



MESTRADO EM GENÉTICA

Dissertação de Mestrado

IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA p53 EM CÂNCER DE MAMA. UM IMPORTANTE FATOR PROGNÓSTICO?

DEIDIMAR CÁSSIA BATISTA ABREU

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Goiânia-GO

2008

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA p53 EM CÂNCER DE
MAMA. UM IMPORTANTE FATOR PROGNÓSTICO?**

DEIDIMAR CÁSSIA BATISTA ABREU

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Stricto Sensu em
Genética da Universidade Católica
de Goiás, como requisito parcial
para obtenção do Título de
Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Maria Paula Curado

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Goiânia-GO

2008

BANCA EXAMINADORA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Deidimar Cássia Batista Abreu

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado

Co-Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Membros Externos:

Titular: Professora Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos

Suplente: Professora Dra. Rejane Silva Sena

Membros Internos:

Titular: Professor Dr. Wagner Gouvêa dos Santos

Suplente: Professor Dr. Flávio Monteiro Ayres

Curso de Mestrado em Genética

Universidade Católica de Goiás

Data: 28/05/2008



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 - Setor Universitário
Caixa Postal 86 - CEP 74605-010
Goiânia - Goiás - Brasil
Fone: (62) 3227.1071 - Fax: (62) 3227.1073
www.ucg.br - heck@ucg.br

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 28 DE MAIO DE 2008 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA
9,0 (Nove inteiros)

Maia Paula Curado
Dr^a. Maria Paula Curado / MGene - UCG
(presidente orientadora)

Vera Aparecida Saddi
Dr^a. Vera Aparecida Saddi / MGene - UCG
(membro interno co-orientadora)

Silvia Helena Rabelo dos Santos
Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos / Fac. Farmácia - UFG
(membro externo)

Wagner Gouvêa dos Santos
Dr. Wagner Gouvêa dos Santos / MGene - UCG
(membro interno)

“Hoje em dia quase todas as doenças têm seu remédio, mas ainda não se encontrou remédio algum para a indiferença com o próximo.”

Madre Teresa de Calcutá

***Dedico este
trabalho...***

Ao meu marido Eliseu, aos meus filhos Pedro Paulo e Ana Flávia, a minha mãe e meus irmãos pelo incentivo e apoio incondicional. Dedico também a todos aqueles que fazem da medicina um sacerdócio e não apenas uma profissão.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, que através de um curso básico de oncologia me mostrou o que é a oncologia e me colocou pela primeira vez dentro de um hospital de câncer. E a partir daí nunca mais deixei de viver a oncologia.

À Prof^a Dr^a. Vera Aparecida Saddi, pela sua paixão por ensinar. Obrigada por cada minuto que se dispôs a me ajudar. Que Deus a recompense!

Ao Dr. Wilmar José Manoel que desde a minha formação acadêmica se dispôs a me ensinar tudo o que sabia e sabe!

Ao Dr. Carlos Inácio de Paula que com suas colocações incisivas e “paternas” forneceu as coordenadas para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás, pela dedicação e amor ao ensino de qualidade.

Aos amigos e colegas pós-graduandos do Programa Pós-Graduação em Genética da Universidade Católica pela companhia e amizade durante estes meses que passamos juntos.

À equipe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia, em especial ao biólogo Edésio Martins pelo profissionalismo, competência e eficiência que fazem do Registro de Câncer um modelo para o Brasil e para o mundo.

Aos colegas e médicos residentes do Hospital Araújo Jorge, Unidade Oncológica de Anápolis e Sistema de Prevenção da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, em especial os colegas patologistas.

Aos colegas do Serviço de Tecido Conjuntivo, do Hospital Araújo Jorge/ACCG: Carlos Inácio de Paula, Roberto Cesar de Conti, Wilmar José Manoel, Luis de Paula Silveira Júnior, Carlos Henrique do Prado e Flávio Leão Rabelo pelo apoio prestado durante a realização deste estudo.

Aos funcionários e amigos do Instituto de Ensino e Pesquisa da ACCG, pela disponibilidade e apoio técnico na finalização da presente obra.

SUMÁRIO

	Página
Figuras, Tabelas e anexos	x
Siglas, Símbolos e Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Introdução	1
História natural do Câncer de Mama	3
Epidemiologia;	5
Fatores de risco;	7
Classificação histológica dos carcinomas de mama	9
Estadiamento	10
Fatores prognósticos para o Câncer de Mama	11
O gene TP53	12
A proteína p53	17
Métodos de análise de p53 e TP53	22

p53 e Câncer de Mama.	24
Justificativas	29
Objetivos	30
Metodologia	31
Resultados	34
Discussão	50
Conclusões	59
Referências Bibliográficas	60
Anexos	73

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

Figura 1	Localização do gene TP53 no cromossomo 17
Figura 2	Representação esquemática do gene TP53.
Figura 3	Representação esquemática das funções de p53 mutante.
Figura 4	Representação esquemática da estrutura da proteína p53
Figura 5	Representação esquemática simplificada da via intracelular sinalizada por p53.
Figura 6	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a faixa etária (anos)
Figura 7	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o estadiamento clínico
Figura 8	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o comprometimento linfonodal axilar
Figura 9	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com os locais de metástase à distância
Figura 10	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o tamanho tumoral
Figura 11	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o grau de anaplasia do tumor
Figura 12	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o tipo histológico do tumor
Figura 13	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a Imunodeteccção de p53
Figura 14	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteccção de receptores de estrogênio
Figura 15	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteccção de receptores de progesterona

Figura 16	Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a hiperexpressão de c-erbB-2
Figura 17	Sobrevida global em cinco anos para o grupo de pacientes estudadas.
Figura 18	Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com diferentes faixas etárias.
Figura 19	Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com os diferentes tamanhos de tumores.
Figura 20	Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o número e o comprometimento linfonodal axilar.
Figura 21	Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico.
Figura 22	Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com a imunodeteção da proteína p53.
Tabela 1	Classificação dos tumores de mama segundo estágio clínico.
Tabela 2	Classificação em categorias dos fatores prognósticos em câncer de mama, segundo Colégio Americano de Patologistas
Tabela 3	Associação entre a imunodeteção nuclear da proteína p53 e variáveis prognósticas clinicopatológicas
Tabela 4	Referências bibliográficas referentes à literatura consultada onde é relacionada a imunexpressão da proteína p53 como fator prognóstico em câncer de mama.
Anexo 1	Ficha de coleta de dados clínico-patológicos – Hospital Araújo Jorge - ACCG
Anexo 2	Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG (CEPACCG)

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACCG	<i>Associação de Combate ao Câncer em Goiás</i>
APAF-1	<i>Proteína citosólica envolvida na morte celular ou apoptose "apoptotic protease activating factor 1"</i>
Bp53.12	<i>Anticorpo monoclonal anti p53 em IHQ</i>
BRCA1	<i>Gene supressor de tumor "breast cancer type I"</i>
BRCA2	<i>Gene supressor de tumor "breast cancer type II"</i>
CEPACCG	<i>Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás</i>
c-erbB-2/Her2-neu	<i>Membro da família ErbB , do inglês:"epidermal growth factor receptor family"</i>
CM1	<i>Anticorpo policlonal anti p53 em IHQ</i>
DGE	<i>Eletroforese em gradiente de gel desnaturante</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucléico</i>
DO - 1	<i>Anticorpo monoclonal anti p53 em IHQ</i>
DO - 7	<i>Anticorpo monoclonal anti p53 em IHQ</i>
E2F- 1	<i>Do inglês: Elongation Factor 2(grupo de genes que codificam uma família de fatores de transcrição em eucariotos superiores</i>
GADD-45	<i>Do inglês: Growth arrest damage DNA 45</i>
H AJ	<i>Hospital Araújo Jorge</i>
HDM2	<i>Do inglês: Gene Humano Double minute 2(gene que promove bloqueio do crescimento celular, frente aos danos causados ao DNA)</i>
IARC	<i>Do ingles: International Agency for Research on Cancer</i>
IEP	<i>Instituto de Ensino e Pesquisa</i>
IgG	<i>Imunoglobulina G</i>
IHQ	<i>Imuno-histoquímica</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
Kda	<i>Kilodaltons</i>
Kb	<i>Kilobase</i>
Ki-67	<i>Marcador celular de proliferação (Kiel-cidade de origem,</i>

67-clone original)

LOH	<i>Perda de heterozigidade</i>
M	<i>Metástase</i>
MDM2	<i>Do inglês: murine Double minute 2</i>
MIB-1	<i>Anticorpo monoclonal que detecta o antígeno Ki-67</i>
N	<i>Linfonodos</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular</i>
PCR	<i>Reação em Cadeia de Polimerase</i>
PTEN	<i>Gene supressor de tumor do inglês: "phosphatase and tensin homolog"</i>
p21	<i>Conhecido também como CDKN1a , do inglês: "cyclin-dependent kinase inhibitor 1ª"</i>
p53	<i>Proteína p53</i>
T	<i>Tumor</i>
TP53	<i>Gene supressor TP53</i>
Tsb1	<i>Gene trombospodina</i>
TCF4	<i>Fator de transcrição betacatenina</i>
UICC	<i>União Internacional Contra o Câncer</i>
UOA	<i>Unidade Oncológica de Anápolis</i>
WHO	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
SOE	<i>Sem Outras Especificações</i>
Rb	<i>Gene do Retinoblastoma</i>
RCBPGO	<i>Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia</i>
SSCP	<i>Análise Conformacional de Polimorfismo de Cadeia Simples.</i>
SV-40	<i>"Simian vacuolating vírus 40 ou simian vírus 40"</i>

RESUMO

No Brasil, o câncer de mama constitui-se na patologia maligna mais incidente na população feminina e a sua história natural demonstra um curso clínico e sobrevida variáveis. Desde que a terapia sistêmica tornou-se parte integrante do tratamento, a necessidade de saber se uma paciente terá maior ou menor probabilidade de recidiva loco-regional ou à distância tornou-se fundamental. O conhecimento de fatores prognósticos é de suma importância na determinação e eficácia dos programas terapêuticos. A imunodeteção da proteína p53 representa um método indireto de avaliar mutações no gene TP53 e tem sido descrita como fator prognóstico para inúmeras neoplasias malignas humanas e tem sido associada a um pior prognóstico das pacientes. Este estudo avaliou a imunodeteção nuclear da proteína p53 e sua associação com os fatores clinicopatológicos relativos ao paciente e ao tumor, em uma série de 214 pacientes portadoras de carcinoma de mama e atendidas no Hospital Araújo Jorge em Goiânia, no período de 1997-2001. Em nossa casuística a imunodeteção positiva de p53 nas células tumorais não demonstrou nenhuma associação com os parâmetros clinicopatológicos convencionais, incluindo: idade superior a 60 anos, estadiamento clínico, grau de anaplasia, expressão de receptores de estrogênio e/ou progesterona, c-erbB-2, comprometimento linfonodal e tamanho tumoral. A imunodeteção da proteína p53 não influenciou significativamente a sobrevida das pacientes analisadas em nossa série. Resultados semelhantes foram obtidos por outros estudos. Assim, concluímos que métodos moleculares mais sensíveis à detecção de mutações sejam testados, a fim de validar o papel prognóstico das mutações em TP53 no câncer de mama.

Palavras chaves: mama, p53, fator prognóstico, câncer.

ABSTRACT

In Brazil, breast cancer is the most incident tumor in the female population, and its natural history demonstrates variable clinical courses and different survival rates, according to each patient. Since the systemic therapy has an essential role in the treatment of breast cancer patients, the selection of those that will relapse became an important issue. Identification of significant prognostic factors is essential in therapeutic programs. Because it has been extensively reported that mutated p53 proteins are more stable its wild type counterpart, immunodetection of nuclear p53 protein in tumor cells became an indirect method used to analyze TP53 mutations. Immunodetection of nuclear p53 protein is considered a bad prognostic factor in a long list of human malignant tumors. This study analyze the imunodetection of p53 nuclear protein and its possible association with recognized prognostic factors in a group of 214 patients with breast cancer assisted at Hospital Araujo Jorge, in Brazil. In our study any association was demonstrated between p53 immunodetection and recognized clinical factors including: age over than 60 years old, clinical stage, tumor microscopic grade, immunodetection of estrogen and progesterone receptor, c-erbB-2, tumor size and nodal involvement. p53 immunodetection did not significantly influenced five years survival rates in the patients analyzed in our series. Similar results have been reported by different groups. We concluded that the more sensitive molecular methods must be evaluated, in order to validate the prognostic value of TP53 mutations in breast cancer.

Key words: breast, p53, prognostic factor, cancer.

I - INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea de curso clínico variável e que atinge uma grande parcela da população mundial (Nagai, 1995). O câncer de mama é considerado a principal causa de morte por câncer entre as mulheres de todo o mundo (Moura-Gallo *et al.*, 2004). As populações de maior risco se encontram na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, enquanto as populações asiáticas apresentam taxas cinco vezes menores (Mendonça *et al.*, 2004). No Brasil, é a neoplasia mais freqüente no sexo feminino e um aumento nos coeficientes de mortalidade vem sendo verificado nos últimos 20 anos (Moura-Gallo *et al.*, 2004). Em Goiânia, a incidência e a mortalidade por câncer de mama estão aumentando com valores que superam o câncer de colo de útero que durante muitos anos representou o tumor mais incidente nesta população (Silva *et al.*, 2002).

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente. Uma série complexa de fatores relacionados às condições imunológicas, hormonal ou mesmo nutricionais, ainda não está completamente entendida (Abreu *et al.*, 2002). Diversos estudos genéticos sugerem que uma variedade de alterações adquiridas somaticamente contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama (Nagai, 1995).

A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento do tumor é especialmente importante em câncer de mama, devido à variabilidade na progressão clínica observada da doença. Nos últimos anos, estudos utilizando técnicas de biologia molecular aumentaram a nossa compreensão sobre as bases moleculares do câncer de mama, fornecendo dados valiosos acerca dos eventos genéticos associados à etiologia e ao comportamento da doença. Enfoque especial tem sido dado à identificação de marcadores prognósticos moleculares independentes, com capacidade de predizer o risco de recorrência em pacientes sem evidência histológica de disseminação da doença para os linfonodos axilares. Uma vez que 30% das

pacientes linfonodo-negativas recorrem da doença dentro de um período de cinco anos a partir do diagnóstico, a identificação de marcadores prognósticos torna-se essencial (Nagai, 1995). Esta identificação possibilitaria um melhor manuseio terapêutico, com uma maior seletividade na aplicação dos tratamentos adjuvantes, reduzindo o sofrimento oriundo dos efeitos colaterais impostos pela grande maioria das drogas utilizadas nos protocolos de tratamento adjuvante (Abreu *et al.*, 2002).

Mutações do gene TP53 são as anormalidades genéticas mais comumente associadas aos cânceres humanos. Mutações neste gene representam o evento chave na transformação e progressão da maioria das neoplasias. Cerca de 30-50% dos cânceres de mama apresentam mutações no gene TP53 que podem ser demonstradas indiretamente por meio de imunodeteccção nuclear da proteína p53. A imunodeteccção desta proteína em câncer de mama parece estar relacionada a um pior prognóstico e associada a um alto grau histológico, à positividade de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e negatividade de Bcl-2 e receptor estrogênico (Megha *et al.*, 2007).

A imunodeteccção nuclear da proteína p53 é avaliada em vários trabalhos e é considerada como fator de pior prognóstico em câncer de mama em muitos deles (Allred *et al.*, 1993; Mac Grogan *et al.*, 1995; Silvestrini *et al.*, 1996; Zellars *et al.*, 2000), mesmo em pacientes com linfonodos axilares negativos (Klijn *et al.*, 2002). A imuno-histoquímica, usada como método de deteção da proteína p53 é um método prático e acessível (Beenken *et al.*, 2001). As mutações mais comuns do gene TP53 (mais de 80%) são do tipo “*missense*” que levam à síntese de uma proteína estável que se acumula no núcleo, tornando-se detectável por meio de imuno-histoquímica (Soussi *et al.*, 2006). A imunodeteccção é positiva em 80% dos casos em que a mutação é detectada por seqüenciamento gênico (Allred, 1997).

II – HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER DE MAMA

A carcinogênese epitelial acontece por meio de múltiplas etapas distintas de alterações moleculares e celulares. Três fases diferentes são descritas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é rápida e irreversível e envolve ligação direta do carcinógeno e dano ao DNA. A promoção é o período entre a iniciação e a pré-malignidade, sendo geralmente reversível e envolvendo mecanismos primariamente epigenéticos. A progressão é o período entre a doença pré-maligna e a maligna, sendo geralmente irreversível e envolvendo mecanismos primariamente genéticos. Tanto a promoção quanto a progressão são prolongadas (Vogel, 1998).

Na carcinogênese mamária, o período entre a menarca e a primeira gestação à termo é considerado como a época de maior susceptibilidade no processo de iniciação da carcinogênese. Estruturas lobulares pouco diferenciadas, influenciadas pelo estímulo ovulatório estrogênico e progestagênico sucessivo e ininterrupto, mantêm altas taxas de proliferação celular. A gravidez, ao induzir o desenvolvimento completo e a diferenciação do lóbulo mamário, retira-o da população susceptível de iniciação neoplásica. A gravidez precoce e a multiparidade fecham a janela de risco, ao passo que a gestação tardia e a nuliparidade a estendem (Nazário, 2000).

A proliferação celular é um componente necessário na carcinogênese. Sem a proliferação, os danos ao DNA não são expressos. É possível que um efeito do estrogênio e da progesterona seja a estimulação da proliferação celular e a promoção do tumor. Os danos ao DNA são comuns, mas a maioria das células danificadas pode reparar seus danos ou então resultar na morte celular (fenômeno da apoptose). Os mecanismos de reparo são mais eficazes quando a divisão celular é mais lenta. Células em repouso parecem reparar melhor o DNA danificado. Se um número pequeno de células sobrevive com danos e estão entre as células que proliferam rapidamente (p.ex. durante o ciclo menstrual ou durante o desenvolvimento mamário), uma maior

probabilidade de ocorrência de erros irreparáveis é verificada (Kopans, 2000).

A hiperplasia ductal é caracterizada pela proliferação de células epiteliais distribuídas de uma maneira não uniforme com um núcleo que varia de forma e padrões de cromatina. É freqüentemente o primeiro sinal patológico na transformação do epitélio mamário. As células têm relativamente pouco citoplasma e não tem bordos celulares claros. Citologicamente as células são benignas. A transição de hiperplasia para hiperplasia com atipias está clinicamente associada com um aumento de risco para câncer. O próximo passo é o desenvolvimento de carcinoma *in situ*, seja ductal ou lobular, o qual é definido como uma proliferação de células com características citológicas malignas, mas sem a invasão do estroma através da membrana basal. As células se descolam da membrana basal e invadem o estroma e assim o tumor torna-se invasivo. Através da disseminação via vasos sanguíneos e linfáticos, as células podem originar metástases, sejam para linfonodos locorregionais ou para órgãos à distância (Kenemans *et al.*, 2004).

III– EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama lidera as causas de morte por câncer no mundo. Nos Estados Unidos da América (EUA), no ano de 2007, foram estimados cerca de 240.000 novos casos de câncer de mama *in situ* e invasor entre as mulheres e um adicional de 2.030 novos casos entre homens. Mais de 40.000 mulheres morreram pela doença neste ano (Hinestrosa *et al.*, 2007).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama esperados em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100.000 mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 68 casos para cada 100.000 habitantes. No Estado de Goiás, em 2008, o INCA estima 1.040 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 34,73 casos para cada 100.000 habitantes. O INCA, em 2008, estima para a cidade de Goiânia, 340 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 50,49 casos para cada 100.000 habitantes. Segundo o Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia, a taxa de incidência ajustada por idade, no período de 1996-2000, foi de 54,5 para cada 100.000 habitantes na cidade de Goiânia.

O câncer de mama apresenta uma incidência baixa (menos de 10 novos casos por 100.000 mulheres) antes dos 25 anos e aumenta cerca de 100 vezes até a idade de 45 anos, sugerindo o envolvimento dos hormônios reprodutivos nesse tipo de câncer. Variações importantes são relatadas nos quatro diferentes continentes com relação à incidência de acordo com a faixa etária (Dumitrescu & Cotarla, 2005). Na pós-menopausa, a incidência do câncer de mama é menor nas mulheres negras e hispânicas do que nas mulheres brancas. Na idade jovem é mais comum nas mulheres negras do que nas mulheres brancas (Moormeier, 1996). Em relação às mulheres, a incidência de câncer de mama no sexo masculino acontece na proporção 1:100, ou seja para

cada caso de câncer de mama masculino, existem 100 casos de câncer de mama femininos (Bilimoria, 1995).

Em Goiânia, um estudo sobre incidência de câncer de mama por décadas de vida demonstrou um aumento superior a 270% na faixa etária de 50-59 anos e acima de 80 anos, quando compararam a incidência de 2003 com a de 1988. Os autores acreditam que possa estar relacionado com um aumento dos programas de detecção precoce e mesmo com o uso da terapia de reposição hormonal (Freitas-Júnior *et al.*, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde (Indicadores e Dados Básicos do Brasil – IDB, 2006), a mortalidade específica por neoplasia de mama feminina, em 2004, no Brasil foi de 10,6/100.000 habitantes. As localidades com as mais altas taxas de mortalidade são: Rio de Janeiro (19,21/100.000 hab), Rio Grande do Sul (17,9/100.000 hab) e São Paulo (14,61/100.000 hab). No Estado de Goiás, esta taxa foi de 7,36/100.000 habitantes.

Apesar de ser considerado como um câncer de bom prognóstico, desde que diagnosticado e tratado oportunamente, dados do INCA demonstram taxas de mortalidade por câncer de mama ainda elevadas no Brasil e consideram que estas taxas ocorrem porque a doença é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2007).

Estima-se que a sobrevida média geral cumulativa, após cinco anos, seja de 65% nos países desenvolvidos e de 56% nos países em desenvolvimento (Gonçalves *et al.*, 2007).

Ries & Eisner (2007), avaliaram a sobrevida de 302.763 casos de câncer de mama registrados pelo *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER). Observaram que mulheres com tumores de estágio clínico 0 e I, independente da faixa etária, tiveram uma sobrevida em 5 anos de 100%. Enquanto que no estágio II, a sobrevida foi de 86% em cinco anos e para III e IV, a sobrevida em cinco anos foi 57% e 20%, respectivamente.

IV – FATORES DE RISCO

O câncer de mama é uma doença complexa que resulta da interação de múltiplos fatores de risco (ambientais, hormonais, estilo de vida) com um genoma individual (Pruthi *et al.*, 2007). Segundo Hankinson *et al.* (2004), os fatores de risco confirmados pela literatura incluem história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, predisposição genética (mutações nos genes BRCA1, BRCA2, PTEN e outros), doenças benignas prévias como adenose esclerosante, doenças proliferativas da mama, mamas densas à mamografia, nuliparidade, idade da primeira gestação à termo após os 30 anos, lactação, uso de hormônios na pós-menopausa, exposição à radiação ionizante na infância, menarca antes dos 12 anos, alto índice de massa corpórea e o uso de bebidas alcoólicas.

O papel da exposição aos estrogênios endógenos e exógenos na indução e promoção da carcinogênese mamária é um importante fator de risco para o câncer de mama. Acredita-se que o mecanismo da carcinogênese seja o resultado da estimulação estrogênica do crescimento tecidual (proliferação) e do potencial genotóxico dos metabólitos resultantes do metabolismo do estrogênico sérico (Pruthi *et al.*, 2007).

A idade e o sexo são considerados os dois mais importantes fatores de risco não hormonais para o câncer de mama (Pruthi *et al.*, 2007). As pacientes jovens têm uma incidência baixa de câncer de mama. A partir dos 30 anos, o risco estimado de desenvolvimento de câncer de mama é de 1 em 250 mulheres; aos 40 anos é de 1 em 77 mulheres, enquanto que em idades mais avançadas, este risco supera 1 em 34 mulheres (Cébrían, 2005).

Algumas lesões mamárias são consideradas marcadoras de alto risco para o desenvolvimento do câncer de mama invasivo, como as lesões proliferativas com ou sem atipia e a neoplasia lobular *in situ*. Outras lesões comportam-se como precursoras diretas do câncer invasivo como o carcinoma ductal *in situ* (Calvo, 2005).

Uma quantidade inferior a 10% das mulheres com câncer de mama tem uma susceptibilidade herdada para a doença. Outras 15-20% têm uma história familiar, porém sem padrões genéticos identificáveis (Hinestrosa *et al.*, 2007). Dentre os aspectos hereditários, mutações germinativas em genes de susceptibilidade como BRCA1, BRCA2 e TP53 estão associadas com um risco aumentado de câncer de mama, estimado em 55-85%, durante a vida. Estes cânceres geralmente acometem mulheres mais jovens e têm características tumorais desfavoráveis (Klijn *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que 65-80% das mulheres com câncer de mama não apresentam fatores de risco conhecidos. Em decorrência do seu gênero, todas as mulheres já estão sob algum risco de apresentar câncer de mama. A presença de fatores de risco adicionais pode aumentar a preocupação com relação ao desenvolvimento de câncer de mama, e por outro lado, a ausência deles ainda nos remete a uma atmosfera de incertezas (Kopans, 2000). Está claro que há a necessidade de identificação dos traços genéticos e fenotípicos que explicariam as causas adicionais do câncer de mama (Dumitrescu & Cotarla, 2005).

V – CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

A classificação histológica dos tumores de mama é resultante de um consenso, coordenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tavassoli & Devilee, 2003) e classifica os tumores epiteliais em:

- a) Carcinomas ductais invasivos não especificados (40 a 75%);
- b) Carcinomas lobulares invasivos (5-15%);
- c) Carcinomas tubulares (< 2%);
- d) Carcinomas medulares (1-7%);
- e) Carcinomas mucinosos (2%);
- f) Carcinomas micropapilíferos (< 2%);
- g) Outros carcinomas invasivos: cribiforme invasivo, metaplásico, adenóide cístico, sebáceo, neuroendócrino, entre outros;
- h) Lesões *in situ* de mama: incluem a neoplasia lobular *in situ* (1-3,8%) e o carcinoma ductal *in situ* (15-40%).

Segundo Tavassoli & Deville (2003), os carcinomas medulares tem altas taxas de alterações no gene TP53, com mutações somáticas entre 39-100% e acúmulo da proteína p53 nuclear entre 61- 87% dos casos.

VI – ESTADIAMENTO CLÍNICO

Atualmente, a classificação dos tumores malignos de mama segue a classificação com agrupamentos por estádios, publicada pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) 6ª edição, 2004. A classificação é aplicável somente para carcinomas, tanto para mama feminina quanto masculina, e requer confirmação histológica da doença.

Tabela 1: Classificação dos tumores de mama segundo estágio clínico.

TNM – 6ª edição	Grupamento por estádios
Estádio 0	Tis, N0, M0
Estádio I	T1, N0, M0
Estádio IIA	T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0, M0
Estádio IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
Estádio IIIA	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, N2, M0
Estádio IIIB	T4, N0, N1, N2, M0
Estádio IIIC	Qualquer T, N3, M0
Estádio IV	Qualquer T, qualquer N, M1

Fonte: TNM/UICC 6ª edição.

Onde:

Tumor primário (T) TX: Tumor primário não pode ser avaliado; T0: Sem evidência de tumor primário; Tis: Carcinoma Intraductal, Carcinoma Lobular *in situ*, ou Doença de Paget do mamilo com ou sem associação de invasão de tecido mamário normal; T1: Tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão; T2: Tumor > 2 cm mas ≤ 5 cm em sua maior dimensão; T3: Tumor > 5 cm em sua maior dimensão; T4: Tumor de qualquer tamanho com extensão direta a parede torácica(a) ou a pele(b) ou ambas(c) e carcinoma inflamatório(d). **Linfonodos Regionais (N)** NX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0: Sem evidência de metástase linfonodal; N1: Metástase para linfonodo axilar móvel ipsilateral; N2: Metástase para linfonodo axilar fixo ipsilateral, ou linfonodo da cadeia mamária interna, clinicamente aparente ipsilateral na ausência de evidentes metástases linfonodais clinicamente evidentes; N3: Metástase em linfonodos infraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar evidente, ou metástase em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar ou envolvimento de cadeia mamária interna. **Metástase à distância (M)** MX: Presença de metástase à distância que não pode ser avaliada; M0: Sem metástase à distância; M1: Metástase à distância.

VII– FATORES PROGNÓSTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA

Fatores prognósticos são características clínicas, patológicas ou biológicas de um paciente ou de seu tumor, analisados ao tempo do diagnóstico e capazes de prever o curso clínico da doença, independente da terapia. Os fatores prognósticos usualmente incluem indicadores de crescimento, de invasão e do potencial metastático (Allred, 1997).

O Colégio Americano de Patologistas classifica os fatores prognósticos do câncer de mama em três categorias. A **categoria I** inclui fatores de comprovada importância prognóstica, úteis no manejo clínico do paciente, compreendendo o tamanho do tumor, o status linfonodal, o grau histológico e a expressão de receptores de estrogênio e progesterona. A **categoria II** inclui fatores que já foram estudados de maneira exaustiva, mas que ainda necessitam ser validados por meio de trabalhos estatísticos mais consistentes, compreendendo o c-erbB-2, p53, invasão vascular e linfática, Ki-67, MIB-1 e quantificação da fração de fase S. A **categoria III** inclui fatores que não foram ainda suficientemente estudados para demonstrar seu valor prognóstico, compreendendo o índice de ploidia do DNA e Bcl-2 (Fitzgibbons *et al.*, 2000) (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação em categorias dos fatores prognósticos em câncer de mama, segundo Colégio Americano de Patologistas (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

 Categoria I (comprovada importância prognóstica)	tamanho do tumor, status linfonodal, grau histológico, RE e RP
 Categoria II (estudados exaustivamente, mas precisam ser validados)	c-erbB-2, p53, invasão vascular e linfática, Ki-67, MIB-1 e fase S
 Categoria III (não foram suficientemente estudados)	ploidia DNA, Bcl-2

VIII – O GENE TP53

Ao longo da evolução, as células dos mamíferos desenvolveram uma rede intrincada de mecanismos de proteção para a integridade genômica. p53 é uma das moléculas mais proeminentes desta rede, tanto que ganhou o título de guardião do genoma por seu envolvimento em processos críticos para preservar e fixar a integridade genômica e a homeostase celular. Uma das mais sérias conseqüências na falência desta rede de segurança é o desenvolvimento do câncer (Hussain & Harris, 2006). O gene TP53 codifica uma fosfoproteína nuclear, primeiramente descrita em 1979 como uma proteína hábil para formar um complexo oligomérico com o antígeno T do vírus SV40 em células transformadas. Os altos níveis de proteína p53 observadas em células transformadas e a habilidade do gene TP53 cooperar com o gene *ras* em embriões de ratos indicaram inicialmente que se tratava de um oncogene. Dez anos depois, foi demonstrado que somente as formas mutantes de p53 tinham propriedades transformantes (Frebourg & Friend, 1992). TP53 foi o primeiro gene supressor de tumor identificado (Gasco *et al.*, 2002). O gene TP53 encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17(p13.1) (Figura 1), codifica uma proteína nuclear com 53 kilodaltons (kDa), denominada proteína 53 (p53). Este gene é altamente conservado, apresentando homologia estrutural nas diferentes espécies, tais como *Xenopus laevis*, galinha e camundongo. No homem, apresenta extensão de 20 Kb e é constituído por 11 éxons e 10 íntrons (Robbin, 1996) (Figura 2).

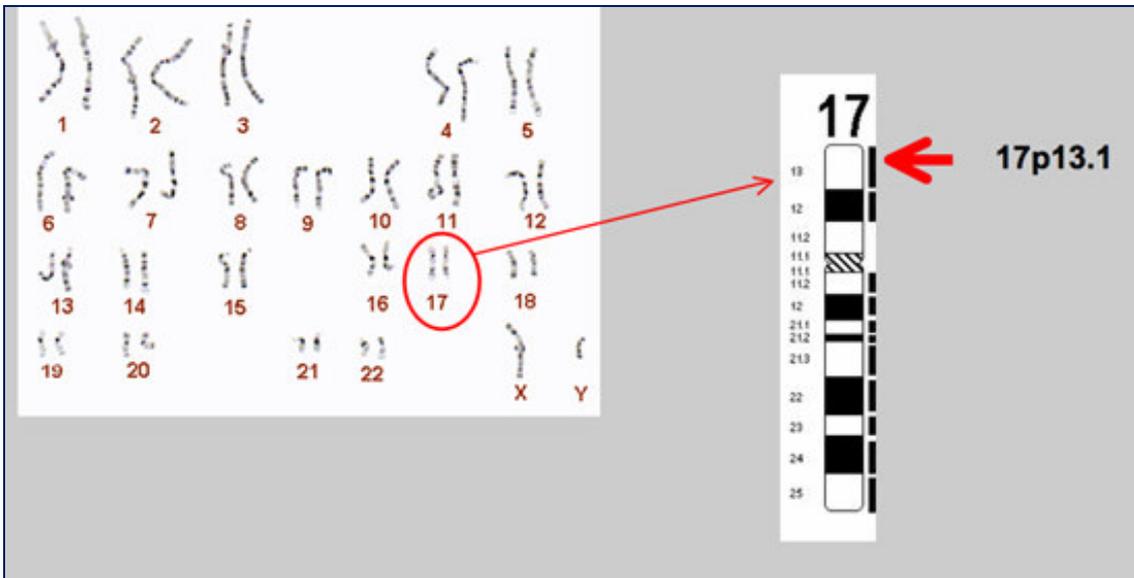


Figura1: Localização do gene TP53 no cromossomo 17.

(Modificada do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_info/p53_gene.html)

Regiões consideráveis do gene TP53 têm sido conservadas ao longo da evolução. Cinco sequências de aminoácidos presentes na proteína p53, correspondendo aos códons 13-19, 120-143, 172-182, 239-259 e 271-290 são altamente preservadas sendo chamadas de “regiões conservadas I-V”, respectivamente. A conservação destas seqüências distintas presumivelmente correlaciona-se com a necessidade de preservar uma estrutura particular ou uma função da proteína p53 (Robbins, 1996).

Reisman *et al.*(1988) identificaram dois promotores do gene TP53, sendo que o primeiro estaria localizado na região de 100 a 250 pares de bases à jusante do primeiro éxon (não codificante) e o segundo, um promotor mais efetivo, dentro do primeiro íntron.

Bourdon (2007), em seu artigo sobre o gene TP53, refere que a transcrição do gene TP53 pode ser iniciada, em tecido humano normal, a partir de dois sítios distintos, um à jusante do éxon 1, e um promotor interno localizado no íntron 4. E ainda, o gene TP53 humano poderia codificar pelo menos nove diferentes isoformas da proteína p53 devido ao “*splicing*” alternativo do íntron 9, o uso do promotor alternativo no íntron 4 e a iniciação

alternativa de tradução ou “*splicing*” alternativo do íntron 2. A expressão tecido-específica das isoformas de p53 poderia explicar a regulação tecido-específica da atividade transcricional de p53, em resposta aos diferentes tipos de estresses tais como radiação ionizante e radiação ultravioleta (Bourdon, 2007).

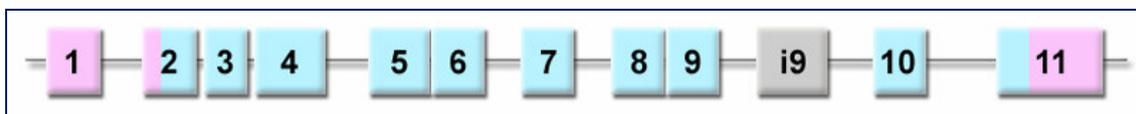


Figura 2: Representação esquemática do gene TP53 (Possui 11 éxons conforme o diagrama. A cor rosa denota os éxons não-codificantes. A azul os éxons codificantes. A cinza os éxons internos dentro dos íntrons).

(Disponível no site: <http://p53.bii.a-star.ed.sg/aboutp53/index.php>)

Mutações do gene TP53, com ou sem deleção alélica, representam uma das alterações genéticas mais comuns identificadas em malignidades humanas. A grande maioria destas mutações está entre os éxons 5 e 8, em quatro regiões conservadas do gene TP53. Mais de 90% das mutações estão localizadas entre os códons 120 e 290 (Robbins, 1996).

A análise do braço curto do cromossomo 17, com sondas polimórficas em tumores humanos, revelou que o alelo selvagem é frequentemente perdido durante o desenvolvimento tumoral. Isto indica que na maioria dos tumores, ambos os alelos são inativados, um através de mutação pontual e o outro através de deleção. Esta observação sugere que a maioria das mutações seja recessiva e que a inativação de p53 pode ser explicada pela hipótese “*two hits*” proposta por Knudson para o gene Rb (Freboung & Friend, 1992). Mais de 10.000 mutações em p53 foram identificadas nos tumores humanos e coletadas em bancos de dados. As mutações de p53 podem ser classificadas em 3 tipos, sendo que as do **tipo I** são mutações *missense* que afetam resíduos da superfície de ligação ao DNA, rompendo os pontos de contato proteína-DNA; as do **tipo II** também são mutações *missense* que rompem a conformação protéica, enquanto as do **tipo III** são mutações do tipo *null* que destroem completamente a funcionalidade da proteína (inserções/deleções = mutações *frameshit*, mutações *nonsense* e mutações de *splicing* de junção) (van Oijen & Slootweg, 2000).

