

CITOMETRIA DE FLUXO EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO

Flow cytometry in head and neck tumors

MIRIAM H. H. FEDERICO¹ IGOR SNITCOVSKY² MARIA A. A. KOIKE¹

Vários estudos têm abordado a análise do conteúdo de DNA em carcinomas de cabeça e pescoço, através da citometria de fluxo. Fazemos aqui um breve relato de alguns desses estudos. O valor potencial de estudos da cinética do crescimento tumoral com a utilização da incorporação in vivo da bromodeoxiuridina é comentado brevemente.

Unitermos: Citometria de fluxo - neoplasias de cabeça e pescoço - prognóstico.

Keywords: Flow cytometry - head and neck neoplasias - prognosis.

Trabalho realizado pela Disciplina de Oncologia, Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1 - Professor Assistente Doutor.

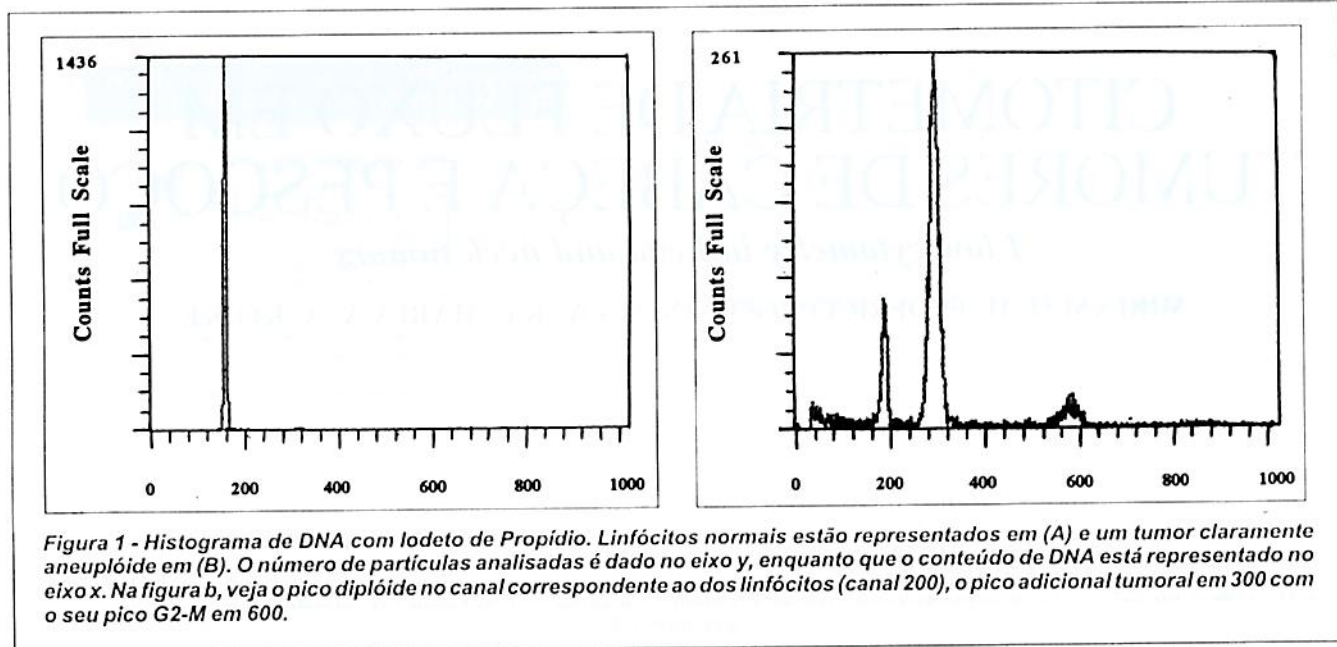
2 - Médico Assistente do HCFMUSP.

Endereço para correspondência: Miriam H. H. Federico - Faculdade de Medicina - Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar - 01246-000 - São Paulo - SP.

Introdução

A medida do conteúdo celular de DNA é um método usado para se avaliar parâmetros de proliferação celular e grau de malignidade. Essas medidas podem ser feitas por dois métodos fundamentalmente: Citometria de fluxo (CFM) e microespectrofotometria (MSP). A MSP avalia a medida de conteúdo de DNA em um pequeno número de células e permite comparar esses dados em conjunto com outros dados, como por exemplo atipia nuclear observada em microscópio. A FCM, que é o propósito dessa revisão, possibilita a análise de grandes populações em curto espaço de tempo, permitindo um estudo estatístico desses dados (19).

