

ATIVIDADE DA TIMIDILATO SINTETASE E ÍNDICE MITÓTICO NO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Thymidylate synthase activity and mitotic index in head and neck neoplasm

ORLANDO PARISE JR.¹ LEDA VIEGAS DE CARVALHO² FRANÇOIS JANOT³ JACQUES BOSQ⁴

A timidilato sintetase (TS) é uma enzima-chave na síntese do DNA. A atividade TS é particularmente aumentada no carcinoma espinocelular (CEC) e apresenta uma grande variabilidade interpacientes. Foi postulado que a atividade TS seria diretamente ligada à velocidade de proliferação tumoral, com absoluto interesse clínico para seleção de doentes e racionalização dos regimes de quimioterapia baseados em 5-fluorouracil.

Material e métodos: Com o objetivo de avaliar a correlação entre a atividade TS e o índice mitótico (IM) dos tumores e a relação destes com a sobrevida, 33 pacientes portadores de um CEC de cabeça e pescoço foram avaliados retrospectivamente.

Resultados: A atividade TS média (método de Houghton) foi de 9.2 ± 21.4 pmol/min/mg prot. e mediana de 3.8 pmol/min/mg prot. com significativo ($p = 0.04$) aumento de atividade TS nos tumores N 1,2 ou 3 (15.3 ± 31.1) versus tumores N 0 (4.1 ± 3.6). O IM médio foi de 20.7 mitoses/10 campos óticos de 400x. Não foi verificada qualquer correlação direta entre a TS e o IM, independente do estadiamento clínico ou patológico. A sobrevida global a 60 meses (Kaplan Meier) foi de 52.2%; para os doentes com atividade TS > 3.8 foi de 36.1% e TS < 3.8 foi de 65%; com IM > 20 foi de 44.5% e IM < 20 foi de 56.6%. Nenhum paciente com TS > 3.8 e IM > 20 sobreviveu mais de 30 meses e a sobrevida a 5 anos para os pacientes com TS < 3.8 e IM < 20 foi de 53.6% ($p > 0.05$).

Conclusão: A atividade TS tem maior poder preditivo se comparada ao IM e provavelmente está ligada à disseminação metastática dos tumores. O poder preditivo da associação de elevada atividade TS e IM no tumor precisa ser confirmado em uma série maior, mas resta uma perspectiva extremamente atraente na seleção precoce de doentes de mau prognóstico.

Unitermos: Câncer de cabeça e pescoço, proliferação tumoral, timidilato sintetase, índice mitótico.

Keywords: Head & neck neoplasm, thymidylate synthase, mitotic index.

Introdução

A escolha da estratégia terapêutica no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCB) é baseada atualmente na localização e extensão locorregional (e à distância) da lesão primária. A diferenciação tumoral tem controvertido valor prognóstico. O fato é que nenhum parâmetro clínico utilizado hoje é francamente preditivo da evolução e, do ponto de vista biológico, tais parâmetros são antes de tudo consequência de características genéticas ou moleculares de cada tumor. Inúmeras vezes vê-se na prática clínica tumores histologicamente comparáveis apresentando evoluções completamente opostas. Existe uma crescente necessidade de incorporar-se na avaliação inicial parâmetros biológicos que permitam a identificação precoce de quais pacientes devem receber uma maior agressividade terapêutica e quais, em contrapartida, a simples exérese da lesão primária já oferece uma boa margem de segurança.

A atividade enzimática da timidilato sintetase (TS) é cada vez mais uma forte candidata a ocupar um lugar de destaque

1 - Depto de Cirurgia de Cabeça e Cabeça e Pescoço do Hospital A. C. Camargo.

2 - Depto de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo.

3 - Depto de Cirurgia Cervicofacial e O.R.L. do Instituto Gustave-Roussy, Villejuif, França.

4 - Depto de Anatomia Patológica do Instituto Gustave-Roussy, Villejuif, França.