O modelo de “inativação” do alelo selvagem de p53 inclui mutações do tipo *missense* levando à síntese de uma proteína mais estável. Perfaz quase 90% das mutações do gene TP53 e altera a função específica da proteína de ligação ao DNA, resultando em seu acúmulo no núcleo das células tumorais. Esse tipo de mutação difere de outros genes supressores de tumores, que são inativados por mutações *nonsense* ou *frameshift*, levando ao desaparecimento ou à síntese aberrante do produto gênico. Este acúmulo particular da proteína p53 nas células tumorais pode ter duas conseqüências: um **efeito dominante negativo**, pela hetero-oligomerização com p53 selvagem, expressa pelo segundo alelo (p53 mutante inativa a proteína p53 selvagem), ou um **ganho específico de função** da proteína mutante p53 (Soussi, 2005). Há indícios de que todos os efeitos de ganho de função sejam mediados pela expressão direta ou indireta de diversos genes (van Oijen & Slootweg, 2000). Mutantes com ganho de função podem exercer funções mitogênicas pela estimulação de fatores de crescimento ou receptores de fatores de crescimento. O gene EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), por exemplo, está ativado por certos mutantes de p53. Embora TP53 selvagem seja um gene supressor de tumor, algumas formas mutantes podem se comportar como oncogenes (Soussi, 2005) (Figura 3).

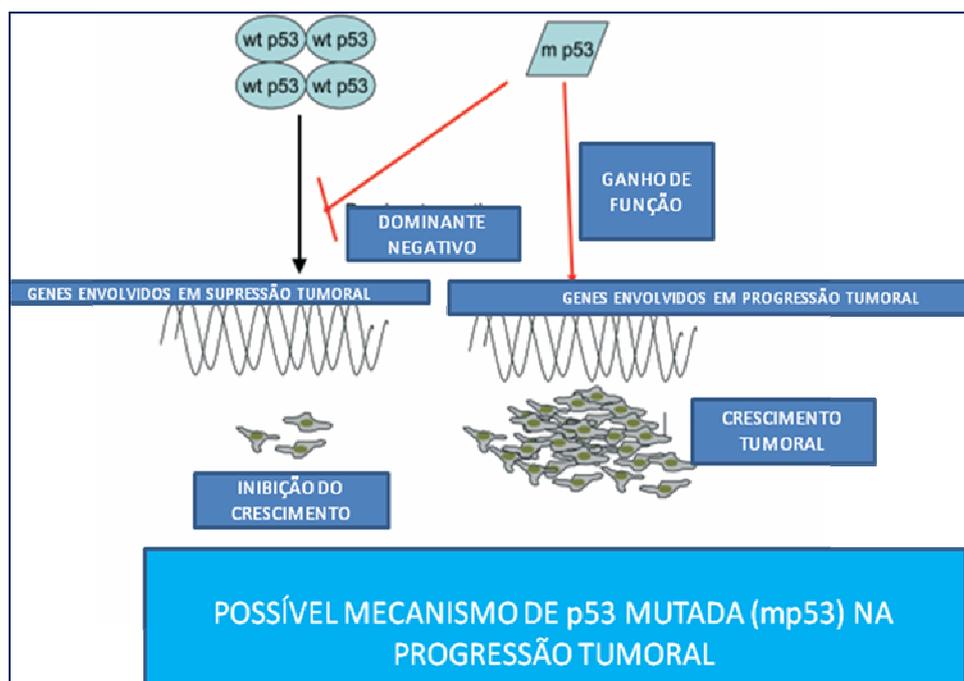


Figura 3: Representação esquemática das funções de p53 mutante. (Modificado

de Stoklosa & Golab, 2005)

Mutações de TP53 em células germinativas são responsáveis por algumas formas hereditárias de câncer. As células germinativas destes pacientes são heterozigotas para o alelo selvagem. A predisposição para a malignidade resulta de inativação do alelo em uma célula germinativa e, conseqüentemente, da necessidade de apenas mais uma mutação somática envolvendo o alelo restante para a perda da função de supressor tumoral. A mutação germinativa, seja *missense* ou *nonsense*, está associada com a instabilidade genômica e com a Síndrome de Li Fraumeni. Indivíduos nestas famílias desenvolvem diferentes tipos de tumores, tipicamente em idades precoces. A síndrome é rara e tem uma transmissão autossômica dominante. O espectro de malignidades inclui sarcomas, leucemias, tumores do sistema nervoso central, carcinomas adreno-corticais, câncer de mama e tumores gonadais. O câncer de mama é responsável por aproximadamente 43% de todas as malignidades entre as mulheres nas famílias com Síndrome de Li Fraumeni. Muitos são carcinomas metacrônicos bilaterais, e 1/3 diagnosticados antes dos 30 anos (Robbins, 1996).

IX – A PROTEÍNA p53

A proteína p53 é denominada assim pelo seu peso molecular de 53 kDa. É uma fosfoproteína nuclear e a designação de antígeno tumoral é baseada em seu acúmulo nuclear característico nas células tumorais. A proteína p53 humana consiste de 393 aminoácidos e uma vez ativada, forma um complexo homotetramérico constituído por quatro unidades idênticas que reconhecem uma sequência específica de DNA, permitindo a regulação da transcrição de vários genes. Cada monômero de p53, por sua vez, consiste de vários domínios bem definidos. O domínio de transativação N-terminal (resíduos 1-73), uma região rica em prolina (resíduos 63-97), um domínio central altamente conservado DNA-ligante (resíduos 94-312) e um domínio C-terminal de tetramerização (resíduos 324-355), seguido por um domínio básico não-estruturado (resíduos 360-393) (Laptenko & Prives, 2006) (Figura 4).

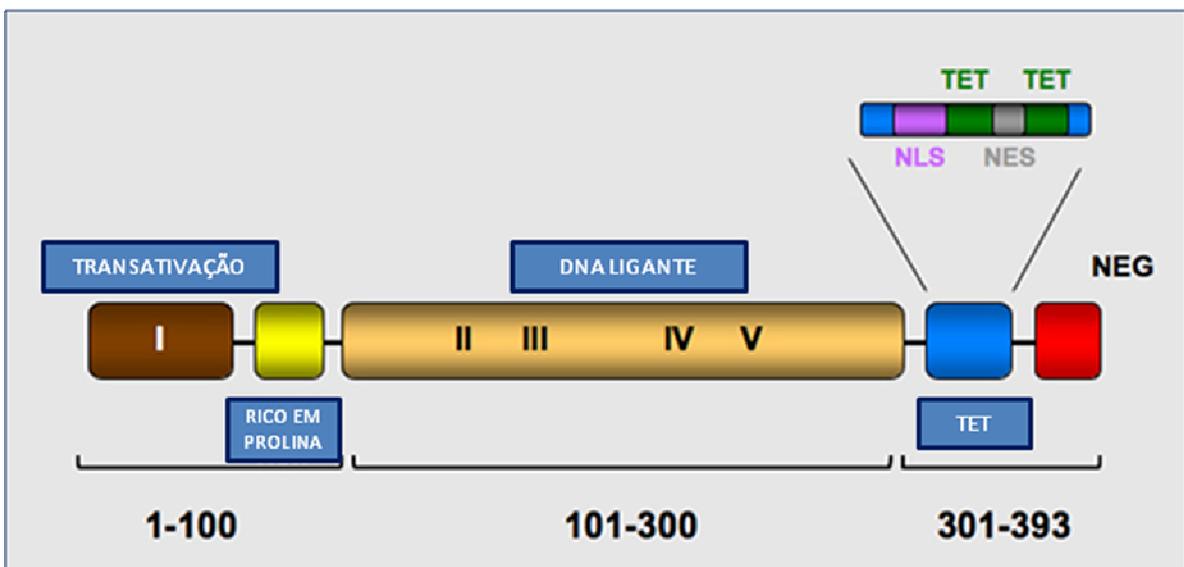


Figura 4: Representação esquemática da estrutura da proteína p53. (Modificado do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)

A proteína p53 existe normalmente em sua forma inativa ou latente em concentrações muito baixas. Esta forma latente de p53 é incapaz de cumprir

suas funções de ativadora de transcrição, porém, situações nas quais se produz um estresse celular (hipóxia, choque térmico, radiações ionizantes) ou um dano ao DNA (ruptura da cadeia dupla de DNA ou formação de dímeros de timidina por efeito de radiação ultravioleta), levam à ativação e estabilização da proteína p53. A proteína p53 desempenha suas funções no núcleo celular e apesar do gene ser continuamente transcrito e seu mRNA traduzido, o produto gênico, a proteína p53, sofre rápida degradação proteossômica, dependente de ubiquitina. Isto determina uma vida média reduzida para a proteína, de aproximadamente 20 a 30 minutos e resulta no fato de que em circunstâncias normais, p53 está em baixa concentração ou em níveis não detectáveis (Sutcliffe & Brehm, 2004).

A perda da função de p53 se dá por dois mecanismos, seja por **mutação** que afete o gene TP53 (mais freqüente), ou mediante uma **inativação funcional** da própria proteína p53 por interação com proteínas virais ou celulares (comportando-se na forma equivalente a uma mutação do gene). Ambos levam a um aumento da instabilidade cromossômica, caracterizada por um incremento na freqüência de ampliações gênicas, rearranjos cromossômicos ou mutações. Uma vez ativada, p53 do tipo selvagem pode funcionar como fator de transcrição, que age direta ou indiretamente na ativação e inativação de genes que afetam o crescimento e a sobrevivência celular. Adicionalmente, p53 pode interagir diretamente com várias proteínas influenciando o crescimento e a sobrevivência celulares. Especificamente, p53 do tipo selvagem pode modular a progressão do ciclo celular, a senescência e a apoptose, além de ter um papel direto no reparo e na recombinação do DNA. Como está envolvida em todos esses processos, p53 pode prevenir a formação de tumores por reduzir o acúmulo de danos genéticos que contribuem para a tumorigênese (Braithwaite & Prives, 2006)

1- LOCALIZAÇÃO DE p53:

A localização citoplasmática de p53 do tipo selvagem foi demonstrada no início da década de 80, na maioria das células normais. Entretanto, em células transformadas ou células normais com crescimento rápido, p53 está primariamente localizada no núcleo. A translocação núcleo-citoplasmática de

p53 é regulada durante o ciclo celular. p53 acumula-se no citoplasma durante a fase G1 e entra no núcleo durante a fase de transição G1/S. Num curto período após o início da fase S, p53 volta ao citoplasma (Liang & Clarke 2001). Como p53 é um fator de transcrição, a localização nuclear da proteína tem um importante papel na regulação de sua atividade. Vários mecanismos estão envolvidos na importação ou exportação de p53 do núcleo. Existem dois meios para transportá-la ao núcleo: primeiramente, p53 pode ser transportada pela dineína e uma rede de microtúbulos, que reconhecem a extremidade N-terminal de p53. E em segundo lugar, dentro da extremidade C-terminal de p53, existe vários sinais de localização nuclear, reconhecidos pelos fatores de importação celular. Para transportá-la de volta, existem também duas maneiras: primeiramente, uma que envolve o domínio de oligomerização de p53 e outra que envolve a região ligante ao MDM2 na extremidade N-terminal. A forma tetramerizada de p53 (ativa) impede que o sinal de exportação nuclear, presente na extremidade C-terminal, esteja acessível a essa via de exportação. Após a ubiquitinação, o sinal de exportação nuclear é exposto e p53 pode ser movida para o citoplasma. Na extremidade N-terminal, o sinal de exportação nuclear é regulado pela fosforilação, que por consequência, inibe a sequência de exportação nuclear de p53 do núcleo. Os efeitos da fosforilação na extremidade N-terminal resultam primeiramente, em inibição do sinal de exportação N-terminal e, em segundo lugar, em inibição da ligação de MDM2 e subsequente ubiquitinação (Sutcliffe & Brehm, 2004).

2- VIA INTRACELULAR SINALIZADA POR p53:

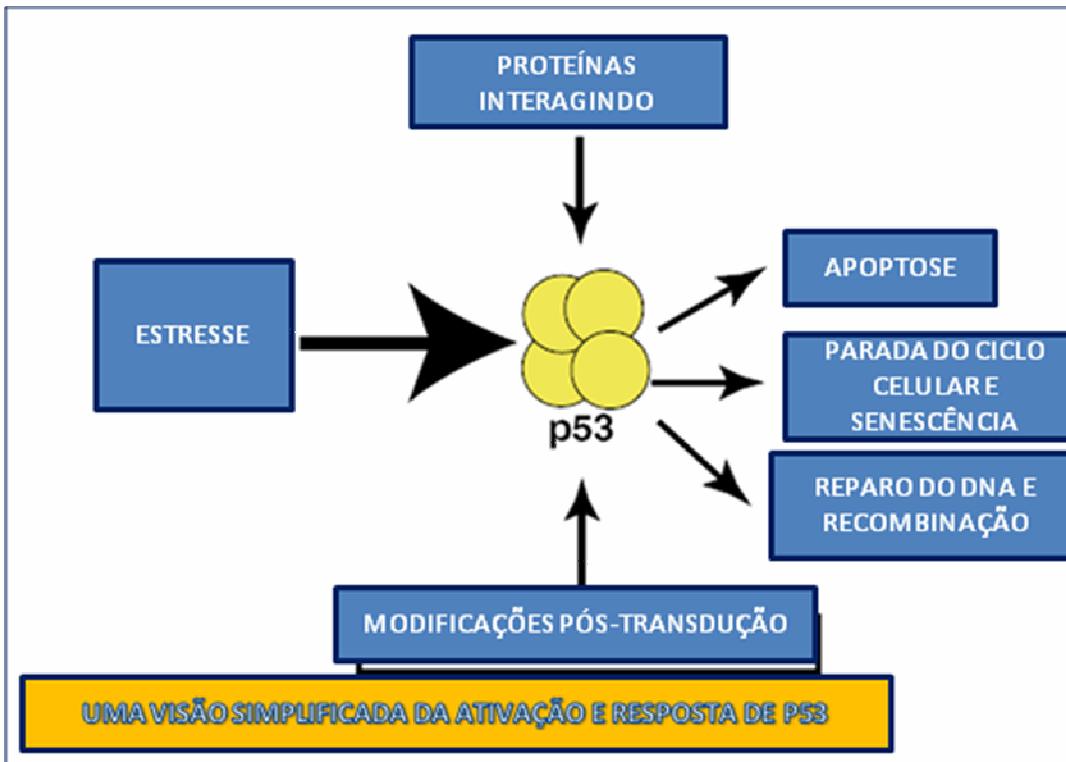


Figura 5: Representação esquemática simplificada da via intracelular sinalizada por p53. (Modificada de Braithwile & Prives, 2006)

A via intracelular sinalizada por p53 (Figura 5) pode ser dividida em cinco etapas. Na primeira etapa, têm-se os sinais que disparam ou induzem a rede a um estado funcional. A via de transdução de sinais controlada por p53 é composta por um grupo de genes e seus produtos protéicos que são designados para responder a sinais de estresse intrínsecos e extrínsecos. Estes sinais operam por meio de mecanismos de homeostase celular que monitoram e controlam a fidelidade da replicação do DNA, a segregação cromossômica e a divisão celular. Muitas causas físicas e químicas causam dano ao DNA, ativando p53, incluindo: irradiação ultravioleta e gamma, alquilação de bases, DNA "cross-link", depuração de DNA, reação com radicais livres, dentre outros. Cada tipo de dano causado ao DNA é diferente e cada um é detectado por diferentes grupos de proteínas, sendo então reparados por diferentes vias enzimáticas. Porém, cada tipo de dano é reportado à proteína p53 e sua via. A segunda etapa da via intracelular ativada

por p53 é mediada por um aumento em sua concentração e atividade, visando à transcrição de genes regulados por p53. Os níveis de p53 são regulados por seu *turnover* proteolítico. A proteína p53 tem uma meia-vida de 6-20 minutos em vários tipos celulares e uma ubiquitina-ligase, denominada MDM-2 (*murine double minute protein*) é responsável pela sua curta meia vida. Frente a vários tipos de danos causados ao DNA (radiação gamma), a proteína MDM-2 é autopoliubiquitinada, resultando em sua degradação e conseqüente aumento nos níveis e na atividade de p53. Uma vez ativada, p53 induz a transcrição de vários genes, dentre eles, o gene MDM-2, seu principal regulador negativo na célula. A regulação transcricional de MDM-2 por p53 é um passo lento (horas), mas uma vez produzida, MDM-2 se liga à proteína p53, inibindo sua atividade como fator de transcrição, ubiquitinando-a e aumentando rapidamente sua quebra proteolítica. Essa alça auto-reguladora produz uma oscilação MDM-2-p53, composta por níveis protéicos variáveis de p53 e MDM-2 na célula. Quando níveis de p53 crescem, aumentam os níveis de MDM-2, que por sua vez, abaixam os níveis de p53, resultando em menor quantidade de MDM-2 (Levine *et al.*, 2006).

Uma vez ativada, p53 do tipo selvagem ganha habilidade de reconhecer e ligar às suas sequências responsivas no DNA. A sequência de consenso no DNA é representada por RRRCWWGYYY, onde R é uma purina, W é Adenina ou Timina e Y é uma pirimidina. Um elemento responsivo a p53 é composto por 2 destas sequências de 10 pares de bases, separadas por um espaçador de 0 - 21 pares de bases. As sequências são frequentemente localizadas na porção 5', ou no primeiro ou segundo íntron do gene regulado por p53. Os genes responsivos a p53 apresentam várias funções, incluindo a parada do ciclo celular (p21, 1-3-3 sigma, GADD-45), a apoptose, tanto por via extrínseca (Fas, killer/DR5) como intrínseca (bax, noxa e puma), a senescência celular, e outras funções adicionais (Levine *et al.*, 2006).

X- MÉTODOS DE ANÁLISE DO GENE TP53 E DA PROTEÍNA p53

Os métodos mais usados são o sequenciamento de DNA e a imunohistoquímica (Sunpaweravong & Sunpaweravong, 2005).

