SAMUEL AGUIAR JUNIOR

**Valor prognóstico e preditivo da expressão
imunohistoquímica de timidilato sintase em pacientes
portadores de adenocarcinoma colorretal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

SÃO PAULO

2004

Ao **Tiago**, por transformar sacrifícios em felicidade.

AGRADECIMENTOS

À **Amanda**, minha esposa, pela paciência e apoio incondicionais, justificados apenas por amor verdadeiro.

Aos **meus pais** e à **minha irmã**, por me proporcionarem condições e ambiente favoráveis em minha formação não só profissional, mas acima de tudo, pessoal.

Ao **Dr. Ademar Lopes**, muito mais que pela orientação, mas por me permitir o privilégio de acompanhá-lo como discípulo.

Aos amigos do dia a dia, **Benedito Mauro Rossi**, **Fábio de Oliveira Ferreira**, **Gustavo Cardoso Guimarães** e **Wilson Toshihiko Nakagawa**, pelas orientações e pela ajuda na difícil conciliação entre atividades médicas assistenciais e acadêmicas.

Ao **Dr. Fernando Augusto Soares (FAS)**, pelo minucioso e preciso trabalho de análise de todas as lâminas.

Ao **Dr. André Lopes Carvalho**, pela imprescindível ajuda na análise estatística.

À **Dra. Alessandra Carvalho Goulart**, pelas contribuições estatísticas e pelas coberturas de plantões durante a confecção desta dissertação.

À **Sra. Elizângela Nivardo Dias**, sentinela incansável dos pós-graduandos da Disciplina de Oncologia.

À **Srta. Sueli Nonogaki** e **Sra. Miyuki Fukuda da Silva**, do Instituto Ludwig, pelo preparo das lâminas.

À **Srta. Suely Francisco** e **Sra. Rosineia Aguiar Carneiro**, pela ajuda no levantamento bibliográfico.

À **Sra. Hirde Contesini**, pela ajuda no levantamento dos dados no Serviço de Arquivo Médico (SAME).

Aos **Drs. Marcelo Bandeira Coelho Dias**, **Luiz Cláudio Lopes Chaves**, **Paulo Cardoso Soares** e **Victor Moutinho da Conceição**, por terem incentivado, na graduação, meu ingresso na Oncologia e na Metodologia Científica.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	16
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1 TIPO DE ESTUDO	17
3.2 MÉTODOS	17
3.2.1 COLETA DE DADOS	17
3.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	17
3.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	18
3.2.4 VARIÁVEIS COLETADAS	18
3.2.4 DETERMINAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE TIMIDILATO SINTASE	23
3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
3.3 CASUÍSTICA	27
3.3.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	27
3.3.2 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	28
3.3.3 DADOS DE ANATOMIA PATOLÓGICA	29
3.3.4 DADOS DO SEGUIMENTO	32

4.	RESULTADOS	33
4.1	TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS	33
4.2	SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA	39
4.2.1	ANÁLISE DA AMOSTRA TOTAL	39
4.2.2	ANÁLISE DOS SUBGRUPOS	41
4.3	SOBREVIDA GLOBAL	46
4.3.1	ANÁLISE DA AMOSTRA TOTAL	46
4.3.2	ANÁLISE DOS SUBGRUPOS	48
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÕES	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

AGUIAR JR., S. Valor prognóstico e preditivo da expressão imunoistoquímica de timidilato sintase em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal. São Paulo, 2003. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: Preconiza-se o emprego de quimioterapia pós-operatória baseada em 5-fluorouracil para pacientes portadores de carcinoma colorretal que apresentem fatores de alto risco para recidiva e óbito pela doença. Apesar dos critérios conhecidos para indicação de tratamento adjuvante, muitos pacientes recaem a despeito do tratamento combinado, enquanto outros são curados com cirurgia exclusiva. A timidilato sintase (TS) é a enzima-alvo do 5-fluorouracil e o aumento de sua expressão está associado à resistência a esta droga em tumores metastáticos. Por outro lado, parece selecionar pacientes que são beneficiados pelo uso de fluoropirimidina de forma adjuvante. Nosso objetivo é estudar a expressão de timidilato sintase como fator preditivo para a eficácia de quimioterapia adjuvante e determinar seu valor prognóstico para a sobrevida em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal de alto risco. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo retrospectivo que avalia uma série de 114 indivíduos portadores de adenocarcinoma colorretal estágio II com fatores de alto risco ou estágio III. Foram distribuídos em dois grupos que receberam tratamentos diferentes: 1) cirurgia

exclusiva (61 pacientes); 2) cirurgia seguida de quimioterapia com 5-fluorouracil combinado com ácido folínico ou levamisole (53 pacientes). A expressão de timidilato sintase foi determinada por imunoistoquímica em tecido tumoral, estocado em parafina. RESULTADOS: No subgrupo tratado com cirurgia exclusiva, a sobrevida livre de doença em cinco anos foi de 68,7% para os pacientes com baixa expressão de TS contra 51,1% para os pacientes com alta expressão ($p=0,028$). No subgrupo de pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia, a sobrevida livre de doença em cinco anos entre os pacientes com alta expressão intratumoral de TS foi de 79,1%, comparada a 58,5% para os pacientes com baixa expressão ($p=0,098$). Observamos que, entre os pacientes com baixa expressão de TS, não houve diferença de sobrevida livre de doença em função da realização ou não de quimioterapia pós-operatória (58,5% *versus* 68,7%; $p=0,145$). Entre os pacientes com alta expressão de TS, houve ganho significativo de sobrevida a favor da realização de quimioterapia (79,1% *versus* 51,1%; $p=0,029$). Observaram-se resultados semelhantes para sobrevida global. Analisando-se a amostra total, a expressão de TS não se revelou um fator prognóstico independente para sobrevida global ou livre de doença. Na análise multivariada, o único fator identificado como independente para risco de óbito foi a presença de embolização linfática (RR: 2,20; IC 95%: 1,10-4,38). CONCLUSÕES: A expressão imunoistoquímica de TS pode selecionar pacientes que se beneficiem de tratamento adjuvante com quimioterapia, já que houve ganho significativo de sobrevida livre de doença e global com o emprego de quimioterapia pós-operatória no subgrupo de pacientes com alta expressão intratumoral de TS, na análise univariada; na análise multivariada, a presença de embolização linfática se apresentou como único fator adverso independente para risco de recidiva e óbito.

SUMMARY

AGUIAR JR., S. Prognostic and predictive value of the immunohistochemical expression of thymidylate synthase in patients with colorectal carcinoma. São Paulo, 2003. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUCTION: The use of post-operative chemotherapy based on 5-fluorouracil (5-FU) is preconized for patients with colorectal adenocarcinoma that show high risk factors of recurrence and death. Notwithstanding the known criteria for indicating adjuvant treatment, many patients suffer recurrence in spite of the combined treatment, while others may be cured with surgery alone. Thymidylate synthase (TS) is the target enzyme of 5-FU and its increased expression is associated with resistance to this drug in metastatic tumors; however it appears to select patients that are favored by the adjuvant use of fluoropyrimidine. In this study, we tried to assess the value of TS expression as a predictive factor in the efficacy of adjuvant chemotherapy in high risk colorectal cancer, as well as its independent prognostic value for survival. **CASUISTIC AND METHODS:** It deals with a retrospective study that assesses a series of 114 individuals with high risk colorectal cancer, distributed into two groups that received different treatments: 1)surgery alone (61 patients); 2)surgery followed by chemotherapy with 5-FU combined with folinic acid or levamisole (53 patients). TS expression was determined by immunohistochemistry

in tumoral tissue stored in paraffin. RESULTS: In the subgroup treated with surgery alone, 5-year disease free survival was 68.7% for the patients with low TS expression against 51.1% for the patients with high expression ($p=0.028$). In the subgroup treated with surgery followed by chemotherapy, 5-year disease free survival among the patients with high intratumoral TS expression was 79.1% compared to 58.5% for the patients with low expression ($p=0.098$). It was observed that among patients with low TS expression, there was no difference in disease free survival as a result of whether or not post-operative chemotherapy was carried out (58.5% *versus* 68.7%; $p=0.145$). Among the patients with high TS expression there was a significant gain of survival in favor of carrying out chemotherapy (79.1% *versus* 51.1%; $p=0.029$). The same trends were observed for overall survival. Analyzing the complete sample, TS expression was not shown as an independent prognostic factor for disease free or overall survival. The only factor identified in the multivariate analysis as independent for the risk of recurrence or death was the presence of lymphatic embolization (RR: 2.20; 95% CI: 1.10 – 4.38). CONCLUSIONS: The immunohistochemical TS expression may select patients that benefit from adjuvant treatment with chemotherapy; in this sample, TS expression was not an independent prognostic factor for survival.

1 - INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto é a terceira neoplasia mais incidente no mundo (Parkin, 2000) e é a segunda causa de morte por câncer nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2003). No Brasil, as taxas brutas de incidência estimadas para 2003 são de 10,96 casos novos / 100.000 homens e 11,73 casos novos / 100.000 mulheres, esperando-se que cerca de 3.700 homens e 4.270 mulheres morram em decorrência da doença neste ano (Instituto Nacional do Câncer, 2003).

A sobrevida esperada em cinco anos, considerando-se todos os estádios, atualmente gira em torno de 62% (Surveillance Epidemiology & End Results, 2003). A sobrevida é influenciada principalmente pelo comprometimento linfonodal e pela profundidade de infiltração da neoplasia na parede intestinal (Freitas *et al.*, 1997, Gelb; Schrock, 1997, Ratto *et al.*, 1998, Compton *et al.*, 2000). Estes fatores são classificados no sistema TNM de estadiamento e são, até agora, os únicos elementos que norteiam a indicação de tratamento adjuvante, fora de ensaios clínicos (Greene *et al.*, 2002, National Institute of Health, 1990).

O tratamento do câncer colorretal é multidisciplinar, mas tem a cirurgia como modalidade mais importante quando a intenção do tratamento é curativa (Nelson *et al.*, 2001). A ressecção considerada ideal para tumores do cólon consiste

na retirada do segmento acometido com margem proximal e distal mínima de 5 cm, em monobloco com a cadeia linfática regional, limitada pela origem do tronco arterial daquele segmento (Nelson *et al.*, 2001).

Para tumores do reto, considera-se ideal a ressecção que obtém margem distal mínima de 2 cm, com excisão total do mesorreto e ligadura na origem da artéria retal superior (Nelson *et al.*, 2001). Em tumores localmente avançados, aderidos a outros órgãos ou estruturas adjacentes, deve-se realizar ressecção ampliada, em monobloco com a estrutura aderida (Vieira, 1999, Nelson *et al.*, 2001).

O tratamento adjuvante é empregado quando o tratamento cirúrgico tem caráter curativo e visa a minimizar os riscos de recaída local e à distância. As modalidades de tratamento adjuvante recomendadas são a quimioterapia, em tumores do cólon e do reto, e a radioterapia, em tumores do reto.

Recomenda-se a radioterapia adjuvante em câncer de reto nos tumores que acometem a gordura perirretal (T3), que infiltram uma estrutura adjacente (T4) ou que apresentam linfonodos comprometidos (NIH, 1990). Empregada antes ou depois da cirurgia, a radioterapia diminui significativamente as taxas de recidiva local, mas o ganho em sobrevida global é apenas discreto (Camma *et al.*, 2000, Colorectal Cancer Collaborative Group, 2001).

