

CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 E A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA NO CARCINOMA MAMÁRIO

Correlation between p53 Protein expression and tumor response to primary chemotherapy on mammary carcinoma

JULIA YORIKO SHINZATO¹ LUIZ CARLOS TEIXEIRA¹ MARIA SALETE COSTA GURGEL¹ MARCELO ALVARENGA¹ HENRIQUE BENEDITO BRENELLI¹

Este estudo teve como objetivo avaliar a correlação da expressão da proteína p53 com a resposta tumoral à quimioterapia primária, em pacientes portadoras de carcinoma da mama ressecável. Foi um estudo clínico, analítico, parcialmente retrospectivo e prospectivo, num total de 65 pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia Mamária, do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, da Universidade Estadual de Campinas, submetidas a 3 ciclos de quimioterapia com FAC ou CMF, seguidos de cirurgia. A expressão da proteína p53 foi avaliada através do método imunistoquímico utilizando o anticorpo monoclonal D07, nas lâminas de citologia ou de histologia dos tumores, previamente à quimioterapia. Encontrou-se uma frequência da superexpressão da proteína p53 em 34% das pacientes. Não se observou influência da expressão da proteína p53 na taxa de resposta à quimioterapia primária.

Unitermos: p53, Quimioterapia, Câncer da Mama.

Keywords: p53, Qhemotherapy, Breast Cancer.

Trabalho realizado na área de Oncologia, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

1 – Professor Assistente Doutor.

Endereço para correspondência: Julia Yoriko Shinzato - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – Unicamp - Rua Alexander Flemming, 101 – CEP 13081-970 – Campinas – SP – Fax: (19) 788-9424.

Introdução

A utilização da quimioterapia como primeira abordagem no tratamento das pacientes portadoras do carcinoma da mama considerado ressecável teve como objetivos realizar um maior número de cirurgias conservadoras e aumentar a sobrevida dessas pacientes (2,5,9,20).

A resposta objetiva obtida com este tratamento, isto é, uma taxa de redução maior que 50% em relação ao volume inicial, varia de 63% a 85% (3). A redução clínica completa varia de 17% a 66%, conforme os diferentes esquemas utilizados (2,22) e as maiores respostas foram observadas em tumores pequenos e sem receptor de estrógeno, independente do esquema de quimioterapia (2).

Outras características tumorais que estão envolvidas na resposta à quimioterapia são: a neovascularização, células da defesa imunológica, tempo de duplicação celular e alterações de elementos citoplasmáticos e nucleares como a proteína p53.

Recentemente tem-se estudado o gene p53, localizado no braço curto do cromossoma 17 e que é considerado

como um gene supressor de tumor devido à sua função reguladora da proliferação celular (9,12). Presente nas células normais na forma "wild" ou não-mutante, tem a função de bloquear a divisão celular através de uma proteína por ele produzida, atuando como mediador da apoptose quando da ocorrência de alterações no genoma (17). Quando esse gene torna-se mutante, ocorre perda do controle do ciclo celular (13) e, como consequência, podem sobreviver células com alto grau de mutações (24).

Nas células normais a concentração da proteína p53 é geralmente muito baixa, não sendo possível sua detecção pelos métodos imunistoquímicos. Entretanto, os tumores com formas mutantes do gene p53 expressam altos níveis da proteína, de maior vida-média, sendo portanto passíveis de detecção imunistoquímica (12).

Como o efeito terapêutico de várias drogas antitumorais decorre dos danos provocados no DNA ou por indução da apoptose celular (10,23), poder-se-ia utilizar a detecção da proteína p53 como marcador de uma eventual resposta aos quimioterápicos (6,14).

Por outro lado, a instabilidade decorrente da perda da função do gene p53 não-mutante permitiria a amplificação de outros genes, como o MDR 1, que está associado com a expressão de uma glicoproteína de 170 kilo-Daltons, a proteína p170 (1). Essa proteína é responsável pela resistência do tumor a vários agentes citotóxicos como antraciclina e alcalóides da vinca, fenômeno conhecido como a resistência a múltiplas drogas (MDR) (25). Assim, haveria uma correlação direta entre a presença da proteína p170 nas células do carcinoma da mama e má resposta à quimioterapia (1).

Poucos trabalhos clínicos, geralmente discordantes, relacionam a superexpressão da proteína p53 com a quimioterapia, existindo uma tendência em correlacionar a superexpressão da proteína p53 com a resistência dos tumores à quimioterapia (4,11).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação entre a expressão da proteína p53 das células tumorais e a resposta à quimioterapia primária, em pacientes portadoras de carcinoma ressecável, tratadas no CAISM/Unicamp.