Endereço para correspondência: Depto de Cirurgia de Cabeça e Cabeça e Pescoço do Hospital A. C. Camargo - Fundação Antonio Prudente - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Tel.: (011) 278-8811 - Fax.: (011) 277-4259 - CEP 01509-010 - São Paulo - SP.

entre os parâmetros biológicos que serão incorporados à prática clínica. Esta enzima nuclear catalisa a metilação da desoxiuridina monofosfato (dUMP) resultando na formação da timidina monofosfato, precursor essencial da desoxitimidina trifosfato (dTTP), um dos quatro desoxirribonucleotídeos necessários à síntese do DNA (Guengerich, 1988; Grem, 1990). Outro interesse desta enzima vem do fato de ser o alvo farmacológico do 5-fluorouracil (5FU), ação esta potencializada na presença de folatos (Spears, 1988; Poon, 1989; Bleyer, 1989; Peters, 1991). O 5FU é uma entre as drogas mais usadas na quimioterapia adjuvante e neo-adjuvante no tratamento do CECCB, particularmente eficaz quando associado à cisplatina (CDDP), que em regime neo-adjuvante chega a uma resposta objetiva de 60%-90% com 20%-50% de respostas completas (Al-Sarraf, 1988; Jacobs, 1989). Este bom nível de resposta não tem impacto na sobrevida dos doentes (Luboinski, 1983), razão pela qual a indicação hoje da quimioterapia neo-adjuvante são quase que exclusivamente protocolos de preservação de órgão.

Em relação ao CECCB, a atividade TS é particularmente aumentada no tumor se comparada à atividade TS na mucosa adjacente e apresenta uma grande variabilidade interpacientes (Parise, 1994). Foi postulado que a TS teria relação com a velocidade de proliferação tissular e que uma elevada atividade provavelmente teria impacto no prognóstico dos pacientes portadores de CECCB.

Com o objetivo de verificar estas hipóteses e consequentemente fundamentar melhor a futura utilização prática deste parâmetro, o índice mitótico (IM) foi correlacionado à atividade TS e retrospectivamente avaliada a influência de ambos na sobrevida.

Material e métodos

Foram incluídos neste estudo pacientes portadores de CECCB, de qualquer localização, histologicamente confirmados, sem prévia irradiação ou quimioterapia, seguidos no Departamento de Cirurgia Cervicofacial e O.R.L. do Instituto Gustave-Roussy (Villejuif, França) entre 1990 e 1992.

As amostras do tumor foram obtidas na sala operatória, identificadas e imediatamente armazenadas em tubos de polipropileno a -180° C (azoto líquido) para evitar perda da atividade enzimática. Cada amostra teve uma parte enviada para controle histológico sobre o material coletado.

Para a análise da atividade TS foi utilizada uma adaptação do método descrito por Houghton (Houghton, 1987). O princípio do método é avaliar por radioatividade (³H) a quantidade de desintegrações por minuto (dpm) obtida na reação entre o citosol livre de dUMP endógeno de cada paciente com o dUMP exógeno marcado com radioatividade a uma dose

conhecida, a qual é diretamente proporcional à atividade TS (desconhecida). Inicialmente cada amostra foi homogeneizada em um Polytron PCU (Bioblock, Kinematica AG, Luzern, Suíça) em um tampão contendo tris-base (20 mM, pH 7.5) e beta-mercaptoetanol (70 mM). O citosol usado para medir a atividade TS foi obtido após centrifugação do homogeneizado durante 60 minutos a 105.000 g. (Centrífuga Sigma 302 K - Bioblock). Neste ponto 100 µl de citosol eram separados para dosagem do teor de proteínas necessário ao cálculo final (Bradford, 1976). O dUMP endógeno foi retirado com carvão ativado (10%) e após nova centrifugação (a 2°C) e filtragem (filtros tipo Gelman-Sciences A/E 25 mm) foi adicionado o dUMP exógeno marcado (100 µl de ³HdUMP com atividade específica de 1.9 Ci/mmol). Ao tempo de 0, 5, 10 e 15 minutos uma amostra de 40 µl foi colhida e o excesso de radioatividade não incorporada foi retirado com carvão ativado (5%) e filtrado. Finalmente em 800 µl de cada amostra foram adicionados 8 ml de líquido cintilante de meio aquoso e a radioatividade foi então contada. O cálculo da atividade TS foi feito baseado na constante 1.9 Ci/mmol - 1.9 MCi/nmol - 4.218 x 10⁶ dpm/nmol, ou seja, X dpm no tempo Y (5, 10 et 15), a atividade TS foi dada pela fórmula:

$$TS \text{ em nmoles / minuto / mg proteína} = \frac{X - (\text{dpm tempo } 0)}{4.218 \times 10^6 \times (\text{mg/ml proteína}) \times Y}$$

