

SUPRAEXPRESIA TIMIDILAT SINTETAZEI CA ȘI FACTOR DE PROGNOSTIC ÎN CANCERUL O.R.L. REZISTENT LA TRATAMENT

THYMIDYLATE SYNTHASE OVEREXPRESSION AS A PROGNOSTIC FACTOR IN CANCER TREATMENT-RESISTANT ENT

Asist. univ. drd. **Daniel Ciurescu**
Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania Brașov

Autor corespondent: Daniel Ciurescu; ciurescu@yahoo.com

Abstract:

Thymidylate synthase (TS) is an important target for 5-Fluorouracil (5-FU) therapy in Head and Neck cancer. In clinical settings, TS levels appear to be a predictive factor in patients' outcome and long term survival. It is obvious that high levels of TS expressed by tumoral cells are implicated in resistance to 5-FU therapy in colorectal, gastric and other cancer types, while low levels are associated with better response.

We evaluated clinical data and laboratory findings existing in the oncologic literature regarding involvement of TS in induced resistance to standard therapy-schemas on basis on 5-FU in Head and Neck cancer. The purpose is to highlight the importance of pre-therapy TS dosage in order to predict treatment response

Key-words: Thymidylate synthase, 5-FU, Head and Neck cancer, resistance

Introducere

Cancerul O.R.L. este o provocare oncologică - tratamentul fiind unul complex, bazat pe chirurgie, radioterapie și chimioterapie. Chiar dacă tipul respectiv de cancer este potențial vindecabil chirurgical și prin radioterapie, stadiile localizate în special, supraviețuirea rămâne scăzută iar recidivele sunt frecvente. Se estimează că între 50% și 60% din pacienții tratați vor avea recurențe în următorii doi ani sub un tratament condus corect iar circa 25% dintre toți pacienții declarați vindecați vor dezvolta metastaze. Prin urmare, progresele în chirurgie, radioterapie, chimioterapie și, mai recent, progresele în terapia biologică se intrinsecă în tratament prin diferite combinații menite să vindece atât boala clinic aparentă cât și boala ocultă. Ținta tratamentului presupune deci controlul maximal tumoral asociat creșterii calității vieții [2]. Schemele de chimioterapie se bazează pe săruri de platină și 5-fluorouracil (5-FU), asocierile cunoscute sub denumirea schema PF. Mai recent la schema de tratament au fost adăugați taxani (docetaxel sau mai puțin utilizatul paclitaxel) – tripla combinație cunoscută ca protocol TPF, în scopul îmbunătățirii controlului tumoral cu mai puține efecte adverse implicite chimioterapiei standard de inducție [24]. În ultimul deceniu 5-FU,

nelipsit din schemele chimioterapeutice în tratamentul cancerului din sfera O.R.L. s-a demonstrat a avea un răspuns progresiv scăzut asupra controlului tumoral, dovezile clinice acumulate sugerând dezvoltarea rezistenței la respectivul agent chimioterapeutic. Fenomenul s-ar explica prin inhibiția timidilat sintetazei (TS) exprimată de celulele tumorale acesta fiind mecanismul implicat în apariția rezistenței la 5-FU atât în condiții de laborator cât și în vivo. În plus, nivelul intrinsec celular de timidilat sintetaza s-a demonstrat a fi un important factor de prognostic în vederea controlului tumoral cu 5-FU. Acest articol se va axa în special pe 5-FU în toate combinațiile terapeutice și relația cu timidilat sintetaza rezultată în dezvoltarea rezistenței la tratament în cancerule din sfera O.R.L.

5-fluorouracil. Fluoropirimidina 5-FU și capecitabina sunt printre cei mai folosiți agenți chimioterapeutici în tratamentul cancerelor solide [7]. 5-FU, folosit pentru prima dată cu aproximativ 40 de ani în urmă nu este substanța activă ca atare ci se metabolizează în FdUMP (fluorodeoxiuridin monofosfat), acesta din urmă se leagă și inhibă timidilat sintetaza. Întreruperea acțiunii timidilat sintetazei, blochează sinteza primidin-timidinei care este o nucleozidă implicată în replicarea AND [19]. 5-

FU este considerat a fi activ doar în faza S a replicării ADN fără importanță în fazele G₀ sau G₁ [26]. Se recunoaște că tratamentul cu 5-FU cauzează alterarea ADN în special prin ruperea catenelor duble (și mai puțin catenele simple), în faza S, prin incorporarea inadecvată a fluorodeoxiuridin - trifosfat (FdUTP) în ADN [6,22]. Căile de control asupra leziunilor ADN-ului din G₁, S și G₂ vor inhiba dezvoltarea celulei tumorale prin activarea reparării și menținerea stabilității genomului, iar în cazul depășirii sistemelor de control se va iniția senescența celulară [32].