Casística e métodos

Participaram deste estudo, 65 pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia Mamária do CAISM/Unicamp, nos períodos de abril de 1994 a abril de 1995 e de maio de 1996 a agosto de 1997. Foram incluídas pacientes com até 70 anos de idade, portadoras de carcinoma ductal

invasivo, apresentando à mamografia tumores acima de 15 mm no seu maior diâmetro, diagnosticados por PAAF, biópsia por agulha grossa ou biópsia incisional, e sem evidência de metástase a distância. Todas receberam tratamento inicial com três ciclos de quimioterapia com Fluorouracil (500 mg/m²), Adriamicina (50 mg/m²) e Ciclofosfamida, (500 mg/m²) ou Ciclofosfamida (500 mg/m²), Methotrexate, (50 mg/m²) e Fluorouracil, (500 mg/m²) e, posteriormente submetidas a quadrantectomia e linfadenectomia axilar ou mastectomia radical, dependendo do tamanho tumoral final.

A expressão da proteína p53 foi avaliada pelo método imunistoquímico (IHQ) de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (8) com modificações, nas lâminas de citologia nas pacientes que apresentavam PAAF como único método diagnóstico e nas lâminas recortadas do bloco de parafina referentes às biópsias por agulha grossa ou incisional, todos prévios à quimioterapia (21). O resultado da leitura à microscopia óptica, tanto na citologia como no corte histológico, foi classificado em duas categorias: **negativo**: até 10% de células por campo, com seus núcleos corados e **positivo**: mais de 10% de células coradas.

Para calcular a resposta tumoral à quimioterapia, foram considerados como medida inicial o tamanho bidimensional à mamografia e como medida final o tamanho bidimensional à macroscopia da peça cirúrgica. Consideramos redução total a ausência de neoplasia invasora à microscopia. Os valores dos produtos inicial e final foram comparados e a resposta classificada em duas categorias: **com resposta objetiva**: redução maior que 50%; **sem resposta objetiva**: progressão, doença estacionária e redução parcial até 50%.

Para a correlação da variável independente (expressão inicial da proteína p53 com a variável dependente (resposta tumoral) foi utilizado o teste estatístico de Qui-Quadrado, com correção de Yates. Definiu-se como significativo o valor de $p < 0,05$.

Resultados

A idade das pacientes variou de 26 a 68 anos, com uma média de $49 \pm 9,64$. A expressão da proteína p53 foi avaliada previamente à quimioterapia primária no material de citologia ou de histologia, num total de 65 casos, tendo sido encontrada positividade em 22 casos (tabela I).

A realização de quimioterapia primária no total de 3

Tabela I. Distribuição das pacientes segundo a expressão da proteína p53

P53	N	%
Negativo	43	66
Positivo	22	34
Total	65	100

ciclos prévios à cirurgia proporcionou, a 60% das pacientes, uma resposta objetiva, ou seja, redução maior ou igual a 50% em relação ao tamanho inicial (tabela II).

Tabela II. Distribuição das pacientes segundo a resposta tumoral à quimioterapia

Resposta Objetiva	N	%
Ausente	26	40
Presente	39	60
Total	65	100

As respostas à quimioterapia primária ocorreram igualmente entre os dois grupos, independente da expressão da proteína p53 (60% nos casos p53 negativos e 59% nos p53 positivos) (tabela III).

Tabela III. Correlação entre a resposta tumoral à quimioterapia e a expressão da proteína p53

Resposta	p53			
	Negativo		Positivo	
	N	(%)	n	(%)
Objetiva				
Ausente	17	(39,5)	9	(40,9)
Presente	26	(60,5)	13	(59,1)
Total	43	(100)	22	(100)

Entretanto, dos seis casos que apresentaram redução completa histológica da neoplasia invasora, dos quais três sem doença residual e três apenas com carcinoma *in situ*, quatro casos (67%) apresentavam superexpressão da proteína p53 (tabela IV).

Tabela IV. Distribuição da expressão da proteína p53 em tumores com resposta completa à quimioterapia primária

p53	Anatomopatológico			
	Sem neoplasia		CIS	
	N	(%)	n	(%)
Negativo	1	(33,3)	1	(33,3)
Positivo	2	(66,7)	2	(66,7)
Total	3	(100)	3	(100)

Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por imunistoquímica, a expressão da proteína p53 nas células tumorais provenientes das pacientes portadoras de carcinoma mamário ressecável, e que foram submetidas à quimioterapia primária, analisando sua correlação com a resposta ao tratamento.

O gene p53 está presente nas células normais na forma "wild" e expressa baixos níveis da proteína p53, envolvida na transcrição do gene, síntese e reparo do DNA, na regulação do genoma e na morte celular programada (18). Essa proteína forma um complexo com outras proteínas celulares e algumas oncoproteínas virais, podendo dar origem à forma mutante, com perda da capacidade de controlar o ciclo celular. Essa forma mutante do gene p53 expressa altos níveis da proteína p53 que, por possuir maior vida-média, pode ser detectada através da técnica de imunistoquímica (7).

