide é apresentado em embalagem com 10 ampolas contendo 50 ml da droga dissolvidos em 5 ml de uma solução não-aquosa contendo: N, N-dimetilacetamida 300 mg, álcool benzílico 150 mg, óleo de rícino polioxetilado (Cremofor) 2,5 g, etanol desidratado 42,7% (v/v) e ácido maleico para ajuste de pH para aproximadamente 5,0. Imediatamente antes de sua administração intravenosa, cada ampola de 5 ml de teniposide é diluída em 50, 125, 250 ou 500 ml de solução glicosada a 5% ou com soro fisiológico. Estas preparações são estáveis, sob iluminação fluorescente normal, por 24 h em recipientes de grande volume de vidro. Não é recomendada a refrigeração. Soluções de heparina podem provocar a precipitação do teniposide.

O teniposide deverá ser administrado por infusão intravenosa em um período mínimo de 30 min. A administração por injeção em bolo ou por uma infusão mais rápida pode causar uma resposta hipotensora devido à presença de picos de concentração plasmática muito elevados (O'Dwyer et al., 1984; Holthuis et al., 1987; Rodman et al., 1990; Cleri & Berkery-Haywood, 1999). Os ciclos podem ser repetidos a cada 3 semanas ou a partir da recuperação da medula óssea (2 a 3 semanas) (Fischer et al., 1993; Jones et al., 1983).

1.2.6 Atividade antitumoral e toxicidade clínica

O teniposide foi testado em estudos de fase I pela primeira vez em 1967, sendo liberado comercialmente (Vumon ou Vehem) em 1976. Após ter sido usado na Europa por vários anos, o órgão que fiscaliza e libera novos medicamentos nos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*), aprovou esta droga antineoplásica para o uso em leucemia pediátrica refratária em 1992 (Pommier et al., 1996). O teniposide é indicado em crianças ou adultos com leucemia linfoblástica aguda recorrente em combinação com a citarabina (Fischer et al., 1993). O teniposide também possui atividade contra linfomas cutâneos malignos, doença de Hodgkin, tumores intracranianos malignos (glioblastoma, ependimoma, astrocitoma), carcinoma de bexiga, carcinoma de pequenas células de pulmão e neuroblastoma.

A sua toxicidade dose-limitante é a leucopenia. Trombocitopenia e anemia são menos frequentes, assim como náuseas e vômitos, que podem ser prevenidos com agentes antieméticos. Alopecia reversível e neuropatia periférica aparecem em 10-30% dos pacientes. Ocasionalmente, pode ocorrer anorexia, diarreia, estomatite, dor abdominal e edema peri-orbital. Além disso, reações de hipersensibilidade (alterações na pressão sanguínea, broncoespasmos e taquicardia) podem ocorrer e podem estar relacionadas ao cremofor utilizado no veículo (Fischer et al., 1993; Donehower, 1997).

1.2.7 Teniposide em carcinoma renal

Em estudos clínicos iniciais, o teniposide mostrou atividade particularmente contra linfomas (Dombernowsky et al., 1972; Mathe et al., 1974; Nissen et al., 1980). Alguns destes efeitos antitumorais também foram observados contra tumores de cérebro e de bexiga (Gutin & Walker, 1977; Stoter et al., 1984). Baseados nestas últimas descobertas, estudos clínicos com teniposide em pacientes com outras malignidades do trato genito-urinário, incluindo carcinoma renal avançado, foram iniciados (Linehan et al., 1997). Infelizmente, os resultados foram inexpressivos e sem impacto significativo na qualidade de vida ou sobrevivência dos pacientes (Hire et al., 1979; Oishi et al., 1987; Pfiefler et al., 1984). Obviamente, estes resultados diminuíram o interesse na avaliação clínica do teniposide nesta doença.

Entretanto, o efeito antitumoral das epipodofilotoxinas é altamente dependente do protocolo de administração. Assim, em modelos pré-clínicos, o efeito antitumoral das epipodofilotoxinas mostrou aumento com exposições mais frequentes e contínuas, sugerindo, desta maneira, a possibilidade de aumentar a sua eficácia clínica pela alteração do seu protocolo de administração (Vendetti, 1971; Dombernowsky & Nissen, 1973). Mais importante ainda, a administração do etoposide feita repetidamente em doses baixas por períodos prolongados comprovou ser mais eficaz quando comparada com a sua administração em uma única dose alta (Greco, 1991; Johnson et al., 1990; Slevin et al., 1989; Clark et al., 1989; Einhorn et al., 1990; Miller & Einhorn, 1990; Schwartzmann et al., 1991).

1.2.8 Justificativa do estudo

As observações acima mencionadas em relação ao etoposide poderiam ser potencialmente verdadeiras, em se tratando de seu análogo teniposide, o qual tem a vantagem adicional de possuir um maior tempo de retenção intracelular em linhagens de câncer de pulmão humano. Portanto, é possível que a eficácia antitumoral deste agente possa ser aumentada através de protocolos de administração prolongados (Muggia, 1994). Deste modo, testamos em um modelo *in vitro* de carcinoma renal humano se o efeito antiproliferativo do teniposide poderia ser aumentado com uma administração mais prolongada. Considerando a alta quimioresistência do carcinoma renal, testamos a hipótese de que o uso concomitante de drogas que ou interferem com a síntese de DNA ou que modulam os mecanismos de efluxo mediados pela glicoproteína P poderiam potencializar os efeitos do teniposide.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a citotoxicidade do teniposide em linhagens de carcinoma renal humano, correlacionando os achados de inibição do crescimento celular com efeitos em sua enzima-alvo, a topoisomerase II; número e/ou estabilidade dos complexos covalentes DNA-topoisomerase II; indução de dano ao DNA; e eventuais alterações na distribuição das células nas fases do ciclo celular.
2. Avaliar o efeito citotóxico do teniposide na presença de agentes que interferem com a ação da glicoproteína P (tamoxifeno, verapamil e ciclosporina A).
3. Avaliar o efeito citotóxico do teniposide na presença de agentes que interferem com a síntese do DNA (hidroxiuréia e afidicolina glicinada).

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Drogas e produtos químicos

O teniposide foi obtido da Bristol-Myers Squibb (São Paulo, SP, Brasil). A hidroxiuréia, o tamoxifeno e o verapamil eram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O Dr. J. Johnson (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) gentilmente cedeu a afidicolina glicinada. A ciclosporina A era da Sandoz Pharmaceuticals Corp. (East Hanover, NJ, USA). Os frascos de cultura eram da Corning Costar Corp. (Cambridge, MA, EUA). O meio nutritivo RPMI-1640 e o fungizone eram da Gibco BRL (Grand Island, NY, USA); já o soro fetal bovino e a tripsina/ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) eram da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). A *L*-glutamina era da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A [U-¹⁴C] leucina (atividade específica 308 mCi/mmol) e a [metil-³H] timidina (atividade específica 76 mCi/mmol) eram da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido). A bisbenzamida (Hoechst 33258) era da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), assim como o iodeto de propídio, o brometo de etídio, o Nonidet P-40 e a sulforodamina B.

3.2 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10, doadas gentilmente pelo Dr. R. Camalier do Instituto Nacional do Cancer (Bethesda, MD, USA), foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² ou 75 cm² com meio nutritivo RPMI-1640 contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino e 2% (p/v) de *L*-glutamina, incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade ≥ 95%. As células eram mantidas em crescimento exponencial com repiques feitos a cada dois dias. Para a realização dos experimentos, a viabilidade celular superior a 95% foi confirmada através da exclusão com azul de tripan. As culturas celulares em crescimento exponencial foram removidas dos frascos de cultura usando tripsina 5%/ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 1 mM ou foram raspadas em solução salina fosfato tamponada (PBS) gelada.

3.3 Determinação do tempo de duplicação celular

Para determinar os tempos de duplicação das linhagens celulares, as células foram inoculadas em diversas densidades e as taxas de proliferação, em vários períodos de tempo após a inoculação, foram inferidos usando-se o método de sulforodamina B (SRB), conforme descrito detalhadamente na Seção 3.6. As curvas de proliferação celular foram feitas plotando-se as absorbâncias *versus* tempo de crescimento, permitindo a determinação do tempo de duplicação celular.

3.4 Tratamentos com drogas

Culturas de células foram expostas por vários períodos de tempo ao teniposide na ausência ou presença de verapamil, ou ciclosporina A, ou tamoxifeno, ou hidroxiuréia ou afidicolina glicinada. Para a determinação dos valores de IC_{50} , isto é, a concentração da droga que inibiu em 50% o crescimento celular, as células foram tratadas por aproximadamente 3 tempos de duplicação (4 dias para as células RXF-393 e A-498 e 7 dias para as células TK-10). Nos experimentos onde foi verificado se as drogas eram dependentes de protocolo de administração, as células foram expostas ao teniposide segundo os seguintes protocolos: a) por 2 h no dia 1 com posterior incubação em meio sem droga por 3 tempos de duplicação (tratamento curto); b) por 2 h diárias durante 3 tempos de duplicação (tratamento fracionado); ou c) por 3 tempos de duplicação consecutivos (tratamento contínuo).

Nos tratamentos que envolveram teniposide na presença dos agentes moduladores, as células foram incubadas no dia 1 com estes últimos em concentrações sub-tóxicas e subsequentemente expostas durante 3 tempos de duplicação a diluições seriadas de teniposide na ausência ou presença de cada um destes moduladores. Ao final das incubações, as culturas foram avaliadas quanto à proliferação celular, atividade da topoisomerase II, complexos DNA-topoisomerase II, integridade do DNA e distribuição no ciclo celular.

3.5 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi verificada através de um ensaio com SRB conforme descrito por Skehan et al., 1990. As células foram fixadas *in situ* por 60 min, à 4 °C com 50 µl de ácido tricloroacético 50% (p/v), lavadas com água destilada, secas e coradas por 10 min com 100 µl de uma solução 0,4% (v/v) de SRB em 1% (v/v) de ácido acético. O excesso de SRB foi retirado com ácido acético 1% (v/v) e o SRB associado às proteínas celulares foi solubilizado com 200 µl de base Trizma (10 mM, pH 10,5). A quantidade de SRB ligado às células é proporcional à densidade destas e foi determinada medindo-se as absorvâncias em um comprimento de onda de 515 nm usando-se um leitor de placas 7500 (Cambridge Technology, Watertown, MA, USA). Os resultados foram corrigidos pelas absorvâncias de fundo, determinado pelos brancos contendo meio ou meio com droga, sem células. A partir das curvas de dose-resposta foram obtidos os valores de IC₅₀, isto é, as concentrações das drogas que resultaram em 50% de redução na leitura da absorvância quando comparadas aos controles não tratados.

3.6 Determinação da atividade enzimática da topoisomerase II

A atividade catalítica da topoisomerase II foi determinada através da capacidade da enzima, presente nos extratos nucleares, de converter o DNA superenovelado em DNA relaxado (Miller et al., 1981), podendo ser visualizada pela intensidade das bandas correspondentes após eletroforese em gel de agarose (Filipski & Kohn, 1982). Os extratos nucleares foram preparados à 4°C. Para isto, culturas de 5×10^5 células foram lavadas com PBS gelado, removidas dos frascos de cultura e coletadas por centrifugação por 10 min a 150 x g. As células foram ressuspensas em 5 ml de solução contendo NaCl 150 mM, KH_2PO_4 1 mM pH 6,4, MgCl_2 5 mM, ácido etilenoglicol bis (β - amino etil éter)-N,N,N',N', tetracético (EGTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 0,2 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) 1 mM, e Triton X-100 0,3% (v/v). Os núcleos foram extraídos por 10 min, coletados por centrifugação por 10 min a 150 x g e homogeneizados por sonicação. A atividade enzimática foi extraída por 30 min com 0,2 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, e após centrifugação por 40 min a 15000 x g localizava-se no sobrenadante (Crepsi, 1986).

A atividade catalítica da topoisomerase II foi avaliada através da conversão do DNA superenovelado de *Crithidia fasciculata* (kDNA) em minicírculos de DNA (Miller et al. 1981), usando-se um kit de ensaio para topoisomerase II (TopoGEN, Columbus, Ohio, USA). O relaxamento foi feito por 1 h à 37 °C, incubando-se 2 μl do extrato nuclear na presença de 0,1 μg de DNA superenovelado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo KCl 120 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 0,5 mM e ATP 0,5 mM em um volume final de 25 μl . A reação foi

parada com a adição, no gelo, de 0,1 volume de solução contendo 5% sarcosil (p/v), 0,0025% azul de bromofenol (p/v) e 50% glicerol (v/v).

Os produtos da reação foram separados por eletroforese, durante 3 h à 25 V e 4 °C, em um gel de agarose 1% (p/v) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio com tampão de corrida contendo Tris-acetato 0,04 M pH 8,0 e 0,001 M EDTA. O gel foi fotografado em filme *Polaroid 667* e os negativos foram usados para quantificar as densidades dos DNAs através do programa Optiquant (Versão 2.0, Packard Instrument Co., 1997). A intensidade das bandas representadas pelos minicírculos de DNA em relação àquelas de DNA total foram usadas para analisar a atividade da topoisomerase II. Os resultados foram comparados em relação àqueles encontrados nas células não tratadas e expressos em unidades arbitrárias.

3.7 Formação do complexo covalente DNA-topoisomerase II

O número e/ou a estabilidade dos complexos DNA-topoisomerase II, intermediários da reação entre a topoisomerase II e o DNA, são fatores importantes na citotoxicidade do teniposide (Andrea et al., 1991; Lönn et al., 1989). A formação destes complexos foi avaliada a partir do método descrito por Zwelling et al. (1989). Assim, 2×10^5 células/ml foram inoculadas em placas de cultura e as proteínas celulares e o DNA foram marcados à 37 °C com [U-¹⁴C] leucina (0,2 µCi/ml) e [metil-³H] timidina (0,6 µCi/ml), respectivamente. Após 24 h, o meio contendo radioativos foi substituído por meio novo no qual as células foram

incubadas por 1 h adicional para que houvesse maior incorporação radioativa e, então, expostas ao teniposide em diferentes protocolos de administração. Logo depois, as células foram lavadas com PBS gelado, raspadas, coletadas por centrifugação por 5 min à 150 x g e ressuspensas em 0,5 ml de tampão contendo EDTA 5 mM pH 8,0 e 1,25% SDS (p/v) pré-aquecido à 65 °C.

As células foram lisadas em 20 passagens por uma seringa com agulha calibre 22. Os lisados foram incubados à 65 °C por 15 min com 0,25 ml KCl 100 mM, misturados vigorosamente e os complexos DNA - proteína foram precipitados no gelo por 10 min. Após serem coletados por centrifugação por 10 min a 10.000 x g e 4 °C, foram lavados com 1 ml de solução contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM e incubados por 10 min à 65 °C. Os *pellets* foram dissolvidos em 0,2 ml de água pré-aquecida à 65 °C, incubados por 15 min à 65 °C e centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g à temperatura ambiente. As amostras foram misturadas com líquido de cintilação Opti Phase - 'High Safe' 3 e contadas no espectrofotômetro de cintilação líquida (Wallac 1409, Wallac Oy, Finland, Turco). Os valores foram normalizados pela incorporação de [U-¹⁴C] leucina e expressos pela razão cpm [metil ³H] timidina/cpm [U-¹⁴C] leucina, usando valores obtidos com células não tratadas como controles.