O IM foi analisado em 10 campos distintos com aumento de 400x em microscopia ótica convencional, a partir das lâminas obtidas das peças operatórias. Cada prontuário clínico foi revisto e o seguimento dos pacientes atualizado até o final de março de 1995. Os dados relativos à atividade TS e IM foram correlacionados entre si e com a sede anatômica da lesão, classificação TNM (Spiessl, 1990), diferenciação histológica, e sobrevida. Foram consideradas significativas diferenças com p ≤ 0.05. No cálculo da sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier e a comparação feita pelo Logrank Test, método de Mantel.

Resultados

Trinta e três pacientes foram incluídos neste estudo, 29 homens e 4 mulheres com a idade variando de 44 a 80 anos (média de 59.7 anos). Desta população, foram clinicamente classificados T1, 1 paciente; T2, 10 pacientes; T3, 10 pacientes; T4, 12 pacientes; N0, 18 pacientes; N1, 2 pacientes; N2, 10 pacientes e N3, 3 pacientes. A localização da lesão inicial mais freqüente foi a laringe com 15 pacientes, seguida por hipofaringe 13, orofaringe 4 e cavidade oral com 1 paciente. Um paciente desta série havia sido submetido à laringectomia parcial em 1985, 6 anos antes de apresentar a recidiva local.

Tabela 1 - Atividade TS e IM de acordo com a classificação TNM. — significa nenhum caso. Unidades: TS=nmol / min / mg proteínas; IM= número de mitoses / 10 campos óticos 400x.

N\T	T1	T2	T3	T4	Total	TS e IM
N0	—	7	7	4	18	TS=4.1±3. IM=20.5±7
N1	—	—	—	2	2	TS=5.9±3. IM=23.5±9
N2	1	3	1	5	10	TS=7.2±6. IM=19.5±7
N3	—	—	2	1	3	TS=48.6±6 IM=24.0±3
Total	1	10	10	12	33	TS=9.2±21 IM=20.7±6
TS e IM	TS=7.8 IM=18.0	TS=3.0±1. IM=18.3±8	TS=7.0±5. IM=23.1±8	TS=16.4±3 IM=20.9±6	TS=9.2±21 IM=20.7±6	TS e IM

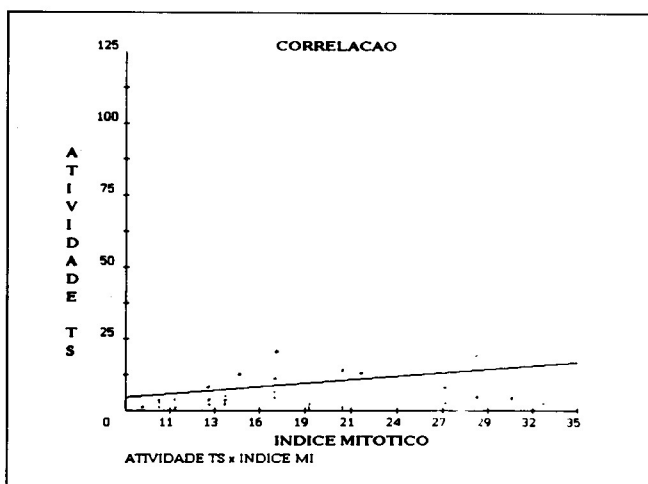


Gráfico 1 - Ausência de relação entre a atividade TS e o IM. Unidades: TS=nmol / min / mg proteínas; IM= número de mitoses / 10 campos óticos 400x.