O emprego de quimioterapia adjuvante em câncer colorretal se baseou, desde o início, no uso de fluoropirimidinas, especialmente o 5-fluorouracil (5-FU) (Kemeny *et al.*, 1997, Ragnhammar *et al.*, 2001).

Diante da falha dos primeiros estudos em demonstrar benefício com uso de 5-FU isolado, iniciou-se, a partir da década de 70 do século passado, uma fase em que alguns ensaios clínicos passaram a empregar o 5-FU em combinação com um

agente alquilante, a metil-cloro-etil-ciclo-hexil-nitrosuréia (metil-CCNU ou semustine) (Kemeny *et al.*, 1997, Ragnhammar *et al.*, 2001). Dentre estes trabalhos, destaca-se o estudo conduzido pelo National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP), que randomizou 1166 pacientes com carcinoma de cólon em três braços: cirurgia isolada; cirurgia seguida de quimioterapia com 5-FU, semustine e vincristina (MOF); cirurgia seguida de imunoterapia com BCG. Este estudo demonstrou haver benefício significativo no grupo tratado com quimioterapia, em comparação com o grupo tratado por cirurgia exclusiva (67% em cinco anos *versus* 59%, $p=0,05$) (Wolmark *et al.*, 1988). Apesar dos resultados obtidos, a combinação com semustine foi limitada em razão de seu conhecido potencial carcinogênico, particularmente para leucemias (Boice *et al.*, 1983).

Na evolução do tratamento adjuvante do câncer colorretal, iniciou-se uma nova fase na década de 80, a partir de relatos de séries que empregaram um anti-helmíntico, o levamisole, em carcinoma colorretal metastático. Apesar de sua eficácia não ter sido confirmada como terapêutica isolada, o levamisole passou a ser utilizado em combinação com 5-FU em alguns ensaios clínicos bem delineados nessa época, baseados em seu efeito imunomodulador (Kemeny, 1997, Moore; Haller, 1999).

Em 1989, publicaram-se os resultados de um estudo conduzido pelo North Central Cancer Therapy Group (NCCTG) e pela Clínica Mayo (Laurie *et al.*, 1989). Este estudo envolveu 401 pacientes portadores de carcinoma de cólon e reto com estádios II ou III, operados e randomizados para: cirurgia exclusiva; cirurgia seguida de quimioterapia com 5-FU mais levamisole; ou cirurgia seguida apenas de levamisole. Após o seguimento por um período mediano de seguimento de sete anos,

observou-se diminuição nas taxas de recaída no grupo tratado com 5-FU mais levamisole, em comparação com o grupo sem tratamento adjuvante ($p < 0,003$), mas constatou-se diferença significativa na sobrevida global apenas no subgrupo com doença em estágio III.

A divulgação dos resultados preliminares do estudo anterior estimulou o início de um ensaio em maior escala, conduzido por um intergrupo nacional nos Estados Unidos, que envolveu 1296 pacientes com carcinoma de cólon, dentre os quais 929 em estágio III. O tratamento combinado (cirurgia seguida de 5-FU mais levamisole) reduziu o risco de recidiva em 41% ($p < 0,001$) e o de óbito em 31% ($p = 0,006$) nos pacientes em estágio III. Não se observou vantagem decorrente de tratamento adjuvante entre os pacientes em estágio II (Moertel *et al.*, 1990).

Os resultados dos dois referidos estudos foram determinantes para levar o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), em uma reunião de consenso realizada em 1990, a recomendar o emprego de quimioterapia adjuvante com 5-FU mais levamisole durante um ano como tratamento padrão para câncer de cólon estágio III (NIH, 1990).

A partir deste consenso, protocolos que envolvessem um braço controle sem tratamento adjuvante para estágio III seriam considerados inapropriados (NIH, 1990). Alguns ensaios clínicos foram interrompidos, mas outros estudos que testavam a eficácia de outro modulador para o 5-FU, em comparação com a cirurgia exclusiva, já haviam sido encerrados e foram publicados posteriormente. Este modulador seria o ácido folínico (leucovorin).

Um estudo italiano randomizou 239 pacientes com câncer de cólon, estágio II ou III, para cirurgia exclusiva ou para quimioterapia pós-operatória com 5-FU

mais leucovorin por um ano (Francini, 1994). No subgrupo com doença em estágio III, houve significativa melhora na sobrevida livre de doença ($p=0,0016$) e na sobrevida global ($p=0,0025$), a favor do braço submetido a tratamento adjuvante.

Uma análise combinada de três estudos prospectivos, randomizados e multicêntricos (Itália, Canadá e França), que usaram os mesmos esquemas de tratamento (5-FU mais leucovorin em alta dose _ 370 a 400 mg/m² _ por seis meses) envolveu 1493 pacientes (IMPACT, 1995). No grupo tratado, houve redução nas taxas de recidiva em 35% ($p<0,0001$) e na mortalidade, em 22% ($p=0,029$).

Nos Estados Unidos, o North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) publicou os resultados de um ensaio randomizado utilizando 5-FU mais ácido folínico em baixa dose (20 mg/m²) por seis meses, comparando com um grupo controle sem tratamento adjuvante (O'connell *et al.*, 1997), sendo que 317 pacientes com carcinoma de cólon estádios III ou II de alto risco entraram no protocolo. Os autores observaram ganho significativo de sobrevida ($p=0,02$) a favor do grupo tratado.

Tais estudos sugeriam equivalência entre as duas formas de tratamento combinado (5-FU com levamisole ou 5-FU com leucovorin), quando comparadas com grupos controle sem tratamento adjuvante. Restava testar diretamente as duas modalidades.

Um ensaio conduzido pela Clínica Mayo e pelo NCCTG, tendo por objetivo avaliar a eficácia da combinação de 5-FU mais leucovorin mais levamisole em comparação com o regime clássico de 5-FU mais levamisole, recrutou 915 pacientes com carcinoma de cólon estádios III e II de alto risco, dentre os quais 891 foram elegíveis para o protocolo (O'connell *et al.*, 1998). Como também tinha por

objetivo comparar o regime de 12 meses com um regime de seis meses, este estudo previa a randomização para quatro braços. Com um seguimento mediano de cinco anos, não se observou diferença entre o esquema com seis meses e aquele com um ano. A mortalidade foi menor no grupo tratado com fluorouracil mais leucovorin mais levamisole por seis meses e foi maior no grupo tratado com fluorouracil mais levamisole por seis meses.

O NSABP também conduziu um estudo prospectivo e randomizado com intenção de comparar os esquemas com 5-FU mais leucovorin, com 5-FU mais levamisole e com 5-FU mais leucovorin mais levamisole, tendo seus resultados publicados em 1999 (Wolmark *et al.*, 1999). Dois mil cento e cinqüenta e um pacientes com carcinoma de cólon estádios II e III foram randomizados para três braços e seguidos por um período mediano de 86 meses. Observou-se uma discreta vantagem de sobrevida livre de doença em cinco anos (65% *versus* 60%, $p=0,04$) a favor da combinação 5-FU / leucovorin, comparada com a combinação 5-FU / levamisole; porém, a diferença de sobrevida global não foi significativa (74% *versus* 70%, $p=0,07$). A adição de levamisole à combinação 5-FU / leucovorin não acrescentou benefício.

A combinação destes estudos demonstra que os esquemas de tratamento adjuvante que utilizam 5-FU com leucovorin durante seis meses são tão eficazes quanto o esquema recomendado pelo consenso do NIH, em 1990 (5-FU mais levamisole por doze meses). O esquema com 5-FU e leucovorin semanal (leucovorin em alta dose) ou mensal (leucovorin em baixa dose), durante seis meses, é a recomendação atual para uso rotineiro em tratamento adjuvante de câncer colorretal, estágio III (Moore; Haller, 1999, Ragnhammar *et al.*, 2001).

A indicação de tratamento adjuvante em pacientes com câncer no estágio II permanece controversa. Vários dos estudos já citados demonstraram benefício do tratamento adjuvante apenas nas análises de subgrupo para o estágio III (Laurie *et al.*, 1989, Moertel *et al.*, 1990, Francini *et al.*, 1994).

O NSABP, com o objetivo de avaliar o benefício da quimioterapia adjuvante para o estágio II, analisou conjuntamente os resultados de quatro estudos prospectivos e randomizados, conduzidos pelo grupo entre 1977 e 1990, em que os critérios de inclusão e o tempo de seguimento foram similares. Nos quatro estudos, 41% dos pacientes elegíveis tinham doença em estágio II. Nesta análise, os benefícios observados com o tratamento adjuvante foram independentes do estágio clínico e os autores recomendaram o emprego de tratamento adjuvante em estágio II, sem considerar a presença ou ausência de outros fatores prognósticos (Mamounas *et al.*, 1999).

As elevadas taxas de sobrevida observadas em pacientes em estágio II, com um número mais reduzido de eventos em relação ao estágio III, dificultam a interpretação dos resultados, para o que se necessita de amostras maiores e seguimento mais longo.

O estágio II constitui um subgrupo ainda heterogêneo no que diz respeito a prognóstico e alguns autores preconizam uma melhor estratificação (Chapuis *et al.*, 1986, Gelb; Schrock, 1997). A versão mais recente do TNM (sexta edição) já traz modificações neste sentido, separando os tumores T3 (estágio IIA) dos tumores T4 (estágio IIB) (Greene *et al.*, 2002).

Após uma reunião de consenso sobre fatores prognósticos em câncer colorretal realizada em 1999, o American Joint Committee on Cancer (AJCC)

estratificou fatores anatomopatológicos e moleculares já estudados em câncer colorretal em cinco categorias, propostas pelo Colégio Americano de Patologistas de acordo com a qualidade dos estudos publicados (Compton *et al.*, 2000a; Compton *et al.*, 2000b). A categoria I agrupa fatores bem validados em estudos de boa qualidade, já utilizados na prática clínica para nortear condutas e candidatos a uma possível incorporação ao TNM. A categoria IIA reúne fatores extensamente investigados e com valor prognóstico suficiente para serem descritos nos laudos anatomopatológicos. Na categoria IIB, encontram-se fatores bem estudados, mas não o suficiente para serem estabelecidos nas categorias I ou IIA. A categoria III agrupa fatores ainda pouco estudados. Na categoria IV, estão os fatores largamente investigados e que, definitivamente, não demonstraram significado prognóstico. Nas categorias I e IIA, encontram-se a dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA), o grau histológico, a invasão vascular linfática e a invasão perineural. Estes fatores auxiliam na seleção de pacientes candidatos a protocolos de tratamento adjuvante e foram utilizados, neste estudo, para a definição de grupos de alto risco para recidiva e óbito dentre os pacientes com doença em estágio II.

Deve-se considerar que cerca de 70 a 80 % dos pacientes em estágio II podem ser curados apenas com cirurgia. Quanto a este aspecto, observamos a incapacidade atual em identificar o pequeno subgrupo de pacientes que é beneficiado com tratamento complementar, particularmente quimioterapia sistêmica baseada em fluorouracil.