Uma vez que a proteína p53 é o produto da expressão gênica, a visualização direta da expressão da proteína por análise imuno-histoquímica tem sido bastante utilizada (Soussi, 2005). Mutações no gene TP53 podem resultar em meia-vida prolongada e conseqüente acúmulo nuclear da proteína p53 alterada. O método de imuno-histoquímica detecta este acúmulo anormal e funciona como uma indicação indireta de mutação no gene TP53. Cerca de 30-50% dos tumores de mama tem acúmulo de proteína p53 detectado pela imuno-histoquímica (Elledge *et al.*, 1993). A imuno-histoquímica é baseada na ligação antígeno-anticorpo em cortes teciduais, com detecção do complexo formado por meio de reação de coloração histoquímica visível à luz do microscópio comum (Ramos-Vara, 2005). O método de imuno-histoquímica é um procedimento diagnóstico de vários passos e envolve seleção apropriada do tecido, fixação, processamento e coloração tecidual. A interpretação final dos resultados é de responsabilidade de um profissional experiente (patologista), sendo baseada na presença, padrão e intensidade dos produtos cromógenos coloridos, que são depositados nos tecidos como resultado de uma reação específica antígeno-anticorpo na célula. E o resultado desta coloração pode ser difuso ou focal, nuclear, citoplasmático ou membranoso (Taylor *et al.*, 2006). A imuno-histoquímica pode ser realizada em tecidos fixados em formalina, porém a fixação modifica a estrutura terciária das proteínas (antígenos), muitas vezes tornando-as indetectáveis aos anticorpos específicos. Aproximadamente 85% dos antígenos fixados em formalina requerem algum tipo de recuperação antigênica para otimizar a imunorreação. Os dois métodos mais comuns de recuperação antigênica são o enzimático e o baseado no calor sob pressão (microondas/panela de pressão) (Ramos-Vara, 2005). A imunorreatividade nuclear de p53 tem sido considerada uma indicação indireta de inativação do gene TP53 por mutações do tipo *missense* e tem sido

descrita como: imunodeteção de p53, acúmulo de p53, ou expressão aberrante de p53 (Barbareschi, 1996). Nosso estudo utilizou o método de calor sob pressão para a recuperação antigênica e definimos que o termo “imunodeteção”, iria designar a deteção imuno-histoquímica de p53 no núcleo das células tumorais de mama.

Diferentes anticorpos têm sido desenvolvidos para detectar a proteína p53, cada um reconhecendo diferentes regiões ou epítomos da proteína selvagem e/ou mutante (Elledge, 1994) e os mais comumente citados na literatura incluem Pab 1801, DO-1, DO-7, CM1, Bp53-12, dentre outros. Os epítomos reconhecidos por alguns destes anticorpos são conhecidos e todos reconhecem tanto p53 selvagem como mutante, exceto Pab240 que é específico para p53 em conformação mutante-associada (Wurl, 1997).

Uma grande maioria dos estudos baseia-se na técnica de imuno-histoquímica para avaliar alterações de p53. Porém sabe-se que muitas mutações não levam ao acúmulo de proteína e que o acúmulo de p53 selvagem também pode ocorrer. Isto faz com que a IHQ tenha um razoável número de variabilidade entre os estudos e não classifique adequadamente as mutações (Olivier *et al.*, 2006) O sequenciamento direto do gene TP53 após amplificação por PCR permanece o “padrão ouro” da análise molecular (Soussi, 2005).

XI- p53 E CÂNCER DE MAMA

O envolvimento de p53 no processo de carcinogênese pode ocorrer por meio de vários mecanismos, incluindo mutações do gene TP53, alterações nos genes reguladores de TP53 e alterações nos genes alvo de p53. No câncer de mama, a maioria das mutações observadas em TP53 é de origem somática. Cerca de 20-35% dos tumores de mama expressam p53 mutante (Lacroix *et al.*, 2006). Mutações germinativas em TP53 ocorrem em altas proporções em indivíduos com a Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome de susceptibilidade ao câncer, que confere um risco aumentado para o câncer de mama. Esta observação suscita um importante papel para a inativação de p53 na carcinogênese mamária (Gasco *et al.*, 2002). Estudos de pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni demonstram que a perda de heterozigossidade (LOH), com inativação do outro alelo, é observada em aproximadamente metade dos tumores. Em adição, tumores esporádicos portando uma mutação somática de p53, apresentam perda de heterozigossidade (LOH) em aproximadamente 70% dos casos. Um mecanismo de haploinsuficiência ou mutações de ganho de função, ou dominantes negativas parecem existir (Borresen-Dale, 2003).

A maioria das informações acerca de mutações em TP53 é derivada da análise dos éxons 5-8 do gene (*hot spot*), que codificam os aminoácidos 126-306 da proteína p53. Entretanto, dados mais recentes analisando a sequência codificante completa começam a revelar um maior número de mutações relacionadas ao câncer de mama, além daquelas já descritas na região de *hot spot* (Lacroix *et al.*, 2006). Cerca de 1400 diferentes mutações de p53 já foram observadas em câncer de mama e estão listadas em um banco de dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (Lacroix *et al.*, 2006). Mais de 90% dessas mutações afetam a região central de ligação ao DNA, incluindo os éxons 5-8 e tais mutações resultam em perda da atividade de ligação ao DNA (Lai *et al.*, 2002).

Estudos têm sido conduzidos na tentativa de identificar o estágio da tumorigênese mamária, na qual ocorrem as mutações somáticas de TP53.

Mutações em TP53 podem ocorrer em carcinoma ductal *in situ* (DCIS), antes do desenvolvimento para câncer de mama invasor e a frequência aumenta de aproximadamente zero nos DCIS de baixo-grau, para 30-40% nos DCIS de alto grau (Borrensens-Dale, 2003). Altas taxas de mutações em TP53 são descritas para portadores de mutações em BRCA1 e BRCA2 e além destes, nos carcinomas medulares clássicos da mama as mutações de TP53 ocorrem em cerca de 100% dos casos (Gasco *et al.*, 2002).

Diferentes frequências de mutações são descritas para portadores de diferentes alelos polimórficos do códon 72 de TP53. Tumores de mama em pacientes homocigotos para o alelo Arg apresentam uma maior frequência de mutações em TP53 comparados aos homocigotos Pro (28,5% X 3,8%) (Borrensens-Dale, 2003). Modificações em outros genes relacionados às vias de p53 também podem resultar em sua inativação, incluindo alterações no gene ATM, BRCA1 e MDM-2 (Gasco *et al.*, 2002).

1- VALOR PROGNÓSTICO DE p53 EM CÂNCER DE MAMA:

O câncer de mama é uma doença heterogênea com um curso clínico variável. Embora o *status* linfonodal seja o maior parâmetro prognóstico, 30% das pacientes com câncer de mama linfonodo-negativas irão morrer desta doença sem um tratamento adjuvante (Soontrapornchai *et al.*, 2007). Apesar de ser potencialmente benéfico, o tratamento adjuvante envolve drogas citotóxicas ou hormonais que apresentam efeitos indesejáveis tornando-o restrito a um grupo de pacientes destinadas a apresentar recorrência da doença, ou morrer em decorrência desta. As variáveis do estadiamento TNM são amplamente aceitas e podem identificar pacientes com prognóstico favorável, de modo que pacientes com tumores menores do que 1cm e sem comprometimento de linfonodos, evoluem com mortalidade menor que 10% em 10 anos (Allred, 1997).

O gene supressor de tumor TP53 é um gene crítico para o controle do ciclo celular e a apoptose. Seu *status* tem sido descrito como um fator prognóstico em uma variedade de tumores malignos (Soontrapornchai *et al.*,

2007). De forma geral, a imunodeteção de p53 em câncer de mama correlaciona-se com tumores de alto grau, aneuploidia, altos índices de proliferação celular e ausência de receptores de estrogênios e progesterônios. Uma vez que esses parâmetros estão associados com curto intervalo de sobrevida livre de doença e menor sobrevida global, não seria surpreendente que a imunodeteção de p53 estivesse também associada com pior prognóstico (Gelman, 1998). A prevalência de mutações em TP53 nos casos com recidiva tumoral mostrou-se duplicada, quando comparada com os tumores primários, indicando que TP53 tem um papel importante não apenas no desenvolvimento tumoral, mas também na progressão do tumor e no aparecimento de metástases (Norberg *et al.*, 2001).

Uma meta-análise (Barbareshi, 1996) avaliou os resultados de 37 estudos de imunodeteção de p53, totalizando 9.860 pacientes. Dentre os estudos analisados, 12 demonstraram que a imunodeteção de p53 apresenta valor prognóstico independente (4.510 pacientes). Utilizando métodos de análise multivariada, verificou-se que o risco relativo de recidivas variou de 1,3 a 3,24 com o valor médio de 2,3. O risco relativo de morrer por câncer de mama variou de 1,3 a 3,2 com valor médio de 2,6. O estudo revelou que métodos mais uniformes de análise de p53, com maior número de casos e períodos de seguimento mais longos devem ser considerados, a fim de que a imunodeteção de p53 seja validada como fator prognóstico independente para o câncer de mama.

Silvestrini *et al.*(1996) analisaram 1400 pacientes com câncer de mama ressecável, linfonodos histologicamente negativos, sem sinais de metástase à distância e imunodeteção de p53, com seguimento por um período de 10 anos. Nesta série de pacientes, a imunodeteção positiva de p53 não demonstrou valor prognóstico para falências contralaterais ou recidivas loco-regionais, após a cirurgia conservadora ou radical associada à radioterapia. Entretanto, associou-se de forma significativa com o aparecimento de metástases à distância.

Olivier *et al.*(2006) analisaram mutações somáticas nos éxons 5-8 de TP53 em 1.794 pacientes com câncer de mama, utilizando seqüenciamento

gênico. Este estudo demonstrou que mutações em TP53 representam um fator prognóstico independente para a sobrevida de pacientes com câncer de mama, após ajuste para tamanho do tumor, status linfonodal e receptor hormonal. Em um dos subgrupos estudados, aquele contendo pacientes com tumores de baixo grau, tamanho limitado do tumor, sem comprometimento linfonodal e com presença de receptores hormonais, demonstrou que as mutações de TP53 associaram-se com uma redução de 60% na sobrevida em um período de 10 anos. Uma relação linear foi demonstrada entre o tamanho do tumor e a frequência de mutações de TP53, além de uma forte associação com o grau tumoral, o comprometimento linfonodal e a perda dos receptores hormonais. Langerod *et al.*(2007) também analisou mutações do gene TP53 por meio de seqüenciamento gênico, analisando uma série de 200 pacientes e demonstraram que as mutações do gene TP53 representam um importante fator prognóstico para o câncer de mama. Em sua análise 23,6% dos casos apresentavam mutações em TP53, sendo que 15% destas estavam fora dos éxons 5-8. Uma forte correlação foi demonstrada entre as mutações de TP53 e a hiperexpressão de c-erbB-2 e alguns subtipos de carcinomas mamários, como aqueles do tipo *basal-like* (apresentaram as maiores taxas de mutações em TP53).

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica, em sua recomendação para marcadores moleculares para o câncer de mama em 2007, conclui que os dados produzidos ainda são insuficientes para recomendar o uso de mutações em TP53 na avaliação do prognóstico e nas decisões de tratamento do câncer de mama. Alerta também, que estudos com maior poder estatístico são necessários, apesar dos inúmeros trabalhos demonstrando sua potencial utilização clínica (Harris *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, um levantamento bibliográfico foi realizado visando selecionar artigos que investigaram a importância prognóstica da imunodeteção da proteína p53 no câncer de mama. Foram selecionados 30 artigos publicados no período de 1993 até 2008, que analisaram um número mínimo de 100 pacientes e que utilizaram o método de imuno-histoquímica. Uma grande variabilidade de anticorpos foi utilizada nesses estudos e as linhas

de corte para que a imunodeteccção de p53 fosse considerada positiva, variaram de estudo para estudo. Os índices de imunodeteccção de p53 variaram de 12,66% a 54,84%. Dentre os 30 artigos revisados, 19 (63,33%) apresentaram correlações estatisticamente significativas entre a imunodeteccção de p53 e menor intervalo livre de doença, enquanto 16 estudos (53,33%) apresentaram correlações entre a imunodeteccção de p53 e uma menor sobrevida global (Tabela 4).

XII - JUSTIFICATIVAS

O presente estudo se justificou pelas seguintes observações:

1 - A neoplasia maligna de mama é o tumor mais incidente na população feminina do Brasil (INCA, 2008).

2 – Definir potenciais marcadores prognósticos em câncer de mama a fim de discernir quais pacientes iriam beneficiar-se do uso de uma terapia sistêmica (complementar ao tratamento cirúrgico). Sabendo-se que, entre 10 a 30% recidivarão dentro de cinco anos de acompanhamento clínico, mesmo sendo axila-negativas ao diagnóstico (Ramos-Filho *et al.*,2002; Nagai,1995).

3 - Alguns estudos de imuno-histoquímica têm demonstrado uma correlação entre a imunodeteção da proteína p53 e um pior prognóstico em pacientes portadoras de neoplasia maligna de mama (Silvestrini *et al.*,1996; Yamashita *et al.*, 2005; Crabb *et al.*, 2008), mas os dados da literatura ainda são conflitantes (Barbareschi,1996; Borresen-Dale,2003).

4 – Existem poucos estudos publicados no Brasil acerca do tema, até a recente data (Medline, Scielo, BIREME).

1- Objetivo Geral:

Investigar a importância prognóstica da detecção imuno-histoquímica da proteína p53 em carcinoma de mama, por meio de uma revisão bibliográfica da literatura e da análise de um grupo de 214 pacientes atendidas no Hospital Araújo Jorge, em Goiânia-GO.

2- Objetivos Específicos:

2.1 - Realizar uma revisão bibliográfica sobre a importância prognóstica da imunodeteção da proteína p53 no câncer de mama na população feminina.

2.2 - Avaliar os aspectos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de uma série de 214 pacientes com câncer de mama, atendidas no hospital Araújo Jorge, em Goiânia-GO.

2.3 - Avaliar os resultados da imunodeteção de p53 nos espécimes de câncer de mama estudados.

2.4 - Avaliar a associação da imunodeteção positiva de p53 com fatores clinicopatológicos (idade, estadiamento clínico, tamanho do tumor, grau de anaplasia, imunodeteção de receptor estrogênico e de progesterona, superexpressão de c-erbB-2 e comprometimento linfonodal).

2.5 - Avaliar a sobrevida global das pacientes estudadas.

2.6 - Avaliar a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama, em relação aos fatores clínicos (idade, estadiamento clínico), histopatológicos (comprometimento linfonodal, grau de anaplasia, tamanho do tumor) e imuno-histoquímicos (imunodeteção da proteína p53, receptor de estrogênio e progesterona e superexpressão de c-erbB-2).

2.7 - Avaliar a sobrevida global das pacientes com carcinoma de mama, em relação à imunodeteção positiva de p53.

2.8 - Comparar os resultados da imunodeteção de p53 no grupo de tumores analisados com aqueles obtidos em outros estudos.

XIV - METODOLOGIA

1 - **Dados clínicos:** O presente estudo representa uma coorte retrospectiva de base hospitalar, no qual foram selecionadas 214 pacientes do sexo feminino, independente do estadiamento clínico, com carcinomas de mama comprovados histologicamente. Foram selecionadas todas as pacientes atendidas no período de 1997 a 2001, cujos espécimes de biópsia ou cirúrgicos foram submetidos à análise imuno-histoquímica para avaliação de p53, c-erbB-2, receptores de estrogênios (RE) e receptores de progesterona (RP) e que apresentavam pelo menos cinco anos de seguimento.

Em dezembro de 2007, quando foi encerrada a coleta de dados, 146 pacientes estavam vivas ao final de 5 anos de seguimento, enquanto 48 pacientes foram à óbito. A sobrevida foi avaliada em meses. Para aquelas pacientes que foram a óbito, foi contado o tempo decorrido do diagnóstico histopatológico até o momento da morte. Para as pacientes vivas, com ou sem doença, o dado foi censurado em dezembro de 2007.

Uma lista de casos com perda de seguimento foi enviada ao Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia e o estado das pacientes foi informado por meio de busca ativa, resultando em uma perda de seguimento de 20 pacientes (9,3%).

Os dados clínicos das pacientes foram coletados dos prontuários no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital Araújo Jorge. O estadiamento clínico dos tumores foi ajustado de acordo com a sexta edição da classificação TNM da UICC, publicada pelo Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer.

2 - **Análise anatomopatológica:** A graduação histológica dos tumores foi realizada com base no sistema descrito por Bloom & Richardson, modificado por Elston & Ellis, (1991), que considera os aspectos de formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Dividido em três categorias: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco

diferenciado). A informação sobre a presença ou ausência de metástases linfonodais foi obtida dos laudos histopatológicos. Todos os laudos foram emitidos pela equipe de patologistas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

3 - Análise imuno-histoquímica: as análises imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. Essas análises empregaram espécimes tumorais fixados em formalina e incluídos em parafina, a partir dos quais foram preparados cortes de espessura de duas a três micras. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas e a reação de imuno-histoquímica foi conduzida conforme descrito por Silva *et al.* (2002).

A análise imuno-histoquímica empregou o método de estreptoavidina-biotina-imunoperoxidase (Super ABCKit, Erviegas) e a imunodeteção da proteína p53 foi feita com anticorpo monoclonal DO-7(DAKO; 1/100). Análise dos demais marcadores imuno-histoquímicos utilizou anticorpos c-erbB-2 (DAKO, policlonal; 1/600); anti-proteína RE (receptor de estrogênio) e anti-proteína RP (receptor de progesterona) (DAKO, monoclonais; 1/200). Os cortes, montados em lâminas silanizadas, foram desparafinados e desidratados, em temperatura controlada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor, em panela de pressão, durante 20 minutos, utilizando-se o citrato 0,01M, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, para resfriamento, por cerca de 1 hora. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 3%, durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, com os anticorpos monoclonais diluídos em solução de PBS contendo 1% de albumina bovina. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com biotina-avidina peroxidase. Depois de uma nova lavagem com PBS, por 5 minutos, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina, por 5 minutos e as lâminas levemente contracordadas com hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula.

A imunodeteccão de p53 foi considerada positiva quando uma proporção $\geq 10\%$ dos núcleos das células tumorais estivesse corada (Viacava *et al.*, 1999). A hiperexpressão de c-erbB-2 foi considerada positiva quando mais de 10% das células tumorais apresentassem membranas coradas fortemente e continuamente. Os receptores de estrogênios (RE) e receptores de progesterônios (RP) foram considerados positivos quando uma proporção $\geq 10\%$ dos núcleos das células tumorais estivessem corados. Todas as análises foram feitas considerando a contagem de pelo menos 100 células tumorais. Controles positivos e negativos, previamente testados, foram utilizados para todos os marcadores utilizados (Quérzoli *et al.*, 1998).

4 - Análise estatística: Uma análise descritiva de todas as variáveis, com números absolutos e percentagens, foi realizada para o grupo de estudo. Para avaliação estatística dos dados obtidos, todas as frequências observadas foram confrontadas com a finalidade de comprovar a hipótese da pesquisa, ou seja, que a imunodeteccão de p53 teria associação com fatores clinicopatológicos clássicos (idade, grau de anaplasia, estadiamento clínico, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, receptor de estrógeno e progesterona e c-erbB-2) e que sua imunodeteccão positiva influencia na sobrevida das pacientes. O teste do qui-quadrado foi utilizado para testar a associação entre as variáveis independentes. As curvas de sobrevida, estimadas pelo método de Kaplan-Meier (KM), foram utilizadas para descrever as proporções acumuladas de óbitos (sobrevida global) conforme o tempo de acompanhamento das pacientes. Estas curvas foram construídas em algumas situações distintas, conforme categorizações das variáveis independentes, e posteriormente comparadas através do teste de Log-Rank. Em todos os testes estatísticos de hipóteses considerados neste estudo, obteve-se como significativos aqueles resultados associados a um valor de p menor que 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS 15.0 for the Windows (SPSS Inc. Chicago, Estados Unidos da América).