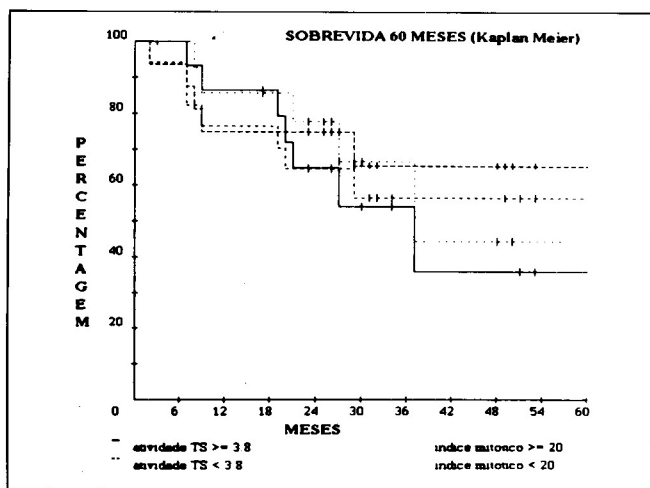


Gráfico 2 - A sobrevida comparada dos pacientes com atividade TS ≥ 3,8 e TS < 3,8 e com IM ≥ 20 e IM < 20. Unidades: TS=nmol / min / mg proteínas; IM= número de mitoses / 10 campos óticos 400x.

No que concerne a diferenciação, 26 foram considerados bem-diferenciados, 3 moderadamente-diferenciados e 4 pouco-diferenciados. O seguimento variou de 30 a 57 meses (média de 44.1 meses). A atividade TS média (método de Houghthon) foi de 9.2 + 21.4 pmol/min/mg prot. (mediana de 3.8 pmol/min/mg prot.) com progressivo aumento da atividade TS de N0 para N1, de N1 para N2 e de N2 para N3. Houve significativo (Wilcoxon Test, p=0.04) aumento de atividade TS nos tumores N 1,2 ou 3 (15.3 ± 31.1) versus tumores N 0 (4.1 ± 3.6). O IM médio foi de 20.7 mitoses / 10 campos óticos de 400x (a distribuição de atividade TS e IM pela classificação TNM é detalhada na tabela 1). Não foi verificada qualquer correlação direta entre a TS e o IM (gráfico 1), independente do estadiamento clínico ou patológico e igualmente não foi observada qualquer diferença da atividade TS e IM em relação à sede anatômica da lesão ou diferenciação tumoral. A sobrevida global a 60 meses (Kaplan Meier) foi de 52.2%; para os doentes com atividade TS ≥ 3,8 foi de 36.1% e TS < 3,8 foi de 65.6%; com IM ≥ 20 foi de 44.5% e IM < 20 foi de 56.6% (gráfico 2). Nenhum paciente que apresentou concomitantemente TS ≥ 3,8 e IM ≥ 20 sobreviveu mais de 30 meses (n=10, 4 óbitos) e a sobrevida do grupo de pacientes que apresentavam concomitantemente TS < 3,8 e IM < 20 foi de 53.6% (n=7, 3 óbitos) - não significativa, p>0.05, Logrank Test, Método de Mantel (gráfico 3).

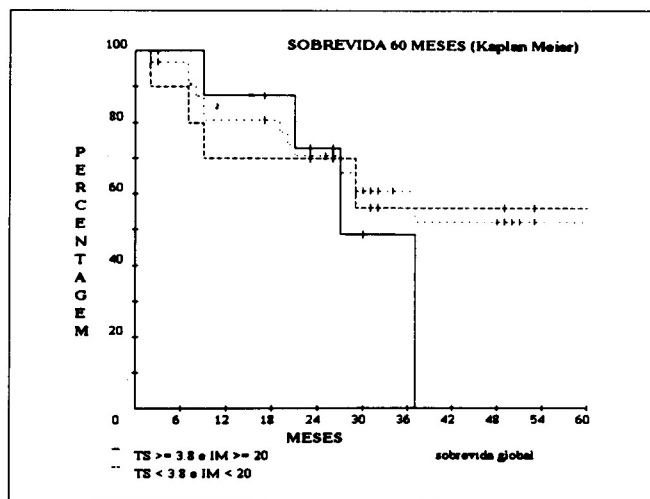


Gráfico 3 - A sobrevida global a 60 meses, sobrevida de pacientes que apresentavam concomitantemente TS ≥ 3,8 e IM ≥ 20 e pacientes com TS < 3,8 e IM < 20. Unidades: TS=nmol / min / mg proteínas; IM= número de mitoses / 10 campos óticos 400x.