3.8 Avaliação do dano ao DNA

O dano induzido ao DNA foi determinado segundo um método fluorescente (FADU) que detecta quebras no DNA e/ou lesões induzidas após tratamento com alcali na fita de DNA (Kanter & Schwartz, 1982). Este método é baseado em: a) tempo que a dupla hélice do DNA leva para ser convertida em fita simples em condições alcalinas; b) aceleração deste processo após a introdução do dano ao DNA, a princípio causada pelos agentes citotóxicos; c) diferença de fluorescência do DNA duplo *versus* o filamento de DNA simples através dos complexos formados com o corante cromossômico fluorescente bisbenzamida.

Culturas de 5×10^6 células aderidas e em suspensão foram lavadas, coletadas por centrifugação e ressuspensas em 5 ml de PBS. Aliquotas de 0,5 ml foram tratadas com: (a) 0,5 ml de NaOH 0,1 N misturado com 0,5 ml de HCl 0,1 N, seguidos pela adição de solução de bisbenzamida (0,2 M KPO₄, 0,16% sarcocinato lauroil de sódio, 0,04 M EDTA dissódico e 1,0 µg/ml de bisbenzamida pH 7,4) e sonicadas por 15 seg.; (b) 0,5 ml de NaOH 0,1 N por 30 min., seguido por neutralização com HCl 0,1 N, adição de 0,5 ml da solução de bisbenzamida e sonicação por 15 seg.; (c) 0,5 ml de NaOH 0,1 N, sonicadas por 5 seg., incubadas por 30 min., neutralizadas com HCl 0,1 N, adicionados 0,5 ml de solução de bisbenzamida e ressonicadas por 15 seg.

Cada suspensão foi dividida em 3 alíquotas para medir a fluorescência do DNA não desnaturado (a), DNA parcialmente desnaturado (b) ou DNA totalmente desnaturado (c). O

percentual da fração total de DNA na forma de dupla-hélice das células sobreviventes (F) foi determinado a partir da intensidade relativa de fluorescência (i) de acordo com a fórmula:

$$F = \% \text{ filamento duplo de DNA} = (i B - i C)/(i A - i C) \times 100\%$$

A fluorescência foi determinada em um comprimento de onda de excitação e emissão de 353 e 451 nm, respectivamente em um espectrofotômetro de fluorescência (F 2000, Hitachi, Tóquio, Japão). Os resultados foram corrigidos pelos valores de fundo obtidos de amostras sem células e expressos através do controle de células não tratadas, em relação ao percentual de DNA de dupla fita intacto.

3.9 Distribuição das células no ciclo celular

A distribuição das células no ciclo celular foi determinada através de citometria de fluxo (Vindelov, 1977). Para isso, amostras de 1×10^6 células foram ressuspensas em 1 ml de solução gelada contendo Tris-HCl 3,4 mM pH 7,6, 0,05 mg/ml de iodeto de propídio, 0,01% Nonidet P-40 (v/v), 700 U/l ribonuclease A e NaCl 10 mM. Após 30 min, aproximadamente 15.000 células foram analisadas quanto ao seu conteúdo de DNA, através de um citômetro de fluxo Becton Dickson FACS Calibur (San Jose, CA, EUA), a um comprimento de onda de excitação e emissão de 564-600 nm e 580-650 nm, respectivamente. Os resultados foram

analisados através do programa Cell Fit de análise do DNA fornecido com o equipamento e expressos em porcentagem de células nas fases G₁, S ou G₂/M do ciclo celular.

3.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos ao menos três vezes em triplicata e os valores de média \pm desvio padrão (DP) estão apresentados nas figuras e tabelas. O teste *t* de Student foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Características relevantes das linhagens celulares utilizadas neste estudo

Levando em consideração a característica quimioresistência do carcinoma renal avançado, decidimos avaliar o teniposide quanto a sua eficácia antitumoral em vários protocolos de administração em culturas de células humanas de carcinoma renal. Com este propósito, utilizamos as linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 que apresentam diferenças em relação as suas características bioquímicas (Wu et al., 1992; O'Connor et al., 1997). Primeiramente, as células foram caracterizadas em termos de taxa de crescimento, distribuição na fase S e atividade da topoisomerase II.

Como pode ser observado pelas curvas de crescimento obtidas (Figura 5), as células RXF-393 e A-498 tiveram o índice de crescimento mais rápido, duplicando-se a cada 24-30 h, enquanto a linhagem TK-10 cresceu aproximadamente 2 vezes mais devagar, duplicando-se a cada 48-56 h (Tabela 5). A fração na fase S de cada linhagem celular foi obtida através da sua respectiva distribuição no ciclo celular (Vindelov, 1977). Como pode ser visualizado na Figura 6 e na Tabela 5, todas as três linhagens celulares tiveram a mesma fração na fase S

(20-25%), assim como uma distribuição essencialmente similar nas outras fases do ciclo celular (50-60% na fase G₀/G₁ e 15-20% na fase G₂/M).

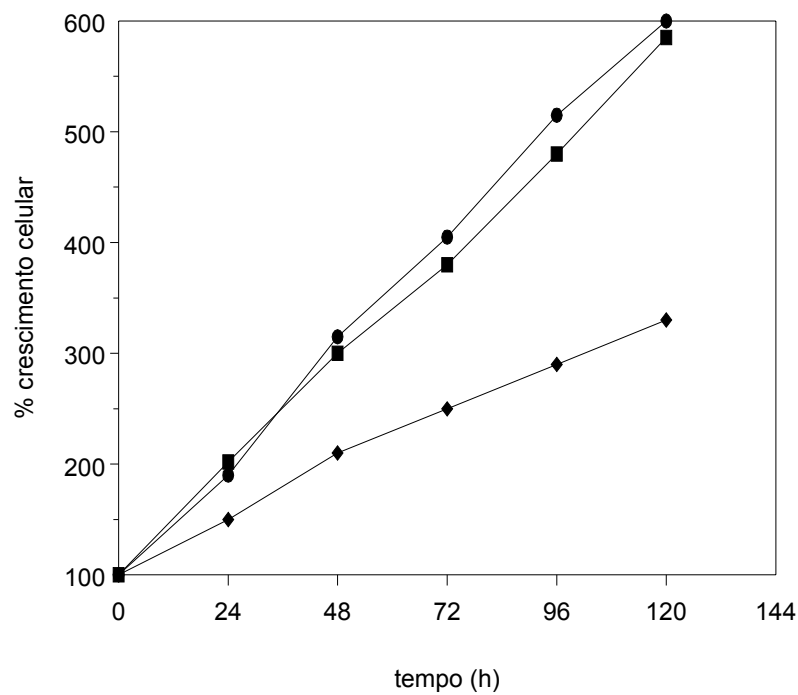


Figura 5: Crescimento das linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393 (●), A-498 (■) e TK-10 (◆) durante incubações de 24-120 horas. O número de células (%; média ± DP; n ≥ 3) foi avaliado pelo método de SRB.

A Figura 7 mostra que a atividade da topoisomerase II nas células A-498 foi comparável a das células TK-10, embora tenha sido aproximadamente 1,6 vezes maior nas células da linhagem RXF-393 (Tabela 1).

Figura 6: Distribuição nas fases do ciclo celular (%; média \pm DP; $n \geq 3$) dos controles das linhagens de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10. M1, apoptose; M2, G₀/G₁; M3, S; M4, G₂/M.

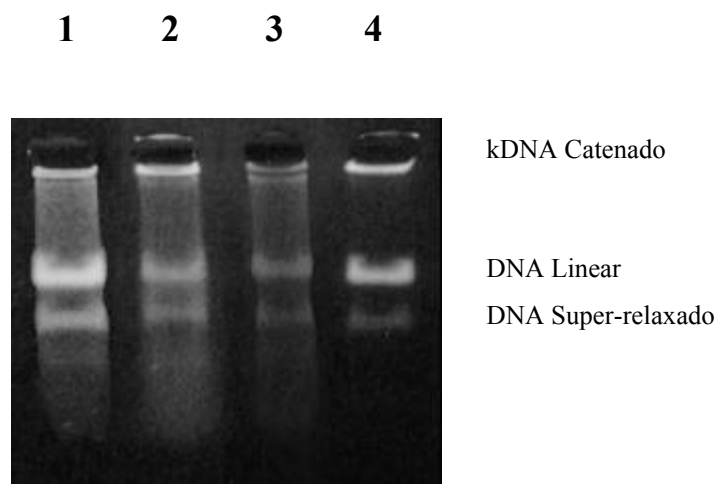


Figura 7: Atividade da enzima topoisomerase II em extratos nucleares das células de carcinoma renal humano RXF-393 (linha 1), A-498 (linha 2) e TK-10 (linha 3) não tratados. A linha 4 corresponde aos marcadores para DNA linear e super-relaxado.

Tabela 5: Tempo de duplicação celular (horas; média \pm DP; $n \geq 3$), fração de células na fase S do ciclo celular (%; média \pm DP; $n \geq 3$), atividade da topoisomerase II (unidades arbitrárias) e sensibilidade ao teniposide (0 – 2 μM) após 3 tempos de duplicação celular (IC_{50} em μM ; média \pm DP; $n \geq 3$) em células de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10.

	RXF-393	A-498	TK-10
Tempo de duplicação (h)	24 \pm 1,5 h	26 \pm 2,0 h	48 \pm 1,7 h
Fração na fase S (%)	23 \pm 3	21 \pm 4	21 \pm 4
Atividade da topoisomerase II (unidades arbitrárias)	1,6	1,0	1,0
IC_{50} (μM)	0,04 \pm 0,01	0,50 \pm 0,04	0,05 \pm 0,01

4.2 Sensibilidade das células RXF-393, A-498 e TK-10 ao teniposide

Nós examinamos as três linhagens celulares quanto à sensibilidade ao teniposide, tentando relacionar estes resultados com os obtidos na seção anterior. Os valores de IC_{50} para as células RXF-393, A-498 e TK-10 nestas condições foram aproximadamente 0,04; 0,50 e 0,05 μM , respectivamente (Figura 8; Tabelas 5 e 6), indicando que a linhagem celular A-498 foi aproximadamente 10 vezes menos sensível ao teniposide do que as linhagens RXF-393 e TK-10. Este ranking de sensibilidade de 10 : 1 : 1 não está de acordo com o ranking de 1 : 1,6

: 1 do nível de atividade da topoisomerase II visto nas células A-498, RXF-393 e TK-10, respectivamente, sugerindo que o nível básico de atividade desta enzima não era o único determinante das respostas celulares ao teniposide.

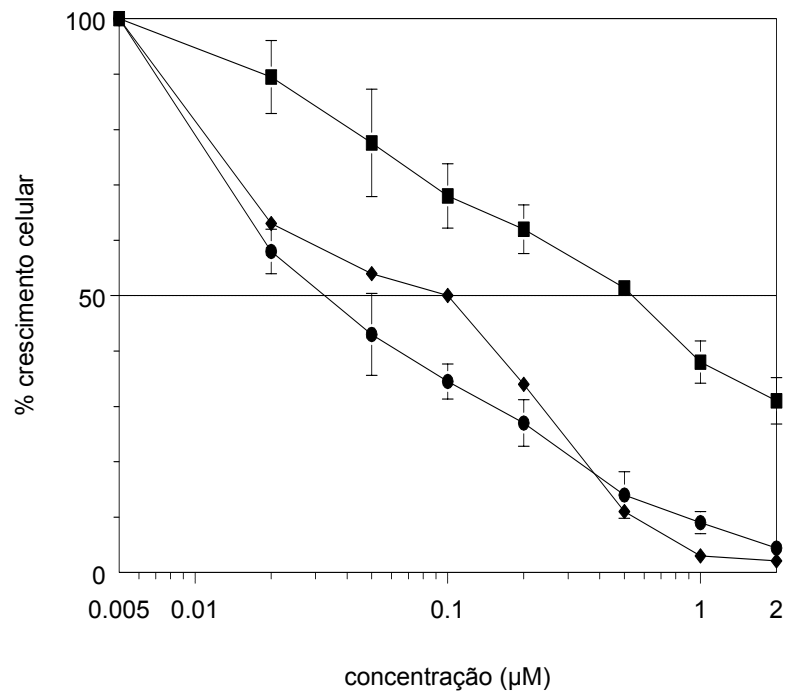


Figura 8: Inibição do crescimento (%; média \pm DP; $n \geq 3$) das linhagens de carcinoma renal humano RXF-393 (●), A-498 (■) e TK-10 (◆) após tratamento contínuo com teniposide (0–2 µM) durante três períodos de duplicação celular.

4.3 Inibição do crescimento celular dependente de protocolo de administração do teniposide

Para investigar se o efeito antiproliferativo do teniposide era dependente de protocolo de administração, nós comparamos o seu efeito inibitório no crescimento celular sob tratamento contínuo com aqueles obtidos sob tratamento curto e fracionado. As respostas celulares expressas em valores de IC_{50} estão representadas na Tabela 6 e Figura 9.

Tabela 6: Valores de IC_{50} (μM ; média \pm DP; $n \geq 3$) do teniposide ($0 - 2 \mu M$) nas linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 após exposição contínua, fracionada ou curta. O número de células foi avaliado após incubações por um período igual a 3 vezes o tempo de duplicação celular de cada uma das linhagens celulares.

	RXF-393	A-498	TK-10
Teniposide contínuo	0,04 \pm 0,01	0,50 \pm 0,04	0,05 \pm 0,01
Teniposide fracionado	0,20 \pm 0,10 ^a	0,75 \pm 0,30	0,20 \pm 0,01 ^a
Teniposide tempo curto	0,60 \pm 0,30 ^a	1,70 \pm 0,40 ^a	1,00 \pm 0,30 ^a

^a Significativamente diferente do teniposide contínuo ($p < 0,05$)

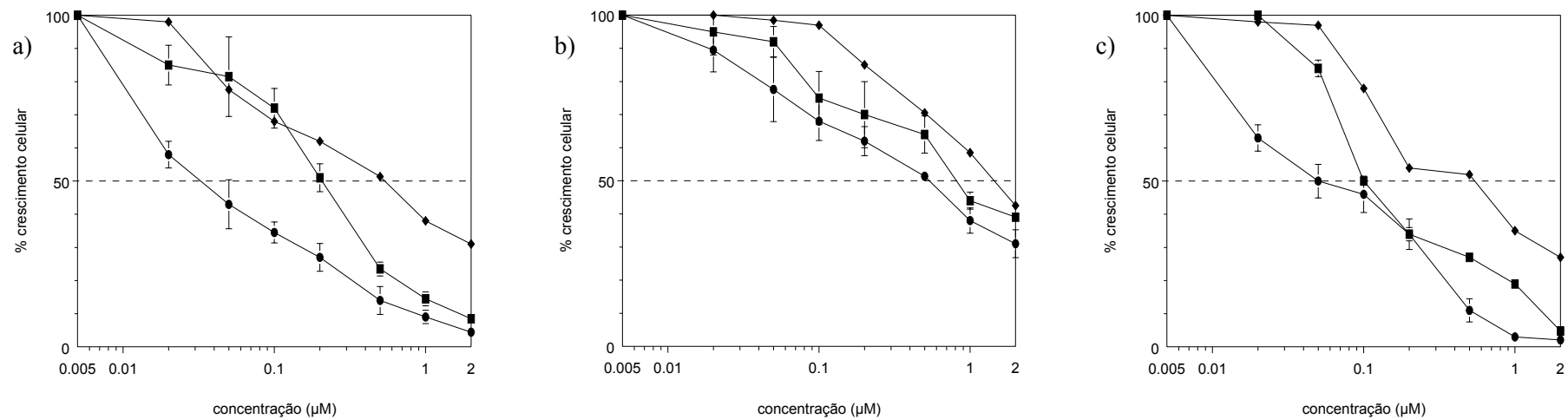


Figura 9: Inibição do crescimento (%; média \pm DP; $n \geq 3$) nas linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393 (a), A-498 (b) e TK-10 (c) após tratamento contínuo (●), fracionado (■) ou de tempo curto (◆) com IC_{50} de teniposide.