O citômetro de fluxo é um aparelho que mede fluorescência emitida por partículas coradas com fluorocromos apropriados. Células ou partículas são forçadas a fluir e são excitadas individualmente por uma fonte de laser (geralmente um laser de argônio produzindo uma luz monocromática de comprimento de onda entre 450 e 514



nm). O nível de fluorescência é captado por um fotomultiplicador e convertido em pulso eletrônico e armazenado em um computador para posterior análise. Para a quantificação de DNA usa-se corantes como o Iodeto de Propídio (PI) que se liga às bases do DNA e emite uma fluorescência cuja medida será proporcional ao conteúdo de DNA.

Problemas relacionados ao corante usado ou ao aparelho poderão afetar os resultados. Mesmo em condições ideais de ensaio, a sensibilidade do exame permite detectar diferença de quantidade de DNA equivalente a dois cromossomos. Como consequência, translocações balanceadas sem mudança na quantidade de DNA não serão detectadas.

Ploidia e análise de ciclo celular

Os dados gerados pela CFM são geralmente mostrados no formato de um histograma, no qual o número de células analisadas está representado como uma função da quantidade de fluorescência emitida expressa em número de canais (figura 1).

O padrão de distribuição de DNA permite dividir os tumores em 2 tipos: diplóides e aneuploides. O tumor classificado como diplóide apresenta uma distribuição de DNA similar ao de células do tecido normal. O tumor é considerado aneuploide se for detectada uma população com conteúdo de DNA diferente do diplóide com pico G2-M correspondente. O índice de DNA (DI) da população aneuploide é definido como a razão entre o canal médio de fluorescência emitido pelo seu pico G0-G1 e o canal médio da população diplóide correspondente. Quando existirem múltiplas populações aneuploides, cada uma terá o seu DI. Uma população

aneuploide com pico principal na região correspondente ao pico G2-M normal e DI entre 1.9 e 2.1 é chamado de tetraploide. O pico hiperdiplóide é aquele com índice de DNA acima da população normal.

Em muitos estudos tem-se feito a tentativa de calcular a proporção de células em fase S (SPF) com a finalidade de se prever a capacidade proliferativa do tumor. Essa proporção é calculada como porcentagem da população entre os picos correspondentes a G0-G1 e G2-M. Apesar de pouco reprodutível entre laboratórios, o cálculo dessa proporção com o uso de programas de computador pode ser relativamente fácil. Entretanto, naqueles casos com populações mal definidas ou com grande número de picos, esse cálculo fica virtualmente impossível. Mais detalhes sobre o método e critérios não é a finalidade desse artigo e pode ser visto em Koike *et al.* (17).

Análise de conteúdo de DNA por CFM em tumores de cabeça e pescoço

Alterações grosseiras de DNA, freqüentemente vistas em alguns tumores, correlacionam-se com outros fatores prognósticos adversos, tais como grau de diferenciação avançada do ponto de vista histológico. Várias evidências sugerem que a avaliação da ploidia feita por CFM fornece informação prognóstica em uma série de tumores humanos incluindo ovário, mama e osteossarcoma (19).

De modo geral, não se pode dizer que os dados existentes de CFM em câncer de cabeça e pescoço (SCCHN) ofereça conclusões definitivas quanto a correlação de ploidia com tipo histológico ou estadiamento (6, 10, 11, 14, 15, 22).

Nesses estudos, a porcentagem de tumores aneuplóides apresenta grande variação (31% a 86%). Parte das dificuldades de correlação possivelmente se deve a diferenças metodológicas como uso de material parafinado ou dissociação enzimática ou mecânica das células (6). Mesmo em carcinoma nasofaríngeo, pacientes com linfocitoma e carcinoma anaplástico não apresentam ploidia diferente daqueles com carcinoma escamoso queratinizante, embora este último constitua um grupo de prognóstico pobre. Um estudo retrospectivo de material parafinado de 55 pacientes não foi capaz de demonstrar diferenças nas taxas de sobrevivência a 5 anos entre pacientes com tumores diplóides e não diplóides (5).