Discussão

Existe uma clara necessidade de incorporar-se parâmetros biológicos na avaliação dos CECCB. Com uma melhor caracterização de cada caso, a decisão terapêutica poderá ser individualizada, resultando provavelmente em melhor controle locorregional, maior sobrevida e melhor qualidade de vida.

Dentro desta filosofia, com o objetivo de verificar se a atividade TS teria relação com a velocidade de proliferação tissular (retrospectivamente inferida pelo IM) e o impacto da atividade TS e/ou IM no prognóstico dos pacientes portadores de CECCB, 33 pacientes foram incluídos neste estudo. Ilustrando o potencial desta abordagem, um estudo conduzido por Volkes mostrou que a associação de CDDP / 5FU / Leucovorin (Folatos) em quimioterapia adjuvante obteve 26 respostas objetivas em um total de 29 pacientes avaliados com CECCB avançado do ponto de vista locorregional. Este resultado foi atingido baseado num modelo otimizando de modo racional a inibição da atividade TS (Volkes, 1990).

A atividade TS média foi de 9.2 ± 21.4 pmol/min/mg prot. A tabela 1 mostra a atividade TS com progressivo aumento de N0 para N1, de N1 para N2 e de N2 para N3 (sem significação estatística, provavelmente pelo pequeno número de pacientes em cada grupo) e com significativo ($p = 0.04$) aumento de atividade TS nos tumores N 1, 2 ou 3 (15.3 ± 31.1) comparados aos tumores N 0 (4.1 ± 3.6). Caso confirme-se a relação da atividade TS com a metastatização regional, este dado é particularmente promissor um vez que abre a possibilidade de emprego da TS na seleção de quais pacientes com lesões iniciais devem ser submetidos a um esvaziamento cervical de princípio ou ainda na estratificação de ensaios clínicos. No que diz respeito ao IM, nenhuma relação foi observada ao estadiamento clínico. Da mesma forma, não foi verificada qualquer correlação direta entre a TS e o IM (gráfico 1), ou qualquer diferença da atividade TS e IM em relação à sede anatômica da lesão ou diferenciação tumoral. Es-

tes dados necessitam de confirmação em um estudo com maior amostragem.

Apesar de diferentes localizações da lesão inicial e grande parte dos pacientes incluídos serem casos avançados principalmente na extensão local (T3 e T4, 22 pacientes) o longo seguimento destes pacientes permite visualizar algumas tendências. O gráfico 2 mostra sobrevida global a 60 meses (Kaplan Meier) foi de 52.2%; para os doentes com atividade TS maior ou igual a atividade mediana ($\geq 3,8$) a sobrevida foi de 36.1% e menor ($< 3,8$) foi de 65.6%. Este resultado, embora não significativo, sugere um maior poder preditivo da TS se comparada ao IM, onde a sobrevida para os pacientes com IM maior ou igual a mediana (≥ 20) foi de 44.5% e IM menor (< 20) foi de 56.6%. Considerando-se a superposição dos dois parâmetros, nenhum paciente sobreviveu mais de 30 meses entre os 10 pacientes que apresentavam concomitantemente $TS \geq 3,8$ e $IM \geq 20$ (com a ressalva de 6 pacientes censurados neste grupo) e para os 7 pacientes que apresentavam $TS < 3,8$ e $IM < 20$ a sobrevida a 60 meses foi de 53.6% (gráfico 3), não significativo (Logrank Test, método de Mantel), muito provavelmente pelo pequeno efetivo em cada grupo. Esta potencialização na identificação dos pacientes a pior prognóstico obtida com a associação TS e IM ilustra de modo claro o absoluto interesse na utilização concomitante de vários parâmetros ligados à biologia tumoral.