5 - Aspectos éticos: O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás protocolo CEPACCG nº 010/06 de 24/07/07.

XV - RESULTADOS

1 - Dados Clínicopatológicos: um grupo de 214 casos de carcinomas de mama em mulheres atendidas na Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás (HAJ / UOA) foi analisado de 1997 a 2001. A idade das pacientes variou de 28 a 90 anos, com uma média de 51,38 anos e mediana de 59 anos. Oito pacientes (4%) apresentaram idades abaixo de 35 anos, 90 pacientes (42%) tinham idades entre 35 e 50 anos e a maioria, 116 pacientes (54%), tinham idades acima de 50 anos (figura 6).

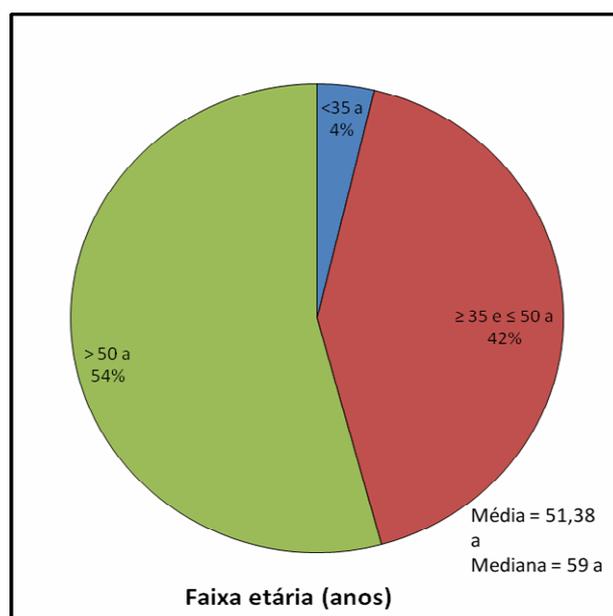


Figura 6: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a faixa etária (anos).

Quanto ao estadiamento clínico, segundo a classificação TNM da UICC (União Internacional Contra o Câncer), 10 pacientes (4,7%) apresentavam estágio clínico 0, 30 pacientes (14%) apresentavam estágio clínico I, 103 pacientes (48,1%) apresentavam estágio clínico II, 58 pacientes (27,1%) estágio clínico III, 9 pacientes (4,2%) estágio clínico IV e 4 pacientes (1,9%) não tiveram estadiamento relatado (NR) (figura 7).

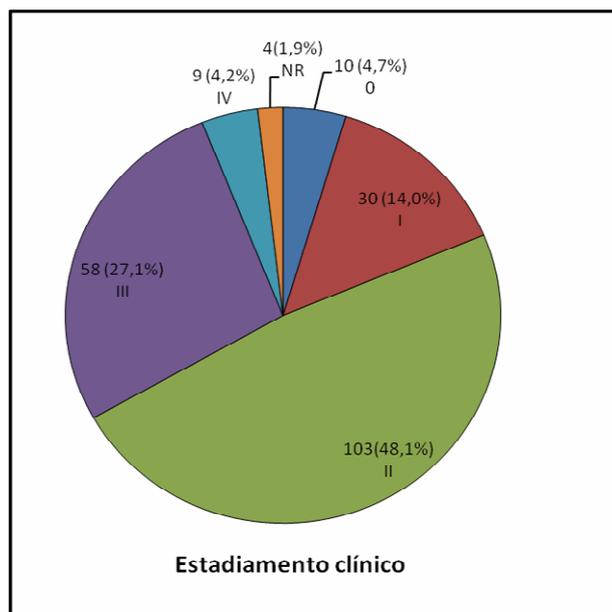


Figura 7: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com estadiamento clínico.

Quanto ao comprometimento de linfonodos axilares, observamos que 106 pacientes (49%) não apresentavam comprometimento linfonodal, 43 pacientes (21%) apresentavam de 1 a 3 linfonodos comprometidos, 21 pacientes (10%) apresentavam de 4 a 9 linfonodos comprometidos e 44 pacientes (20%) apresentavam mais de 10 linfonodos comprometidos (figura 8).

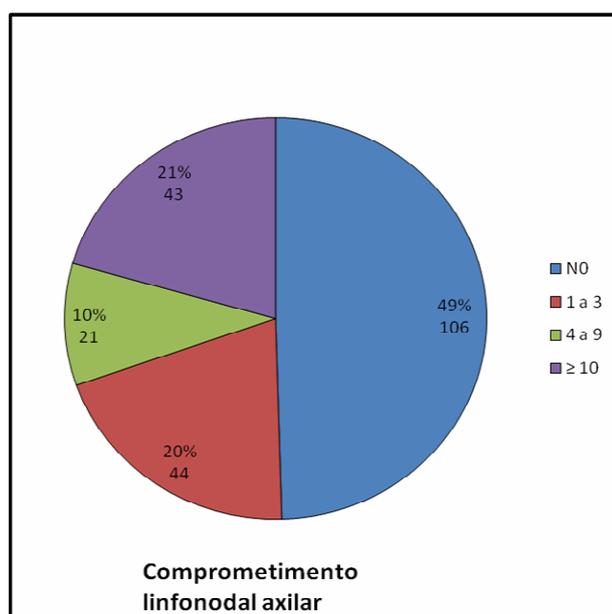


Figura 8: Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o comprometimento linfonodal axilar.

As metástases à distância foram descritas em 69 pacientes, perfazendo 32 % dos casos. A localização mais freqüente de metástases foi em ossos (32%), pulmão (28%), fígado (13%), cérebro (8%), linfonodos não-axilares (8%) e outros locais (11%). A recidiva local foi observada em 28 pacientes (13,1%). Das 214 pacientes analisadas, 11(5,1%) tiveram uma segunda neoplasia, 9 pacientes (4,2%) desenvolveram câncer na mama oposta e duas desenvolveram segunda neoplasia maligna (melanoma maligno cutâneo e neoplasia maligna de vias biliares) (figura 9).

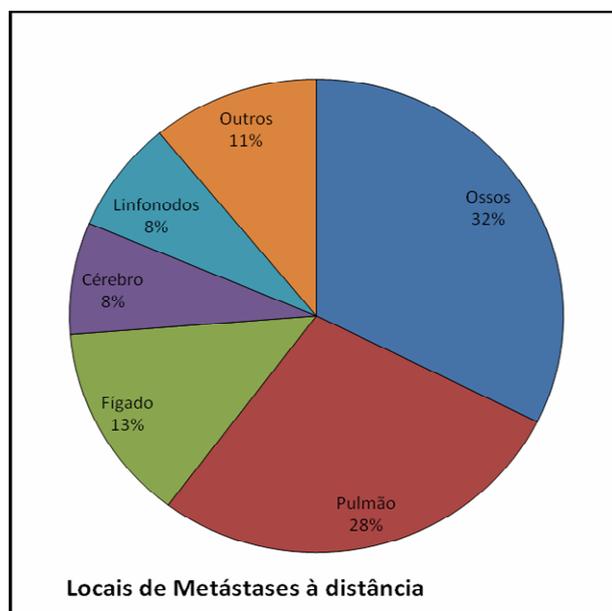


Figura 9: Distribuição de casos de carcinomas de mama de acordo com os locais de metástase à distância.

Quanto ao tamanho do tumor, 47 pacientes (22%) apresentaram tumores ≤ 2 cm, 89 (42%) apresentaram tumores $2\text{cm} < T \leq 5\text{cm}$, 54 (25%) apresentaram tumores $> 5\text{cm}$ e 24 pacientes (11%) não tiveram o tamanho do tumor determinado(figura 10).

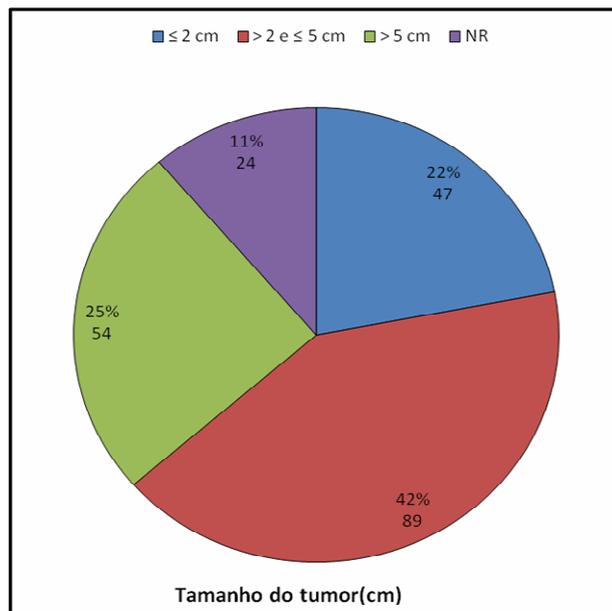


Figura 10: Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o tamanho tumoral (cm) .

Quanto ao grau de anaplasia do tumor, 14 tumores (7%) foram classificados com grau histológico I, 128 (60%) com grau histológico II, 39 tumores (18%) com grau histológico III e 33 tumores não tiveram graduação histológica determinada (15%) (figura 11).

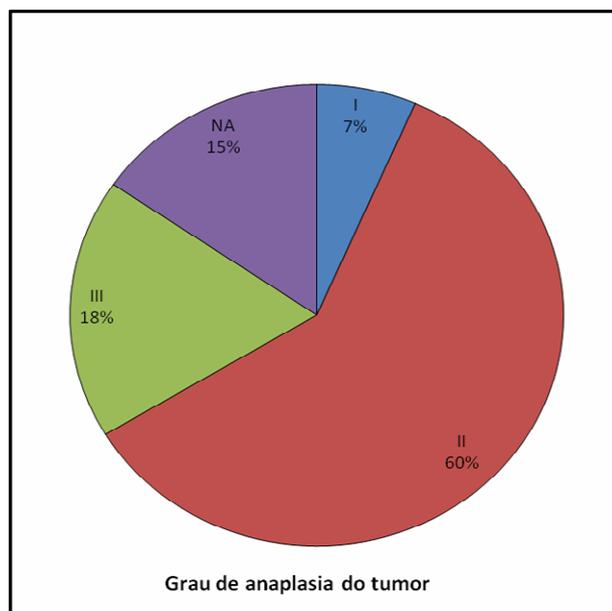


Figura 11: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o grau de anaplasia do tumor.

Quanto ao tipo histológico, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais frequente, com 180 casos (84%), seguido do carcinoma lobular infiltrante com 11 casos (5%), carcinoma medular com 7 casos (3%), carcinoma ductal *in situ* com 5 casos (2%), carcinoma SOE (sem outra especificação) com 3 casos (2%), carcinoma mucinoso com 1 caso (1%) e outros tipos histológicos com 7 casos (3%) (figura 12).

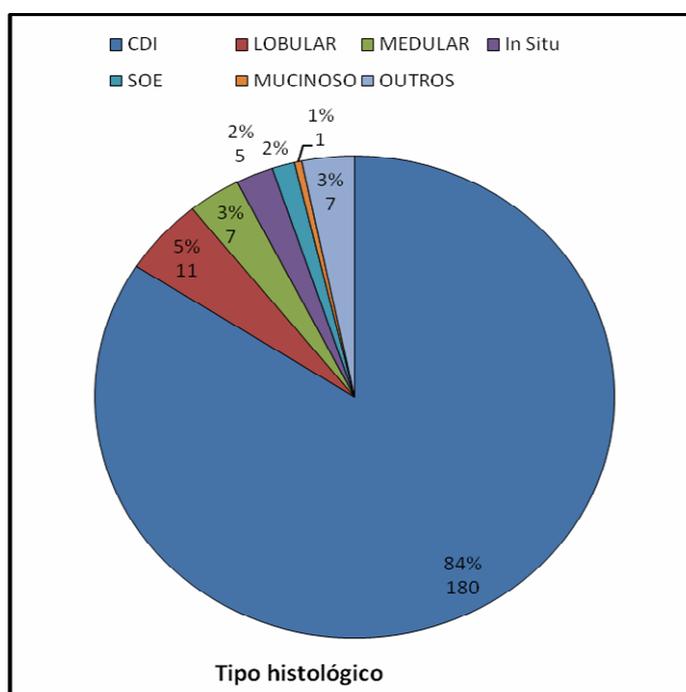


Figura 12: Distribuição dos casos de carcinomas de mama acordo com o tipo histológico.

2 - Avaliação dos Marcadores Imuno-histoquímicos: todos os 214 casos foram avaliados quanto à imunodeteção de receptores de estrógenos, receptores de progesterona, c-erbB-2 e p53. A imunodeteção de p53 foi positiva em 99 tumores (46%), negativa em 114 tumores (53%) e inconclusiva em 1 caso (1%) (figura13).

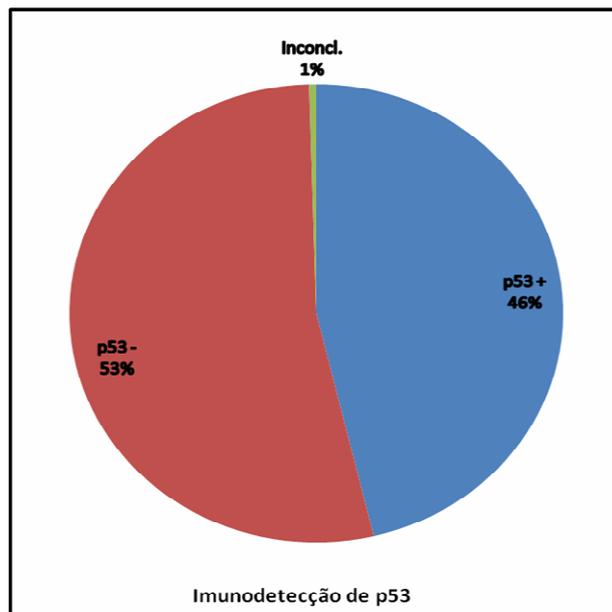


Figura 13: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteccção de p53.

Quanto à imunodeteccção do receptor de estrógenos, 117 tumores foram positivos (55%) e 97 (45%) foram negativos (figura 14).

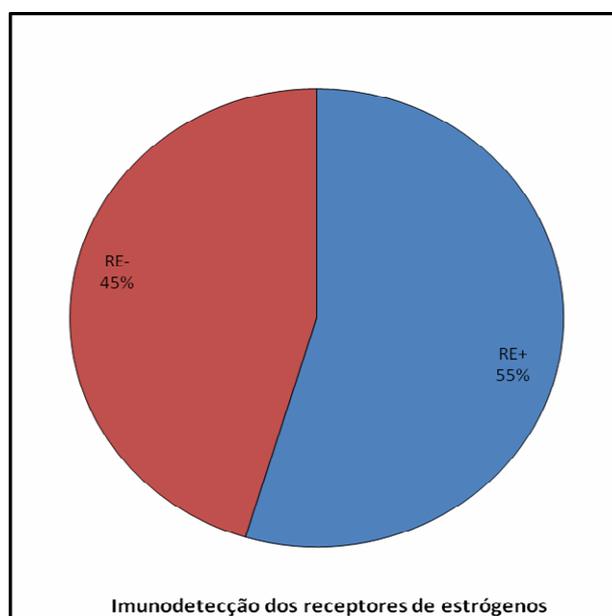


Figura 14: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteccção de receptores de estrogênio.

A imunodeteccção do receptor de progesterona foi positiva em 82 casos (38%), negativa em 131 casos (61%) e inconclusiva em 1 caso (1%) (figura 15).

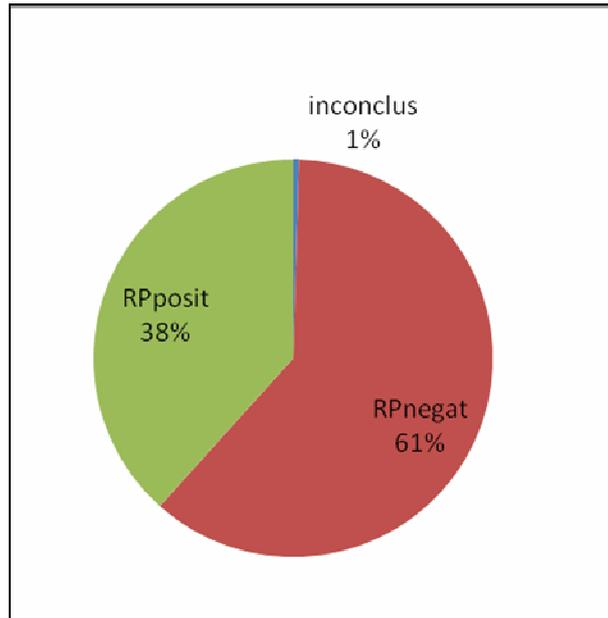


Figura 15: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteção de receptores de progesterona.

A hiperexpressão de c-erbB-2 foi positiva em 115 casos (54%) e normal em 94 casos (44%), além de 5 casos que foram inconclusivos (2%). O tipo histológico caracterizado com carcinoma medular (7 casos) apresentou imunodeteção positiva de p53 em 87,5%(figura 16).

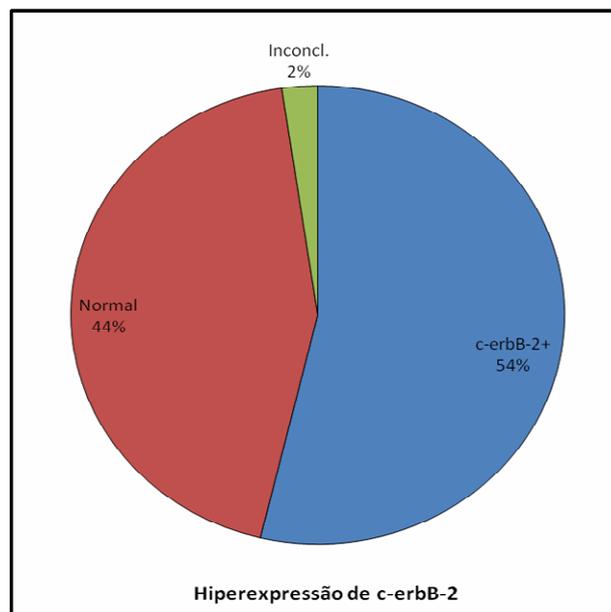


Figura 16: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a hiperexpressão de c-erbB-2.