Por outro lado, a despeito do tratamento multidisciplinar e dos benefícios alcançados com a evolução dos tratamentos adjuvantes, cerca de 20 a 35 % dos

pacientes tratados com doença em estágio III vêm a falecer por recidiva tumoral. Considerando-se o tratamento cirúrgico adequado e o emprego de terapêutica sistêmica adjuvante, as recidivas provavelmente ocorrem porque estes tumores já possuem, intrinsecamente, características biomoleculares que lhes conferem resistência ao agente quimioterápico empregado (5-fluorouracil).

A compreensão dos possíveis mecanismos de resistência ao 5-FU exige o conhecimento dos próprios mecanismos de ação das fluoropirimidinas.

Introduzido na década de 50, o 5-fluorouracil foi sintetizado com base em um racional especificamente direcionado para a bioquímica tumoral, a partir das observações experimentais de que células neoplásicas utilizavam uracila para síntese de ácido nucléico com mais avidéz do que células normais (Heidelberger *et al.*, 1957, Diasio; Harris, 1989). O objetivo foi sintetizar um análogo de base pirimídica com propriedades físico-químicas similares às da uracila, resultando em um potente antimetabólito que interferisse na síntese de ácido nucléico e, conseqüentemente, no crescimento tumoral (Heidelberger *et al.*, 1957, Diasio; Harris, 1989).

A atividade do 5-FU ocorre somente após sua metabolização intracelular para nucleotídeos citotóxicos, como o 5-fluoro-uridina-5'-trifosfato (FUTP), o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) e o 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003). As vias de anabolismo envolvem as mesmas enzimas e substratos da síntese *de novo* de uracila (Diasio; Harris, 1989) e estão ilustradas na figura 1. Estes três nucleotídeos atuam em três mecanismos diferentes de citotoxicidade: 1) o FUTP substitui a UTP, incorpora-se e causa dano ao RNA; 2) o FdUDP, após a ação de DNA polimerase, substitui a timidina-5'-trifosfato (dTTP) e incorpora-se ao DNA;

3) o FdUMP inibe a atividade da timidilato sintase (TS) (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003).

Mais de 80% do 5-FU é catabolizado no fígado após sua administração em um metabólito inativo, o dihidro-fluorouracil (DHFU), por uma enzima chamada dihidropirimidina-dehidrogenase (DPD) (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003), (figura 1).

Vias metabólicas do 5-FU

FIGURA 1. Vias de metabolização do 5-FU. DHFU: dihidro-fluorouracil. DPD: dihidro-pirimidina-desidrogenase. FUr d: fluoxuridina. FUMP: fluoro-uridina-monofosfato. FUDP: fluoro-uridina-difosfato. FUTP: fluoro-uridina-trifosfato. FdUMP: fluoro-deoxi-uridina-monofosfato.

Dentre as três vias de ação do 5-FU, ainda não se esclareceu bem qual é a principal; porém, a que tem sido melhor estudada é a inibição da atividade da

timidilato sintase (TS). A figura 2 esquematiza os três principais mecanismos de ação do 5-FU.

FIGURA 2. Mecanismos de ação do 5-FU: bloqueio de síntese de RNA; bloqueio de síntese de DNA; inibição de atividade de timidilato sintase.

A TS é uma proteína de aproximadamente 36 kDa e que catalisa a metilação redutiva de deoxiuridina-monofosfato (dUMP) para deoxitimidina-monofosfato (dTMP), fornecendo timidina para síntese de DNA (Carreras; Santi, 1995). A reação utiliza um folato reduzido como doador de metil, o 5,10-metilenotetraidrofolato (CH_2THF). A TS atua como dímero e cada subunidade contém um sítio de ligação ao nucleotídeo e um sítio de ligação ao co-fator folato, formando um complexo covalente ternário (Carreras; Santi, 1995). O FdUMP, um dos metabólitos ativos do 5-FU, tem maior afinidade pelo sítio de ligação da TS do que o substrato natural dUMP e, ao se ligar à enzima, inibe sua atividade, bloqueando a síntese de

dTMP e, conseqüentemente, o fornecimento de timidina. Para haver efeito inibitório sobre a atividade da TS, é necessária a formação do complexo ternário entre FdUMP, TS e CH_2THF (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003), (figura 3). Portanto, concentrações intracelulares elevadas de folato são necessárias para se manter a formação de complexos estáveis. Este é o racional da modulação do 5-FU pelo ácido folínico (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003).

FIGURA 3. Inibição da atividade da timidilato sintase pelo FdUMP (metabólito ativo do 5-FU) e conseqüente bloqueio da produção de timidina (dTTP) para síntese de DNA.

Múltiplos fatores podem explicar mecanismos de resistência ao 5-FU: deficiências nas vias anabólicas, reduzindo a metabolização para os nucleotídeos ativos; aumento do catabolismo, possivelmente através de elevação dos níveis de

DPD; ou aumento da expressão de TS (Pinedo; Peters, 1988, Diasio; Harris, 1989, Longley *et al.*, 2003).

Johnston *et al.* (1992) demonstraram que linhagens celulares resistentes ao 5-FU apresentavam significativo aumento da expressão de TS, analisada por quantificação imunológica (Western blot e imunofluorescência).

Outro ensaio experimental comparou a atividade enzimática de TS, assim como sua expressão de RNA e DNA, em linhagens celulares de câncer de cólon sensíveis ao 5-FU com linhagens resistentes. Este estudo observou um aumento expressivo tanto da atividade enzimática como da expressão de RNA e DNA (ensaios de Northern e Southern blot) nas culturas resistentes, demonstrando amplificação do gene da TS em células tumorais resistentes ao 5-FU (Copur *et al.*, 1995).

Estudos clínicos também demonstraram correlação entre a expressão de TS e a resposta à quimioterapia com 5-FU em doença avançada.

Leichman *et al.* (1997) avaliaram, prospectivamente, a expressão intratumoral do RNAm de TS através de reação em cadeia da polimerase (PCR), em quarenta e seis pacientes com câncer colorretal disseminado, tratados com 5-FU e leucovorin em infusão contínua. Houve correlação inversa ($p=0,001$) entre a quantificação intratumoral de RNAm de TS e a resposta à quimioterapia, com melhor sobrevida ($p=0,02$) para os pacientes com determinação de RNAm de TS abaixo da mediana da amostra ($3,5 \times 10^{-3}$).

Um outro estudo italiano também demonstrou significativa correlação entre a expressão intratumoral de TS e a resposta à quimioterapia com 5-FU em doença metastática, avaliando, agora, a expressão de TS por imunoistoquímica em 48

pacientes. Neste estudo, a taxa de resposta entre os pacientes com baixa expressão de TS foi de 67%, contra 24% nos pacientes com alta expressão ($p=0,003$), com repercussão significativa na sobrevida em dois anos ($p=0,02$) (Aschele *et al.*, 1999).

A expressão de TS também foi fator preditivo de resposta à quimioterapia intra-arterial hepática no tratamento de metástases, onde as taxas de resposta foram inversamente proporcionais aos níveis de RNAm quantificados por PCR (Peters *et al.*, 1994, Kornman *et al.*, 1997).

Resumidamente, os estudos citados demonstram que, em câncer colorretal avançado (metastático), a alta expressão de TS confere resistência à quimioterapia adjuvante com 5-FU (piores taxas de resposta) e pior sobrevida.

Alguns estudos se propuseram a avaliar o papel da TS em câncer colorretal localizado, tanto como fator prognóstico para sobrevida como fator preditivo de eficácia da quimioterapia adjuvante.

O primeiro destes estudos avaliou, retrospectivamente, um subgrupo (câncer de reto em estádios II e III) de um protocolo do NSABP para tratamento adjuvante que previa três braços: cirurgia exclusiva; cirurgia mais radioterapia; cirurgia mais quimioterapia adjuvante com esquema MOF. A expressão imunoistoquímica intratumoral de TS foi avaliada em 294 pacientes como fator prognóstico e em 194 pacientes como fator preditivo de eficácia da quimioterapia adjuvante. A sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram significativamente piores para os pacientes com expressão elevada ($p<0,01$). Entre os pacientes com baixa expressão de TS, não houve diferença de sobrevida livre de doença e global em função do emprego de quimioterapia adjuvante. No subgrupo com alta expressão, a sobrevida global em cinco anos foi de 31% no braço randomizado para cirurgia

exclusiva contra 54% no grupo tratado com quimioterapia adjuvante ($p<0,01$) (Johnston *et al.*, 1994).

Apesar de contraditórios, tais resultados foram reproduzidos em outros estudos retrospectivos, onde os pacientes que parecem ter-se beneficiado com quimioterapia adjuvante baseada em 5-FU foram os que apresentavam alta expressão tumoral de TS (Takenoue *et al.*, 2000, Edler *et al.*, 2002).

Um estudo mais recente, também retrospectivo, não conseguiu demonstrar associação da expressão de TS com sobrevida ou com eficácia da quimioterapia adjuvante (Allegra *et al.*, 2002).

Em concordância com revisões publicadas mais recentemente sobre o assunto (Van Triest; Peters, 1999, Allegra, 2003, Bertino; Banerjee, 2003), consideramos que o papel da expressão da TS como fator preditivo de eficácia da quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil em pacientes portadores de adenocarcinoma de cólon ou reto não metastático ainda é controverso, justificando a realização de um estudo voltado para esta investigação.

2 – OBJETIVOS

2.1- Avaliar o papel da expressão intratumoral de timidilato sintase em carcinoma de cólon e reto, em estádios II de alto risco e III, como fator preditivo para a eficácia da quimioterapia adjuvante baseada em 5-fluorouracil.

2.2- Avaliar o papel da expressão intratumoral de timidilato sintase em carcinoma de cólon e reto, em estádios II de alto risco e III, como fator prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global.

3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo longitudinal.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- COLETA DE DADOS

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

3.2.2- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

- a) confirmação de adenocarcinoma de cólon ou reto;
- b) estadiamento patológico (pTNM) III ou;
- c) estadiamento patológico (pTNM) II considerado de alto risco, definido pela presença de pelo menos um dos seguintes fatores:

- pT4,
- CEA pré-operatório maior que 5 ng/mL,
- grau de diferenciação II (moderadamente diferenciado) ou III (pouco diferenciado),
- presença de embolização linfática,
- presença de invasão perineural,

d) disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunoistoquímico.

3.2.2- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes que:

- a) receberam tratamento cirúrgico ou quimioterápico em outra instituição;
- b) receberam tratamento pré-operatório, no caso de tumores do reto;
- c) apresentavam comorbidades que contra-indicassem quimioterapia adjuvante;
- d) desenvolveram segunda neoplasia primária cinco anos antes ou até cinco anos após o diagnóstico do câncer colorretal, excetuando-se neoplasias de pele não-melanoma.

3.2.3- VARIÁVEIS COLETADAS

As variáveis coletadas com a finalidade de descrição da amostra ou para correlação com a expressão de TS, recidiva e óbito foram as abaixo indicadas.

- a) Variáveis demográficas e clínicas, compreendendo os itens apresentados a seguir.