Timidilat sintetaza (TS) reglează sinteza de dTMP (deoxitimidin-monofosfat) din dUMP (deoxiuridin-monofosfat) în prezența cofactorului metil 5,10 – CH₂THF. Prin urmare, TS devine enzima-cheie în perspectiva sintezei normale de ADN din moment ce dTMP este singura sursă de timidină necesară producerii de ADN. Metabolitul 5-FU – FdUMP va participa la formarea unui complex terțiar stabil cu TS și 5-10CH₂THF (metilen tetrahidrofolat); astfel FdUMP inhibă activitatea TS și va întrerupe sinteza ADN-ului celulei tumorale. Activitatea timidilat sintetazei este considerată a fi una din determinantele atât a eficacității cât și a toxicității 5-FU [15].

Trei tipuri de polimorfisme ale genei TS (TMYS) au fost descoperite până acum. În primul rând, există un număr variabil de secvențe repetitive de 28 de baze asociate (VNTR) în regiunea netranscrisă 5'-UTR (5'-untranslated region). În al doilea rând, polimorfismul nucleotidelor izolate (SNP-single nucleotide polymorphism) dispuse în tandemuri repetitive aduce o variație funcțională în plus a transcripției (TMYS). În al treilea rând, există o deleție a unei perechi de 6 baze sau inserția polimorfică a perechii de baze 1494 în regiunea 3'-UTR [27]. Reglarea transcriptională a TYMS este dependentă de un număr de factori stimulatori (USF-upstream stimulatory factor) al site-urilor de reglare în tandemurile repetitive. Proteina upstream stimulatory factor legându-se de tandemuri repetitive, sporește activitatea catalizatorului TYMS. Numărul tandemurilor repetitive variază între 2 și 9 [20] cu repetițiile duble (2R/2R) sau triple (3R/3R) fiind cele mai frecvente. Numărul site-urilor de legătură al USF este unul în 2R și două în 3R astfel încât această triplă repetitivă va oferi, cel puțin

teoretic o activitate transcriptională mult crescută comparativ cu o dublă repetitivă. În consecință, analizele funcționale ale TS în vitro dar și în studiile clinice ale cancerelor gastro-intestinale au demonstrat creșterea activității TS în paralel cu creșterea numărului de tandemuri repetitive [10]. Astfel, prezența repetițiilor triple (3R/3R) s-a demonstrat a fi asociat cu expresia mai marcată a timidilat sintetazei [16] traducându-se într-o eficiență diminuată a 5-fluorouracilului [25], în condițiile în care repetițiile duble homozigote aduc un beneficiu clinic în răspunsul chimioterapiei cu 5-FU [29].

Dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) este implicată în calea metabolică inițială ducând la catabolismul bazelor pirimidinice uracil și tiamin. Prin urmare, un agent pirimidinic precum 5-FU va fi de asemenea degradat cu ajutorul DPD. Din moment ce aproximativ 80% din totalul de 5-FU administrat este catabolizat, activitatea DPD este practic cea mai importantă determinantă a acumulării 5-FU cu toxicitatea care rezultă din aceasta [9].

Aproximativ 25 de ani în urmă a fost pentru prima oară documentat un defect genetic autosomal recesiv moștenit care cauzează o deficiență severă în funcționalitatea DPD. Prezenta aceste mutații la un pacient aflat sub chimioterapie cu 5-FU s-a demonstrat a avea un efect defavorabil în eliminarea agentului biologic activ a 5-FU cu o toxicitate severă rezultată, în special neutropenia febrilă, trombocitopenia, anemia, mucozită, stomatită, diaree, vărsături și efecte neurologice [18].