3 – Sobrevida global: Dentre as 214 pacientes, a sobrevida global em cinco anos foi de 77,6%, sendo que 146 pacientes estavam vivas ao final de 5 anos de seguimento, enquanto 48 pacientes foram à óbito. Vinte pacientes (9,3%), livres de doença e sem seguimento ao final de cinco anos, foram censuradas na análise (figura 17).

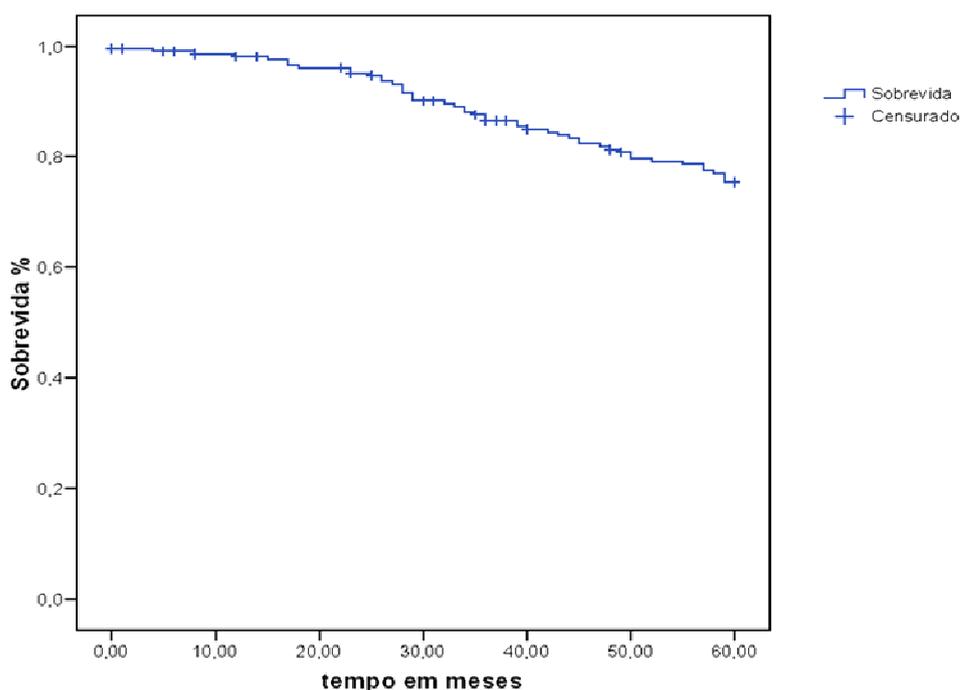


Figura 17: Sobrevida global em cinco anos para o grupo de pacientes estudadas.

Utilizando o teste de Logrank, verificamos que os fatores que influenciaram significativamente a sobrevida das pacientes foram: a idade menor do que 35 anos, o tamanho do tumor, o comprometimento dos linfonodos axilares e o estadiamento clínico.

Com relação às faixas etárias verificou-se que, no grupo de pacientes com idades inferiores a 35 anos, a sobrevida global foi de 50%, comparada com 78,6% para o grupo com idade acima ou igual a 35 anos ($p = 0.047$). Porém é importante ressaltar que essa diferença estatística foi prejudicada, uma vez que a amostra constitui-se de apenas 8 casos (3,7%) (Figura 18)

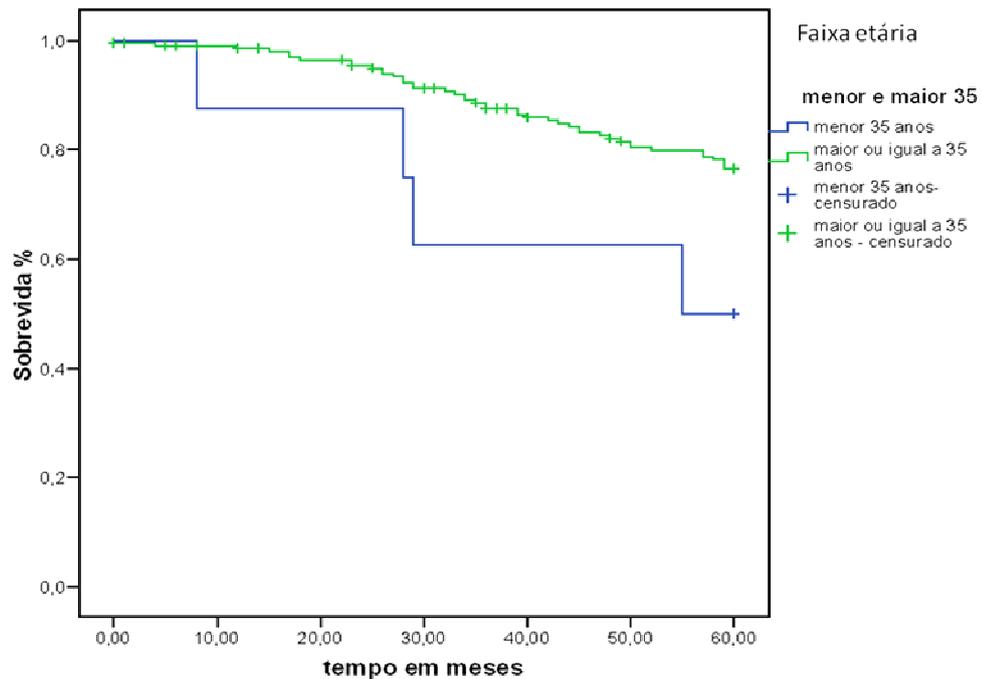


Figura 18: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com diferentes faixas etárias.

O tamanho do tumor foi um fator prognóstico que influenciou significativamente a sobrevida do grupo estudado (figura 19), uma vez que pacientes com tumores ≤ 2 cm tiveram uma sobrevida de 87,2%, comparadas com pacientes com tumores entre 2 e 5 cm que tiveram a sobrevida de 80,0% e pacientes com tumores > 5 cm foi de 63,0%, ao final dos cinco anos ($p = 0.003$).

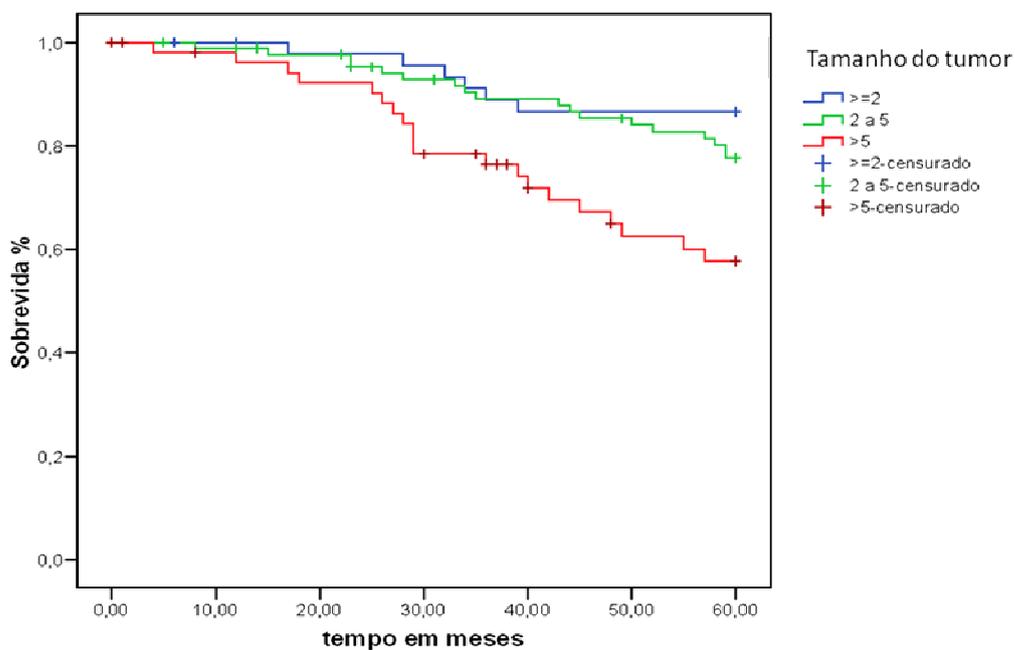


Figura 19: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com os diferentes tamanhos dos tumores.

O comprometimento dos linfonodos axilares mostrou-se um fator prognóstico importante uma vez que a sobrevida global das pacientes com câncer de mama sem comprometimento da axila foi de 91,5% em 60 meses, 69,8% para as pacientes com 1-3 linfonodos comprometidos, 81,0% para o grupo com 4-9 linfonodos comprometidos e 44,5% para as que tinham mais do que 10 linfonodos comprometidos ($p < 0.0001$) (Figura 20). É provável que uma maior sobrevida para as pacientes que tinham de 4-9 linfonodos comprometidos em relação às pacientes de 1-3, se deve ao fato de que naquela época apenas se indicava quimioterapia adjuvante com doxorrubicina para o primeiro grupo.

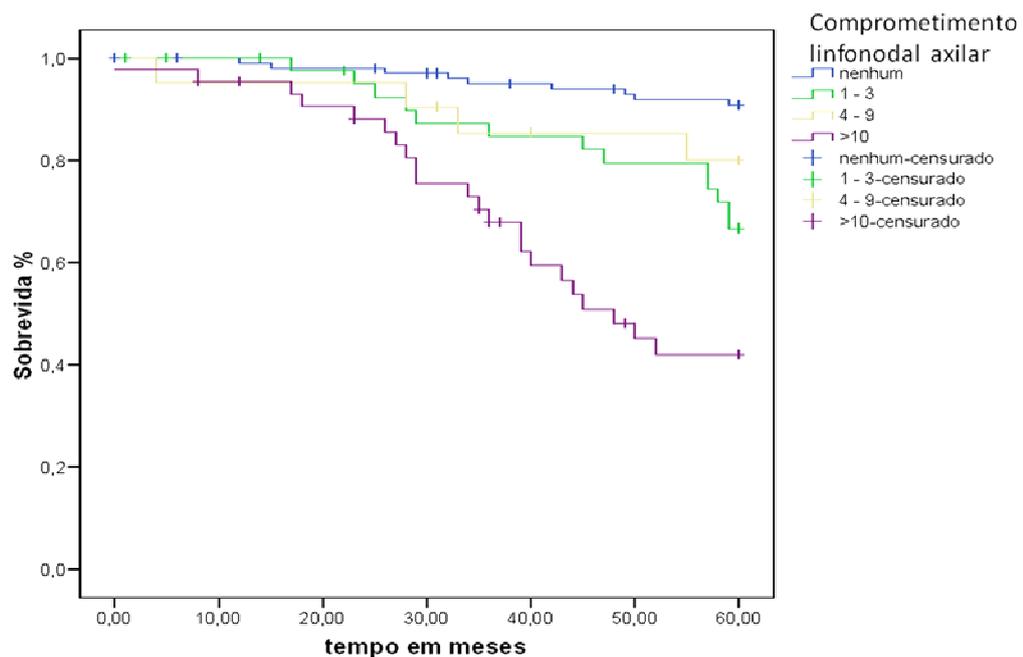


Figura 20: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o número e o comprometimento linfonodal axilar.

O estadiamento clínico representou um fator prognóstico estatisticamente significativo para as pacientes estudadas (figura 21). A sobrevida global para o grupo foi de 86,7% nas pacientes com estágio I, 85,6% para as de estágio II, 65,5% para as de estágio III e 22,2% para as pacientes com estágio IV ($p < 0.0001$).

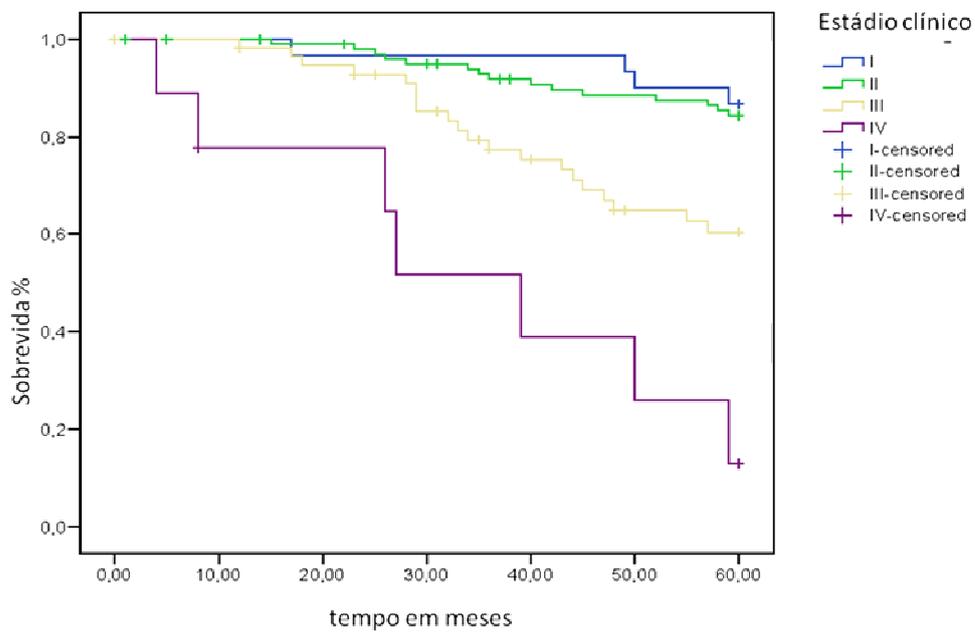


Figura 21: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico.

Os marcadores imuno-histoquímicos, incluindo a imunodeteccção dos receptores hormonais e a hiper-expressão de c-erbB-2, nenhum deles influenciou significativamente a sobrevida do grupo estudado ($p > 0.05$). A imunodeteccção de p53 foi avaliada nos 214 casos, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada na sobrevida das pacientes com imunodeteccção positiva ou negativa ($p = 0,653$) (figura 22).

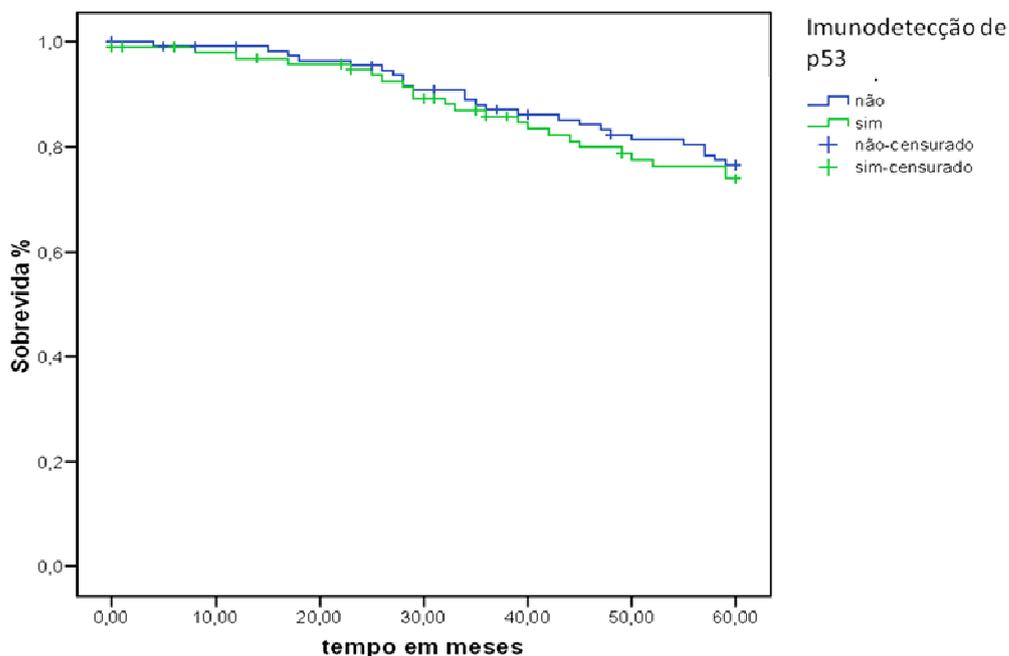


Figura 22: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com a imunodeteccção da proteína p53.

4 - Associações entre a Imunodeteccção nuclear de p53 e os parâmetros clinicopatológicos: utilizando o teste do qui-quadrado, foram investigadas as possíveis associações entre a imunodeteccção de p53 com: idade, estadiamento clínico, tamanho, grau de anaplasia, imunodeteccção do receptor de estrogênio e do receptor de progesterona, hiperexpressão de c-erbB-2 e comprometimento linfonodal. Dentre estes parâmetros verificou-se

que nenhuma associação foi estatisticamente significativa. Entretanto uma associação marginal foi demonstrada entre a imunodeteção positiva de p53 e o grau de anaplasia ($p=0,05$), provavelmente devido a um percentual preponderante de tumores grau II de anaplasia (59,8%) (Tabela 3).

Tabela 3: Associação entre a imunodeteção nuclear da proteína p53 e variáveis prognósticas clinicopatológicas.

Variável	p53				p
	Negativo		Positivo		
	N	%	N	%	
Idade					
< 60	87	53,4	76	46,6	
≥ 60	27	54,0	23	46,0	NS
Estadiamento					
0	3	30,0	7	70,0	NS
I	18	60,0	12	40,0	
II	51	49,5	52	50,5	
III	34	58,6	24	41,4	
IV	6	66,7	3	33,3	
Grau de anaplasia					
I	12	85,7	2	14,3	0,050
II	70	54,7	58	45,3	
III	14	35,9	25	64,1	
Receptor de Estrógeno					
Negativo	49	50,5	48	49,5	NS
Positivo	65	56,0	51	44,0	
Receptor de Progesterona					
Negativo	70	53,4	61	46,6	NS
Positivo	44	53,7	38	46,3	
C_erb_B2					
Negativo	53	57,0	40	43,0	NS
Positivo	61	53,0	54	47,0	
Lindondos					
Nenhum	55	52,4	50	47,6	NS
1 – 3	24	55,8	19	44,2	
4 – 9	12	57,1	9	42,9	
> 10	23	52,3	21	47,7	
Tamanho do Tumor					
≤ 2 cm	31	66,0	16	34,0	NS
2 – 5	45	50,6	44	49,4	
> 5	29	53,7	25	46,3	

5 – Levantamento bibliográfico de artigos publicados em literatura médica referentes à imunexpressão de p53 como fator prognóstico em câncer de mama: 30 artigos foram selecionados que associavam imunexpressão de p53 e câncer de mama. Todos analisaram um número mínimo de 100 pacientes, utilizaram a imunohistoquímica como método de detecção de p53 e foram publicados no período de 1993 até janeiro de 2008.

Tabela 4: Referências bibliográficas referentes à literatura consultada onde é relacionada a imunexpressão da proteína p53 como fator prognóstico em câncer de mama.