- Idade: agrupada em duas categorias (maior que 65 anos e menor ou igual a 65 anos).
 - Sexo: masculino ou feminino.
 - Localização: cólon ou reto. Definida pela descrição do exame endoscópico anotado no prontuário médico. Para fins de planejamento cirúrgico, considera-se reto o segmento até 12 cm da margem anal (Nelson *et al.*, 2001).
 - Tipo de cirurgia: ressecções segmentares clássicas e ressecções ampliadas. Definiu-se como ressecção ampliada a retirada do órgão acometido (segmento de cólon ou reto), em monobloco com outros órgãos ou estruturas adjacentes aderidos ao tumor.
 - Esquema de quimioterapia adjuvante empregado: esquema 1 (5-FU + ácido folínico): 5-fluorouracil ($425 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$) por cinco dias associado a ácido folínico ($20 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$) por cinco dias, repetindo a cada quatro semanas, até completar seis ciclos. Esquema 2 (5-FU + levamisole): 5-fluorouracil ($450 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$) por cinco dias, seguido quatro semanas após por: 5-FU ($425 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$) semanalmente (48 semanas) associado a levamisole ($150 \text{ mg}/\text{dia}$) por três dias consecutivos, a cada duas semanas.
 - Realização de radioterapia pós-operatória nos tumores de reto: sim ou não.
 - Nível sérico pré-operatório do antígeno carcinoembrionário (CEA): variável obtida a partir das anotações nos prontuários médicos.
- b) Variáveis anatomopatológicas, compreendendo os itens abaixo.

- Estadiamento TNM: utilizou-se a classificação TNM com base nos dados obtidos dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos. A classificação foi feita de acordo com a última edição do TNM, proposta pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Greene *et al.*, 2002). Os quadros 1 e 2 abaixo descrevem esta classificação.

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TNM PARA TUMORES DE CÓLON E RETO – 2002

Tx	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência de tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor ultrapassa a muscular própria até a subserosa ou invade gordura pericólica (segmentos não peritonizados)
T4	Tumor invade outros órgãos ou estruturas e/ou perfura o peritônio visceral
Nx	Linfonodos regionais não avaliáveis
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Metástases em 1 até 3 linfonodos
N2	Metástases em 4 ou mais linfonodos
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância

QUADRO 2 – AGRUPAMENTO DA CLASSIFICAÇÃO TNM POR ESTÁDIOS – 2002.

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
IIIB	T3-T4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

- Grau de diferenciação: utilizou-se a classificação padronizada no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, que segue a classificação preconizada por Broders (1925), adaptada para três categorias: grau 1: bem diferenciado; grau 2: moderadamente diferenciado; grau 3: pouco diferenciado. Para fins de análise estatística, como o número de casos com tumores pouco diferenciados foi muito pequeno, optamos por agrupar os graus 2 e 3 em uma única categoria. Esta variável foi obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.

- Invasão perineural: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos.

- Invasão vascular linfática: presença ou ausência. Variável obtida por revisão de todas as lâminas, coradas em hematoxilina-eosina. Foi considerada

presente quando células neoplásicas livres ou agrupadas foram encontradas em lúmen vascular de paredes delgadas, revestidas por células endoteliais desprovidas de fibras musculares lisas ou de hemáceas no seu lúmen. Em geral, estes vasos são encontrados próximos a arteríolas ou vênulas. Todas as lâminas foram revistas por um único patologista.

- Determinação da expressão de timidilato sintase: baixa expressão ou alta expressão. Determinada pela expressão do anticorpo monoclonal TS-106 por imunistoquímica.

3.2.4- DETERMINAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE TIMIDILATO SINTASE

Os blocos de parafina contendo fragmentos de tumor foram pesquisados no Serviço de Arquivo de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C.Camargo e encaminhados para a realização de reação imunistoquímica no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Ludwig.

A pesquisa do antígeno da TS foi realizada pela técnica estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). O anticorpo primário utilizado foi proveniente da firma Chemicon (clone TS 106, código MAB-4130). Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura (ALVES et al, 1999).

Em resumo, as lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS-Sigma® A3648), diluído a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol, sendo submetidos à

recuperação antigênica pelo calor com panela de pressão, utilizando-se tampão citrato. Uma vez preparados os cortes, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, seguido pela incubação *overnight* do anticorpo indicado anteriormente, diluído em título pré-estabelecido de 1:100. As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]) a 60 mg% e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck[®]).

As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo, através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

A coloração pelo anticorpo produz um padrão citoplasmático granular.

Todas as lâminas foram lidas por um único patologista (F.A.S.).

A expressão de TS foi interpretada segundo a técnica padronizada por Johnston *et al.* (1994). De acordo com esta padronização, a intensidade da coloração do anticorpo foi visualmente graduada em valores de 0 (sem coloração) a 3 (intensidade mais forte de coloração). Os valores de 0 e 1 foram agrupados como baixa expressão (figura 4) e os valores de 2 e 3 foram agrupados como alta expressão (figura 5).

FIGURA 4. Exemplo de tumor exibindo baixa expressão do anticorpo para a proteína timidilato sintase.

FIGURA 5. Exemplo de tumor exibindo alta expressão do anticorpo para a proteína timidilato sintase.

Inicialmente, classificaram-se tumores com coloração do anticorpo em menos de 25% da amostra como expressão focal e em mais de 25%, como expressão difusa. Como apenas três tumores com alta expressão de TS apresentaram o padrão focal de distribuição, passou-se a considerar apenas a maior intensidade de coloração encontrada em um tumor para sua classificação. Assim, mesmo que uma área de alta intensidade constituísse apenas uma pequena parte da área tumoral estudada (expressão focal), o tumor foi classificado como de alta expressão.

3.2.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “SPSS 8.0 for Windows”.

A variável de interesse foi a expressão imunoistoquímica de TS. As variáveis de controle foram: realização ou não de quimioterapia adjuvante; idade; sexo; estágio clínico (EC); embolização vascular linfática (EVL); invasão perineural (IPN); grau de diferenciação histológica e radioterapia pós-operatória.

Como o nível sérico de CEA pré-operatório não estava disponível no prontuário de 49 pacientes, esta variável não foi considerada no estudo.

Inicialmente, foram calculadas as frequências simples de todas as variáveis.

As associações entre as variáveis foram analisadas pelo teste por quadrado bi-caudal e pelo teste de Fisher.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan e Meyer, e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste de log rank (Kaplan; Meyer, 1958).

O tempo de seguimento foi calculado a partir da data da cirurgia até a data da última informação objetiva na atualização dos dados. As taxas de sobrevida livre de doença foram analisadas com base na data da primeira recidiva local ou à distância. As taxas de sobrevida global foram calculadas de acordo com a data da última informação objetiva na atualização dos dados.

A análise multivariada foi realizada através do modelo de regressão de Cox (Cox, 1972).

Para todos os testes realizados, considerou-se um erro alfa de até 5% ($p < 0,05$).

3.3- CASUÍSTICA

3.3.1- COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Dentre 587 pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo, em São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 1990 a agosto de 2000, 114 casos foram considerados elegíveis para o estudo.

A amostra foi constituída por dois subgrupos de pacientes que receberam tratamentos diferentes.

Um subgrupo foi constituído por 53 pacientes consecutivos, tratados no período de janeiro de 1994 a agosto de 2000 com cirurgia e quimioterapia adjuvante baseada em 5-FU.

Outro subgrupo foi constituído por 61 indivíduos tratados apenas por cirurgia. Neste subgrupo, 35 pacientes foram tratados no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 (antes do emprego rotineiro e padronizado de quimioterapia adjuvante para câncer colorretal em nossa instituição); 26 pacientes foram tratados a partir de 1994 e não receberam quimioterapia adjuvante por: não terem sido encaminhados ao Departamento de Oncologia Clínica (falha de protocolo); terem optado por não realizar quimioterapia; ou terem desenvolvido complicação pós-operatória que atrasou o encaminhamento. Os pacientes em que a quimioterapia foi suspensa por toxicidade antes da metade do esquema (menos de três ciclos no esquema 5-FU / ácido folínico ou menos de 24 semanas no esquema 5-FU / levamisole) foram incluídos no grupo sem tratamento adjuvante.

3.3.2- DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Para os 114 pacientes estudados, a idade variou de 28 a 78 anos, com mediana de 61 anos. Dentre eles, 73 (64%) tinham mais de 65 anos e 41 (36%) tinham até 65 anos de idade.

Com relação ao sexo, 42 pacientes eram do sexo masculino (36,8%) e 72, do sexo feminino (63,2%).

Quanto à localização, 43 pacientes possuíam tumores no reto (37,7%) e 71, nos cólons (62,3%).

Em relação às cirurgias realizadas, 83 (73,5%) foram ressecções segmentares clássicas. Houve duas colectomias totais (1,8%), uma proctocolectomia total (0,9%), sete amputações abdominoperineais (6,1%) e 21 ressecções ampliadas (18,4%).

Dentre os 53 pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante, 41 receberam o esquema 5-FU / ácido folínico mensalmente, por seis ciclos e 12 receberam esquema 5-FU / levamisole semanalmente, por 12 meses.

Dos 61 pacientes que não realizaram quimioterapia adjuvante, 35 não a receberam por terem sido tratados em um período em que a quimioterapia adjuvante não era padronizada no Hospital A.C. Camargo. Deles, 26 foram tratados após 1994, quando a quimioterapia adjuvante já tinha suas indicações estipuladas em protocolo institucional. Destes 26 pacientes, 11 não receberam tratamento adjuvante por atraso determinado por complicações pós-operatórias (oito complicações relacionadas à ferida operatória, duas trombozes venosas profundas, uma fístula intestinal); seis não receberam por terem optado pela não realização e quatro por atraso de encaminhamento ao Departamento de Oncologia Clínica (falha de protocolo). Cinco pacientes foram incluídos no grupo sem tratamento adjuvante por suspensão no início do tratamento em função de toxicidade (dois por toxicidade gastrointestinal e três por toxicidade hematológica).

Foram 21 os pacientes com tumores de reto que receberam radioterapia pós-operatória.

A dosagem sérica pré-operatória de CEA foi maior que 5,0 ng/mL em 18 pacientes. Esta variável não estava disponível em 49 casos.

3.3.4- DADOS DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Quanto ao estadiamento patológico, 54 casos foram classificados como estágio II (47,4%) e 60, como estágio III (52,6%). A tabela 1 expõe a distribuição dos pacientes em função do estadiamento.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS 114 PACIENTES DE ACORDO COM ESTADIAMENTO.

Estádio clínico	n(%)
IIA	16 (14)
IIB	37 (32,5)
IIIA	7 (6)
IIIB	37 (32,5)
IIIC	17 (15)
Total	114 (100)

Quanto ao grau de diferenciação, 36 tumores foram considerados bem diferenciados (31,6%); 73, moderadamente diferenciados (64%) e apenas cinco pouco diferenciados (4,4%). Diante do pequeno número de tumores classificados como pouco diferenciados, agrupou-se esta classe aos tumores moderadamente diferenciados, constituindo uma única categoria que foi chamada de alto grau. Assim, 36 tumores (31,6%) foram considerados de baixo grau e 78 (68,4%) foram considerados de alto grau.

Quanto à invasão perineural, estava presente em 31 casos (27,2%) e ausente em 83 (72,8%).

Detectou-se embolização (invasão) vascular linfática de células neoplásicas em 43 casos (37,7%), estando ausente em 71 (62,3%) espécimes.

Com relação à expressão de TS, 73 pacientes (64%) apresentavam tumores com baixa expressão de TS, enquanto que 41 (36%) apresentavam alta expressão intratumoral de TS.