Inter-relatia 5-FU cu timidilat sintetaza. Până în momentul de față nu există suficiente studii care să stabilească cu certitudine dacă expresia timidilat sintetazei în tumorile sferei digestive în particular se asociază cu un prognostic clinic nefavorabil la pacienții tratați cu diferite scheme chimioterapeutice având în comun 5-FU. Mai mult de atât, supraexpresia timidilat sintetazei pare a fi asociată cu rezistența la tratament cu 5-FU în cancerul colo-rectal și cancerul gastric; totuși și alte alterații genetice a căilor de reglare a apoptozei celulare pot fi incriminate în dezvoltarea rezistenței. Lenz și colegii au raportat asocierea între unele genotipuri ale timidilat sintetazei și probabilitatea recurențelor, în special în stadiile II/III a cancerului colorectal

la pacienții tratați cu o terapie adjuvantă bazată pe 5-FU [21]. Cauzele variabilității în expresia TS nu sunt pe deplin înțelese, unele polimorfisme genetice fiind incriminate în influențarea expresiei TS, totuși se admite ca unele genotipuri pot fi considerate factori de prognostic în aprecierea răspunsului tumoral la chimioterapia cu 5-FU. Nivelurile ridicate a timidilat sintetazei au o valoare predictivă la tratamentul cu unii agenți chimioterapeutici precum gemcitabina și agenții de platină, lucru demonstrat în puținele trialuri prospective [12]. Unul dintre cele mai semnificative studii pentru demonstrarea interrelației dintre nivelul TS și rezistența la 5-FU este cel al Fukui Y., Oka T., Nagayama S., Danenberg PV și colaboratorilor care au documentat răspunsul la tratament în relație cu nivelele exprimate de timidilat sintetaza a celulelor tumorale la peste 17.000 de tumori rezecate la pacienții din studiu [8]. Autorii nu au reușit să demonstreze cu certitudine cum exact enzima TS influențează răspunsul la 5-FU și nici nu s-a demonstrat dacă supraexpresia timidilat sintetazei este cauza sau doar răspunsul rezistenței în tratamentul cu fluorouracil. Bazându-ne pe un alt studiu, se pare ca atât nivelul de timidilat sintetaza cât și variabilitatea genotipul respectivei gene sunt asociate cu răspunsul la 5-FU la pacienții cu cancer colorectal și cancer gastric [15]. Natura exactă a relației dintre TS și celulele tumorale rămâne și acum insuficient precizată.

Analizele desfășurate ulterior au demonstrat că respectivul genotip 2R/2R este mult mai frecvent regăsit în apariția cancerului gastroesofagian printre asiatici în același timp având efect protectiv împotriva cancerului colorectal la pacienții caucazieni. În plus, polimorfismul TS 1494del6 contribuie la susceptibilitatea genetică a cancerului de sân la pacientele asiatice [32]. Relația dintre nivelele timidilat sintetazei și răspunsul la tratamentul chimioterapeutic cu 5-FU constituie baza unui studiu prospectiv în care TS se măsoară înainte de tratament pentru a determina protocoalele de tratament individualizate.

Iwahashi S., Shimada M., Utsunomiya T și alții au condus un studiu pentru a determina rolul timidilat sintetazei și expresia DPD în cancerul de vezică biliară. Nivelele scăzute de timidilat sintetază au fost corelate cu o incidență crescută a metastazării în ganglionii limfatici

regionali și stadii clinice mai avansate ale cancerului. S-a presupus că expresia TS poate fi utilă în identificarea pacienților la risc pentru progresia cancerului de vezică biliară [11].