O tratamento de curta duração inibiu o crescimento das células RXF-393, A498 e TK-10 em valores de IC_{50} de aproximadamente 0,6; 1,7 e 1,0 μ M, respectivamente. A exposição fracionada aumentou a inibição do crescimento celular em aproximadamente 3-, 2- e 5-vezes nas linhagens RXF-393, A-498 e TK-10, respectivamente. A melhor inibição foi obtida após a exposição contínua, a qual aumentou o efeito antiproliferativo do teniposide em 15-, 5-, 3- e 2-, 20- e 4- vezes nas células RXF-393, A-498 e TK-10, respectivamente, quando comparada com as exposições curta e fracionada, nesta ordem. Estes resultados confirmam que a inibição do crescimento celular do teniposide, de acordo com a sua especificidade para a fase S (Clark, 1992), é altamente dependente de protocolo de administração.

Os nossos resultados indicaram também que as células menos sensíveis ao teniposide, as A-498 (Tabela 5), foram também menos (2-4 vezes) suscetíveis a alterações no protocolo do teniposide quando comparadas às células RXF-393 e TK-10.

4.4 Ausência de dependência de administração do teniposide na inibição da topoisomerase II

Para verificar se a topoisomerase II estava envolvida na dependência de tempo de administração do teniposide, sua atividade catalítica foi determinada em extratos nucleares através da conversão do DNA superenovelado em DNA relaxado. A Figura 10 e a Tabela 7 mostram que o teniposide, seja em protocolo curto, fracionado ou contínuo de tratamento, ocasionou uma diminuição pela metade na atividade da topoisomerase II nas células RXF-393

e TK-10, mas não afetou significativamente a atividade na linhagem celular A-498. Aparentemente, a atividade da enzima não era alterada com mudanças na administração do teniposide, sugerindo que a inibição do crescimento celular dependente de protocolo de administração do teniposide não estava envolvida com a inibição da atividade da topoisomerase II nos diferentes tempos de tratamento. A ausência de alterações na atividade da topoisomerase II nas células A-498 com o uso desta droga em diferentes protocolos está de acordo com a menor sensibilidade ao teniposide apresentada por estas células em relação às linhagens celulares RXF-393 e TK-10 (Figura 9; Tabela 7).

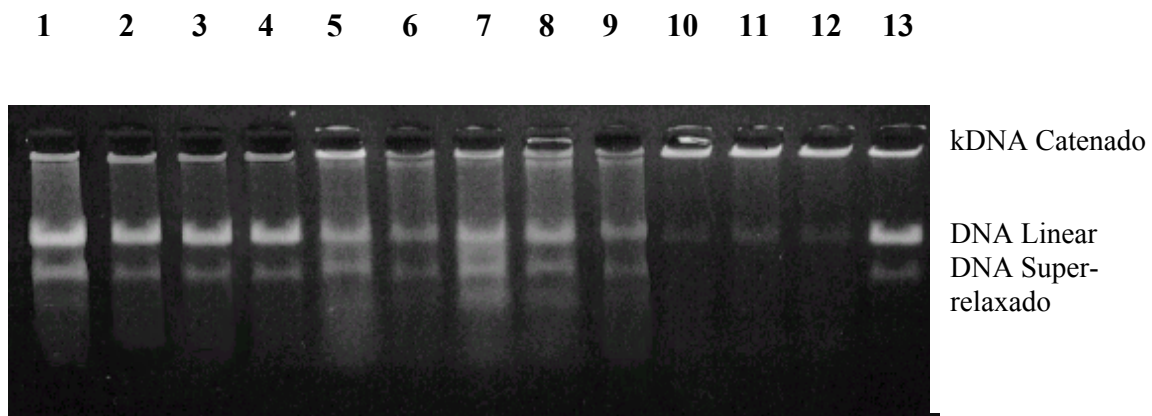


Figura 10: Atividade da topoisomerase II em extratos nucleares das linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393 (linhas 1-4), A-498 (linhas 5-8) e TK-10 (linhas 9-12). As linhas 1, 5 e 9 correspondem às células do controle não tratado; as linhas 2, 6 e 10 ao tratamento contínuo; as linhas 3, 7 e 11 ao tratamento fracionado e as linhas 4, 8 e 12 ao tratamento curto com valores de IC_{50} de teniposide nas linhagens de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10, respectivamente. A linha 13 corresponde aos marcadores para DNA linear e superrelaxado.

Tabela 7: Atividade da topoisomerase II (unidades arbitrárias) em células não tratadas das linhagens RXF-393, A-498 e TK-10 e após tratamento contínuo, fracionado ou curto com IC₅₀ de teniposide. A atividade da topoisomerase II foi obtida por um método de decatenação do DNA superenovelado.

	RXF-393	A-498	TK-10
Controle não tratado	1,6	1,0	1,0
Teniposide contínuo	0,8	1,0	0,5
Teniposide fracionado	0,8	1,0	0,5
Teniposide tempo curto	0,8	1,0	0,5

4.5 Ausência de dependência de administração do teniposide na formação de complexos DNA-topoisomerase II

O número e/ou a estabilidade dos complexos DNA-topoisomerase II são importantes determinantes na sensibilidade das células em relação às drogas com mecanismo direcionado à topoisomerase II, como o teniposide (Andrea et al., 1991; Lönn et al., 1989). Investigamos se a inibição do crescimento celular dependente de protocolo de administração do teniposide estava relacionada com a formação dos complexos DNA-proteína nos diferentes tempos de

tratamento. Como se pode observar na Figura 11 e Tabela 8, as células tratadas continham aproximadamente 30 vezes mais complexos DNA-proteína do que os controles não tratados.

No entanto, diferenças significativas não foram observadas na quantidade de complexos DNA-proteína formados nos diferentes protocolos de administração do teniposide. Assim, apesar da formação dos complexos DNA-proteína parecerem ser altamente relevantes para o efeito antiproliferativo do teniposide, a diferença de quantidade entre eles provavelmente ainda não foi a responsável pelo efeito inibitório do crescimento celular do teniposide com dependência de protocolo de administração.

Tabela 8: Valores relativos à quantidade de complexos DNA-topoisomerase II em linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 após exposição contínua, fracionada ou curta a valores de IC₅₀ de teniposide. A quantidade de complexos estabilizados está indicada pela razão entre a quantidade de timidina e leucina incorporadas pelas células (média ± DP; n = 3).

	RXF-393	A-498	TK-10
Controle não tratado	0,7 ± 0,04	0,7 ± 0,04	0,74 ± 0,05
Teniposide contínuo	0,97 ± 0,05 ^a	0,99 ± 0,03 ^a	0,98 ± 0,06 ^a
Teniposide fracionado	1,03 ± 0,02 ^a	0,99 ± 0,01 ^a	0,87 ± 0,1
Teniposide tempo curto	1,0 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,05 ^a	0,94 ± 0,04 ^a

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

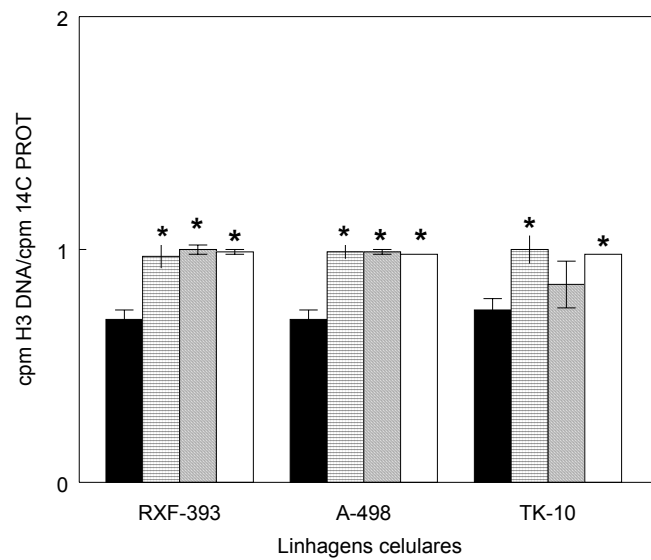


Figura 11: Quantidade de complexos DNA-topoisomerase II em linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 não tratadas (■) e após exposição contínua (▣), fracionada (▤) ou curta (□) a valores de IC_{50} de teniposide. Os complexos DNA-proteína foram determinados pela razão entre a quantidade de timidina e leucina incorporadas pelas células (média \pm DP; $n = 3$).

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

4.6 Produção de dano ao DNA dependente de administração do teniposide

A introdução de quebras na fita do DNA pode estar relacionada com a citotoxicidade do teniposide (Liu, 1989; Andrea et al., 1991). Como está indicado na Figura 12, o tratamento de curta duração não provocou dano significativo ao DNA nas três linhagens celulares.

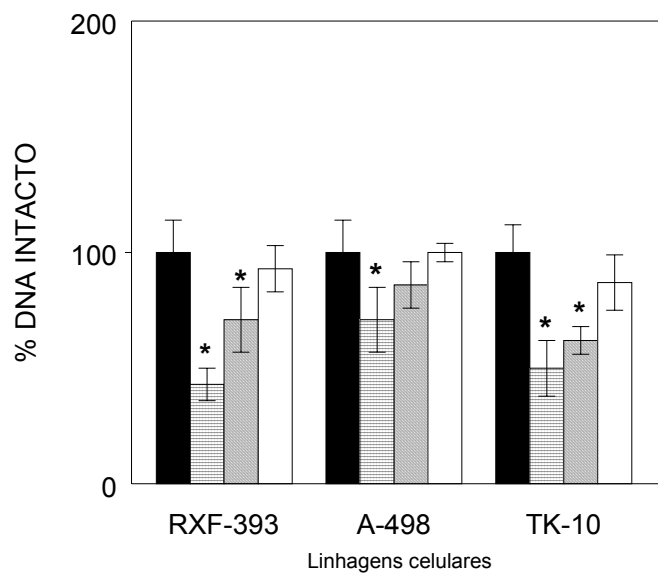


Figura 12: Quantidade de DNA em dupla-hélice (% DNA intacto; média \pm DP; $n \geq 3$) em linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 não tratadas (■) e após exposição contínua (▣), fracionada (▤) ou curta (□) a valores de IC₅₀ de teniposide. A integridade do DNA foi avaliada ao término dos tratamentos através de um método fluorescente (FADU).

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

O tratamento fracionado também não afetou significativamente a integridade do DNA nas células A-498, mas causou entre 30 e 40% de dano ao DNA das linhagens RXF-393 e TK-10, respectivamente. No entanto, o tratamento contínuo introduziu considerável dano ao DNA nas três linhagens celulares, isto é, entre 60, 50, e 30% nas células da RXF-393, TK-10 e A-498, respectivamente. Estes resultados sugerem que os efeitos antiproliferativos do teniposide dependentes de protocolo de administração estavam relacionados à introdução de dano ao DNA em vários tempos de exposição à droga.

4.7 Efeito dos inibidores da glicoproteína P tamoxifeno, verapamil e ciclosporina A na citotoxicidade do teniposide

Na tentativa de aumentar a eficácia antitumoral do teniposide, nós examinamos se a inibição da glicoproteína P poderia tornar as células mais sensíveis ao teniposide. Como pode ser visualizado na Figura 13 e Tabela 9, o teniposide, tanto na ausência quanto na presença dos moduladores verapamil, ciclosporina A ou tamoxifeno, inibiu o crescimento das três linhagens celulares essencialmente de acordo com as curvas dos valores similares de IC_{50} . Estas observações sugerem que a expressão de glicoproteína P não era um fator crítico para as respostas celulares ao teniposide.

Tabela 9: Valores de IC₅₀ (média ± DP; n ≥ 3) de células de carcinoma renal humano na ausência ou presença de teniposide durante 3 períodos de duplicação após prévia exposição de 24 h aos agentes inibidores da glicoproteína P: verapamil (6 µM), ciclosporina A (4 µM) ou tamoxifeno (6 µM).

	RXF-393	A498	TK-10
Teniposide contínuo	0,05 ± 0,00	0,48 ± 0,05	0,05 ± 0,017
Teniposide + verapamil	0,02 ± 0,002 ^a	0,20 ± 0,03 ^a	0,08 ± 0,03
Teniposide + ciclosporina A	0,02 ± 0,003 ^a	0,60 ± 0,05	0,04 ± 0,00
Teniposide + tamoxifeno	0,02 ± 0,003 ^a	0,30 ± 0,10	0,02 ± 0,002 ^a

^a Significativamente diferente do teniposide contínuo (p < 0,05)

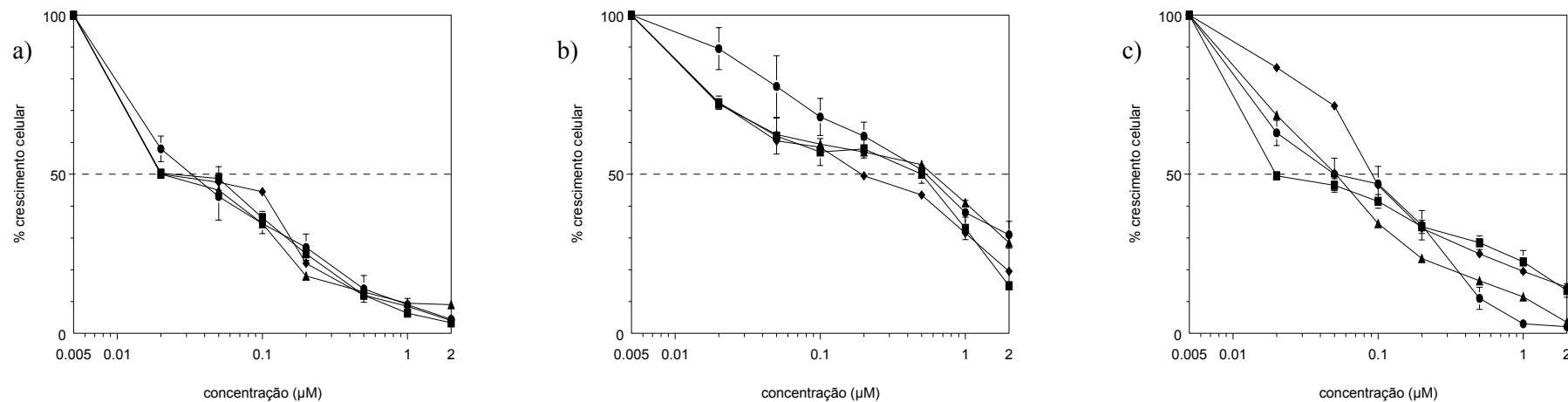


Figura 13: Inibição do crescimento (%; média \pm DP; $n \geq 3$) das linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393 (a), A-498 (b) e TK-10 (c) após tratamento contínuo com IC₅₀ de teniposide sozinho (●) ou na presença de tamoxifeno (6 μM; ■), verapamil (6 μM; ◆) ou ciclosporina A (4 μM; ▲) durante 3 tempos de duplicação celular.