A tabela 2 resume as frequências das variáveis clinicopatológicas entre os 114 pacientes.

TABELA 2- CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DOS 114 PACIENTES.

Variável		n (%)
Idade	< 65 anos	73 (64)
	> 65 anos	41 (36)
Sexo	Masculino	42 (36,8)
	Feminino	72 (63,2)
Localização	Cólon	71 (62,3)
	Reto	43 (37,7)
Radioterapia	Não	93 (81,6)
	Sim	21 (18,4)
Quimioterapia adjuvante	Não	61 (43,5)
	Sim	53 (46,5)
Embolização linfática	Ausente	71 (62,3)
	Presente	43 (37,7)
Invasão perineural	Ausente	83 (72,8)
	Presente	31 (27,2)
Grau histológico	Baixo	36 (31,6)
	Alto	78 (68,4)
Estádio	II	54 (47,4)
	III	60 (52,6)
Expressão de TS	Baixa	73 (64)
	Elevada	41 (36)

3.3.5- DADOS DO SEGUIMENTO

O tempo de seguimento mediano foi de 55,3 meses, variando de 1 a 147,5 meses. Ao final da atualização do seguimento, dos 114 pacientes, 41 (36%) haviam evoluído com recidiva tumoral (13 recidivas locais e 27 metástases à distância), dentre os quais 32 (28,1%) morreram por câncer. Quatro pacientes (3,5%) morreram por outras causas e 65 (57%) estavam vivos e sem sinais de recidiva tumoral. Houve perda de seguimento em oito (7%) pacientes. A sobrevida global da amostra foi de 72% em cinco anos.

4- RESULTADOS

4.1- TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

As variáveis clínicas e patológicas apresentaram distribuição estatisticamente semelhante entre os subgrupos em função da realização ou não de quimioterapia pós-operatória, com exceção da idade, observando-se que os pacientes que realizaram quimioterapia eram significativamente mais jovens (tabela 3).

No subgrupo de pacientes que não realizaram quimioterapia (53 pacientes), 24 (39,3%) apresentavam alta expressão de TS. No subgrupo que recebeu quimioterapia adjuvante (61 pacientes), 17 (32%) apresentavam alta expressão intratumoral de TS. Não houve diferença estatisticamente significativa de expressão de TS entre os grupos que realizaram ou não quimioterapia (tabela 3).

TABELA 3- DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLINICOPATÓGICAS ENTRE OS SUBGRUPOS EM FUNÇÃO DA REALIZAÇÃO OU NÃO DE QUIMIOTERAPIA.

Variável		Quimioterapia adjuvante		p
		não(n=61)	Sim(n=53)	
Idade	< 65 anos	27	46	0,001
	> 65 anos	34	7	
Sexo	Masculino	27	15	0,08
	Feminino	34	38	
Localização	Cólon	41	30	0,25
	Reto	20	23	
Radioterapia	Não	50	43	0,55
	Sim	11	10	
Embolização linfática	Ausente	33	38	0,08
	Presente	28	15	
Invasão perineural	Ausente	45	34	0,09
	Presente	11	18	
Grau histológico	Baixo	25	11	0,06
	Alto	36	42	
Estádio	II	34	20	0,06
	III	27	33	
Expressão de TS	Baixa	37	36	0,44
	Elevada	24	17	

Entre os 114 pacientes que compõem esta casuística, não houve diferença significativa na distribuição da expressão de TS entre as variáveis estudadas, exceto em relação ao sexo, onde 50% dos homens apresentaram tumores com alta expressão da proteína, contra 27,5% entre as mulheres ($p=0,03$). Nenhuma outra variável mostrou correlação com a expressão de TS nos subgrupos referentes à realização ou não de quimioterapia. As tabelas 4, 5 e 6 expõem a distribuição de TS e das outras variáveis na amostra total e nos dois subgrupos separadamente.

TABELA 4- CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS COM AS OUTRAS VARIÁVEIS NA AMOSTRA DE 114 PACIENTES.

Variável		Expressão de TS		p
		baixa	elevada	
Quimioterapia adjuvante	Não	37	24	0,44
	Sim	36	17	
Idade	< 65 anos	48	25	0,68
	> 65 anos	25	16	
Sexo	Masculino	21	21	0,03
	Feminino	52	20	
Localização	Cólon	43	28	0,42
	Reto	30	13	
Radioterapia pós-operatória	Não	60	33	0,80
	Sim	13	8	
Embolização linfática	Ausente	47	24	0,55
	Presente	26	17	
Invasão perineural	Ausente	54	28	0,49
	Presente	19	13	
Grau histológico	Baixo	22	14	0,67
	Alto	51	27	
Estádio	II	37	17	0,43
	III	36	24	

TABELA 5- CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS COM AS OUTRAS VARIÁVEIS NO SUBGRUPO DE PACIENTES SEM QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE (61 PACIENTES).

Variável		Expressão de TS		p
		baixa	Elevada	
Idade	< 65 anos	16	11	0,52
	> 65 anos	21	13	
Sexo	Masculino	13	14	0,11
	Feminino	24	10	
Localização	Cólon	24	17	0,78
	Reto	13	7	
Radioterapia pós-operatória	Não	31	19	0,73
	Sim	6	5	
Embolização linfática	Ausente	22	11	0,43
	Presente	15	13	
Invasão perineural	Ausente	31	17	0,73
	Presente	7	6	
Grau histológico	Baixo	14	11	0,60
	Alto	23	13	
Estádio	II	23	11	0,29
	III	14	13	

TABELA 6- CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS COM AS OUTRAS VARIÁVEIS NO SUBGRUPO DE PACIENTES SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE (53 PACIENTES).

Variável		Expressão de TS		p
		baixa	Elevada	
Idade	< 65 anos	32	14	0,66
	> 65 anos	4	3	
Sexo	Masculino	8	7	0,19
	Feminino	28	10	
Localização	Cólon	19	11	0,55
	Reto	17	6	
Radioterapia pós-operatória	Não	29	14	0,59
	Sim	7	3	
Embolização linfática	Ausente	25	13	0,74
	Presente	11	4	
Invasão perineural	Ausente	25	10	0,54
	Presente	11	7	
Grau histológico	Baixo	8	3	0,50
	Alto	28	14	
Estádio	II	14	6	0,52
	III	22	11	

4.2- SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

4.2.1- ANÁLISE DA AMOSTRA TOTAL

À análise univariada, para a amostra total de 114 pacientes, observamos que invasão vascular linfática, estágio clínico, localização do tumor e radioterapia pós-operatória influenciaram a sobrevida livre de doença em cinco anos. Nem a intensidade da expressão de TS nem o emprego de quimioterapia adjuvante influenciaram o risco de recaída na amostra total. A tabela 7 expõe as taxas de sobrevida livre de doença em cinco anos para as variáveis estudadas, com os respectivos valores de significância estatística.

TABELA 7- TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA (SLD) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DEMAIS VARIÁVEIS, ANALISANDO-SE A AMOSTRA TOTAL DE 114 PACIENTES (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SLD (%) em	p
		5 anos	
Expressão de TS	Baixa	60,0	0,60
	Elevada	62,5	
Quimioterapia adjuvante	Não	62,0	0,82
	Sim	60,0	
Idade	< 65 anos	64,8	0,28
	> 65 anos	55,0	
Sexo	Masculino	63,3	0,83
	Feminino	60,1	
Localização	Cólon	74,3	0,0018
	Reto	45,6	
Radioterapia pós-operatória	Não	67,5	0,0022
	Sim	35,7	
Embolização linfática	Ausente	75,0	0,0003
	Presente	40,0	
Invasão perineural	Ausente	65,2	0,26
	Presente	57,1	
Grau histológico	Baixo	60,6	0,28
	Alto	62,0	
Estádio	II	72,0	0,0091
	III	51,5	

No modelo multivariado aplicado a toda a amostra, considerando-se invasão vascular linfática, estágio clínico, radioterapia pós-operatória, localização do tumor, intensidade de expressão de TS e realização de quimioterapia adjuvante, apenas a presença de invasão vascular linfática se manteve como fator independente para risco de recaída (risco relativo: 2,54 ; intervalo de confiança (95%): 1,32 - 4,92), (tabela 8).

TABELA 8– RISCO DE RECIDIVA NOS 114 PACIENTES – MODELO MULTIVARIADO AJUSTADO PARA EXPRESSÃO DE TS E QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE.

Variável			RR	IC 95%	p
Presença	de	invasão	2,54	1,32 – 4,92	0,005
vascular linfática					
Estádio III			1,60	0,75 – 3,42	0,22
Alta expressão de TS			0,98	0,50 – 1,91	0,97
Realização de quimioterapia			0,91	0,47 – 1,77	0,78
Realização de radioterapia			1,80	0,82 – 3,93	0,13
Localização no reto			1,56	0,73 – 3,33	0,24

4.2.2- ANÁLISE DOS SUBGRUPOS

Analizamos a sobrevida livre de doença em função da expressão de TS para os subgrupos de realização ou não de quimioterapia adjuvante. Efetuamos também análise univariada para as variáveis que apresentaram significado estatístico na análise da amostra total.

No subgrupo de pacientes tratados com cirurgia exclusiva, a sobrevida livre de doença para os pacientes com alta expressão intratumoral de TS foi de 51%, contra 68,6% para os pacientes com baixa expressão ($p=0,028$) (gráfico 1). Os resultados da análise univariada para este subgrupo estão apresentados na tabela 9.

TABELA 9- TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA (SLD) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DEMAIS VARIÁVEIS, ANALISANDO-SE O SUBGRUPO DE 61 PACIENTES TRATADOS APENAS POR CIRURGIA (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SLD (%) em 5 anos	p
Expressão de TS	Baixa	68,6	0,028
	Elevada	51,0	
Localização	Cólon	66,9	0,27
	Reto	52,0	
Radioterapia pós-operatória	Não	71,4	0,027
	Sim	34,0	
Embolização linfática	Ausente	79,5	0,0007
	Presente	41,5	
Estádio	II	73,0	0,0046
	III	48,7	

GRÁFICO 1 – CURVAS DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS NOS 61 PACIENTES TRATADOS APENAS POR CIRURGIA.

Quando analisamos a sobrevida livre de doença em função da expressão de TS entre os pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante, não observamos mais diferença significativa. Ao contrário, observamos até uma tendência no sentido de melhor sobrevida para os pacientes com alta expressão intratumoral de TS (79,1% X 58,5%; $p=0,09$). Esta observação está ilustrada no gráfico 2. Os resultados da análise univariada para este subgrupo estão demonstrados na tabela 10.

TABELA 10- TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA (SLD) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DEMAIS VARIÁVEIS, ANALISANDO-SE O SUBGRUPO DE 53 PACIENTES TRATADOS POR CIRURGIA E QUIMIOTERAPIA (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SLD (%) em	p
		5 anos	
Expressão de TS	Baixa	58,5	0,098
	Elevada	79,1	
Localização	Cólon	86,2	0,0008
	Reto	33,3	
Radioterapia pós-operatória	Não	71,3	0,041
	Sim	37,5	
Embolização linfática	Ausente	72,0	0,13
	Presente	50,0	
Estádio	II	73,6	0,35
	III	59,3	

GRÁFICO 2 – CURVAS DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS NOS 53 PACIENTES TRATADOS POR CIRURGIA E QUIMIOTERAPIA.