Ao avaliarmos a expressão da proteína p53 em 65 casos de carcinoma mamário antes da ação da quimioterapia, utilizando o anticorpo monoclonal D07, encontramos 34% de positividade ou superexpressão desta proteína. Quando correlacionamos a expressão desta proteína com a resposta à quimioterapia primária, observamos que cerca de 60% das pacientes, tanto as que tinham tumores p53 positivos como p53 negativos, apresentaram resposta objetiva ao tratamento. Portanto, aparentemente, a avaliação da proteína p53 não prediz resposta à quimioterapia. Apesar do pequeno número de casos de redução histológica completa, 67% deles apresentavam superexpressão da proteína p53, o que sugere que tumores com gene p53 mutante têm maior possibilidade de apresentar redução total com a quimioterapia.

Makris et al. (1995), ao avaliarem a expressão da proteína p53 nas pacientes submetidas à quimio-endocrinoterapia primária, não encontraram diferença estatisticamente significativa quanto à resposta ao tratamento (16), mesmo resultado observado por MacGrogan et al. (15).

Faille et al., em 1994, utilizando quimioterapia neoadjuvante em pacientes portadoras do carcinoma localmente avançado, relataram baixa taxa de resposta nas mulheres que apresentavam expressão aumentada da proteína p53, embora sem significância estatística (4). Experimentalmente, uma associação significativa foi verificada *in vitro*, entre a superexpressão da proteína p53 e a quimiorresistência (11).

A utilização da quimioterapia como tratamento inicial do câncer da mama operável tem como objetivo promover a redução do volume tumoral e possibilitar a realização de cirurgias menos extensas. Esta nova modalidade de tratamento permitiu a avaliação em modelo humano do efeito imediato da quimioterapia. Assim, a quimioterapia primária

possibilita a análise de alguns fatores possivelmente relacionados com a resposta ao tratamento, como a expressão da proteína p53, que no presente estudo não exerceu influência na resposta à quimioterapia primária, não tendo demonstrado valor na seleção de pacientes que poderiam responder ao tratamento.

Summary

The aim of this study was to evaluate the correlation of p53 protein expression and the tumor response to primary chemotherapy in patients presenting resectable breast carcinoma. This study was clinical, experimental, partially retrospective and prospective, and performed in 65 patients. These patients were seen at the Breast Disease Outpatient Clinic of University of Campinas and submitted to three cycles of chemotherapy with FAC or CMF followed by surgery. The p53 protein expression was evaluated through the immunohistochemical technique by utilizing the monoclonal antibodies D07 before chemotherapy. In 34% of the patients a p53 expression was observed. The influence of p53 protein expression on the response degree to the primary chemotherapy was not observed.

Referências bibliográficas

1. Bodey B, Bodey Jr B, Groger A M, et al. Immunocytochemical detection of the p170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cells: clinical and therapeutical significance. *Anticancer Res* 1997;17:1311-8.
2. Bonadonna G, Veronesi V, Brambilla C, et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1539-45.
3. Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, Salvadore B. Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1995;45:227-43.
4. Faillie A, De Cremoux P, Extra JM, et al. p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 1994;69:1145-50.
5. Fisher B, Brwn NA, Mamounas E, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer; findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* 1997;15:2483-93.
6. Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, et al. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemia. *Leukemia* 1993;7:659-70.
7. Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited!. *J Pathol* 1994;172:1-4.
8. Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981;75:734-8.
9. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986;320:84-7.
10. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989;49:5870-8.
11. Koechli OR, Schaer GN, Seifert B, et al. Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. *Lancet* 1994;344:1647-8.
12. Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990;4:1-8.
13. Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
14. Lowe SW, Bodis S, Macclatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266:807-10.
15. MacGrogan G, Mauriac L, Durand M, et al. Primary chemotherapy in breast

- invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, pS2, MiB-1 and GSTpi. *Br J Cancer* 1996;74:1458-65.
16. Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Allred C. p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 1995;345:1181-2.
17. Milner J. The role of p53 in normal control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:282-6.
18. Montenarh M. Functional implications of the growth-suppressor / oncoprotein p53. *Int J Oncol* 1992;1:37-45.
19. Ragaz J. Emerging modalities for adjuvant therapy of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy. *Natl Cancer Inst Monogr* 1986;1:145-52.
20. Scholl SM, Fourquet A, Asselain B, et al. Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumours considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomised trial: S6. *Eur J Cancer* 1994;30A:645-52.
21. Shinzato JY. Expressão da proteína p53 como indicadora da resposta à quimioterapia primária do carcinoma mamário: estudo clínico e correlação com tamanho tumoral, grau nuclear e receptor de estrógeno. Campinas, 1998. [Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP]
22. Smith IE, Walsh G, Jones A, et al. High complete remission rates with primary neoadjuvant infusional chemotherapy for large early breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:424-9.
23. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:749-55.
24. Symonds H., Krall L., Remington L. et al. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994;78:703-11.
25. Van Kalken CK, Pinedo HM, Giaccone G. Multidrug resistance from the clinical point of view. *Eur J Cancer* 1991;27:1481-6.

Agradecimentos: ao FAEP - Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, que financiou a pesquisa, à Dra. Sílvia Pierre Irazusta, à Dra. Glauce Aparecida Pinto e à técnica Fernanda Paula de Oliveira.