O poder preditivo da associação de elevadas atividade TS e IM no tumor precisa ser confirmado em uma série maior, bem como a correlação isolada da atividade TS com metastatização locorregional no CECCB, restando no presente como uma perspectiva extremamente atraente. O estabelecimento de um verdadeiro estadiamento biológico e padronização de uma abordagem avaliando enzimas e co-fatores implicados na ativação e detoxificação de drogas, reações de biossíntese, reparação celular, amplificação e expressão de oncogenes e antioncogenes e pesquisa de genoma viral entre outros, poderão levar a um salto qualitativo na terapia de pacientes portadores de CECCB.

Summary

Background: Thymidylate synthase activity (TS) is a key enzyme for DNA synthesis and is the pharmacological target of the 5-fluorouracil. It was postulated that there is a relationship between TS activity and the proliferative rate of a given tissue.

Patients, material and methods: Thirty-three head and neck squamous cell carcinoma patients were included in this study. The TS activity was blindly retrospectively compared to mitotic index (IM), tumor necrosis, desmoplasia, and tumor lymphatic invasion.

Results: TS mean activity (Houghton's method) was 9.2 ± 21.4 pmol/min/mg prot. with a significant increase ($p = 0.04$) to N1-3 patients compared to that of N0 patients, 15.3 ± 31.1 versus 4.1 ± 3.6 , respectively. The mean IM was 20.7 mitosis / 10 optical 400x fields. No one relationship between TS and IM was observed. The overall 5 years survival (Kaplan Meier) was 52.2%; for patients presenting $TS \geq 3,8$ was 36.1% and for those with $TS < 3,8$ was 65.6%; for patients with $IM \geq 20$ was 44.5% and for those with $IM < 20$ was 56.6%. No one patient presenting $TS \geq 3,8$

and IM ≥ 20 survived more than 30 months and the 5 years survival rate for patients presenting TS $< 3,8$ and IM < 20 was 53.6% ($p > 0.05$).

Conclusion: TS seems to be better to predict patients outcome compared to that of IM and probably was related to regional tumor spread. In this study, the concomitance of high TS activity and elevated IM was strongly related to bad prognosis. The prediction value of this association deserves to be confirmed in a larger series and remain a very attractive perspective.

Referências bibliográficas

- 1 - AL-SARRAF, M. - *Head and neck cancer: chemotherapy concepts*. Semin Oncol., 15:70-85, Feb 1988.
- 2 - BLEYER, W. A. - *New vistas for leucovorin in cancer chemotherapy*. Cancer, 63:995-1007, 1989.
- 3 - BRADFORD, M. M. - *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem., 72:248-54, 1976.
- 4 - GREM, J. L. - *Fluorinated pyrimidines*. In: Chabner, B. A. & Collins, J. M. - *Cancer chemotherapy principles & practice*. Philadelphia, J. B. Lippincott, pg. 180-224, 1990.
- 5 - GUENGERICH, F. P. - *Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy*. Cancer Res., 48:2946-54, 1988.
- 6 - HOUGHTON, J. A. et al. - *Determination of thymidylate synthase activity in colon tumor tissues after treatment with 5-fluorouracil*. Biochem Pharmacol., 36:1285-9, 1987.
- 7 - JACOBS, C. - *Adjuvant chemotherapy for head and neck cancer*. J Clin Oncol., 7:823-6, 1989. (Editorial).
- 8 - LUBOINSKI, B. et al. - *Pelvi-mandibulectomie après chimiothérapie première: a propos de 71 cas*. J Eur Radiother., 4:143-50, 1983.
- 9 - PARISE Jr., O. et al. - *Thymidylate synthase activity, folates, and the glutathione system in head and neck cancer*. Head Neck, 16:158-64, 1994.
- 10 - PETERS, G. J.; van GROENINGEN, C. J. - *Clinical relevance of biochemical modulation of 5-Fluoracil: review*. Ann Oncol., 2:469-80, 1991.
- 11 - POON, M. A.; O'CONNELL, M. J.; MOERTEL, C. G. - *Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma*. J Clin Oncol., 7:1407-17, 1989.
- 12 - SPEARS, C. P. et al. - *Mechanism of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil*. Cancer Res., 48:5894-900, 1988.
- 13 - SPIESSL, B. et al. - *TNM Atlas illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumors: head and neck tumors*. 3 ed. Berlin, Springer-Verlag, 1990.