Ao analisarmos todos os subgrupos, observamos a influência da quimioterapia sobre pacientes com alta ou baixa expressão de TS. Observando-se os pacientes com baixa expressão de TS, notamos que não houve diferença de sobrevida livre de doença em cinco anos quanto à realização ou não de quimioterapia (58,5% X 68,7%; $p=0,145$). Porém, entre os pacientes com alta expressão de TS, houve significativa melhora de sobrevida com o emprego do tratamento adjuvante (51,1% X 79,1%; $p=0,029$), (gráfico 3).

GRÁFICO 3– CURVAS DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E REALIZAÇÃO OU NÃO DE QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE.

4.3- SOBREVIDA GLOBAL

4.3.1- ANÁLISE DA AMOSTRA TOTAL

À análise univariada, para a amostra total de 114 pacientes, observamos que a invasão vascular linfática, a localização e a radioterapia pós-operatória influenciaram a sobrevivência global em cinco anos. Nem a intensidade da expressão de TS nem o emprego de quimioterapia adjuvante influenciaram o risco de óbito na amostra total. A tabela 11 mostra as taxas de sobrevivência global em cinco anos para as variáveis estudadas, com os respectivos valores de significância estatística.

TABELA 11 – TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL (SOB) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DEMAIS VARIÁVEIS PARA OS 114 PACIENTES (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SOB (%) em 5 anos	p
Expressão de TS	Baixa	73,0	0,11
	Elevada	69,4	
Quimioterapia adjuvante	Não	69,2	0,49
	Sim	74,3	
Idade	< 65 anos	75,3	0,14
	> 65 anos	65,9	
Sexo	Masculino	65,9	0,98
	Feminino	76,2	
Localização	Cólon	79,9	0,01
	Reto	61,2	
Radioterapia pós-operatória	Não	77,9	0,026
	Sim	47,8	
Embolização linfática	Ausente	85,0	0,0047
	Presente	53,3	
Invasão perineural	Ausente	76,0	0,48
	Presente	63,8	
Grau histológico	Baixo	64,3	0,30
	Alto	75,6	
Estádio	II	78,0	0,178
	III	66,2	

No modelo multivariado aplicado a toda a amostra, considerando a invasão vascular linfática, a expressão de TS, a realização de quimioterapia adjuvante, a radioterapia pós-operatória e a localização, novamente apenas a presença de invasão vascular linfática se manteve como fator independente de risco para óbito (risco relativo: 2,20 ; intervalo de confiança (95%): 1,10 - 4,38), (tabela 12).

TABELA 12 – RISCO DE ÓBITO PARA OS 114 PACIENTES – MODELO MULTIVARIADO AJUSTADO PARA EXPRESSÃO DE TS E QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE.

Variável	RR	IC 95%	p
Presença de invasão vascular linfática	2,20	1,10 – 4,38	0,02
Alta expressão de TS	1,65	0,83 – 3,26	0,14
Realização de quimioterapia	0,77	0,37 – 1,59	0,48
Realização de radioterapia	1,45	0,61 – 3,45	0,39
Localização no reto	2,08	0,93 – 4,66	0,07

4.3.2- ANÁLISE DOS SUBGRUPOS

Analizamos a sobrevida global em função da expressão de TS para os subgrupos de realização ou não de quimioterapia adjuvante. Efetuamos também análise univariada para as variáveis que apresentaram significado estatístico na análise da amostra total.

No subgrupo de pacientes tratados com cirurgia exclusiva, a sobrevida global para os pacientes com alta expressão intratumoral de TS foi de 57,7%, contra

77,4% para os pacientes com baixa expressão ($p=0,006$) (gráfico 4). A análise univariada para este subgrupo está apresentada na tabela 13.

TABELA 13 – TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL (SOB) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DAS OUTRAS VARIÁVEIS PARA O SUBGRUPO DE 61 PACIENTES TRATADOS APENAS POR CIRURGIA (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SOB (%) em 5 anos	p
Expressão de TS	Baixa	77,4	0,006
	Elevada	57,7	
Localização	Cólon	75,9	0,14
	Reto	54,6	
Radioterapia pós-operatória	Não	76,4	0,07
	Sim	36,8	
Embolização linfática	Ausente	90,2	0,006
	Presente	46,0	
Estádio	II	80,0	0,05
	III	54,5	

GRÁFICO 4 – CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS PARA OS 61 PACIENTES TRATADOS APENAS POR CIRURGIA.

Quando analisamos a sobrevivência global em função da expressão de TS entre os pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante, não observamos mais diferença significativa de sobrevivência. Como ocorreu para a sobrevivência livre de doença, observamos novamente uma tendência a melhor sobrevivência entre os pacientes com alta expressão intratumoral de TS (87,1% X 65,8%; $p=0,26$). Os resultados da análise univariada para este subgrupo estão indicados na tabela 14.

TABELA 14 - TAXAS DE SOBREVIDA GLOBAL (SOB) EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E DAS OUTRAS VARIÁVEIS PARA O SUBGRUPO DE 53 PACIENTES TRATADOS POR CIRURGIA E QUIMIOTERAPIA (ANÁLISE UNIVARIADA).

Variável		SOB (%) em 5 anos	p
Expressão de TS	Baixa	65,8	0,26
	Elevada	87,8	
Localização	Cólon	82,7	0,03
	Reto	66,8	
Radioterapia pós-operatória	Não	78,5	0,19
	Sim	57,8	
Embolização linfática	Ausente	79,1	0,52
	Presente	63,1	
Estádio	II	72,7	0,97
	III	75,3	

Analizando-se todos os subgrupos, observamos que, entre os pacientes com baixa expressão de TS, não houve diferença de sobrevida em cinco anos quanto à realização ou não de tratamento adjuvante (65,8% X 77,5%; $p=0,29$). Porém, entre os pacientes com tumores com TS superexpressa, houve significativa melhora de sobrevida com a realização de quimioterapia (87,8% X 57,7%; $p=0,04$), (gráfico 5).

GRÁFICO 5 – CURVAS DE SOBREVIDA GLOBAL EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE TS E REALIZAÇÃO OU NÃO DE QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE.

5- DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados observados sugeriram que a expressão intratumoral da proteína timidilato sintase, avaliada pelo método imunoistoquímico, pode ser capaz de selecionar um subgrupo de pacientes que são favorecidos com a quimioterapia adjuvante baseada em 5-fluorouracil. Observamos que, em um subgrupo de pacientes portadores de carcinoma de cólon ou reto com fatores de alto risco para recaída, ressecados adequadamente e sem tratamento quimioterápico adjuvante, a alta expressão de TS conferiu uma evolução pior tanto para sobrevida livre de doença como para sobrevida global. Por outro lado, ao analisarmos outro subgrupo de pacientes com características semelhantes, mas submetidos a tratamento adjuvante com quimioterapia, notamos significativa melhora de sobrevida naqueles pacientes portadores de tumores que apresentavam alta expressão de TS. A quimioterapia não alterou as taxas de sobrevida livre de doença ou sobrevida global nos pacientes com expressão baixa de TS no tumor. Considerando-se a expressão de TS e a realização ou não de quimioterapia adjuvante, as piores taxas de sobrevida livre de doença e global (51% e 57,7%, respectivamente) foram observadas nos pacientes com alta expressão intratumoral de TS e sem tratamento quimioterápico. As melhores taxas de sobrevida livre de doença e global (79,1% e 87,8%,

respectivamente) foram observadas entre os pacientes com alta expressão intratumoral de TS e que receberam quimioterapia pós-operatória.

Cinco estudos publicados se propuseram a avaliar o valor preditivo da expressão de TS no tratamento adjuvante baseado em 5-FU para câncer colorretal.

O primeiro estudo foi publicado por Johnston *et al.*, em 1994. Este estudo avaliou retrospectivamente um subgrupo de um protocolo já encerrado do NSABP para tratamento adjuvante em câncer colorretal e que envolveu um total de 801 pacientes com câncer de cólon e reto estádios II e III. Neste trabalho, os autores avaliaram apenas os pacientes com câncer de reto (294 pacientes), os quais haviam sido randomizados para receber radioterapia adjuvante ou quimioterapia adjuvante com esquema MOF ou não receber tratamento adjuvante (três braços). A expressão intratumoral de TS, determinada por imunoistoquímica, foi analisada em 294 pacientes com o objetivo de avaliar o valor prognóstico para sobrevida e em 194 pacientes com o objetivo de avaliar o valor preditivo para a eficácia da quimioterapia. Como fator prognóstico, a alta expressão de TS foi fator independente de pior sobrevida. Por outro lado, entre os pacientes com alta expressão de TS, 54% estavam vivos em cinco anos quando tratados com quimioterapia, comparados com apenas 31% entre os pacientes tratados apenas com cirurgia. Não houve benefício da quimioterapia para os pacientes com baixa expressão de TS. Segundo estes autores, este comportamento paradoxal ocorre porque a expressão de TS, em doença localizada e completamente ressecada, reflete muito mais o alto índice proliferativo destes tumores (conseqüentemente mais responsivos a tratamento citotóxico em geral) do que sua resistência específica às fluoropirimidinas.

Os estudos de Yamachika *et al.* (1998) e de Takenoue *et al.* (2000) reproduziram resultados muito semelhantes aos de Johnston *et al.* Estes autores também utilizaram a hipótese de que a expressão elevada de TS provavelmente reflete muito mais o índice proliferativo destes tumores do que sua resistência ao 5-FU, selecionando-os como mais susceptíveis à quimioterapia adjuvante.

Um estudo mais recente conduzido por um grupo sueco (Edler *et al.*, 2002), agora com cálculos sobre uma amostra bem maior (862 pacientes), além de confirmar o benefício da quimioterapia adjuvante baseada em 5-FU entre os pacientes com alta expressão de TS, observou que, entre os pacientes com baixa expressão da proteína, a quimioterapia adjuvante exerceu efeito deletério. Estes autores não sugeriram hipóteses biológicas para explicar os resultados, mas apontaram a necessidade de sua reprodução em séries diferentes.

O quinto e último trabalho publicado com o objetivo de avaliar o valor preditivo da expressão de TS em quimioterapia adjuvante foi conduzido por Allegra *et al.* (2002). Este estudo avaliou, retrospectivamente, a expressão de TS por imunoistoquímica em 445 pacientes com carcinoma de cólon, estádios II e III. Estes pacientes eram oriundos de cinco ensaios clínicos diferentes, conduzidos pelo NCCTG para avaliar quimioterapia adjuvante. Neste estudo, a expressão de TS não demonstrou nenhuma correlação com a eficácia da quimioterapia adjuvante.

Nossos resultados estão de acordo com quatro dos cinco estudos já publicados com o mesmo objetivo.