4.8 Efeito dos inibidores da síntese do DNA afidicolina glicinada e hidroxiuréia na citotoxicidade do teniposide

Avaliamos se o uso concomitante dos agentes afidicolina glicinada ou hidroxiuréia, que interferem no processo de síntese de DNA, poderia aumentar o efeito antiproliferativo do teniposide. Como está indicado na Figura 14 e Tabela 10, a afidicolina glicinada potencializou a inibição do crescimento celular mediada pelo teniposide em aproximadamente 2 vezes nas três linhagens celulares, enquanto a hidroxiuréia aumentou o efeito antiproliferativo desta mesma droga (2 e 2,5 vezes) somente nas linhagens RXF-393 e TK-10, respectivamente.

Tabela 10: Valores de IC_{50} (média \pm DP; $n \geq 3$) de células de carcinoma renal humano na ausência ou presença de teniposide durante 3 períodos de duplicação após prévia exposição de 24 h aos agentes afidicolina glicinada (0,2 μ M) ou hidroxiuréia (200 μ M). O número de células foi avaliado após incubações por 3 tempos de duplicação celular.

	RXF-393	A-498	TK-10
Teniposide contínuo	0,04 \pm 0,01	0,50 \pm 0,04	0,05 \pm 0,01
Teniposide + afidicolina glicinada 0,2μM	0,02 \pm 0,00 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a
Teniposide + hidroxiuréia 200μM	0,02 \pm 0,01 ^a	0,70 \pm 0,10 ^a	0,02 \pm 0,01 ^a

^a Significativamente diferente do teniposide contínuo ($p < 0,05$)

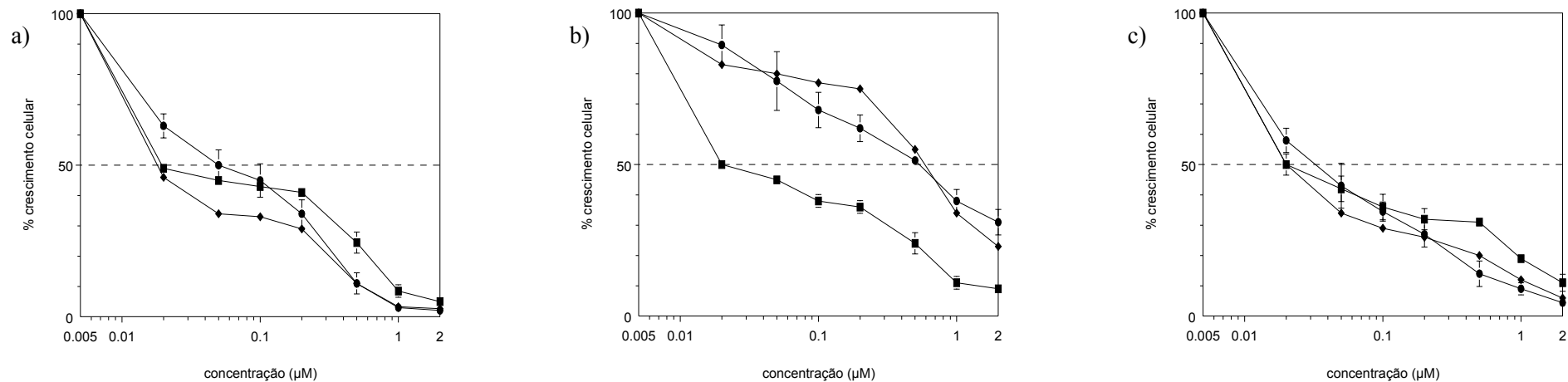


Figura 14: Inibição do crescimento (%; média \pm DP; $n \geq 3$) das linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393 (a), A-498 (b) e TK-10 (c) após tratamento contínuo com IC_{50} de teniposide sozinho (\bullet) ou na presença de afidicolina glicinada (0,2 μM ; \blacksquare) ou hidroxauréia (200 μM ; \blacklozenge) durante 3 tempos de duplicação celular.

4.9 Efeito da afidicolina glicinada ou hidroxiuréia na indução de dano ao DNA pelo teniposide

Examinamos se o uso de afidicolina glicinada e hidroxiuréia estava relacionado com uma introdução maior de dano ao DNA em relação ao induzido pelo teniposide isoladamente. Como pode ser verificado na Figura 15, o uso tanto da afidicolina glicinada quanto da hidroxiuréia não afetou significativamente o dano ao DNA mediado pelo teniposide nas três linhagens, sugerindo que a potencialização do crescimento celular do teniposide por estes agentes não estava relacionado com a introdução de mais dano ao DNA.

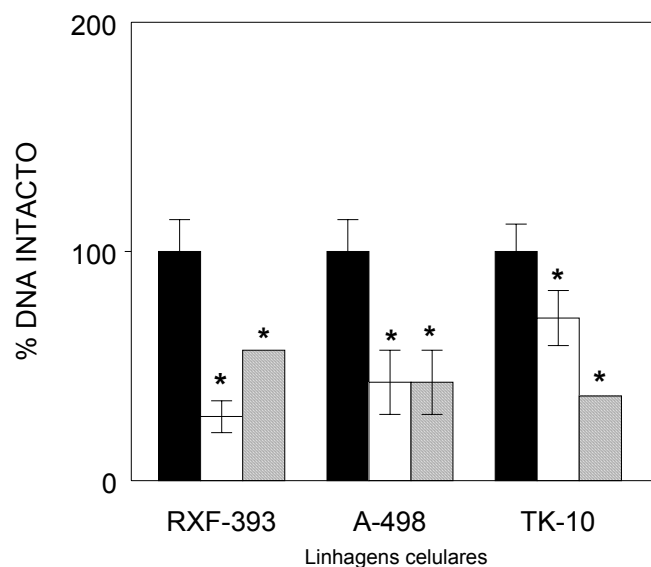


Figura 15: Dano ao DNA (% DNA intacto; média \pm DP; $n \geq 3$) em linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 após tratamento contínuo (■) com teniposide (0-2 μ M) na ausência ou presença dos agentes afidicolina glicinada (□; 0,2 μ M) ou hidroxiuréia (▨; 200 μ M). A quantidade de DNA em dupla-hélice foi expressa em relação à encontrada nos controles não tratados.

* Significativamente diferente do tratamento com teniposide contínuo ($p < 0,05$)

4.10 Efeito da afidicolina glicinada e hidroxiuréia na distribuição das células no ciclo celular

A seguir, utilizamos um método FACS (Vindelov, 1977) para determinar se a utilização dos agentes moduladores afidicolina glicinada e hidroxiuréia estavam relacionados com mudanças na distribuição das células no ciclo celular, tornando-as mais vulneráveis à toxicidade destes agentes. Os resultados estão resumidos na Tabela 11 e Figura 16.

O tratamento com afidicolina glicinada por 1 dia não afetou o número de células na fase G_0/G_1 , mas este aumentou na fase S em aproximadamente 2 vezes, enquanto foi reduzido pelo mesmo fator na fase G_2/M . Após a exposição à afidicolina glicinada por três períodos de duplicação, o número de células na fase S ainda era 2 vezes maior do que nas células não tratadas, mas o número de células na fase G_2/M era 2 vezes maior, enquanto na fase G_0/G_1 era 2 vezes menor. Estes resultados sugerem que o tratamento por 1 dia com afidicolina glicinada acumulou as células na fase S, e que os tratamentos por períodos mais extensos com esta droga moveram as células mais para a fase G_2/M .

Contudo, a interferência da afidicolina glicinada com as polimerases poderia ter levado ao bloqueio do ciclo celular, retendo uma maior quantidade de células nas fases S e G_2 .

O tratamento com hidroxiuréia, tanto por 1 dia ou por três períodos de duplicação, não afetou significativamente a distribuição no ciclo celular das linhagens RXF-393 e TK-10. Por outro lado, na linhagem A-498, ambos os tratamentos levaram a um aumento de aproximadamente 2 vezes no número de células na fase S, sem afetar significativamente o número de células nas fases G_0/G_1 e G_2/M .

Tabela 11: Distribuição no ciclo celular das linhagens de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 após tratamento com afidicolina glicinada (0,2 μ M) ou hidroxiuréia (200 μ M) por 24 h ou 3 períodos de duplicação. Valores de média \pm DP expressos em porcentagem, n \geq 2.

	RXF-393			A-498			TK-10		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Controle não tratado	52 \pm 5,0	23 \pm 3,0	21 \pm 4,0	59 \pm 5,0	21 \pm 4,0	18 \pm 2,0	55 \pm 4,0	21 \pm 4,0	15 \pm 4,0
+ Afidicolina glicinada 1 dia	51 \pm 0,0	38 \pm 0,0 ^a	10 \pm 0,0 ^a	43 \pm 4,0 ^a	43 \pm 3,0 ^a	10 \pm 5,0	49 \pm 20	30 \pm 13	24 \pm 2,0
+ Afidicolina glicinada 4 dias	38 \pm 3,0 ^a	34 \pm 1,0 ^a	30 \pm 1,0 ^a	22 \pm 2,0 ^a	33 \pm 2,0	42 \pm 11 ^a	49 \pm 4,0	15 \pm 1,0	7,0 \pm 1,0 ^a
+ Hidroxiuréia 1 dia	51 \pm 2,0	22 \pm 9,0	22 \pm 3,0	43 \pm 3,0 ^a	41 \pm 5,0 ^a	13 \pm 4,0	50 \pm 12	24 \pm 8,0	15 \pm 5,0
+ Hidroxiuréia 4 dias	43 \pm 7,0	38 \pm 3,0 ^a	17 \pm 3,0	38 \pm 2,0 ^a	40 \pm 1,0 ^a	16 \pm 1,0	32 \pm 1,0 ^a	23 \pm 3,0	4,0 \pm 1,0 ^a

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

Figura 16: Distribuição nas fases do ciclo celular (%; média \pm DP; $n \geq 3$) das linhagens de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10. Controles (a), tratamento com afidicolina glicinada (0,2 μ M) por 24 h (b) ou 4 dias (c) ou com hidroxiuréia (200 μ M) por 24 h (d) ou 4 dias (e); M1, apoptose; M2, G₀/G₁; M3, S; M4, G₂/M.

5 DISCUSSÃO

Nesta dissertação, foram realizados estudos *in vitro* com o agente teniposide em linhagens celulares de carcinoma renal humano. Estes estudos foram estimulados por observações anteriores com um outro derivado das epipodofilotoxinas, o etoposide, o qual apresenta atividade clínica em vários tumores avançados e uma clara vantagem terapêutica quando utilizado em protocolos de administração prolongada (Stähelin, 1970; Long et al., 1984). Portanto, foram estudadas formas mais prolongadas de administração do teniposide, as quais pudessem promover uma inibição por um tempo maior de sua enzima-alvo, a topoisomerase II, e, talvez, produzindo maior citotoxicidade.

Além disso, utilizando agentes que interferem com a síntese de DNA, potenciais sinergismos do teniposide com outros agentes foram também explorados. Por fim, uma vez que a expressão do gene *mdr1* é freqüente nos carcinomas de origem renal, e a resistência ao teniposide pode ser consequência deste fenótipo, foram estudadas combinações de teniposide com agentes potencialmente inibidores da ação da glicoproteína P, proteína responsável pelo mecanismo de efluxo ativo da droga do interior da célula tumoral.

Utilizando modelos pré-clínicos, agentes antineoplásicos tem sido identificados, cujos efeitos antiproliferativos dependem de seu protocolo de administração, ou seja, o nível de inibição do crescimento celular é significativamente influenciado pelo protocolo de exposição à droga. Em muitos casos, este fenômeno tem sido relacionado tanto a variações associadas ao ciclo celular, quanto à disponibilidade ou acesso de drogas ao seu alvo intracelular. Assim, agentes inibidores da topoisomerase II ou que interferem na tubulina podem se tornar mais eficazes quando administrados contínua ou repetidamente em doses moderadas, ao invés de uma única dose alta, pois os níveis de seus alvos flutuam por todo o ciclo celular, apresentando picos durante as fases S ou M, respectivamente (O'Dwyer et al., 1984; Johnson et al., 1963).

Ao menos para alguns agentes neoplásicos, como os derivados das epipodofilotoxinas, este conceito provou ser verdadeiro no cenário clínico, onde o protocolo de administração realmente teve uma influência substancial na sua eficácia terapêutica e/ou toxicidade clínica. Protocolos mais prolongados de administração de metotrexate e citarabina, ao contrário, normalmente resultam em grande toxicidade sem aparente vantagem terapêutica (Lokich & Curt, 1985; Hansen et al., 1987; Leclerc & Momparler, 1984; Capizzi, 1996). Já as alterações no protocolo de administração do 5-fluorouracil ou etoposide podem resultar diferenças consideráveis em seus efeitos terapêuticos e tóxicos (Meta-analysis Group in Cancer, 1998; Slevin et al., 1989; Greco et al., 1990). Além disso, resultados de estudos com o antimetabólito floxuridina (5-fluoro-2'-deoxiuridina) em pacientes com carcinoma renal sugeriram uma melhor atividade antitumoral quando esta droga foi administrada de acordo

com o ritmo circadiano (Hrushesky et al., 1990; Damascelli et al., 1990; Wilkinson et al., 1993).

Atualmente, o etoposide é um dos poucos agentes antineoplásicos que obtiveram respostas significativas em triagens clínicas com uso prolongado ao invés de em uma administração curta, até mesmo em pacientes refratários a várias outras drogas, incluindo aqueles que já haviam falhado em tratamentos anteriores com o etoposide (D’Incalci et al., 1982; Slevin et al., 1989; Clark et al., 1989; Greco et al., 1990; Schwartzmann et al., 1997).

Estas considerações nos levaram a reavaliar a citotoxicidade da epipodofilotoxina teniposide em um modelo *in vitro* de carcinoma renal humano, caracteristicamente considerado um tumor quimioresistente. Os poucos estudos clínicos que avaliaram o teniposide em carcinoma renal avançado apresentaram resultados inexpressivos (Hire et al., 1979; Pfiefler et al., 1984; Oishi et al., 1987), embora nenhum deles tenha explorado o uso da droga em protocolos de administração prolongada ou em associações consideradas desejáveis com base em estudos pré-clínicos.