Alguns estudos como de *Kokal et al.* (18), mostram a ploidia como o mais importante indicador prognóstico de recaída e sobrevivência em SCCHN. Estudo mais recente de *Kearsley et al.* (16) confirma taxa de recaída maior e sobrevivência 3 vezes menor em pacientes com tumores aneuplóides comparados àqueles com tumores diplóides.

No caso específico de carcinoma de células escamosas de cavidade oral sem tratamento prévio, *Hemmer et al.* (13) descreve a emergência de clones aneuplóides como um marcador de progressão. Estudando 110 amostras incluídas em parafina, esse autor encontrou frequência de aneuploidia de 76.9% e 90.3% em tumores classificados, respectivamente, como T2 e T3, contra 1% encontrado em tumores T1.

Bjelkenkrantz et al. (4), em pacientes com carcinoma laríngeo haviam mostrado anteriormente um subgrupo tetraplóide de pior prognóstico.

Cinética celular e carcinoma de cabeça e pescoço

O estudos de cinética de proliferação em tumor fundamentam-se na idéia de que tumores altamente proliferantes são também responsivos à radioterapia e quimioterapia. SPF nos tumores de cabeça e pescoço. Estudos iniciais como os de *Holm et al.* (14), *Franzen et al.* (10) e *Greiner et al.* (12) correlacionam aneuploidia e alto SPF com sobrevivência reduzida. Essa correlação, entretanto, não parece ser absoluta (8).

A utilização in vivo de análogos sintéticos da timidina como a Bromodeoxiuridina (BrdUrd) foi recentemente desenvolvida com a finalidade de se estimar o grau de proliferação de tumores (1). A BrdUrd é um composto de sobrevivência curta após injeção intravenosa, sendo captada rapidamente pelas células sintetizadoras de DNA. A análise, feita por CFM, de biópsias do tumor retiradas com intervalo de tempo conhecido após a injeção de BrdUrd permite a análise da porcentagem das células sintetizando DNA (LI-labeling index), duração de fase S (Ts) e tempo de duplicação

potencial do tumor (Tpot).

No carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço, os estudos publicados utilizando o método de incorporação da BrdUrd são ainda preliminares (3, 9, 20). Desses trabalhos, *Begg et al.* (2) sugerem uma relação entre LI elevado, Ts prolongado e baixo Tpot com aneuploidia. Sugere-se que, portadores de tumores com Tpot de 5 dias ou menos poderiam se beneficiar com intensificação da radioterapia, combinada com multifracionamento da dose. A aplicação da dose radioterápica total em um menor tempo poderia ser mais efetiva nesses tumores altamente proliferantes. Resultados preliminares desses programas de radioterapia em pacientes com CEC de cabeça e pescoço mostraram maior grau de controle de doença local comparados aos esquemas radioterápicos convencionais (2).

A grande aplicação do Tpot, se for confirmada, será sem dúvida na avaliação prognóstica. Poucos autores, entretanto, arriscam quaisquer previsões quanto a essa utilidade. Estudos como o de *Nylander et al.* (21), mostram em uma série pequena de 23 casos, correlação positiva entre sobrevivência curta e Tpot menor de 7 dias. Nesse estudo, Tpot calculado por um método de avaliação combinado de LI medido por método histoquímico e Ts calculado por incorporação de BrdUrd medido por CFM mostrou ser um indicador prognóstico melhor do que o Tpot calculado da forma convencional somente utilizando a CFM.

Perspectivas

Os dados de literatura revelam várias questões em aberto com relação ao valor da ploidia e SPF em câncer de cabeça e pescoço. Embora a experiência dos investigadores com material parafinado tenha aumentado, a recomendação de vários centros ainda é a utilização de material fresco ou congelado. Esse tipo de material permite o exame do material por análise multiparamétrica. A utilização conjunta do corante de DNA com outros marcadores poderia servir para isolar a célula tumoral ou identificar as células inflamatórias. Inúmeras possibilidades existem em se acoplar análise de DNA com outros marcadores, tais como, antígenos ligados a proliferação ou produtos de proto-oncogenes. Essa estratégia permitiria uma melhor avaliação da ploidia nos tumores de cabeça e pescoço. Estudos prospectivos controlados e um melhor conhecimento dos problemas metodológicos deverão fornecer dados definitivos no futuro.

Agradecimentos

Agradeço o trabalho fotográfico a D. Cristina Pinheiro Grandal.