O papel da expressão de TS no tratamento adjuvante também foi documentado no tratamento de metástases hepáticas. Um estudo conduzido por Gonen *et al.* (2003) avaliou a expressão imunoistoquímica de TS em metástases

hepáticas de carcinoma colorretal submetidas à ressecção. Estes pacientes eram oriundos de um estudo prospectivo que previa randomização para receber quimioterapia sistêmica (fluorouracil mais leucovorin) pós-ressecção hepática ou quimioterapia sistêmica associada à quimioterapia intra-arterial hepática após a ressecção (fluoxuridina). Entre os 156 pacientes que participaram do estudo, a expressão de TS se mostrou como fator prognóstico independente para sobrevida (análise multivariada), onde a sobrevida mediana foi de 64 meses para os pacientes com baixa expressão de TS na metástase hepática, contra 37 meses para os pacientes com alta expressão. Não houve diferença de sobrevida em relação ao emprego de quimioterapia pós-operatória sistêmica ou combinada (intra-arterial e sistêmica) entre os pacientes com baixa expressão de TS na metástase (63 *versus* 67 meses). Por outro lado, entre os pacientes com alta expressão de TS, a sobrevida foi significativamente melhor (64 *versus* 21 meses) para os pacientes que receberam quimioterapia intra-arterial. É importante salientar que, neste estudo, a expressão de TS foi determinada na metástase. A determinação de TS no tumor primário não se correlaciona com a evolução ou com as taxas de resposta à quimioterapia em doença metastática (Findlay *et al.*, Berglund *et al.*, 2002, Johnston *et al.*, 2003).

A hipótese de que tumores com alta expressão de TS apresentam maiores índices proliferativos e, conseqüentemente, são mais susceptíveis à ação dos quimioterápicos vem sendo a mais utilizada para explicar o comportamento paradoxal da expressão de TS no tratamento de doença localizada em relação ao tratamento de doença metastática. Esta maior sensibilidade à ação citotóxica pela possível maior fração de células em fase S seria mais importante do que a potencial resistência destas células ao 5-FU, considerando-se doença microscópica.

De fato, a TS é uma enzima cuja síntese atinge seu pico na fase S do ciclo celular (Chu *et al.*, 1991). No estudo de Allegra *et al.* (2002) a alta expressão de TS se correlacionou com índices elevados de Ki-67, um marcador de proliferação. Porém, van Triest *et al.* (2000) não conseguiram demonstrar esta correlação, também avaliando TS e Ki-67 por imunistoquímica. Fujii *et al.* (2003) realizaram um interessante estudo com ensaios em culturas de células extraídas de tumores de 54 pacientes. Estes autores observaram que a sensibilidade ao 5-FU foi maior nas células com baixa atividade enzimática de TS; verificaram que os tumores com alta atividade proliferativa, medida por Ki-67, também apresentavam boa sensibilidade ao 5-FU e constataram que altos índices de Ki-67 estavam associados à alta atividade enzimática de TS. Os resultados deste estudo sugerem uma interpretação dicotômica do aumento da expressão de TS: se, por um lado, denota resistência à ação de fluoropirimidinas, por outro, reflete células em maior atividade proliferativa.

Em nossa amostra, a expressão de TS não se correlacionou com o grau de diferenciação histológica, um indicador indireto de proliferação celular. Apesar da falha também de outros estudos (Allegra *et al.*, 2002, Fujii *et al.*, 2003) em demonstrar correlação da expressão de TS com grau histológico, nossos resultados devem ser interpretados com cautela, em razão da alta frequência de tumores moderadamente diferenciados na amostra (64%) e da frequência muito baixa de tumores pouco diferenciados (4,4%).

A hipótese da correlação da expressão de TS com proliferação celular não parece ser suficiente para explicar sua interpretação em tratamento adjuvante.

Considerando-se que a inibição de TS é um dos principais mecanismos de ação do 5-FU, esperamos observar maior atividade inibitória em um meio em que o

alvo (TS) esteja mais concentrado, ou seja, em maior expressão. Em doença metastática com superexpressão de TS, a dose necessária para se obter resposta objetiva (e isto significa inibição adequada de TS) ultrapassa limites de toxicidade. Por outro lado, em tratamento adjuvante, em que o objetivo é tratar doença microscópica residual e a dose utilizada para tratamento parece adequada para agir sobre populações celulares muito menores, deveríamos esperar melhores resultados exatamente sobre aqueles tumores que mais expressam a enzima-alvo.

Devemos considerar que a expressão da proteína isoladamente pode não ser capaz de refletir o real potencial de resistência ao 5-FU. Alguns estudos já demonstraram boa correlação entre a expressão protéica e a quantificação do RNAm (Johnston *et al.*, 1995). Mas estes dois parâmetros medidos em um tumor conferem uma avaliação estática, ou seja, apenas pontual. Isto se deve ao fato de que a expressão de TS é regulada também por um mecanismo de auto-regulação negativa pós-transcricional, onde elevações nos níveis da proteína inibem a tradução do RNAm (Chu *et al.*, 1991). Já se demonstrou, também, que a exposição ao 5-FU induz aumento da expressão de TS através de liberação da tradução do RNAm do efeito inibitório de seu próprio produto (Parr *et al.*, 1998, Peters *et al.*, 2000, Peters *et al.*, 2002). Portanto, a regulação da tradução pode ser um fator determinante do quanto as células sobrevivem após a exposição ao 5-FU.

O gene da TS possui uma particularidade em sua região reguladora 5'-terminal, imediatamente proximal ao códon iniciador ATG, caracterizada por seqüências repetidas em série (Kaneda *et al.*, 1987). Estas repetições são polimórficas, podendo apresentar-se em repetição dupla ou tripla. As repetições duplas estão associadas à menor atividade de tradução do RNAm e as repetições

triplas conferem uma eficiência de tradução de três a quatro vezes maior, porém sem demonstrar alteração na expressão gênica (transcrição) (Horie *et al.*, 1995, Kawakami *et al.*, 2001). Do ponto de vista clínico, Villafranca *et al.* (2001) demonstraram que os polimorfismos das seqüências repetidas em série podem prever resposta ao tratamento pré-operatório (radioterapia e quimioterapia) de carcinoma de reto, onde os tumores que apresentam homozigose para a repetição tripla têm menor probabilidade de resposta objetiva, comparados aos heterozigotos e aos homozigotos para repetição dupla. Estes estudos levam à hipótese de que tumores com expressão alta ou baixa de TS, avaliada pela expressão protéica ou pela quantificação de RNAm, podem apresentar potenciais diferentes de aumento de expressão após exposição ao 5-FU.

Outros fatores também podem estar envolvidos com a resistência ao 5-FU, mediada ou não por TS.

Como já foi citado, TS é uma enzima de produção máxima em fase S e sua síntese é mediada pelo fator de transcrição E2F (Degregori *et al.*, 1995). Banerjee *et al.* (1998) demonstraram que células em cultura de fibrossarcoma, quando transfectadas com um plasmídeo para aumentar a expressão de E2F, aumentam também expressão de TS em até 14 vezes e passam a apresentar maior resistência ao 5-FU. Estes dados ainda necessitam de validação em ensaios *in vivo* e em estudos clínicos.

A resistência ao 5-FU também pode estar associada ao aumento da expressão da enzima responsável pelo seu catabolismo. No estudo de Salonga *et al.* (2000), em 33 pacientes com carcinoma colorretal avançado, a expressão elevada de dihidropirimidina dehidrogenase (DPD) foi detectada em todos os pacientes que não

responderam à terapêutica com 5-FU. Dentre os pacientes com baixa expressão de DPD, 50% apresentaram resposta objetiva. Ao analisar conjuntamente a expressão de DPD, TS e timidina fosforilase (TP), os autores observaram que, quando a expressão concomitante do RNAm das três proteínas era baixo, todos os pacientes apresentaram resposta ao 5-FU. Como não houve correlação entre a expressão dos três fatores, os autores concluíram que atuavam por vias diferentes.

Outro fator envolvido com a eficácia da quimioterapia adjuvante com 5-FU foi a frequência de instabilidade de microssatélites. Embora de fundamentação biológica pouco esclarecida, a alta frequência de instabilidade de microssatélites se correlacionou com sobrevida melhor entre pacientes submetidos a quimioterapia adjuvante em um estudo clínico retrospectivo (Gryfe *et al.*, 2000).

Como fator prognóstico, a expressão da proteína TS, em nossa casuística, não se correlacionou com sobrevida livre de doença ou global, quando analisamos a amostra total. A expressão de TS se correlacionou com sobrevida livre de doença e global apenas no subgrupo sem quimioterapia adjuvante. A expressão de TS se constitui em fator prognóstico independente em vários estudos, tanto em doença metastática (Leichman *et al.*, 1997, Lenz *et al.*, 1998, Aachele *et al.*, 1999) como em doença localizada (Johnston *et al.*, 1994, Yamachika *et al.*, 1998, Edler *et al.*, 2000, Takenoue *et al.*, 2000, van Triest *et al.*, 2000, Edler *et al.*, 2002). Nos estudos que envolveram doença localizada e que mostraram valor prognóstico significativo da expressão de TS, também se demonstrou que este valor foi muito mais significativo entre os pacientes que não receberam tratamento adjuvante. Acreditamos que, em nosso estudo, a expressão de TS não se mostrou como fator prognóstico na amostra total em razão da igual distribuição, na amostra, de realização ou não de

quimioterapia adjuvante. Portanto, a realização de quimioterapia adjuvante, ao melhorar as taxas de sobrevida entre os pacientes com alta expressão de TS, parece ter anulado seu efeito deletério.

Nesta amostra, o único fator prognóstico independente para sobrevida, identificado no modelo de regressão multivariado, foi a embolização vascular linfática. Na análise univariada, a localização do tumor no reto e a realização de radioterapia pós-operatória conferiram pior evolução. Ao excluirmos do estudo os pacientes com tumores de reto submetidos a tratamento neoadjuvante, acabamos por selecionar tumores de reto que, ao exame físico, pareciam pouco avançados (portanto, não candidatos a tratamento pré-operatório), mas que se mostravam agressivos ao estadiamento patológico. Dentre estes pacientes com tumores de reto e que realizaram radioterapia pós-operatória (21 casos), observamos que 16 (76%) apresentavam linfonodos comprometidos, dentre os quais sete (33,3%) eram N2. Portanto, trata-se de um subgrupo de tumores pequenos com metastatização regional precoce. Como estes 21 pacientes estavam proporcionalmente distribuídos na amostra, tanto em função da expressão de TS como em função da realização de quimioterapia (tabelas 3,4 e 5), a localização no reto ou a realização de radioterapia pós-operatória não influenciaram na interpretação dos resultados para o objetivo principal do estudo.

O fato de termos proporções de tumores de reto distribuídas de forma equilibrada em todos os subgrupos permitiu-nos analisar, conjuntamente, tumores de cólon e reto. Uma amostra constituída apenas por tumores de cólon certamente seria considerada ideal. Porém, ao excluirmos tumores de reto, teríamos uma amostra total de apenas 71 casos, inadequada para as inferências estatísticas.

A opção pelo método imunoistoquímico para determinação da expressão de TS merece algumas considerações. A alta sensibilidade e a alta especificidade do anticorpo monoclonal utilizado nas reações (TS 106) já foram bem demonstradas por outros autores, que o testaram tanto em ensaios de Western blot como em ensaios de afinidade para FdUMP (Johnston *et al.*, 1991, Johnston *et al.*, 1992)^{34,55}. Nestes trabalhos, a quantificação do anticorpo foi de 12,8 a 26 vezes maior em linhagens celulares carcinoma de cólon resistentes ao 5-FU, quando comparadas a linhagens sensíveis. Edler *et al.* (1997) demonstraram significativa correlação linear entre a atividade enzimática de TS e a intensidade da reação imunoistoquímica com o anticorpo TS 106, em espécimes de tumores colorretais. Este estudo encontrou homogeneidade na expressão de TS em 67% das amostras. A correlação entre o conteúdo de RNAm, quantificado por PCR, e a intensidade da expressão imunoistoquímica da proteína também já foi demonstrada (Johnston *et al.*, 1995). A disponibilidade de um anticorpo já bem validado e a possibilidade de utilização em tecidos estocados em parafina levaram-nos, em concordância com a maioria dos estudos publicados mais recentemente, a utilizar o método imunoistoquímico para a determinação da expressão de TS.