Dessa forma, nós utilizamos neste estudo as linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10 para examinar se alterações nos protocolos de administração poderiam afetar o efeito antiproliferativo do teniposide. Para isto, comparamos o efeito inibitório do teniposide no crescimento celular causado por tratamentos segundo os seguintes protocolos: a) por 2 h no dia 1 com posterior incubação em meio sem droga por 3 tempos de duplicação (tratamento curto); b) por 2 h diárias durante 3 tempos de duplicação

(tratamento fracionado); ou c) por 3 tempos de duplicação consecutivos (tratamento contínuo).

Os nossos resultados mostraram uma clara dependência do modelo de administração sobre o efeito antiproliferativo do teniposide, tendo sido alcançada a melhor inibição celular pela exposição contínua à droga. Estas observações estão de acordo com os resultados pré-clínicos e clínicos encontrados para o etoposide (Vendetti, 1971; Dombernowski & Nissen, 1973; Slevin et al., 1989; Greco et al., 1990). Segundo dados de protocolos clínicos (Cleri & Berkery-Haywood, 1999), as concentrações que resultaram na inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50} de 0,05 a 0,5 μ M) estão de acordo com os níveis das concentrações plasmáticas de teniposide encontrados nos pacientes.

O fato da ação do teniposide ser dependente de protocolo de administração já era esperado, pois seu análogo, o etoposide, demonstrou em experimentos *in vitro* e *in vivo* ser altamente dependente de protocolo de administração (Johnson et al., 1990; Drewinko & Barlogie, 1976; D'Incalci et al., 1982; Wolff et al., 1987; Clark & Slevin, 1987). Além disso, modificações na atividade da topoisomerase II, seu alvo intracelular, também podem estar relacionados com a sua especificidade para a fase S do ciclo celular (O'Dwyer et al., 1984; Catapano et al., 1997). As células A-498, mais resistentes ao teniposide, também foram menos suscetíveis a alterações no protocolo de administração do teniposide quando comparadas às linhagens RXF-393 e TK-10. De fato, as linhagens RXF-393 e TK-10 responderam aproximadamente 5 vezes mais a alterações no protocolo de administração do teniposide quando comparadas às células A-498.

Assim, apesar das três linhagens celulares terem se mostrado mais sensíveis ao teniposide com a sua administração por períodos mais prolongados de tempo, o grau da sensibilização obtida pareceu ser (parcialmente) dependente da sensibilidade intrínseca de cada linhagem celular ao teniposide. No entanto, uma vez que a sensibilidade ao teniposide não mostrou ser determinada somente pelo nível basal da atividade da topoisomerase II (Figura 10; Tabela 5), outros processos bioquímicos também foram relevantes para o efeito antiproliferativo desta droga ser dependente de tempo de exposição.

Já que a formação de quebras em ambas as fitas do DNA tem sido relacionada com a citotoxicidade induzida pelo teniposide (Hsiang & Liu, 1989; Pommier & Bertrand, 1993; Pommier & Tanizawa, 1993), investigamos se o seu efeito na inibição do crescimento celular dependente de protocolo de administração estava relacionado a uma maior ou menor introdução de tais lesões. Esta hipótese nos pareceu sustentável, pois enquanto o tratamento curto não afetou a integridade do DNA de modo significativo em quaisquer das três linhagens celulares, o tratamento fracionado induziu 30% e 40% de dano apenas nas células RXF-393 e TK-10, respectivamente, e o tratamento contínuo introduziu 60%, 50% e 30% de dano ao DNA das células RXF-393, TK-10 e A-498, respectivamente.

A ausência de dano detectável no DNA das células tratadas apenas nas primeiras 2 h de um período 4-7 dias, está completamente de acordo com relatos prévios de que as lesões que possam ter sido provocadas pelas epipodofilotoxinas são eliminadas após a retirada do meio com droga (Tewey et al., 1984; Rowe et al., 1985; Gantchev & Hunting, 1997). O

aumento da quantidade de dano ao DNA em todas as três linhagens celulares após mudanças nas condições de tratamento, do curto ao fracionado e então para o contínuo, dá suporte ao conceito de que o efeito antiproliferativo tempo-dependente induzido pelo teniposide esteja também relacionado à introdução de dano ao DNA dependente de tempo de exposição.

O menor dano causado ao DNA nas células A-498 sob exposição contínua, quando comparado com o das linhagens RXF-393 e TK-10 e a completa falta de lesões na primeira linhagem sob tratamento fracionado, estão de acordo com a menor sensibilidade da mesma ao teniposide. Já o fato das células RXF-393 possuírem maior nível de atividade da topoisomerase II, quando comparada com as outras duas linhagens (Figura 10; Tabela 7), sugere que a topoisomerase II nesta linhagem seja menos suscetível ao efeito do teniposide ou que estas células possuam outros mecanismos para reparar as lesões provocadas por esta epipodofilotoxina. Obviamente, estas suposições relacionadas as nossas linhagens celulares precisam ser verificadas em futuros estudos.

Como já mencionado, somente as diferenças na topoisomerase II podem não ser as responsáveis pelas diferenças de sensibilidade ao teniposide apresentadas pelas linhagens celulares. Comparativamente, embora a topoisomerase II tenha sido modificada quando exposta ao teniposide, não houve nenhuma mudança significativa nesta enzima entre os protocolos de administração da droga. O mesmo é verdadeiro para a formação de complexos DNA-topoisomerase II, onde não foi visualizada diferença no número de complexos estabilizados nos diferentes tempos de tratamento. Entretanto, como previamente sugerido (Anderson & Roberge 1996), o número de complexos DNA-proteína nem sempre está

diretamente relacionado com a citotoxicidade da droga ou frequência de dano ao DNA, o mesmo sendo verdadeiro para a quantidade de RNAm transcrito pela topoisomerase II, o nível de atividade desta enzima e o número de complexos DNA-topoisomerase II (Zwelling et al., 1982; Pommier et al., 1985; Pommier & Kohn, 1989).

Em resumo, o efeito antiproliferativo do teniposide nestas linhagens celulares de carcinoma renal humano, as quais diferem quanto à sensibilidade à droga, foi altamente dependente de tempo e estava relacionado aos danos ao DNA provocados pela dependência do teniposide ao protocolo de exposição. O fato de a linhagem celular mais resistente ao teniposide, a A-498, ter sido menos suscetível a alterações no protocolo de administração desse agente, quando comparada às células RXF-393 e TK-10, sugere que outros fenômenos além da intrínseca sensibilidade ao teniposide podem ser relevante para a produção do efeito citotóxico.

Estudamos a seguir o efeito antiproliferativo com a interferência simultânea na função da glicoproteína P. Uma causa importante da quimioresistência apresentada por tumores humanos, incluindo o carcinoma renal, seria uma superexpressão desta glicoproteína P (Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989; Chapman & Goldstein, 1995). Vários estudos visando reverter este processo através da inibição do funcionamento desta glicoproteína P tem sido descritos (Akiyama et al., 1988; Mickisch et al., 1990). Porém, a glicoproteína P é expressa em uma variedade de tecidos normais (Thiebaut et al., 1987; Sugawara et al., 1988; Cordon-Cardo et al., 1990; Chaudhary et al., 1992), provavelmente como mecanismo de defesa contra toxinas de origem natural (Chapman & Goldstein, 1995). Em estudos clínicos, a modulação

da glicoproteína P tem resultado em toxicidade excessiva e generalizada (Chapman & Goldstein, 1995), levando ao abandono das estratégias que envolviam o uso de drogas moduladoras capazes de inibir a função da glicoproteína P. Os nossos resultados mostraram que as linhagens celulares de carcinoma renal utilizadas neste estudo não responderam aos agentes moduladores de glicoproteína P, o que pode ter sido devido à ausência de superexpressão desta glicoproteína P neste modelo (Wu et al., 1992).

Na tentativa de aumentar a eficácia antiproliferativa do teniposide, examinamos se a inibição do crescimento celular mediada pelo teniposide poderia ser potencializada através de modulação bioquímica com o emprego dos agentes inibidores da síntese de DNA afidicolina glicinada ou hidroxiuréia. A afidicolina glicinada é uma pró-droga da afidicolina mais solúvel em água, um antibiótico diterpeno derivado de culturas de *Cephalosporium aphidicola* (Ikegami et al., 1978). Este agente exibe atividade marcante em vários modelos pré-clínicos incluindo carcinoma de células renais (Plowman et al., 1989) e sua citotoxicidade também foi relatada como sendo dependente de protocolo de administração (Sessa et al., 1991; O'Dwyer et al., 1994). O seu mecanismo de ação está relacionado à inibição das atividades enzimáticas das DNA polimerases α e δ (Ikegami et al., 1978; Pedrali-Noy & Spadari, 1979; Huberman, 1981; Goscin & Byrnes, 1982; Lee et al., 1984), o que poderia aumentar a sua toxicidade em células localizadas na fase S do ciclo de crescimento, assim como a inibição tanto da replicação quanto da síntese não programada do DNA (Masuda et al., 1988).

Esta última propriedade da afidicolina glicinada parece ter levado à retenção das células nas fases S e G₂ mais sensíveis à ação do teniposide e pode ser a explicação da

potencialização observada no efeito antiproliferativo do teniposide. Do ponto de vista da cinética celular, esta sugestão pode ser explicada pelo aumento de células nas fases S e G₂/M, e a uma diminuição deste na fase G₁ após o tratamento por 3 tempos de duplicação celular com a da afidicolina glicinada. Esta probabilidade merece confirmação em estudos futuros, mas encontra respaldo em estudos descritos em células de carcinoma de ovário, nas quais a citotoxicidade da cisplatina foi potencializada pela afidicolina, também após a retenção das células em uma fase mais favorável do ciclo celular para a ação da afidicolina glicinada (Masuda et al., 1988).

Enquanto o uso de afidicolina glicinada potencializou a inibição do crescimento celular mediada pelo teniposide em aproximadamente 2 vezes em todas as três linhagens, a hidroxiuréia só apresentou tal efeito nas células RXF-393 e TK-10, mas não na linhagem mais resistente A-498. Como mostrado pelos resultados dos experimentos de dano ao DNA, estas observações não puderam ser completamente explicadas pela introdução de um maior número de lesões pela afidicolina glicinada ou hidroxiuréia combinadas com o teniposide, quando comparadas com o teniposide sozinho.

A hidroxiuréia é um inibidor da ribonucleotídeo redutase, enzima estritamente necessária para a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (Thelander & Reichard, 1979; Donehower, 1996), inibindo, assim, a síntese e o reparo do DNA. Por conseguinte, este agente mata seletivamente células na fase S, particularmente aquelas que estão sintetizando DNA mais rapidamente (Farber & Baserga, 1969; Sinclair, 1965; Ford & Shackney, 1977; Kim et al., 1967). Este agente havia sido avaliado anteriormente em vários

tumores sólidos avançados com respostas clínicas apenas modestas (Nevinny & Hall, 1968; Carter & Wasserman, 1975; Donehower, 1992, 1996). Porém, seu uso atual é na terapia inicial de leucemia mielógena crônica, onde atrasa a transformação dos blastos (Fishbein et al., 1964; Kennedy & Yarbrow, 1966; Kennedy, 1972; Bolin et al., 1982).

Os efeitos cinéticos das células após a exposição à hidroxiuréia envolvem sincronização parcial destas nas fases G_1 ou S. As células progridem normalmente pelo ciclo celular até que alcançam a interfase G_1/S . Elas entram na fase S apresentando uma taxa normal, mas se acumulam lá devido à inibição da síntese do DNA (Maurer-Schultze et al., 1988; Walters et al., 1976; Cress & Gerner, 1979). Conseqüentemente, o uso da hidroxiuréia também levou a uma potencialização (2 vezes) no efeito inibitório do teniposide. Entretanto, ao contrário da afidicolina glicinada, a hidroxiuréia teve tal efeito apenas nas células RXF-393 e TK-10, as quais, além disso, não foram significativamente afetadas nas suas distribuições ao longo do ciclo celular.

Por outro lado, enquanto a hidroxiuréia não influenciou significativamente o efeito de inibição celular mediado pelo teniposide nas células A-498, isto levou a uma retenção celular 2 vezes maior na fase S. O bloqueio das células A-498 na fase S pode refletir uma resposta normal da ribonucleotídeo redutase destas células à hidroxiuréia, as quais devido à resistência que apresentam ao teniposide não sofreram um grande efeito antiproliferativo. As linhagens celulares RXF-393 e TK-10 não foram bloqueadas na fase S pela hidroxiuréia, provavelmente devido a alta atividade da ribonucleotídeo redutase (Minford et al., 1984), e que não seria

suficiente para explicar as suas maiores sensibilidades ao teniposide. Estas suposições precisam ser verificadas futuramente.

Uma hipótese alternativa para a potencialização dos efeitos da afidicolina glicinada e da hidroxiuréia na inibição do crescimento celular mediada pelo teniposide poderia ser explicada por processos que envolvem outros sistemas enzimáticos (Reddy & Pardee, 1980). Estes complexos podem envolver enzimas como as DNA polimerases, topoisomerases I e II, ribonucleotídeo redutase, timidilato sintase e dihidrofolato redutase (Reddy & Pardee, 1983; Plucinski et al., 1990). Sendo assim, é aceitável que o uso de afidicolina glicinada ou hidroxiuréia não afete somente a atividade da DNA polimerase ou da ribonucleotídeo redutase, mas também de outras enzimas, talvez não presentes em todas as três linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

Deve-se salientar novamente que estudos recentes com o seu análogo, o etoposide, demonstram vantagens claras em suas taxas de respostas com protocolos de administração contínua. Isto foi demonstrado em pacientes com carcinoma de pequenas células de pulmão não previamente tratados, nos quais a mesma dose total de etoposide produziu 89% de respostas quando administrado diariamente em infusões de 2 h, durante 5 dias, contra apenas 10% de respostas quando utilizado em infusão intravenosa por 24 h (Greco, 1991; Slevin et al., 1989). Em estudos subsequentes com prolongada administração por 21 dias consecutivos de baixas doses de etoposide oral (50 mg/m²/dia), foram observadas respostas encorajadoras em pacientes que sofriam de tumores de células germinativas, linfomas ou carcinoma de pequenas células de pulmão, inclusive em pacientes que haviam fracassado em tratamentos

prévios com doses e protocolos padrão de etoposide (Hainsworth et al., 1989). O efeito tóxico principal foi a mielossupressão e a toxicidade gastrointestinal foi infreqüente (Johnson et al., 1990). Estes autores concluíram que o etoposide em tais protocolos de administração foi bem tolerado.

Outros estudos também dão suporte a estas observações. O etoposide quando administrado na concentração de 50 mg duas vezes ao dia, durante 14 dias em um ciclo de 21 dias produziu respostas em 17 dos 20 pacientes que eram anciões, sendo moderada em 15 e completa em 2, além de ter induzido uma modesta toxicidade (Clark et al., 1990). Além disso, em 25 pacientes que sofriam de sarcoma de Kaposi relacionado à SIDA, o etoposide administrado oralmente na concentração de 25 mg/m², duas vezes ao dia durante 7 dias, a cada duas semanas, produziu 2 respostas completas e 6 parciais com uma progressão de sobrevida média no período de 8 meses (média entre 4 e 27) (Schwartsmann et al., 1997). Por esta razão, a Fundação SOAD de Pesquisas do Câncer está conduzindo um estudo em pacientes com tumores sólidos que convencionalmente não respondem ao etoposide, como os carcinomas de mama e pâncreas avançados. Os resultados iniciais destes estudos serão brevemente publicados (Schwartsmann et al., *in press*).