Importanța în cancerul O.R.L. Un mecanism important al apariției rezistenței celulelor tumorale la 5-FU rezultă din abilitatea lor de a învinge inhibiția agentului chimioterapeutic asupra timidilat sintetaza; în consecință, supraexpresia timidilat sintetazei se traduce într-un răspuns deficitar la tratament și supraviețuire mai mică. Nu există un consens și nici o bază solidă de studii care să recomande testarea în pre-terapia cu 5-FU a expresiei TS și astfel rămâne echivocă necesitatea unei asemenea testări în vederea deciziilor terapeutice sau a determinării eficacității tratamentului [23]. Importanța practică a expresiei TS în rezistența tumorală la tratamentul cu 5-FU a fost semnalată de numeroase studii care au reușit să demonstreze că atât nivelele ridicate ale enzimei cât și amplificările stabile ale genelor TS specifice sunt asociate cu rezistența la fluoropirimidine [30, 5, 14]. Pe de alta parte nivelurile TS pot fi crescute în vitro ca și rezultat al expunerii tumorii la 5-FU conducând la menținerea nivelurilor crescute a TS [3, 4, 28]. Studiile menționate mai sus sugerează că această abilitate a tumorii de a exprima rapid TS ca și răspuns la tratamentul cu agenți citotoxici poate fi determinant în dezvoltarea rezistenței la 5-FU. O importanță deosebită capătă în aceste condiții măsurarea nivelului de TS. Tragem concluzia așadar că expresia TS este relevantă pentru identificarea pacienților cu cancer O.R.L care vor beneficia de chimioterapia neoadjuvantă cu fluoropirimidine. Patrick G. Johnston, Katherine A. Behan and Carmen J. Allegra, în studiul lor indică supraexpresia timidilat sintetazei asociată cu cancerule rezistente la tratament, sugerând că nivelele de exprimare a timidilat sintetazei în celule poate fi considerat un factor de prognostic pentru recurențe și calitatea răspunsului la pacienți. De asemenea s-a observat că o chimioterapie de inducție cu 5-FU în combinație cu cisplatin rezultă în creșterea ratei de răspuns și controlul mai strict al tumorii, crescând și rata de reușită a tratamentului chirurgical. Mai mult decât atât, pacienții cu tumori demonstrate a avea o expresie TS focalizată, au o rată de supraviețuire ridicată [13]. Studiile în vitro au

arătat că rezistența liniilor celulare la 5-FU crește expresia TS. Similar, tumorile colorectale cu o expresie crescută de TS sunt în general neinfluențate de terapia cu 5-FU însă expresia izolată a enzimei nu este nici ea suficientă pentru a prezice rata de răspuns favorabil [1]. Pentru a evita astfel instalarea rezistenței la 5-FU s-au încercat diverse artificii terapeutice în special bazate pe adăugarea unor agenți chimioterapeutici capabili să diminueze expresia timidilat sintetazei precum leucovorin, sau mai nou, taxani (docetaxel sau paclitaxel) crescând rata de răspuns. Rolul taxanilor în cancerul O.R.L. a fost revizuit în anul 2000. Ca și agenți necombinați cu 5-FU, taxanii au avut o rată de răspuns între 20-42% la pacienții cu boală metastatică sau recurentă. De menționat că în acest studiu pacienții nu au avut o chimioterapie prealabilă. Aceste date încurajatoare ne permit să sperăm renunțarea la 5-FU din schemele de tratament pentru cancerul O.R.L. evitându-se reacțiile adverse severe asociate fluoropirimidinelor. O altă modalitate de a reduce din agresivitatea 5-FU exprimată prin mucozită, diaree, dureri abdominale - care apar în infuzia continuă pe 96 de ore, este modificarea schemei de tratament în care 5-FU este infuzat pe 24 de ore cu o doză de $2600\text{mg}/\text{m}^2$ săptămânal plus docetaxel ($75\text{mg}/\text{m}^2$) și carboplatin ($300\text{mg}/\text{m}^2$) la fiecare 3 săptămâni în 3 cure de tratament [17].

Concluzii.

Chiar dacă înțelegerea apariției rezistenței la 5-FU este redusă de multe necunoscute, principiul de bază relevat de ultimele studii asupra timidilat sintetaze propune o abordare rațională a tratamentului cancerelor din sfera O.R.L. Atât inhibiția insuficientă a timidilat sintetazei cât și nivelul crescut intrinsec sunt implicate în rezistența cu 5-FU. Nivelul crescut de expresie enzimatică poate fi codificată într-un prognostic nefavorabil la chimioterapie. Aceste informații sunt utile în implementarea unei chimioterapii mai efective precum chimioterapie bazat pe inhibiția timidilat sintetazei sau scoaterea 5-FU din schemele de tratament și introducerea unor agenți terapeutici cu o eficiență comparabilă 5-FU-lui sau fără reacții adverse incriminate acestuia din urmă. Din moment ce 5-FU și-a demonstrat limitele în cancerul epitelial

bronhopulmoare unde nu este utilizat în schemele terapeutice, considerăm oportună reducerea utilizării 5-FU și în cancerul O.R.L. pe același principiu al similarității de epiteliu și răspunsului redus prin creșterea expresiei de TS, lucru evidențiat de studii în alte tipuri de cancer.