AUTORES	nºcasos	método	anticorpo	p53+ (%)	cut off	POPULAÇÃO ESTUDADA	FOLLOW -UP	SLD/ UV(P)	SG/ UV(P)
Allred et al.,1993	700	IHQ/SSCP	Pab1801/240	52%	>0	LIN_	54m	0,0008	0,003*
Barnes et al.,1993	195	IHQ	CM1	19%	>75%	_	124,8m	0,001	0,001
Hurliman ,1993	196	IHQ	Pab1801/240/ 421/CM1	35%	>0	_	81m	NS	0,057
Gasparini et al.,1994	254	IHQ	Pab1801	28%	>10%	LIN_ /T1-T3	62m	0,004	0,024
Marks et al.,1994	230	IHQ	Pab1801	24%	>0	ECI/ECII	NR	0,03	0,01
Beck et al.,1995	462	IHQ	DO1	21,40%	>10%	_	48m	0,02	0,0002
Göhring et al., 1995	204	IHQ	Pab1801	38%	>10%	_	72m	0,02	NS
Pietiläinen et al., 1995	392	IHQ	CM1	54,80%	>0	_	133,2m	NS	?
Stenmark-Askmal et al., 1995	205	IHQ	Pab1801/DO1	12,66%	>20%	ECI	60m	0,002	_
MacGrogan et al.,1995	942	IHQ	DO7	33,50%	>50%	_	117,9m	0,0001	<0,000
Caffo et al., 1996	261	IHQ	DO7	23%	>15%	_	73m	0,001	0,00001
Michalides et al.,1996	248	IHQ	DO7	18%	>5%	EC I-II	106m	NS	NS
Silvestrini et al.,1996	1400	IHQ	Pab1801	NR	>5%	LIN-	120m	0,0012	0,0001
Silvestrini et al.,1996	240	IHQ	Pab1801	14%	>5%	pós-menop/LINF+/operavel/RE+	-60m	0,0001	?
Fresno et al.,1997	151	IHQ	DO7	30%	>50%	LINF_	75m	NS	0,003
Iwaya et al.,1997	154	IHQ	Rsp53	21,40%	≥10%	LIN_ / <=5cm	157m	0,003	_
Zhang et al.,1997	228	IHQ	Rsp53	18%	>10%	LIN+(1-3)	132m	0,01	0,001
Reed et al.,2000	613	IHQ	CM1	29%	>0	LINF-/<=5cm/M0	186m	NS	NS
Thor et al.,2000	798	IHQ	Pab1801	29,45%	>0	_	195,6m	NS*	0,0308
Zellers et al.,2000	1530	IHQ	Pab1801/Pab 240	51,89%	>0	2grupos:com RXT/sem RXT	62m	<0,001/0,009*	_
Pérez-Requena et al.,2002	100	IHQ	DO7	25%	>10%	_	52m	0,00	0,01
Pellikainen et al.,2003	418	IHQ	DO7	46%	≥10%	CDI/Cin situ	54m	NS	NS
Chung et al.,2004	346	IHQ/tissue	DO7	31%	>30%	LINF_	171,6m	_	0,0379
Yamashita et al., 2004	506	IHQ	Pab1801	29%	>0	_	82m	0,01	0,01
Kröger et al.,2006	157	IHQ	DO1	24%	>10%	>10LIN	60m	NS	_
Song et al.,2006	440	IHQ	DO7	51,60%	>1%	_	84m	NS	0,045
Malamou-Mitsi et al., 2006	392	IHQ	DO1	26,50%	>10%	T1-3N1MO/T3NOMO	50m	0,001	0,002
de Roos et al., 2007	330	IHQ/tissue	BP53-12-1	54,84%	>30%	CDI/Cin situ	49,8m	*0,014	_
Keam et al.,2007	145	IHQ	#	52%	>24%	ECII/ECIII	18m	NS	NS
Crabb et al.,2008	313	IHQ/tissue	DO7	30,64%	>10%	>4LINF+	140m	0,004	_

Onde: a cor azul indica os trabalhos que utilizaram o anticorpo DO-7; **IHQ:** imuno-histoquímica; **Tissue:** tissue microarray; **SSCP:** single strand conformational polymorphism (análise conformacional de polimorfismo de cadeia simples); **DO-1/ DO-7/ Pab 1801/ Pab 240/ Pab 421/ CM1/ Rsp53/ Bp53.12.1:**

anticorpos anti-p53;**p53(+)**: porcentagem de imunodeteção positiva de p53 na população estudada;**cutoff**: valor de corte considerado quanto a porcentagem de núcleos corados para que seja considerada como imunexpressão positiva de p53;_: população escolhida de modo aleatório;**LIN_**: população estudada com axila negativa;**LINF+**: população estudada com axila positiva;**ECI/ECII/ECIII**: tumores de estágio clínico I/II/III;**CDI**: carcinoma ductal infiltrante;***in situ***: carcinoma ductal in situ;**RE+**: receptor de estrogênio +;**RXT**: radioterapia;**NS**: não significativo do ponto de vista estatístico;**SLD**: sobrevida livre de doença;**SG**: sobrevida global;**UV**: análise univariada;**(p)**: valor de p.

XVI - DISCUSSÃO

No Brasil, o câncer de mama constitui-se na patologia maligna mais incidente na população feminina e tem o seu quadro agravado pelo diagnóstico tardio, em especial nas classes de menor poder aquisitivo. Na grande maioria das instituições de câncer, os tumores com estadiamentos III e IV chegam a corresponder a 60% dos diagnósticos (Abreu & Koifman, 2002). Em nosso estudo a percentagem de pacientes em estádios III e IV foi de 31,3% e a sobrevida global destas pacientes foi de 65,5% e 22,2%, respectivamente, contrastando com uma sobrevida global de 77,6% para o grupo total estudado.

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida são variáveis de paciente para paciente. Esta variação é determinada por vários fatores que ainda não estão totalmente entendidos. Apesar de certos aspectos anatômicos, o tamanho do tumor primário e as condições dos linfonodos axilares, continuam sendo fatores importantes na avaliação prognóstica (Abreu & Koifman, 2002).

Desde que a terapia sistêmica passou a ser parte integrante do tratamento do câncer de mama, tornou-se importante saber se uma paciente terá maior ou menor probabilidade de recidiva loco-regional ou à distância. Os fatores prognósticos são indicativos da agressividade biológica herdada de um tumor, refletindo sua história natural (Elledge & Allred, 1998). O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação de programas terapêuticos. Uma terapia baseada em avaliação prognóstica possibilita a aplicação de diferentes modalidades terapêuticas disponíveis, com intensidade e efetividade adequadas e individualizadas para uma paciente específica (Abreu & Koifman, 2002).

O gene supressor de tumor TP53 foi primeiramente associado ao câncer de mama em 1982, quando Crawford e seus colegas relataram que 9% das pacientes com câncer de mama, particularmente aquelas com metástases viscerais, tinham anticorpos circulantes para a proteína p53. Este dado gerou a hipótese de que “p53 alterada em quantidade, tipo, ou apresentação em

tumores de mama seria imunogênica” (Thor *et al.*, 1992).

Cattoretti *et al.*(1988) foram os primeiros a descrever a imunodeteção de p53 em câncer de mama, demonstrando a associação entre a imunodeteção de p53 e um grupo fenotipicamente distinto de carcinomas com receptores de estrogênio negativos.

Davidoff *et al.*(1991) sugeriam que altos níveis de expressão de proteína p53 em câncer de mama primário, ocorrem durante a progressão tumoral e a metastatização ou na iniciação do tumor, provendo uma grande vantagem de crescimento . Segundo este autor, no câncer de mama as alterações de p53 podem estar presentes precocemente na fase *in situ* do crescimento tumoral e podem ser mantidas através dos estágios de progressão, sem evidência da aquisição da mesma durante a passagem de um tumor *in situ* para invasor ou de invasor para metastático. Isto sugere segundo este autor, que a inativação de p53 pode ser um evento precoce na progressão do câncer de mama e conferindo um fenótipo mais agressivo.

As mutações do gene TP53, ou a imunodeteção da proteína p53 como método indireto de avaliar uma mutação, têm sido descritas como fator prognóstico em uma longa lista de tumores humanos, incluindo o câncer de mama, associando-se com pior prognóstico (Cattoretti *et al.*, 1988; Callahan *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1993; Silvestrini *et al.*, 1993; Thor & Yandell, 1993; Bergh *et al.*, 1995; Gasparini *et al.*, 1998). Existem cerca de 30 trabalhos na literatura médica avaliando p53 como fator prognóstico em câncer de mama, pelo método de análise imuno-histoquímica, cujas casuísticas excedam 100 casos. Destes trabalhos, 10 não conseguiram demonstrar significância estatística quanto à sobrevida livre de doença (Hurliman *et al.*, 1993; Pietainen *et al.*, 1995; Michalides *et al.*, 1996; Fresno *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2000; Thor *et al.*, 2000; Pellikainen *et al.*, 2003; Kroger *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Keam *et al.*, 2007) e cinco destes não demonstraram significância estatística quanto a sobrevida global (Gohring *et al.*, 1995; Michalides *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 2000; Pellikainen *et al.*, 2003; Keam *et al.*, 2007).

A imunodeteção de p53 foi avaliada nos 214 casos de nossa casuística,

entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada na sobrevida global em cinco anos para as pacientes com imunodeteção positiva ou negativa de p53 ($p = 0,653$), não constituindo-se assim em um fator de pior prognóstico para os casos estudados.

Em uma meta-análise com mais de 9000 pacientes, o valor prognóstico e preditivo de p53, avaliado por imuno-histoquímica foi considerado fraco (Barbareschi, 1996). Pharoah *et al.*(1999) em outra meta-análise, utilizando métodos que detectem mutações e não o acúmulo da proteína, confirmaram que mutações no gene TP53 conferem uma pior sobrevida global e menor sobrevida livre de doença em casos de câncer de mama, um efeito que seria independente de outros fatores prognósticos.

Silvestrini *et al.*(1996) demonstraram em uma grande série de pacientes linfonodo negativas uma desvantagem na sobrevida global para aquelas pacientes com a expressão imuno-histoquímica aumentada de p53 ($p = 0,024$). Estes achados foram também demonstrados em outros estudos com linfonodos-negativos usando imuno-histoquímica (Allred *et al.*, 1993; Fresno *et al.*, 1997; Gasparini *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2004).

Em nossa série de 214 pacientes, 106(49,5%) não apresentavam comprometimento metastático linfonodal. Quando comparamos o grupo linfonodo negativo com imunodeteção positiva de p53 e o grupo linfonodo negativo sem imunodeteção positiva de p53, não obtivemos uma associação entre tais parâmetros (57,42% X 58,02%) ($p=0,212$). Isto demonstra que a imunodeteção nuclear de p53 também não teve importância prognóstica nas pacientes linfonodo negativas de nossa casuística.

Quanto à imunodeteção de p53, 99 pacientes (46,26%) tiveram a imunodeteção nuclear positiva da proteína p53, com um valor de corte de >10%. O anticorpo utilizado na imunodeteção nuclear da proteína p53 foi o anticorpo monoclonal DO7, considerado por Horne *et al.*(1996) como o mais efetivo na detecção de p53. Dados da literatura revelam que a imunodeteção nuclear positiva de p53 varia de 12,66% (Stenmark-Askmalin *et al.*, 1995) até 54,84% (Silvestrini *et al.*, 1996) em carcinomas de mama. Os valores de corte

são extremamente variáveis, porém, a maioria considera a imunodeteção positiva quando mais de 10% do núcleo das células tumorais estiverem corados (Gasparini *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 1995; Gohring *et al.*, 1995; Iwaya *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Requena *et al.*, 2002; Pellikainen *et al.*, 2003; Kroger *et al.*, 2006; Crabb *et al.*, 2008).

Elledge (1996) sugere que quanto maior o valor de corte para a imunodeteção nuclear de p53, maior a chance de que p53 estar associado com pior prognóstico em câncer de mama. Allred *et al.*(1993) obtiveram uma associação altamente significativa entre a imunodeteção de p53 e menor sobrevida global ($p = 0,0002$) quando considerou um valor de corte superior a 52%. Barnes *et al.*(1993) também demonstraram uma associação significativa quando consideraram um valor de corte superior a 75%. Um maior valor de corte para a imunodeteção de p53 provavelmente traduz uma correlação mais estreita com a presença de mutações no gene TP53.

Correlações inversas entre a imunodeteção de p53, negatividade de receptores hormonais e alto grau tumoral foram observadas em vários estudos (Thor *et al.*,1992; Malamou-Mitsi *et al.*, 2006; Davidoff *et al.*, 1991; Isola *et al.*,1992). Em nosso estudo, a imunodeteção nuclear positiva da proteína p53 nas células tumorais não demonstrou nenhuma associação com os parâmetros prognósticos como: idade maior que 60 anos, estadiamento clínico, grau de anaplasia, receptores de estrogênio e progesterona, c-erbB-2, número de linfonodos axilares comprometidos e o tamanho tumoral ($p = 0,029$). É importante ressaltar que neste estudo, observamos uma associação marginal entre a imunodeteção de p53 e o grau de anaplasia dos tumores, com uma nítida preponderância da imunodeteção de p53 nos tumores com grau histológico III (64,1%). Entretanto frente a um maior número de tumores grau II de anaplasia (60,28%), esta associação foi prejudicada.

Um estudo histórico sobre fatores prognósticos em câncer de mama (Cacinelli *et al.*,1989) descreveu uma série de 2.170 casos, avaliando o prognóstico de pacientes após tratamento loco-regional, por um período de 5 anos. Os resultados demonstraram que as taxas de mortalidade foram afetadas significativamente pelo comprometimento dos linfonodos regionais, o tamanho

do tumor primário, a idade da paciente e o quadrante sede do tumor primário. Em nossa casuística, as curvas de sobrevida foram estatisticamente afetadas em pacientes com: a idade inferior a 35 anos (com baixo poder estatístico pelo pequeno número da amostra), o comprometimento e o número dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor e o estadiamento clínico

Em nosso estudo o número de linfonodos axilares comprometidos também afetou a sobrevida das pacientes de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), sendo esse achado semelhante ao da literatura (Cacinelli *et al.*, 1989; Styblo & Wood, 1998; Cianfrocca & Goldstein, 2004). Pacientes que não apresentam comprometimento linfonodal axilar apresentam um melhor prognóstico, tanto para a sobrevida global, quanto para a sobrevida livre de doença (Abreu & Koifman, 2002).

A imunodeteção da proteína p53 que se acumula em altos níveis no núcleo é um método relativamente fácil e acurado para detecção de mutações, com uma sensibilidade de aproximadamente de 80%, na maioria dos estudos clínicos (Allred, 1997). Entretanto, alguns autores consideram por outro lado, baixa a sensibilidade da imunodeteção p53 como 65% (Lai *et al.*, 2004) e 80% (Allred, 1997; Chakravarty *et al.*, 1996). A análise de polimorfismo conformacional de cadeias simples (SSCP: *single strand conformational polymorphism*) e a eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGE: *denaturant gradient gel electrophoresis*) apresentam uma sensibilidade superior para a detecção de mutação, em torno de 85-90% (Lai *et al.*, 2004) e a concordância destes métodos com o seqüenciamento genômico é de cerca de 96,5% (Chakravarty *et al.*, 1996).

Enquanto a imuno-histoquímica detecta a maioria das mutações de TP53, falsos negativos e falsos positivos podem ocorrer por inúmeras razões. Uma imunopositividade de p53 em ausência de uma mutação detectada pode ser explicada pelo acúmulo de proteína p53 selvagem em situações de estresse celular. Do mesmo modo, reações de imunodeteção negativa de p53 podem decorrer de mutações do gene TP53 como: deleções, mutações *nonsense* e *missense*, associadas com baixos níveis da proteína p53,

detectáveis à imuno-histoquímica (Robbins,1996).

Poller *et al.*(1992) detectaram a proteína p53 em carcinomas ductais *in situ* com resultados positivos em 25% dos casos. Dos 5 casos de carcinoma ductal *in situ* em nossa casuística, 5 tumores (100%) apresentaram imunodeteção positiva da proteína p53 considerando um valor de corte de 10%. Em função do pequeno número de casos não podemos inferir este número como real. Estes dados podem sinalizar a necessidade de estudos mais detalhados em uma maior amostra de carcinomas *in situ*.

Em nosso estudo, a imunodeteção de p53 foi positiva em 87,5% dos tumores cujo tipo histológico era carcinoma medular. Hurliman (1993) já descrevia em seu artigo uma alta taxa de positividade de p53 em carcinomas medulares (94%).

As dificuldades de se associar o status de p53 às propriedades biológicas das células cancerosas e a sensibilidade destas células às diversas drogas poderiam ser explicadas em parte pela expressão das diferentes isoformas da proteína p53. TP53 contém um promotor interno alternativo no íntron 4 e pode transcrever 9 diferentes isoformas. Essas diferentes isoformas têm localizações subcelulares diferentes. Assim, o uso de painel de anticorpos anti-p53 em IHQ pode resultar em diferentes padrões em uma mesma amostra tumoral. Os anticorpos monoclonais DO-1 e DO-7 reconhecem p53, p53 β e p53 α , mas não reconhecem as outras isoformas de p53. A fim de se obter um melhor entendimento sobre a imunodeteção de p53, uma transcrição reversa associada a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) poderia ser utilizada, visando a detecção de diferentes isoformas de p53. Entretanto, tais ensaios necessitam de RNA de alta qualidade (Bourdon *et al.*, 2007).

Elledge *et al.*(1994) sugeriam que a importância prognóstica de p53 em câncer de mama seria mais evidente se considerássemos na execução da imuno-histoquímica uma combinação de anticorpos anti-p53 para tornar o método mais sensível e assim obtermos informações mais relevantes do que com um anticorpo apenas. Ele considerou como anticorpos mais sensíveis o Pab 1801 e 240. Barbareschi (1996) em sua meta-análise sobre

imunexpressão de p53 e seu valor prognóstico em câncer de mama recomenda o uso de três anticorpos diferentes para o reconhecimento de três diferentes epítomos localizados nas regiões N-terminal, média e C-terminal da molécula de p53. Barnes *et al.*(1993) reconhecem CM-1, um anticorpo policlonal, com múltiplas vantagens por reconhecer diferentes formas estruturais da proteína p53 e também por ser usado em material fixado em formalina. Ressalta a importância de cautela com relação ao fato de que a imunodeteção de p53 nem sempre ser indicativa direta de mutação do gene TP53.