Já que os dados clínicos sobre o maior índice terapêutico do etoposide estão claramente documentados na literatura, achamos oportuno que os resultados desta dissertação sejam colocados em perspectiva. Sendo o teniposide um análogo de maior retenção intracelular e maior potência que o etoposide, torna-se plenamente justificada uma retomada de nosso interesse em estudá-lo mais profundamente. Nesse sentido, os resultados com

teniposide em células de carcinoma renal humano apresentados nesta dissertação nos estimulam a prosseguir na investigação deste agente em protocolos de exposição prolongada e/ou associação com afidicolina glicinada ou hidroxiuréia em um painel contendo um maior número de linhagens tumorais humanas.

Uma vez confirmada uma atividade citotóxica de interesse neste painel, estudos subseqüentes com teniposide utilizando modelos *in vivo* serão planejados. Confirmada, então, a sua eficácia nestes modelos experimentais, poderemos reconsiderar a avaliação deste agente em pacientes com câncer avançado sob a forma de administração de baixas doses por tempo prolongado.

Parece-nos oportuno que drogas como o teniposide e o etoposide, as quais apresentam uma clara dependência ao tempo de exposição na sua citotoxicidade em modelos pré-clínicos, sejam trazidas a estudos clínicos, ou mesmo reavaliadas, em protocolos de administração adequados e definidos em modelos pré-clínicos, e que tenham uma maior probabilidade de revelar a sua real potencialidade terapêutica.

6 CONCLUSÕES

1. Os protocolos de administração de teniposide por tempo prolongado induziram uma maior citotoxicidade nas linhagens celulares de carcinoma renal humano RXF-393, A-498 e TK-10.
2. Os diferentes protocolos de tratamento com o teniposide não influenciaram a formação dos complexos DNA-topoisomerase II nem a atividade desta enzima. Entretanto, foram demonstrados danos ao DNA dependentes do protocolo de administração.
3. O nível de atividade da topoisomerase II não pareceu ser o único fator modulador das respostas das linhagens tumorais ao teniposide.
4. O uso concomitante de agentes que interferem com a expressão da glicoproteína P, como o tamoxifeno, o verapamil e a ciclosporina A não foi capaz de modificar significativamente o efeito citotóxico do teniposide.
5. O uso concomitante de agentes que interferem na síntese de DNA, como a afidicolina glicinada e a hidroxiuréia, produziu um aumento no efeito citotóxico do teniposide, diferenciado para as linhagens tumorais estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, T; BENEDETTO, P; YAGODA, A. et al. Estrogen, progesterone, and androgen-binding sites in renal cell carcinoma: observations obtained in a phase II trial of flutamide. *Cancer*; 54: 477-481, 1984.
- AKIYAMA, SI; CORNWELL,MM; KUWANO, M. Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analogue. *Mol Pharmacol* 33:144-47, 1988.
- ANDERSON, H, ROBERGE, M. Topoisomerase II inhibitors affect entry into mitosis and chromosome condensation in BHK cells. *Cell Growth & Differentiation*, 7: 83-90, 1996.
- ANDREA, JE; ADACHI, K; MORGAN, AR. Fluorometric assays for DNA topoisomerases and topoisomerase-targeted drugs: quantitation of catalytic activity and DNA cleavage. *Mol Pharmacol* 4:495-501, 1991.
- BAGLEY, DH. Renal Parenchymal Tumors (Chapter 104). In: Mossa AR, Stephen C (eds). *Comprehensive text book of Oncology*. Williams & Wilkins, 1991; 1055-1066.
- BECK, WT; DANKS, MK. Mechanisms of resistance to drugs that inhibit DNA topoisomerases. *Seminars in Cancer Biology*, 2: 235-244, 1991.
- BELLDEGRUN, A; deKERNION, JB. "Renal tumors". In: WALSH, PC; RETIK, AB & DARRACOTT VAUGHAN JR, E et al. *Campbell's urology*. 7.ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. cap. 76, v.3, p.2283-2326.
- BENNINGTON, JL. Cancer of the kidney - etiology, epidemiology, and pathology. *Cancer*, 32: 1017-1029, 1973.
- BLOOM, HJG; BAKER, WH, DUKES, CE et al. Hormone-dependent tumours of the kidney. I. The oestrogen-induced renal tumour of the syrian hamster: hormone treatment and possible relationship to carcinoma of the kidney in man. *Br J Cancer* 17:611, 1963.
- BOLIN, RW; ROBINSON, WA; SUTHERLAND, J et al. Busulfan versus hydroxyurea in long term therapy of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 50:1683, 1982.
- CAPIZZI, RL. Curative chemotherapy for acute myeloid leukemia: the development of high-dose ara-C from the laboratory to bedside. *Invest New Drugs* 14(3):249-56, 1996.
- CARSON, WJ. Tumors of the kidney: histologic study. *Trans Sect Urol AMA*, 1928.
- CARTER, SK; WASSERMAN, TH. The chemotherapy of urologic cancer. *Cancer* 36:729-747, 1975.

- CATAPANO, CV; CARBONE, GMR; PISANI, F et al. Arrest of replication fork progression at sites of topoisomerase II-mediated DNA cleavage in human leukemia CEM cells incubated with VM-26. *Biochemistry* 36:5739-48, 1997.
- CHABNER, BA & LONGO, DL (eds). *Cancer chemotherapy and biotherapy*. 1.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1990. cap. 10, p.262-275.
- CHABNER, BA & LONGO, DL (eds). *Cancer chemotherapy and biotherapy*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap. 18, p.435-461.
- CHAPMAN, AE.; GOLDSTEIN, LJ. Multiple drug resistance: Biologic basis and clinical significance in renal-cell carcinoma. *Seminars in Oncology*, 22 (1): 17-28, Feb. 1995.
- CHAUDHARY, PM; MECHESTER, EB; RONINSON, IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2735-39, 1992.
- CHOW, WH, DEVESA, SS & FRAUMENI JR., JF. Epidemiology of renal cell carcinoma. In: VOGELZANG, NJ (eds). *Genitourinary Oncology*. 2. ed. New York (USA): Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 7, p. 101-110.
- CLARK, P.I. Clinical pharmacology and schedule dependency of the podophyllotoxin derivatives. *Seminars in Oncology*, 19 (2): 20-27, April 1992.
- CLARK, PI; COTTIER, B; JOEL, SP et al. Prolonged administration of single-agent oral etoposide in patients with untreated small cell lung cancer (SCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:874, 1990 (abstr).
- CLARK, PI; JOEL, SP; SLEVIN, ML. A pharmacokinetic hypothesis for the clinical efficacy of etoposide in small cell lung cancer. *Proc. Am Soc Clin Oncol* 8:66, 1989.
- CLARK, PI; SLEVIN, ML. The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet* 12:223, 1987.
- CLERI, Lorraine B. & BERKERY-HAYWOOD, Regina. *Oncology pocket guide to chemotherapy*. 4.ed. New York, Mosby-Wolfe, 1999. 361p.
- CORDON-CARDO, C; O'BRIEN, JP; CASALS, D. et al. P-glycoprotein expression in human tumors and normal tissues. *J Histochem Cytochem.*, 38: 1277, 1990.
- COUILLARD, DR; deVERE WHITE, RW. Surgery of renal cell carcinoma. *Urol Clin N Am* 20:263, 1993.
- CREPSI, MD, IVANIER, SE, GENOVESE, J, et al. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 521-528, 1986.
- CRESS, AR; GERNER, EW. Hydroxyurea inhibits ODC induction, but not the G₁ to S-phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 87:773-780, 1979.
- CUMMINGS, J; SMYTH, JF. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 4(7):533-43, Aug, 1993.
- D'INCALCI, M; ERBA, E; VAGHI, M et al. In vitro cytotoxicity of VP16 on primary tumor and metastasis of Lewis lung carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18:377-380, 1982.
- D'INCALCI, M; FARINA, P; SESSA, C. et al. Pharmacokinetics of VP16-213 given by different administration methods. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 7: 141-145, 1982.

- DAMASCELLI, B; MARCHIANO, A; SPREAFICO, C et al. Circadian continuous chemotherapy of renal cell carcinoma with an implantable programmable infusion pump. *Cancer* 66:237-241, 1990.
- DeKERNION, JB; RAMMING, KP; SMITH, RB. The natural history of metastatic renal cell carcinoma: a computer analysis. *J Urol* 120:148, 1978.
- DINNEY, CPN; AWAD, SA; GAJEWSKI, JB et al. Analysis of imaging modalities, staging systems and prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Urology* 39:122, 1992.
- DOMBERNOWSKY, P; NISSEN, NI. Schedule dependency of the antileukaemic activity of the podophyllotoxin-derivative VP-16-213 (NSC-141540) in L1210 leukaemia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 81:715-24, 1973.
- DOMBERNOWSKY, P; NISSEN, NI; LARSEN, V. Clinical investigation of a new podophyllin derivative, VM 26, in patients with malignant lymphomas and solid tumors. *Cancer Chemother Rep* 5:71, 1972.
- DONEHOWER RC. An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin Oncol* 19:11, 1992.
- DONEHOWER, RC. "Hydroxyurea". In: CHABNER, BA & LONGO, DL (eds). *Cancer chemotherapy and biotherapy*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap. 18, p.435-461.
- DRABKIN, HA, BRADLEY, C, HART, I et al. Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t(3;8) (p14.2;q24.13) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 82: 6980-6984, 1985.
- DREWINKO, B; BARLOGIE, B. Survival and cycle progression delay of human lymphoma cells in vitro exposed to VP16-213. *Cancer Treat Rep* 60:1295-1306, 1976.
- EINHORN, LH; PENNINGTON, K; McCLEAN, J. Phase II trial of daily oral VP-16 in refractory small cell lung cancer: a Hoosier Oncology Group study. *Semin Oncol* 17(suppl 2):32-35, 1990.
- FARBER, E; BASERGA, R. Differential effects of hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo. *Cancer Res* 29:136, 1969.
- FILIPSKI, J; KOHN, KW. Ellipticine-induced protein associated DNA breaks in isolated L1210 nuclei. *Biochem Biophys Acta*, 698: 280-286, 1982.
- FINNEY, R. Radiotherapy in the treatment of hypernephroma: a clinical trial. *Br J Urol* 45:26, 1973.
- FISCHER, DS, KNOBF, MT, DURIVAGE, HJ. *The Cancer Chemotherapy Handbook*. 4. ed. St. Louis (EUA): Mosby, 1993. p. 191-192.
- FISHBEIN, WN; CARBONE, PP; FREIREICH, EJ et al. Clinical trials of hydroxyurea in patients with cancer and leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 5:574, 1964.
- FLEMING, S. Renal cancer genetics: von Hippel Lindau and other syndromes. *Int J Dev Biol.*, 43: 469-471, 1999.
- FOJO, AT; SHEN, D-W; MICKLEY, LA et al. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol* 5:1922-27, 1987.

- FOJO, AT; UEDA, K; SLAMON, DJ, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:265-9, 1987.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186, 1971.
- FORD, SS; SHACKNEY, SE. Lethal and sublethal effects of hydroxyurea in relation to drug concentration duration of drug exposure in sarcoma 180 in vitro. *Cancer Res* 37:2628, 1977.
- FOSSA, SD; WIK, B; BAE, E et al. Phase II study of 4'-epi-doxorubicin in metastatic renal cancer. *Cancer Treat Rep* 66:1219-21, 1982.
- FOSTER, K; PROWSE, A; VAN DEN BERG, A. et al.. Somatic mutation of the von Hippel Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet.*, 3: 2169-2173, 1994.
- FYFE, G; FISCHER, RI; ROSENBERG, SA et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 13(3): 688-696, Mar 1995.
- GAGO-DOMINGUEZ, M; YUAN, J-M; CASTELAO, JE et al. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 81(3):542-48, 1999.
- GANTCHEV, TG; HUNTING, DJ. Inhibition of the topoisomerase II-DNA cleavable complex by the ortho-Quinone derivat of the antitumor drug etoposide (VP-16). *Biochem and Biophys Res Commun* 237:24-27, 1997.
- GARNICK, MB; REICH, SD; MAXWELL, B. Phase I/II study of recombinant interferon gamma in advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 139:251, 1988.
- GELB, AB. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80(5):981-6, Sep 1, 1997.
- GERSHANOVICH, M.; MOISEYENKO, V.; KAPYLA, H. et al. High dose of new antiestrogen toremifene in advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 29^A (suppl. 6): S233 (abstr 1306), 1993.
- GIGANTE M, SORIO R, COLUSSI AM, et al. Effect of cyclosporine on teniposide pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with renal cell cancer. *Anticancer Drugs* 6(3):479-82, Jun 1995.
- GNARRA, JR; TORY, K; WENG, Y. et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nature Genet.*, 7: 85-90, 1994.
- GOLDFARB, S; PUGH, TD. Morphology and anatomic localization of renal microneoplasms and proximal tubule dysplasias induced by four different estrogens in the hamsters. *Cancer Res* 50: 113-119, 1990.
- GOLDSTEIN, LJ; GALSKI, H; FOJO, A et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 81:116-118, 1989.
- GOLIMBU, M; JOSHI, P; SPERBER, A et al. Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology* 27:291, 1986.

- GOSCIN, LP; BYRNES JJ. DNA polymerase δ : one polypeptide, two activities. *Biochemistry* 21:2513-18, 1982.
- GOSPODAROWICZ MK, O'SULLIVAN B, BERKEL HJ, BEATTY DJ. Staging of cancer revisited. *CMAJ* 150(5):663-5, Mar 1994.
- GRECCO, FA. Future directions for etoposide therapy. *Cancer* 67:315, 1991.
- GRECO, FA; JOHNSON, DH; HAINSWORTH, JD. Chronic daily administration of oral etoposide. *Semin Oncol* 17(suppl 2):71-74, 1990.
- GUINAN, PD; VOGELZANG, NJ; FREMGEN, AM et al. Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. *J Urol* 153:901, 1995.
- GUTIN, PH; WALKER, MD. IV methyl-CCNU, VM26 and cranial irradiation in therapy for malignant brain tumors. *Cancer Treat Rep* 61:1715, 1977.
- HAINSWORTH, JD; JOHNSON, DH; FRAZIER, SR et al. Chronic daily administration of oral etoposide – A phase I trial. *J Clin Oncol* 7:396-401, 1989.
- HALPERIN, EC; HARISIADIS, L. The role of radiation therapy in the management of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 51: 614-617, 1983.
- HANDE, KR. Etoposide: four decades of development of topoisomerase ii inhibitor. *Eur J Cancer*, 34 (10): 1514-1521, 1998.
- HANSEN, RM; QUEBBEMAN, EJ; RITCH, PS et al. Continuous 5-fluorouracil infusion and pulse methotrexate/leucovorin for colorectal adenocarcinoma.; a report of excessive toxicity. *Am J Clin Oncol* Jun 10(3):216-8, 1987.
- HARTWELL, JL; SCHRECKER, AW. Components of podophyllin. V. The constitution of podophyllotoxin. *J Am Chem Soc* 73:2909-16, 1951.
- HARTWELL, JL; SCHRECKER, AW. The chemistry of Podophyllum. *Prog Chem Org Nat Prod* 15:83-166, 1958.
- HIRE, SA; SAMSON, MK; FRAILE, RJ et al. Use of VM-26 as a single agent in the treatment of renal carcinoma. *Cancer Clin Trials* 2:293-95, 1979.
- HOLTHUIS, JJ; deVRIES, LG; POSTMUS, PE et al. Pharmacokinetics of high-dose teniposide. *Cancer Treat Rep* 71:599-603, 1987.
- HRUSHESKY WJM; von ROEMELING, R; LANNING, RM et al. Circadian-shaped infusions of floxuridine for progressive metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 8:1504-13, 1990.
- HSIANG, Y-H; LIU, LF. Evidence for the reversibility of cellular DNA lesion induced by mammalian topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 264 (17):9713-15, Jun 15, 1989.
- HUBERMAN, JA. New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase α . *Cell* 23:647-8, 1981.
- IKEGAMI, S; TAGUCHI, T; OHASHI, M et al. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* 275:458-460, 1978.
- JAFFEE EM, PARDOLL DM. Gene therapy: its potential applications in the treatment of renal-cell carcinoma. *Semin Oncol* 22(1):81-91, Feb 1995.