Summary

Several studies have analysed DNA ploidy in head and neck cancer using flow cytometry. The authors review some of these studies. Finally the potential value of cell-cynetic studies with *in vivo* bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry is briefly reviewed.

Referências bibliográficas

- 1 - BEGG, A. C. et al. - *A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample.* Cytometry, 6:620-6, 1985.
- 2 - BEGG, A. C. et al. - *Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumour patients.* Sem Rad Oncol, 2:22-5, 1992.
- 3 - BENNET, M. H. et al. - *Tumor proliferation assessed by combined histologicall and flow cytometryc analysis implications for therapy in squamous cell carcinoma in the head and neck.* Br J Cancer, 65: 870-8, 1992.
- 4 - BJELKENKRANTZ, K.; LUNDGREN, J. & OLOFSSON, J. - *Single cell DNA measurements in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous laryngeal epithelia, with especial reference to the occurrence of hypertetraploid nuclei.* Anal Quant Cytol, 5:184-8, 1983.
- 5 - COSTELLO, F. et al. - *A clinical and flow cytometric analysis of patients with nasopharyngeal cancer.* Cancer, 66:1789-95, 1990.
- 6 - ENSLEY, J. F. et al. - *Cellular DNA content parameters in untreated and recurrent squamous cell cancer of head and neck.* Cytometry, 10:334-8, 1989.
- 7 - ENSLEY, J. F. et al. - *Variations in DNA aneuploid cell content during tumor dissociation in human colon and head and neck cancers analysed by flow cytometry.* Cytometry, 14:550-8, 1993.
- 8 - FEITCHER, G. E. et al. - *S phase fractions and DNA ploidy of oropharyngeal squamous epithelium carcinomas compared to histological grade, stage response to chemotherapy and survival.* Acta Otolaryngol, 104:10-4, 1987.
- 9 - FORSTER, G. et al. - *Tumour growth rates in squamous carcinoma of the head and neck measured by *in vivo* bromodeoxyridine incorporation and flow cytometry.* Br J Cancer, 65:698-702, 1992.
- 10 - FRANZEN, G. et al. - *Pre-operative irradiation in oral cavity carcinomas: a study with special reference to DNA pattern, histological response and prognosis.* Acta Oncol, 26:349-55, 1987.
- 11 - GOLDSMITH, M. M. et al. - *The significance of ploidy in laryngeal cancer.* A J Surg, 152: 396-402, 1986.
- 12 - GREINER, T., ROBINSON, R.A. & MAVES M.D. - *Adenod cystic carcinoma.* Am J Clin Pathol, 92:71-2, 1989.
- 13 - HEMMER, J. & KREIDLER, J. - *Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinoma of oral cavity.* Cancer, 66:317-20, 1990.
- 14 - HOLM, L. E. - *Cellular DNA amounts of squamous cell carcinoma of head and neck region in relation to prognosis.* Laryngoscope, 92:1064-9, 1982.
- 15 - JOHNSON, T. S. et al. - *Flow cytometric analysis of head and neck carcinoma - DNA index and S phase from parffin embedded sections: comparison with malignancy grading.* Cytometry, 6: 461-80, 1985.
- 16 - KREARSLEY, J. H. et al. - *Prognostic importance of cellular DNA content in head and neck squamous cell cancers. A comparison of retrospective and prospective series.* J Cancer, 47:31-7, 1991.
- 17 - KOIKE, M. A. A. et al. - *Flow cytometric DNA analysis of Brazilian breast carcinoma.* Ciência e Cult, 1994. (no prelo).
- 18 - KOKAL, W. A. et al. - *Tumour DNA content as a prognostic indicador in squamous cell carcinoma of head in neck region.* Proc Am Soc Clin Clin 7:149-53, 1988. (abstract).
- 19 - KOSS, L. G. et al. - *Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumours.* Hum Pathol, 20:528-48, 1989.
- 20 - I.OCHRIN, C. A. et al. - *Tumour cell kinetics, local tumor control, and accelerated radiotherapy: a preliminary report.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 24:87-91, 1992.
- 21 - NYLANDER, K. et al. - *Cell kinetics of head and neck squamous cell carcinoma.* Acta Oncol, 33: 23-8, 1994.
- 22 - SICKLE-SANTANELLO, B. J. et al. - *Flow cytometry as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the tongue.* Am J Surg, 152:393-5, 1986.