Bibliografie

- [1] Bhushan S., McLeod H., and Walko CM., Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill
- [2] Burri RJ., Lee NY. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Head and Neck Cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2009;9(3):293-302., 03/23/2009
- [3] Chu E., Koeller DM., Johnston PG., Zinn S., Allegra CJ. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. Mol Pharmacol 1993;43:527-33.
- [4] Chu E., Zinn S., Boarman D., Allegra CJ. The interaction of γ interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. Cancer Res 1990;50:5834-40
- [5] Clark JL., Berger SL., Mittelman A., Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. Cancer Treat Rep 1987;71:261-5
- [6] Curtin NJ., Harris AL., Aherne GW. Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. Cancer Res 1991, 51:2346-2352
- [7] Diasio RB., Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin. Pharmacokinet. 16, 215-237 (1989).
- [8] Fukui Y., Oka T., Nagayama S., Danenberg PV., Danenberg KD., Fukushima M.: Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, orotate phosphoribosyltransferase mRNA and protein expression levels in solid tumors in

- large scale population analysis. *Int. J. Mol. Med.* 22,709-716 (2008).
- [9] Heggie GD., Sommadossi JP., Cross DS., Huster WJ., Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res.* 1987; 47: 2203–6.
- [10] 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 for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 1995; 20: 191–7.
- [11] Iwahashi S., Shimada M., Utsunomiya T., Morine Y., Imura S., Ikemoto T., Mori H., Hanaoka J. Role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expressions in gallbladder carcinoma. *Surg Today.* 2012 Jan 24
- [12] Jack West H., What Molecular Markers to Order in Non-Small Cell Lung Cancer? It's A Murky Mess!
- [13] Johnston PG., Behan KA. and Allegra CJ. Thymidylate Synthase Expression and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Advanced Head and Neck Cancer *JNCI J Natl Cancer Inst* (1997) 89 (4): 308-313. doi: 10.1093/jnci/89.4.308
- [14] 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.
- [15] Johnston PG., Lenz HJ., Leichman CG., Danenberg KD., Allegra CJ., Danenberg PV., Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1407-12.
- [16] Kawakami K., Salonga D., Park JM. 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
- [17] Kohno N. The role of taxanes for head and neck cancer, *Gan To Kagaku Ryoho.* 2005 Dec;32 (13):2035-9.
- [18] Lee A., Ezzeldin H., Fourie J., et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2004;2:527-532
- [19] Longley DB., Harkin DP., Johnston PG (May 2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies". *Nat. Rev. Cancer* 3 (5): 330–8. doi:10.1038/nrc1074. PMID 12724731
- [20] Luo HR., Lü XM., Yao YG., et al. Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem. Genet.* 2002; 40: 41–51.
- [21] Peters GJ., Backus HH., Freemantle S., van Triest B., Codacci-Pisanelli G., van der Wilt CL., Smid K., Lunec J., Calvert AH., Marsh S., McLeod HL., Bloemena E., Meijer S., Jansen G., van Groeningen CJ., Pinedo HM. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jul 18;1587(2-3):194-205.
- [22] Peters GJ., van Triest B., Backus HH., 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, 36:916-924
- [23] Popat S., Matakidou A., Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22:529-536
- [24] Posner MR. Role of Induction Chemotherapy in the Treatment of Head and Neck Cancer -- An Ongoing Debate: An Expert Interview With Dr. Marshall R. Posner
- [25] Pullarkat ST., Stoehlmacher J., Ghaderi V., et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2001; 1: 65–70.

- [26] Shah MA., Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001, 7:2168-2181.
- [27] Shouji S., Pharmacogenetics of Fluoropyrimidine and Cisplatin, Gastrointestinal Unit, Settlement Clinic, Towa, Adachi-ku, Tokyo, Japan
- [28] Swain SM., Lippman ME., Egan EF., Drake JC., Steinberg SM., Allegra CJ. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:890-9.
- [29] Villafranca E., Okruzhnov Y., Dominguez MA., 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.
- [30] Washtien WL. Increased levels of thymidylate synthetase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 1984;25:171-7
- [31] Zhou BB., Bartek J.: Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004., 4:216-225.
- [32] Zhou JY., Shi R., Yu HL., Zeng Y., Zheng WL., Ma WL. The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer.* 2012 Feb 5. doi: 10.1002/ijc.27465.