- JOHNSON, DH; GRECO, FA; STRUPP, J et al. Prolonged administration of oral etoposide in patients with relapsed or refractory small-cell lung cancer: a phase II trial. *J Clin Oncol* 8:1613-17, 1990.
- JOHNSON, IS; ARMSTRONG, JG; GORMAN, M et al. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 23:1390-1427, 1963.
- JONES, RB et al. Safe handling of chemotherapeutic agents: a report from the Mount Sinai Medical Center. *CA-A Cancer J for Clinicians* 33:258-263, 1983.
- JONES, RB et al. Safe handling of chemotherapeutic agents: a report from the Mount Sinai Medical Center. *CA-A Cancer J for Clinicians* 33:258-263, 1983.
- JUDSON, IR. Understanding anticancer drug resistance: opportunities for modulation and impact on new drug design. *Eur J Cancer*, 28: 285-289, 1990.
- JUUSELA, H; MALMIO, K; ALFTHAN, D. Preoperative irradiation in the treatment of renal adenocarcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 11:277, 1977.
- KAKEHI, Y; KANAMARU, H; YOSHIDA, O et al. Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers: elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance. *J Urol* 139:862-65, 1988.
- KANTER, PM; SCHWARTZ, HS. A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Mol Pharmacol.*, 22: 145-151, 1982.
- KAPLAN, IW. Condylomata acuminata. *New Orleans Med Surg J* 94:388-90, 1942.
- KATZ, SE; SCHAPIRA, HE. Spontaneous regression of genitourinary cancer: An update. *J Urol*, 128: 1-4, 1982.
- KENNEDY, BJ. Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 29:1052, 1972.
- KENNEDY, BJ; YARBRO, JW. Metabolic and therapeutic effects of hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 195:1038, 1966.
- KIM, JH; GELBARD, AS; PEREZ, AG. Action of hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells. *Cancer Res* 27:1301, 1967.
- KING, SL; SULLIVAN, M. The similarity of the effect to podophyllin and colchicine and their use in the treatment of condylomata acuminata. *Science* 104:244-5, 1946.
- KIRKMAN, H; BACON, RI. Estrogen-induced tumors of the kidney. I. Incidence of renal tumors in intact and gonadectomized male golden hamsters treated with diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* 13:745, 1952.
- KJAER, M; FREDERIKSEN, PL; ENGELHOLM, SA. Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma: a randomized trial by the Copenhagen renal cancer study group. *Int J Radiat Oncol Bio Phys* 13:665, 1987.
- KOVACS, G, SZUCS, S, DE RIESE, W et al. Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, 40: 171-178, 1987.
- KOVACS, G; ERLANDSSEN, R; BOLDEG, F. et al. Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 1571-1575, 1988.

- KREGER BE, SPLANSKY GL, SCHATZKIN A. The cancer experience in the Framingham Heart Study cohort. *Cancer* 67(1):1-6; Jan 1991.
- KUMAR, A, MITTAL, S, BUCKSHEE, K et al. Reproductive functions in obese women. *Prog Food Nutr Sci* 17: 89-98, 1993.
- LANDIS SH, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 49(1):8-31, Jan-Feb, 1999.
- LANDIS, SH; MURRAY, T; BOLDEN, S et al. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 48:6-29, 1998.
- LATIF, F, TORY, K, GNARRA, JR et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317-1320, 1993.
- LAW, TM, MOTZER, RJ, MAZUMDAR, M et al. Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 76: 824-832, 1995.
- LECLERC, JM; MOMPARTLER RL. Effect of the interval between exposures to cytarabine on its cytotoxic action on HL-60 myeloid leukemic cells. *Cancer Treat Rep Sep* 68(9):1143-8, 1984.
- LEE, MY; TAN, CK; DOWNEY, KM et al. Further studies on calf thymus DNA polymerase δ purified to homogeneity by a new procedure. *Biochem* 23:1906-13, 1984.
- LINDBLAD P, WOLK A, BERGSTRÖM R et al. The role of obesity and weight fluctuations in the etiology of renal cell cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 631-639, 1994.
- LINEHAN, WM; CORDON-CARDO, C; ISAACS, W. Cancers of the Genitourinary System. In: DEVITA, VT, HELLMAN, S, ROSENBERG, SA (eds). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5.ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven, 1997. cap. 33, p. 1253-1300.
- LINEHAN, WM; SHIPLEY, WU; PARKINSON, DR. "Cancer of the kidney and ureter". In: DeVita VT, Hellman S (eds): *Cancer: principles and practice of oncology* (ed 4). Philadelphia, PA, Lippincott, 1993. p.1023-51.
- LIU, LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann Rev Biochem.*, 58: 351-375, 1989.
- LOKICH, JJ; CURT, G. A phase I and pharmacology study of continuous-infusion low-dose methotrexate administration. *Cancer* 56(10):2391-4, Nov 15, 1985.
- LOMBARD, LH. "Medicinal plants of our Maine Indians". In The Maine Writers' Research Club (eds). *Maine Indians in history and legends*. Portland, Maine, Severn-Wylie-Jennet, 1952, p.96-102.
- LONG, BH; MUSIAL, SF; BRATTAIN, MG. Comparison of cytotoxicity and DNA breakage activity of congeners of podophyllotoxin including VP-16-213 and VM-26: a quantitative structure-activity relationship. *Biochem* 23:1183-88, 1984.
- LONN U, LONN S, NYLEN U, WINBLAD G. Altered formation of DNA in human cells treated with inhibitors of DNA topoisomerase II (etoposide and teniposide). *Cancer Res* 49(22):6202-7, Nov 15, 1989.

- MACLURE, M. Asbestos and renal adenocarcinoma: a case-control study. *Environ Res.*, 42: 353-361, 1987.
- MAHER, ER; YATES, JR; HARRIES, R. et al. Clinical features and natural history of von Hippel Lindau disease. *Q J Med.*, 77: 1151-1163, 1990.
- MALONNE H, ATASSI G. DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives. *Anticancer Drugs* 8(9):811-22, Oct 1997.
- MASUDA, H; OZOLS, RF; LAI, GM et al. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 48(20):5713-6, Oct 1988.
- MATHE, G; SCHWARTZENBERG, L; POUILLART, P et al. Two epipodophyllotoxin derivatives, VM26 and VP 16213, in the treatment of leukemia, hematosarcomas and lymphomas. *Cancer* 34:985, 1974.
- MAURER-SCHULTZE, B; SIEBERT, M; BASSUKAS, ID. An in vivo study on the synchronizing effect of hydroxyurea. *Exp Cell Res* 174:230, 1988.
- McCREIDIE, M. Cancers of the bladder and kidney. *Cancer Surveys*, 19/20: 343-368, 1994.
- MCLAUGHLIN JK, CHOW WH, MANDEL JS, et al. International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *Int J Cancer* 63(2):216-21, Oct 9, 1995.
- McLAUGHLIN, JK; SCHUMAN, LM. "Epidemiology of renal cell carcinoma". In: Lilienfeld, AM, ed. *Review in cancer epidemiology*. V.2 New York, Elsevier/North Holland, 1983. p.170-210.
- McNICHOLS, DW; SEGURA, JW; deWEERD, JH. Renal cell carcinoma: long-term survival and late recurrence. *J Urol* 126:17, 1981.
- MELLEMGAARD A, LINDBLAD P, SCHLEHOFER B et al. International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int J Cancer* 60: 350-354, 1995.
- MICKISCH, GH; KOSSIG, J; TSCHADA, RK et al. Circumvention of multidrug resistance mediated by P-170 glycoprotein using calcium antagonists in primary human renal cell carcinoma. *Urol Int* 47:118-25, 1991.
- MICKISCH, GH; ROEHRICH, K; KOESSIG, J et al. Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma. *J Urol* 144:755-59, 1990.
- MICKISCH, GH; WORD, J. Chemoresistance of renal cell carcinoma. *World J Urol* 12:214, 1994.
- MILLER, JC; EINHORN, LH. Phase II study of daily oral etoposide in refractory germ cell tumors. *Semin Oncol* 17(suppl 2):36-39, 1990.
- MILLER, KG; LIU, LF; ENGLUND, PT. A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 256:9334-39, 1981.
- MINASIAN, LM; MOTZER, RJ; GLUCK, L et al. Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11(7):1368-75, Jul 1993.

- MINFORD, J; KERRIGAN, D; NICHOLS, M. et al. Enhancement of the DNA breakage and cytotoxic effects of intercalating agents by treatment with sublethal doses of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine or hidroxyurea in L1210 cells. *Cancer Res* 44: 5583-5593, 1984.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Programas de Controle de Câncer - Pro-Onco. "O problema do Câncer no Brasil". 4.ed. Rio de Janeiro, 1999.
- MOTZER, RJ, NEIL, MD, BANDER, MD et al. Renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 335: 865-875, Sep 19, 1996.
- MOTZER, RJ; RUSSO, P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 163:408-417, 2000.
- MUGGIA, FM. Teniposide: overview of its therapeutic potential in adult cancers. *Cancer Chem Pharmacol* 34(Suppl): S127-S133, 1994.
- MULDERS, P; FIGLIN, R; deKERNION, JB et al. Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. *Cancer res* 57:5189-95, Nov, 1997.
- NEGRIER, S; ESCUDIER, B; LASSET, C et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med.* 338(18):1272-8, Apr 30, 1998.
- NELSON, EM; TEWEY, KM; LIU, LF. Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1361-65, 1984.
- NEVINNY, H; HALL, TC. Chemotherapy with hydroxyurea in renal cell carcinoma. *J Clin Pharmacol* 88:352-359, 1968.
- NICOL, D; HII, SI; WALSH, M et al. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol.* 157(4):1482-6, Apr 1997.
- NIIJIMA, T; ASO, Y; AKAZA, H. Collaborative study of UFT in far-advanced renal cell carcinoma. *Urol Coop UFT Study Group: Gan to Kagaku Ryoho* 15:109-114, 1988.
- NISSEN, NI; DOMBERNOWSKY, P; HANSEN, HH et al. The epipodophyllotoxin derivatives VM-26 and VP-16-213, 1976-1979, a review. *Recent Results Cancer Res* 74:98-106, 1980.
- O'CONNOR, PM; JACKMAN, J; BAE, I et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57:4285-4300, Oct, 1997.
- O'DWYER, PJ; ALONSO, MT; LEYLAND-JONES, B; et al. Teniposide: a review of 12 years of experience. *Cancer Treat Rep.* 68(12):1455-66, 1984.
- O'DWYER, PJ; MOYER, JD; SUFFNESS, M et al. Antitumor activity and biochemical effects of aphidicolin glycinate (NSC 303812) alone and in combination with cisplatin *in vivo*. *Cancer Res* 54:724-29, Feb, 1994.
- OISHI, N; BERENBERG, J; BLUMENSTEIN, BA et al. Teniposide in metastatic renal and bladder cancer: a southwest oncology group study. *Cancer Treat Rep* 71:1307-8, 1987.

- OSHEROFF, N; ZECHIEDRICH, E; GALE, KC. Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* 13:269-75, 1991.
- PAGANINI-HILL, A; ROSS, RK, HENDERSON, BE. "Epidemiology of kidney cancer". In: Skinner, DG, ed. *Urological cancer*. New York, Grune, 1983. p.383-407.
- PAPAC, RJ.; KEOHANE, MF. Hormonal therapy for metastatic renal carcinoma combined androgen and provera followed by high dose tamoxifen. *Eur J Cancer*, 29^A (suppl. 5): 997-999, 1993.
- PARKIN DM, MUIR CS. Cancer Incidence in Five Continents: comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* (120):45-173, 1992.
- PARKIN DM, PISANI P, FERLAY J CA. Global cancer statistics. *Cancer J Clin* 49(1):33-64, Jan-Feb, 1999.
- PATHAK, S, STRONG, LC, FERRELL, RE et al. A familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells. *Science*, 217: 939-941, 1982.
- PEDRALI-NOY, G; SPADARI, S. Effect of aphidicolin on viral and human DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun* 88:1194-1202, 1979.
- PEEHL, DM. Molecular biology of proto-oncogenes in genitourinary cancer. *Cancer*, 60: 645-649, 1987.
- PEELING, WB; MANTELL, BS; SHEPHEARD, BCF. Postoperative irradiation in the treatment of renal cell carcinoma. *Br J Urol* 41:23, 1969.
- PFIEFLE, D; RENTER, N; HAHN, R et al. Phase II trial of VM-26 in advanced measurable renal cell carcinoma. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 3:162, 1984 (abstr C-634)
- PLOWMAN, J; HARRISON, SD,Jr; DYKES, DJ et al. Preclinical antitumor activity of an α -picoline derivative, penclomedine (NSC 338720), on human and murine tumors. *Cancer Res* 49:1909-15, 1989.
- PLUCINSKI, TM; FAGER, RS; REDDY, GP. Allosteric interaction of components of the replitase complex is responsible for enzyme cross-inhibition. *Mol Pharmacol*, 38(1): 114-20, Jul 1990.
- PODWYSSOTZKI, V. Pharmakologische Studien über Podophyllum peltatum. *Arch Exp Path Pharmacol* 13:29-52, 1880.
- POMMIER, Y; BERTRAND, R. "The mechanisms of formation of chromosomal aberrations: role of eukaryotic DNA topoisomerases". In: KIRSCH, IR, ed. *The causes and consequences of chromosomal aberrations*. Boca Raton, Fl, CRC Press, 1993. p.277.
- POMMIER, Y; FESEN, MR; GOLDWASSER, F. "Topoisomerase II inhibitors: the epipodophyllotoxins, m-AMSA, and the ellipticine derivatives". In: CHABNER, BA & LONGO, DL (eds). *Cancer chemotherapy and biotherapy*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap. 18, p.435-461.
- POMMIER, Y; KOHN, K. "Topoisomerase II inhibition by antitumor intercalators and demethylepipodophyllotoxins". In: Glazer RI (ed). *Developments in cancer chemotherapy*. V.2 Boca Raton, Fl, CRC Press, 1989. p.175-195.