Em nossa casuística, apenas três tumores apresentaram alta expressão de TS em menos de 25% da amostra, impossibilitando a avaliação estatística do valor da distribuição da expressão da proteína neste estudo. Os trabalhos que demonstraram importância do valor prognóstico da expressão de TS determinada por imunoistoquímica, tanto em doença metastática como em doença localizada, encontraram correlação de sobrevida com o grau de intensidade da coloração do anticorpo e não com a distribuição (focal ou difusa) (Johnston *et al.*, 1994, Aschele

et al., 1999, Edler *et al.*, 2000a, Edler *et al.*, 2000b, Tomiak *et al.*, 2001, Edler *et al.*, 2002).

Resumidamente, nossos resultados sugerem que, apesar de não se revelar como fator prognóstico independente para sobrevida, a expressão da proteína timidilato sintase pode selecionar um subgrupo de pacientes que se beneficia de tratamento quimioterápico adjuvante baseado em 5-FU, assumindo importância como fator preditivo. Em pacientes com tumores em estágio III, estes dados parecem ser desprovidos de relevância clínica, já que a presença de linfonodos comprometidos já impõe a necessidade de quimioterapia. Porém, novas drogas de mecanismos de ação diferentes das fluoropirimidinas, como o inibidor de topoisomerase I, o irinotecano, ou o derivado de platina oxaliplatina, que já demonstraram sua eficácia em doença metastática, vêm sendo estudados também no tratamento adjuvante, em ensaios clínicos ainda não publicados (NSABP – C-07; FRE-FNCLCC-ACCORD-2, EU-20014, FFCD-9802; RP-64174-V-307, EORTC-40993, PETACC-3). Considerando-se que pacientes com tumores com alta expressão de TS têm melhor evolução quando submetidos à quimioterapia adjuvante baseada em 5-FU, porque estes tumores têm maiores índices proliferativos, mas mesmo assim podem apresentar um potencial intrínseco de resistência ao 5-FU, talvez a sobrevida deste subgrupo (estágio III com alta expressão de TS) possa aumentar com a associação de outra droga aos esquemas clássicos, hipótese esta que só pode ser validada por estudos prospectivos e randomizados. Em pacientes com tumores em estágio II, onde o benefício da quimioterapia adjuvante ainda não foi adequadamente comprovado, a estratificação em função da expressão de TS poderia

ser utilizada para randomização em ensaios clínicos prospectivos com a finalidade de avaliar o benefício da quimioterapia em estágio II.

6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, podemos concluir o exposto abaixo.

1. Os níveis elevados de timidilato sintase, determinados por imunoistoquímica, associaram-se de modo significativo a piores taxas de sobrevida livre de doença e global no subgrupo de pacientes tratados exclusivamente por cirurgia, em análise univariada.
2. No subgrupo de pacientes com alta expressão intratumoral de timidilato sintase, houve ganho significativo de sobrevida livre de doença e global com emprego de quimioterapia adjuvante, em análise univariada.
3. No subgrupo de pacientes com baixa expressão intratumoral de timidilato sintase, não se observou benefício com o emprego de quimioterapia pós-operatória.
4. A presença de embolização vascular linfática de células neoplásicas foi a única variável de risco independente para recidiva e óbito, identificada na análise multivariada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allegra C, Sargent D. Molecular diagnostics: assays, tissues, progress, and pitfalls. *J Clin Oncol* 2003; 21: 395-6.
- Allegra JC, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DL, Johnston PG, *et al.* Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1735-43.
- Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia. São Paulo, 1999.
- American Cancer Society: Cancer facts and figures 2003. Available from: < URL: <http://www.cancer.org> > [12/08/2003].
- Aschele C, Debernardis D, Casaza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, *et al.* Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1760-70.
- Banerjee D, Schnieders B, Fu JZ, Adhikari D, Zhao SC, Bertino JR. Role of E2f-1 in chemosensitivity. *Cancer Res* 1998; 58: 4292-6.

- Berglund A, Edler D, Molin D, Nordlinder H, Graf W, Glimelius D. Thymidylate synthase and p53 expression in primary tumor do not predict chemotherapy outcome in metastatic colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 3653-9.
- Bertino JR, Banerjee D. Is the measurement of thymidylate synthase to determine suitability for treatment with 5-fluoropyrimidines ready for prime time? *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1235-9.
- Boice JD, Greene MH, Killen JY, *et al.* Leukemia and preleukemia after adjuvant treatment of gastrointestinal cancer with semustine (methyl-CCNU). *N Engl J Med* 1983; 309: 1079-84.
- Broders AC. The grading of carcinoma. *Minnesota Med* 1925; 8: 726-30.
- Camma C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2000; 284: 1008-15.
- Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Ann Rev Biochem* 1995; 64: 721-62.
- Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, *et al.* An evaluation of the American Joint Committee on Cancer (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 6-10.
- Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake CJ, Chabner AB, Elwood PC, *et al.* Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8977-81.
- Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 2001; 358: 1291-304.

- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer prognostic factor consensus conference: colorectal working group. *Cancer* 2000; 88: 1739-57.
- Compton C, Fielding LP, Burgart JL, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, *et al.* Prognostic factors in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-94.
- Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E. Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1419-26.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc Br* 1972; 34: 187-220.
- DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G₁/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4215-24.
- Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics* 1989; 16: 215-37.
- Edler D, Blomgren H, Allegra CJ, Johnston PG, Lagerstedt U, Magnusson I, Ragnhammar P. Immunohistochemical determination of thymidylate synthase in colorectal cancer – methodological studies. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2278-81.
- Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, *et al.* Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1721-8.
- Edler D, Hallström M, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local

recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer.

Clin Cancer Res 2000; 6: 1378-84.

Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, *et al.*

Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 488-92.

Findlay MPN, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW.

Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumors and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997; 75: 903-9.

Francini G, Petrioli R, Lorenzini R, Mancini S, Armênio S, Tanzini G, *et al.* Folinic

acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 899-906.

FRE-FNCLCC-ACCORD-2, EU-20014, FFCD-9802. Phase III randomized study of

adjuvant leucovorin calcium and fluorouracil with or without irinotecan in patients with resected stage III colon cancer at high risk of recurrence.

Available from: < URL: http://www.nci.nih/view_clinicaltrials > [07/09/2003].

Freitas LLL, Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT, Bachega Jr W. Adenocarcinoma

de cólon: fatores prognósticos em 60 pacientes tratados com cirurgia curativa. *Rev Col Bras Cir* 1997; 24: 29-32.

Fujii R, Seshimo A, Kameoka S. Relationships between the expression of

thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2003; 8: 72-8.

- Gelb AB, Schrock TR. Prognostic factors in colorectal carcinoma. *Surgical oncology clinics of North America* 1997; 6: 463-95.
- Gonen M, Hummer A, Zervoudakis A, Sullivan D, Fong Y, Banerjee D, *et al.* Thymidylate synthase expression in hepatic tumors is a predictor of survival and progression in patients with resectable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 406-12.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual – 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danenberg PV. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179: 663-66.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene of thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7.
- IMPACT. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995; 345: 939-44.
- Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2003. Disponível em: < URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas> > [12/08/2003].
- Johnston PG, Benson III AB, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of

correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J Clin Oncol* 2003; 21: 815-9.

Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 4306-12.

Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake CJ, *et al.* The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2640-7.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, *et al.* Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1407-12.

Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 1991; 51: 6668-76.

Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, Shimizu K, Seno K, Altman S. The role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase RNA. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 1259-70.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 8: 423-46.

Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, *et al.* Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase

- gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4096-101.
- Kemeny N, Saltz L, Cohen A. Adjuvant therapy of colorectal cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 1997; 6: 699-723.
- Kornmann M, Link KH, Lenz HJ, Pillasch J, Metzger R, Butzer U, *et al.* Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy. *Cancer Lett* 1997; 118: 29-35.
- Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, *et al.* Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil: the North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1447-56.
- Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg KD, Baranda J, Groshen S, *et al.* Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3223-9.
- Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, *et al.* p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1243-50.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330-8.
- Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, *et al.* Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B *versus* Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant

- Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17: 1349-55.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, *et al.* Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; 322: 352-8.
- Moore HCF, Haller DG. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 545-55.
- Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, *et al.* Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 583-96.
- NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264: 1444-50.
- NSABP – C-07. Phase III study of fluorouracil and leucovorin calcium with or without oxaliplatin in patients with stage II or III carcinoma of the colon. Available from: < URL: http://www.nci.nih/view_clinicaltrials > [07/09/2003].
- O’Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ, Erlichman C, Shepherd L, *et al.* Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high risk colon cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 295-300.
- O’Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, *et al.* Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 246-50.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 596.

- Parr AL, Drake CJ, Gress RE, Schwartz G, Steinberg SM, Allegra CJ. 5-fluorouracil-mediated thymidylate synthase induction in malignant and nonmalignant human cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 231-5.
- Peters GJ, Backus HHJ, Freemantle S, van Triest G, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, *et al.* Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 194-205.
- Peters GJ, Van der Wilt CL, Van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2035-42.
- Peters GJ, van Triest B, Backus HHJ, Kuiper CM, van der Wilt CL, Pinedo HM. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 2000; 36: 916-24.
- Pinedo HM, Peters GFJ. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1653-64.
- Ragnhammar P, Hafström L, Nygren P, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncologica* 2001; 40: 282-308.
- Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, *et al.* Prognostic factors in colorectal cancer: literature review for clinical application. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1033-49.
- RP-64174-V-307, EORTC-40993, PETACC-3. Phase III randomized study of adjuvant fluorouracil and leucovorin calcium with or without irinotecan in

patients with resected stage III colorectal cancer. Available from: < URL: http://www.nci.nih/view_clinicaltrials > [07/09/2003].

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, *et al.* Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1322-7.

SEER Cancer Statistics Review 1973-1999. National Cancer Institute. Available from: < URL: http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/overview.pdf > [12/08/2003]

Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii M, Fujii S, Nita ME, *et al.* Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 193-8.

Tomiak A, Vincent M, Earle CC, Johnston PG, Kocha W, Taylor M, *et al.* Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer. A retrospective review. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 597-602.

Van Triest B, Peters GJ. Thymidylate synthase: a target for combination therapy and determinant of chemotherapeutic response in colorectal cancer. *Oncology* 1999; 57: 179-94.

Van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JLG, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, *et al.* Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1063-72.

- Vieira RAC. Fatores prognósticos envolvidos nas ressecções alargadas de pacientes portadores de adenocarcinoma colônico. São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- Villafranca E, Okruzhnov Y, Domonguez MA, García-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, *et al.* Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1779-86.
- Wolmark N, Fisher B, Rockette H, *et al.* Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 30-6.
- Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, *et al.* Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3553-9.
- Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Kato T, Fukushima M, *et al.* A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 1998; 82: 70-7.