- POMMIER, Y; SCHWARTZ, RE; ZWELLING, LA et al. Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II-induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. *Biochem* 24:6406, 1985.
- POMMIER, Y; TANIZAWA, A “Mammalian DNA topoisomerase I and its inhibitors”. In: HICKMAN, J. & TRITTON, T, eds. *Cancer chemotherapy*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993. p.214.
- POSTON CD, JAFFE GS, LUBENSKY IA, et al. Characterization of the renal pathology of a familial form of renal cell carcinoma associated with von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular genetic implications. *J Urol* 153(1):22-6, Jan 1995.
- PYRHÖNEN, S; SALMINEN, E; RUUTU, M et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2 a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol* 17(9):2859-67, Sep, 1999.
- RABINOVITCH, RA; ZELEFSKY, MJ; GAYNOR, JJ et al. Patterns of failure following surgical resection of renal cell carcinoma: implications for adjuvant local and systemic therapy. *J Clin Oncol* 12:206-12, 1994.
- RAFLA, S. Renal cell carcinoma: natural history and results of treatment. *Cancer* 25:26, 1970.
- REDDY, GP & PARDEE, AB. Inhibitor for allosteric interaction in the replitase multienzyme complex. *Nature*, 304(5921): 86-88; Jul 7-13, 1983.
- REDDY, GP & PARDEE, AB. Multienzyme complex for metabolic chaneling in mammalian DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77(6): 3312-16, Jun 1980.
- ROBSON, CJ; CHURCHILL, BM; ANDERSON, W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Trans Am Assoc Genitourin Surg* 60:122, 1968.
- ROBSON, CJ; CHURCHILL, BM; ANDERSON, W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 101:297-303, 1969.
- RODMAN, JH; SUNDERLAND, M; KAVVANAGH, RL et al. Pharmokinetics of continuous infusion of methotrexate and teniposide in pediatric cancer patients. *Cancer Res* 50(14): 4267-71, 1990.
- ROED H, VINDELOV LL, CHRISTENSEN IJ, SPANG-THOMSEN M, HANSEN HH. The effect of the two epipodophyllotoxin derivatives etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) on cell lines established from patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer Chemother Pharmacol* 19(1):16-20, 1987.
- ROSENBERG, AS; YANG, JC; TOPALIAN, SL et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271(12):907-13, Mar, 1994.
- ROSENBERG, SA; LOTZE, MT; YANG, JC et al. Prospective randomized trial of high dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:622-632, 1993.
- ROSS, WE; BRADLEY, MO. DNA double-strand breaks in mammalian cells after exposure to intercalating agents. *Biochim Biophys Acta* 654:129-134, 1981.

- ROSS, WE; GLAUBIGER, D; KOHN, KW. Qualitative and quantitative aspects of intercalator-induced DNA strand breaks. *Biochim Biophys Acta* 562:41-50, 1979.
- ROWE, T; KUPFER, G; ROSS, W. Inhibition of epipodophyllotoxin cytotoxicity by interference with topoisomerase-mediated DNA cleavage. *Biochem. Pharmacol* 34(14):2483-87, Jul 15, 1985.
- SANDOCK, DS; SEFTEL, AD; RESNICK, MI. A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage. *J Urol* 154:28-31, 1995.
- SCHMIDT, L, DUH, FM, CHEN, F et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*, 16: 68-73, 1997.
- SCHOMBURG, A; KIRCHNER, H.; FENNER, M. et al. Lack of therapeutic efficacy of tamoxifen in advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 29^A (suppl. 5): 737-740, 1993.
- SCHWARTSMANN, G; CALDAS, APF; DALLACOSTA, T. Phase I study of 3 times daily oral etoposide in patients with refractory solid tumors. *Clin Drug Invest* 19(5), May 2000 (*in press*).
- SCHWARTSMANN, G; SPRINZ, E; KRONFELD, M et al. Phase II study of teniposide in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 27:1637, 1991.
- SCHWARTSMANN, G; SPRINZ, E; KRONFELD, M; et al. Clinical and pharmacokinetic study of oral etoposide in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma with no prior exposure to cytotoxic therapy. *J Clin Oncol*, 15(5): 2118-24, May 1997.
- SEIZINGER, BR; ROULEAU, GA; OZELIUS, LJ et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332:268, 1988.
- SELLI, C; HINSHAW, WM, WOODARD, BH et al. Stratification of risk factors in renal cell carcinoma. *Cancer* 52:899, 1983.
- SESSA, C; ZUCCHETTI, M; DAVOLI, E et al. Phase I and clinical pharmacological evaluation of aphidicolin glycinate. *J Natl Cancer Inst* 83(16):1160-64, Aug 1991.
- SHUIN, T; KONDO, K; TORIGOE, S. et al.. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel Lindau tumour suppressor gene in primary human renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 54: 2852-2855, 1994.
- SIEMEISTER, G; WEINDEL, K; MOHRS, K et al. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56:2299-2301, 1996.
- SINCLAIR, WK. Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. *Science* 150:1729, 1965.
- SKEHAN, P; STORENG, R; SCUDIERO, D. et al. New colorimetric assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.*, 82: 1107-1112, 1990.
- SKINNER, DG; PFISTER, RF; COLVIN, R. Extension of renal cell carcinoma into the vena cava: the rationale for aggressive surgical management. *J Urol* 107:711, 1972.
- SKINNER, DG; PFISTER, RF; COLVIN, R. Extension of renal cell carcinoma into the vena cava: the rationale for aggressive surgical management. *J Urol* 107:711, 1972.

- SLEVIN, ML; CLARK, PI; JOEL, SP et al. A randomised trial to examine the effect of more extended scheduling of etoposide administration in small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 8:236, 1989 (abstr).
- SLEVIN, ML; CLARK, PI; JOEL, SP. et al. A randomised trial to evaluate the effect of schedule on the activity of etoposide in small cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, 7: 1333-1340, 1989.
- STÄHELIN, H. 4'-Demethylepipodophyllotoxin thenilydene glucoside (VM-26), a podophyllum compound with a new mechanism of action. *Eur J Cancer* 6:303-311, 1970.
- STÄHELIN, H. Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP-16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Eur J Cancer* 9:215-21, 1973.
- STÄHELIN, H; CERLETTI, A. Experimentelle Ergebnisse mit den Podophyllum Cytostatica SP-I and SP-G. *Schweiz Med Wochenschr* 94:1490-1502, 1964.
- STÄHELIN, H; von WARTBURG, A. From podophyllotoxin glucoside to etoposide. *Progr Drug Res* 33:169-266, 1989.
- STAHL, M; SCHMOLL, E; BECKER, H. Lonidamine versus high-dose tamoxifen in progressive advanced renal cell carcinoma: Results of an ongoing randomized phase II study. *Semin Oncol.*, 18: 33-37, 1991.
- STENZL, A; deKERNION, JB. Pathology, biology, and clinical staging of renal cell carcinoma. *Semin in Oncology* 16(1):3-11, Feb, 1989.
- STENZL, A; deKERNION, JB. Pathology, biology, and clinical staging of renal cell carcinoma. *Semin in Oncology* 16(1):3-11, Feb, 1989.
- STENZL, A; DEKERNION, JB. The natural history of renal cell carcinoma. *Semin Urol.*, 7 (3): 144-148, Aug 1989.
- STOTER G, VAN OOSTEROM AT, MULDER JH, DE PAUW M, FOSSA SD. Combination chemotherapy with cisplatin and VM-26 in advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 20(3):315-7, Mar 1984.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. 1000p.
- SUGAWARA, I; KAKAHAMA, M; HAMADA, H. et al. Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr170,000-180,000 P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 48: 4611-4614, 1988.
- TEWEY, KM; CHEN, GL; NELSON, EM et al. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259(14):9182-87, Jul 25, 1984.
- THE META-ANALYSIS GROUP IN CANCER. Efficacy of intravenous continuous infusion to fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 16:301-308, 1998.
- THELANDER, L; REICHARD, P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* 48:133-142, 1979.
- THIEBAUT, F; TSURUO, T; HAMADA, H. et al. Cellular localization of the multidrug-resistant gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7735-7738, 1987.

- TRICHOPOULOS, D, LIPWORTH, L, PETRIDOU, E & ADAMI, H. Epidemiology of Cancer. In: DEVITA, VT, HELLMAN, S, ROSENBERG, SA (eds). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5.ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven, 1997. cap. 12, p. 231-258.
- VAN der WERF-MESSING, B. Carcinoma of the kidney. *Cancer* 32:1056-1062, 1973.
- VENDETTI, JM. Treatment schedule dependency of experimentally active anti-leukemic (L1210) drugs. *Cancer Chemother Rep* 2:35-39, 1971.
- VINDELOV LL. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 10;24(3):227-42, Aug 1977.
- VOGELZANG, NJ. Chemotherapy of genitourinary cancer (Chapter 57). In: Perry MC (ed): *The chemotherapy sourcebook*. Williams & Wilkins: Baltimore, USA 1992; 1008-1038.
- VonWARTBURG, A; ANGLIKER, E; RENZ, J. Lignanglucoside aus *Podophyllum peltatum* L. *Helv Chim Acta* 40:1331-57, 1957.
- WALTERS, RA; TOBEY, RA; HILDEBRAND, CE. Hydroxyurea does not prevent synchronized G₁ Chinese hamster cells from entering DNA synthetic period. *Biochem Biophys Res Commun* 69:212, 1976.
- WALTHER, MM; LUBENSKY, IA; VENZON, D et al. Prevalence of microscopic lesions in "normal" renal tissue obtained from patients with Von Hippel-Lindau disease, patients with no renal disease: molecular genetic and clinical implications. *J Urol* 154(6):2010-2014, 1995.
- WECHSEL, HW; BICHLER, KH; FEIL, G et al. Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res* 19(2C):1537-40, Mar-Apr, 1999.
- WEISZ, J, FRITZ-WOLZ, G, CLAWSON, GA et al. Induction of nuclear catechol-O-methyltransferase by estrogens in hamsters kidney: implications for estrogen-induced renal cancer. *Carcinogenesis* 19: 1307-1312, 1998.
- WILKINSON, MJ; FRYE, JW; SMALL, EJ et al. A phase II study of constant infusion floxuridine for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 71: 3601-04, 1993.
- WIRTH MP. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 20(2):283-95, May 1993.
- WOLFF, SN; GROSH, WW; PRATER, K et al. In vitro pharmacodynamic evaluation of VP16-213 and implications for chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 19:246-49, 1987.
- WU, L; SMYTHE, AM; SHERMAN, FS et al. Multidrug-resistant phenotype of disease-oriented panels of human tumor cell lines used for anticancer drug screening. *Cancer Res* 52:3029-34, Jun 1992.
- YAGODA, A.; ABI-RACHED, B.; PETRYLAK, D. Chemotherapy for advanced renal cell carcinoma: 1983-1993. *Seminars in Oncology*, 22 (1): 42-60, Feb. 1995.
- YUAN JM, CASTELAO JE, GAGO-DOMINGUEZ, M et al. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 77: 1508-1513, 1998.

- ZBAR, B, GLENN GM, LUBENSKY, I et al. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol* 153: 907-912, 1995.
- ZBAR, B; BRAUCH, H; TALMADGE, C et al. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 327:721, 1987.
- ZWELLING, LA, HINDS, M, CHAN, D. et al. Characterization of an amsacrine-resistant line of human leukemia cells. *J Biol Chem*, 264: 16411-16420, 1989.
- ZWELLING, LA; KERRIGAN, D; POMMIER, Y et al. Formation and resealing of intercalator-induced DNA strand breaks in permeabilized L1210 cells without the stimulated synthesis of poly (ADP-ribose). *J Biol Chem* 257:8957-63, 1982.

ABSTRACT

Renal cell carcinoma represents about 3% of malignant neoplasms in adults, but is among the most treatment-refractory human malignancies. Neither surgery, nor radiation therapy or chemotherapy have a significant impact on the outcome of this disease. Thus, these poor results indicate a need to evaluate alternative forms of treatment for this malignancy. The epipodophyllotoxin etoposide has a broad activity spectrum that includes various hematological and solid tumors in both children and adults. These agent act by inhibiting the nuclear enzyme topoisomerase II. Recent in vitro studies demonstrated that the antitumor activity of epipodophyllotoxins are highly schedule-dependent, improving with more frequent and extended administration schedules instead of as one high dose at once. Employing this concept in the clinic, encouraging response rates have been noted in (etoposide-) pretreated patients that received daily repeated doses. Unfortunately, early experimental studies with this agent against advanced renal cell carcinoma showed no significant antitumor activity. For this reason, its drug sister, teniposide, although having a comparable activity spectrum as etoposide, is still an investigational anticancer agent, since no studies have been performed to assess the impact of schedule alterations on teniposide's efficacy in this disease. Available data with cultured tumor cells showed about a ten times greater potency of teniposide when compared to etoposide, which is possibly due to better cellular retention. Moreover, teniposide has been suggested to be selectively retained by tumor cells when compared to normal cells. These features, together with the greater efficacy of etoposide with more prolonged administration schedules, led us to assess teniposide in this study at diverse schedules for its potential antitumor efficacy in an in vitro model of advanced renal cell carcinoma, a characteristically drug-resistant tumor. We used three human kidney carcinoma cell lines, RXF-393, A498, and TK-10, that were incubated with IC₅₀ concentrations of teniposide in the absence or presence of agents that inhibited the function of P-glycoprotein, an efflux pump that exports drugs from the interior of cells, rendering them so-called 'multidrug resistance'. We also examined whether the growth-inhibitory effect of teniposide could be further improved by biochemical modulation, employing the DNA polymerase α -inhibiting agent aphidicolin glycinate (0.2 μ M); or the ribonucleotide reductase-inhibiting agent hydroxyurea (200 μ M), following a 24 h pre-treatment with the latter agents at these same lowly cytotoxic concentrations. Cellular responses were assessed with the SRB method. When compared to short-term exposure or fragmented exposure, continuous exposure improved teniposide cytotoxicity significantly, suggesting that the growth inhibitory effects of teniposide is highly schedule-dependent. Consequently, we showed a increasing amount of DNA damage in all three cell lines upon continuous exposure. Interestingly, no differences in topoisomerase II activity was observed in the various administration schedules of teniposide, neither in the number of DNA-topoisomerase II complexes. Indeed, our data show that the

presently used kidney cancer cell lines did not respond to the P-glycoprotein-modulating agents verapamil, ciclosporina A e tamoxifeno. However, the treatments with the agents that interfere in the DNA synthesis potencialized teniposide cytotoxicity in all three cell lines, according to intrinsic characteristics of each cell line. This results suggested clear schedule-dependent growth-inhibitory effects of teniposide, the greater inhibition being achieved upon continuous exposure to the drug or in combination with the DNA synthesis inhibitors aphidicolin glycinate or hydroxyurea. Our results suggest that proper scheduling, as well as proper chemomodulation, may improve the cytotoxicity of teniposide markedly, making it a candidate for clinical reevaluation. Once this observations will be confirmed, studies with an *in vivo* tumor model will begin. This data will be considered in future discussions about the clinical reevaluation of teniposide in phase I studies in patients with advanced refractory tumors.