A positividade da imunodeteção de p53, em ausência de mutação detectável, pode ser explicada de várias formas. A proteína p53 selvagem pode acumular-se em níveis suficientes para ser detectada pela IHQ em ambas as células, normais e neoplásicas, devido ao acúmulo da proteína refletir mais amplamente o ambiente celular, do que simplesmente a estrutura intrínseca da proteína. A negatividade de reação de IHQ em tumores contendo uma mutação pode refletir seja a falta de sensibilidade ou a ausência de acúmulo da proteína p53. Esta última pode ocorrer quando a produção da proteína estiver bloqueada ou truncada como resultado de uma mutação, particularmente, em decorrência de deleções, mutações “*splicing*” e mutações “*nonsense*”. Alternativamente, a presença de mutação pode não ser detectada pela análise molecular. Regiões altamente conservadas do gene (éxons 5-8) são geralmente aquelas escolhidas para serem analisadas, tendo em vista que contém a vasta maioria das mutações. Mutações que ocorrem fora destes éxons poderão não ser detectadas, mas são menos frequentes (Robbins, 1996). Mais recentemente, estudos moleculares têm se estendido para os éxons 4, 9 e 10 e observou-se que eles contêm um considerável número de mutações (cerca de 15%). O sequenciamento direto do gene TP53 após amplificação por PCR permanece o “padrão ouro” de análise molecular. Infelizmente, sua sensibilidade permanece limitada, sendo que seu maior problema seria a presença de células normais (linfócitos, células estromais) que contaminariam as amostras tumorais (Soussi, 2005).

Complicações adicionais na interpretação da imunodeteção de p53

incluem o número das distintas formas ou padrões de positividade que podem ser observadas nos tumores e a seleção do percentual mínimo ou valor de corte para a distinção entre reação positiva ou negativa. É provável que vários destes padrões de imunexpressão de p53 tenham uma diferente base biológica e que estas diferenças possam ter relevância biológica. A imunodeteccção de p53 está normalmente localizada no núcleo das células malignas e não expressas nas células normais. A mutação é normalmente acompanhada de positividade em amplas proporções da população maligna, mas os padrões de imunodeteccção são raramente homogêneos. Assim, a padronização de ambos, metodologia e interpretação são essenciais para o uso rotineiro da IHQ (Robbins, 1996).

Falso negativo em IHQ acontece e é geralmente devido ao uso de somente um anticorpo, e/ou uso inadequado do material, seja fixado em formalina ou material congelado por um longo período (Hurliman, 1993). Há um número de variáveis incontroláveis no processamento tecidual que poderia explicar os diferentes padrões de imunodeteccção entre os blocos individualmente, como por exemplo, o tempo entre a retirada e a fixação, o tamanho do tecido a ser fixado, o tempo que o tecido está fixado e a temperatura do estado de embebição em parafina. Todos estes fatores têm um impacto direto na qualidade da preservação antigênica (Kerns *et al.*, 1992). Falsos positivos em IHQ também são descritos e por outras causas que não as mutações. Causas estas que controlariam a expressão de p53 (Hurliman, 1993).

A imunodeteccao de p53 no carcinoma da mama como fator prognóstico é um método controverso, pois a falta de padronização leva a resultados heterogêneos. As causas da heterogeneidade são múltiplas: vários anticorpos usados, aspectos metodológicos (níveis de corte), material a ser analisado (em parafina, congelados), condições de estocagem e variabilidade individual de interpretação dos resultados (Soussi, 2005).

O papel crucial de p53 em resposta ao estresse é demonstrado em vários tipos de células, entretanto, sua contribuição para o câncer de mama ainda é difícil de ser avaliada. Sem dúvidas, o número de funções que p53

desempenha, a diversidade de suas mutações, a multiplicidade de proteínas com as quais interage e a variabilidade genética inerente à progressão da célula cancerosa, podem resultar em um efeito supressor tumoral, assim como numa ação oncogênica de p53. E assim, a ligação entre p53 e o seu papel prognóstico ou preditivo permanece pouco clara, apesar de numerosos estudos a este respeito. Investigações futuras são necessárias para determinar sob quais condições uma abordagem terapêutica visando p53 poderia ser de real benefício para as pacientes com câncer de mama (Lacroix *et al.*, 2006).

Com base no estudo realizado podemos concluir que:

1 - A partir da revisão da literatura, 30 estudos foram selecionados acerca de importância prognóstica da imunodeteção de p53 no câncer de mama, sendo que 19 deles demonstraram uma associação significativa entre a imunodeteção de p53 e uma menor sobrevida livre de doença; enquanto que 16 estudos demonstraram uma associação significativa entre a imunodeteção de p53 e menor sobrevida global.

2 - Dentre as pacientes analisadas, a maioria tinha idades acima de 50 anos (54,2%) e apresentavam estágio clínico II (48,1%); 50,5% apresentavam comprometimento linfonodal; 41,6% apresentavam tumores com tamanho intermediários ($2\text{ cm} < T \leq 5\text{ cm}$); 59,8% apresentavam tumores de grau histológico II e a grande maioria (84,1%) eram carcinomas ductais infiltrantes.

3 - A imunodeteção de p53 foi positiva em 46,3% dos casos.

4 - Os resultados da imunodeteção de p53 nos tumores de mama foram semelhantes àqueles relatados por outros estudos, entretanto, diferentes valores de corte são utilizados pelos diferentes grupos.

5 - Nenhuma associação estatisticamente significativa foi demonstrada entre a imunodeteção de p53 e os aspectos clinicopatológicos estudados.

6 - A sobrevida global das pacientes em cinco anos com câncer de mama avaliadas neste estudo foi de 77,6%.

7 - Os fatores prognósticos que influenciaram a sobrevida global foram: idade inferior a 35 anos, tamanho do tumor, número e comprometimento linfonodal e estadiamento clínico.

8 - A imunodeteção de p53 não influenciou a sobrevida das pacientes com câncer de mama avaliadas nesta série.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminino. **Rev Bras Cancerol.** 2002; 48 (1):113-31.

Allred CD. Prognostic and predictive factors in breast cancer assessed by immunohistochemistry. "In": Page DL, Tavassoli FA, course directors. Proceedings of the Long Course Breast Pathology; 1997; Flórida, EUA. Orlando: United States and Canadian Academy of Pathology; 1997. p. 77-97.

Allred CD, Clark GM, Elledge R, Fuqua SAW, Brown RW, Chamness GC, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 1993; 85 (3):200-6.

Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L, Borrensen AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. **Br J Cancer.** 1993; 68(3):540-8.

Barbareschi M. Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas. A review of the literature involving over 9.000 patients. **Appl Immunohistochem.** 1996; 4(2):106-16.

Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? **Human Pathol.** 1993; 24(5):469-76.

Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapsen PG. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. **Gynecologic Oncology.** 1995; 57(1):96-104.

Beenken SW, Grizzle WE, Crowe R, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2

and p53. **Ann Surg.** 2001; 233(5): 630-8.

Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lingren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nat Med.** 1995; 1(10): 1029-34.

Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. **CA Cancer J Clin.** 1995; 45(5):263-78.

Borrensens-Dale AL. TP53 and breast cancer. **Hum Mutation.** 2003; 21(3):292-300.

Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. **Br j Cancer.** 2007; 97(3):277-82.
Review

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. UICC: TNM classificação de tumores malignos/traduzido por Eisenberg ALA. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. ESTIMATIVA/2008. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

Braithwaite AW, Prives CL. p53: more research and more questions. **Cell Death Differ.** 2006; 13(6):877-80.

Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Bittitta F, et al. Prognostic value of p21 (WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. **Clin Cancer Res.** 1996; 2(1):1591-99.

Callahan R. P53 mutations, another breast cancer prognostic factor. **J Natl Cancer Inst.** 1992; 84(11): 826-7.

Calvo JP. Marcadores moleculares de riesgo del cáncer de mama. **Boletin Del GEICAM** (Grupo Español de investigación em Câncer de Mama). 2005; 15:35-37.

Cascinelli N, Singletary E, Greco M, Ames F, Testori A, Baldini M, et al. Long-

term survival and prognostic factors for 2170 breast cancer patients treated at two cancer centers(Milan and Houston). **Tumori**. 1989; 75(2):123-31.

Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Della D. p53 expression in breast cancer. **Int J Cancer**. 1988; 41(2):178-83.

Cavalcanti Jr GB, Klumb CE, Maia RC. P53 e as hemopatias malignas. **Rev Bras Cancerol**. 2002; 48(3):419-27.

Cébrian EA. Población de riesgo y beneficio de las manobras preventivas? Qué sabemos hoy? **Boletín Del GEICAM** (Grupo Español de investigación em Cáncer de Mama). 2005; 15:41-3.

Chakravarty G, Redkar A, Mitra I. A comparative study of detection of p53 mutations in human breast cancer by flow cytometry, single-strand conformation polymorphism and genomic sequencing. **Br J Cancer**. 1996; 74(8):1181-7.

Chung GC, Zerkowski MP, Ocal IT, Dollet-Filhart M, Kang JY, Psyrrri A, et al. b-Catenin and p53 analyses of breast carcinoma tissue microarray. **Cancer**. 2004; 100(10):2084-92.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**. 2004; 9(6):606-16.

Crabb SJ, Bajdek CD, Leung S, Speers CH, Kennecke H, Huntsman DG *et al*. Can clinically relevant prognostic subsets of breast cancer patients with four or more involved axillary lymph nodes be identified through immunohistochemical biomarkers? A tissue microarray feasibility study. **Breast Cancer Res**. 2008; 10(1):R6 [epub ahead of print]

Davidoff AM, Herndon JE, Glover NS, Kerns B-JM, Pence JC, Iglehart D, et al. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. **Surgery**. 1991; 110(2):259-64.

Davidoff AM, Humprey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci**. 1991; 88(11): 5006-10.

Dumitresku RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med.** 2005; 9(1):208-21.

Elledge RM. Assessing p53 status in breast cancer prognosis: where should you put the thermometer if you think your p53 is sick? **J Natl Cancer Inst.** 1996; 88(3/4):141-3.

Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1994; 32(1):39-47.

Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1998; 52(1-3):79-98.

Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, Yu Y-Y, Allred C. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. **Cancer Res.** 1994; 54(14):3752-7.

Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1993; 26(1-2):225-35.

Elston CW, Ellis JO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** 1991; 19(5): 403-10.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.** 2000; 124(7):966-78.

Frebourg T, Friend SH. Cancer risks from germline p53 mutations. **J Clin Invest.** 1992; 90(5):1637-41.

Freitas-Jr R, Freitas NMA, Curado MP, Martins E, Moreira MAR, Bandeira e Silva CM. Variations in breast câncer incidence per decade of life (Goiânia, GO, Brazil): 16-year analysis. **Cancer Causes Control.** 2008. [Epub ahead print]

Fresno M, Molina R, Pérez del Río MJ, Alvarez S, Díaz-Iglesias IM, Garcia I *et al.* p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative

breast carcinoma. **Eur J Cancer.** 1997; 33(8):1268-74.

Hussain SP, Harris CC. P53 biological network: at crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **J Nippon Med Sch.** 2006; 73(2):54-64.

Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Res.** 2002; 4(2):70-6.

Gasparini G, Toi M, Verderio P, Ranieri G, Dante S, Bonaldi E *et al.* Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. **Int J Oncol.** 1998; 12(5): 1117-25.

Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Palma PD, Caffo O, *et al.* Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. **J Clin Oncol.** 1994; 12(3):454-66.

Gelman EP. Oncogenes in human breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, editores. The breast. Comprehensive management of benign and malignant diseases. 2^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p.499-517.

Göhring U-J, Scharl A, Heckel C, Ahr A, Crombach G. p53 protein in 204 patients with primary breast carcinoma- immunohistochemical detection and clinical value as a prognostic factor. **Arch Gynecolog Obstet.** 1995; 256(3):139-46.

Gonçalves ATC, Jobim PFC, Vanacor R, Nunes LN, Albuquerque IM, Bozzetti MC. Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. **Cad saúde pública.** 2007; 23(8):1785-90.

Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, life style, and hormones. **Breast Cancer Res.** 2004; 6(5):213-8.

Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. **J Natl Cancer Inst.** 1996; 88(20):1442-

55.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S *et al.* American Society of clinical oncology 2007. Update of recommendation for the use of tumors markers in breast cancer. **J Clin Oncol.** 2007; 25(33):1-26.

Hinestrosa MC, Dickersin K, Klein P, Noss K, Slamon D, Sledge G, et al. Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance. **Nat Rev Cancer.** 2007; 7(4):309-15.

Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, McIntosh GC, Thomas MD, Angus B, et al. p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of five antibodies for immunohistochemistry . **Br J Cancer.** 1996; 73(1):29-35.

Hurliman J. Prognostic value of p53 protein expression in breast carcinomas. **Path Res Pract.** 1993; 189(9):996-1003.

Iwaya Kelichi, Tsuda H, Fukutomi T, Tsugane S, Suzuki M, Hirohashi S. Histologic grade and p53 immunoreaction as indicators of early recurrence of node-negative breast cancer. **Jpn J Clin Oncol.** 1997; 27(1):6-12.

Keam B, Im SA, Kim HJ, Oh DY, Kim JH, Lee SH *et al.* Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy; paradoxal features of triple negative breast cancer. **BMC Cancer.** 2007; 7:203.

Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas.** 2004; 49(1):34-43.

Kerns B-JM, Jordan PA, Moore M-BH, Humphrey PA, Berchuck A, Kohler ME, et al. p53 over expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue detected by immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem.** 1992; 40(7):1047-51.

Klijn JGM, Berns EMJJ, Foekens JA. Prognostic and predictive factors and targets for therapy in breast cancer. "In": Pasqualini JR, editor. Breast cancer. Prognosis, Treatment and Prevention. New York: Marcel Dekker Inc; 2002. p.93-124.

Kopans DB. Imagem da mama/traduzido por Bertuol M. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. p.29-54.

Kröger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. **Clin Cancer Res**. 2006; 12(1):159-68.

Lacroix M, Toillon R-A, Leclercq G. P53 and breast cancer, an update. **Endocr Relat Cancer**. 2006; 13(2):293-325.

Lai H, Lin L, Nadji S, Lai S, Trapido E, Meng L. Mutation in the p53 tumor suppressor gene and early onset breast cancer. **Cancer Biol Ther**. 2002; 1(1):31-6.

Lai H, Ma F, Trapido E, Meng L, Lai S. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. **Breast Cancer Res Treat**. 2004; 83(1):57-66.

Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JN, Bukholm IRK, Ikdahl T, et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2007; 9(3):R30.

Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. **Cell Death Differ**. 2006; 13(6):951-61.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The p53 pathway: what questions remain to be explored. **Cell Death Differ**. 2006; 13(6):1027-36.

Liang S-H, Clarke MF. Regulation of p53 localization. **Eur J Biochem**. 2001; 268(10):2779-83.

Macgrogan G, Mauriac L, Durand M, Bonichon F, Trojani M, Mascarel I, et al. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, cerB-2, MiB1, pS2 and GSTpi. **Br J Cancer**. 1996; 74(9): 1458-65.

MacGrogan G, Bonichon F, Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, et al. Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an

immunohistochemical study on 942 cases. **Breast Cancer Res Treat.** 1995; 36 (1): 71-81.

Malamou-Mitsi V, Gogas H, Dafni U, Fillipidis T, Sotiropoulou M, Vlachodimitropoulos D, et al. Evaluation of the prognostic and predictive value of p53 and Bcl-2 in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. **Ann Oncol.** 2006; 17(10):1504-11.

Marks JR, Humphrey PA, Wu K, Berry D, Bandarenko N, Kerns B-JM, et al. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. **Ann Sur.** 1994; 219(4):332-41

Megha T, Ferrari F, Benvenuto A, Bellan C, Lalinga AV, Lazzi S, et al. P53 mutation in breast cancer. Correlation with cell kinetics and cell of origin. **J Clin Pathol.** 2002; 55(6): 461-6.

Mendonça GAS, Silva AM, Caula WM. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad saúde pública.** 2004; 20(5):1232-39.

Michalides R, Hagerman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klompmaker , et al. A clinic pathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. **Br J Cancer.** 1996; 73(6):728-34.

Ministério da Saúde. IDB- indicadores e dados básicos do Brasil. 2006. Disponível em URL< <http://www.datasus.gov.br> [22 fev 2008]

Moormeier J. Breast cancer in black woman. **Ann Intern Med.** 1996; 124(10): 897-905.

Moura-Gallo CV, Simão TA, Ribeiro FS, Andrada-Serpa MJ, Cardosos LEB, Mendonça GA. Mutações do gene p53 em tumores malignos de mama: associação com os fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Rev Bras Epidemiol.** 2004; 7(2):167-75.

Murray- Zmijewski F, Lane DP, Bourdon, J-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cells differentiation and response to stress. **Cell Death Differ.** 2006; 13(6):962-72.

Nagai MA. Alterações genéticas em câncer de mama. **Rev Bras Mastologia.** 1995; 5(3):31-41.

Nazário AC. Cinética do lóbulo mamário durante gravidez e lactação."In": Santos Jr LA. A mama no ciclo gravídico-puerperal. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p.19-24.

Norberg T, Klaar S, Kart G, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J. Increased p53 mutation frequency during tumor progression-results from breast cancer cohort. **Cancer Res.** 2001; 61(22):8317-21.

van Oijen MGCT, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. **Clin Cancer Res.** 2000; 6(6):2138-45.

Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1.794 patients with breast cancer. **Clin Cancer Res** . 2006; 12(4):1157-67.

Pellikainen MJ, Pekola TT, Rapponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ. p21(WAF1) Expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. **J Clin Pathol.** 2003; 56(3):214-20.

Pérez-Requena J, Palomo-González MJ, Baena-Cañada JM, Córdoba-Doña JA, Alonso-Redondo E, Escolar-Pujolar A. Valor pronóstico de La expresión inmunohistoquímica de La proteína p53 em el cancer de mama. **Rev Esp Patol.** 2002; 35(3):315-24.

Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer.** 1999; 80(12):1968-73.

Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V-M, Syrjänen K. Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer. **J Pathol.** 1995; 17(3):225-32.

Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma *in situ*: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. **Human Pathol.** 1993; 24(5):463-8.

Pruthi S, Brandt KR, Degnim AC, Goetz MP, Perez EA, Reynolds CA *et al.* A multidisciplinary approach to the management of breast cancer, Part 1: prevention and diagnosis. **Mayo Clin Proc.** 2007; 82(8): 999-1012.

Querzoli P, Albonico P, Ferretti S, Rinaldi R, Biccatti D, Corcione S *et al.* Modulation of biomarkers in minimal breast carcinomas: a model for human breast carcinoma progression. **Cancer.** 1998; 83(1): 89-97.

Ramos Filho AOA, Castro TWN, Rêgo MAV, Alves FO, Almeida LC, Sousa MV, *et al.* Fatores preditivos de recidiva do carcinoma mamário axila-negativo. **Rev Bras Cancerol.** 2002; 48(4): 499-503.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol.** 2005; 42(4):405-26.

Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen, Host H, Nesland JM. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. A multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with follow-up of 14-30 anos. **Cancer.** 2000; 88(4):804-13.

Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second stronger promoter within intron 1. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1988; 85(14):5147-50.

Ries LAG, Eisner MP. Cancer of the female breast. In: SEER survival monograph: cancer survival among adults: US SEER Program, 1988-2001, patient and tumor characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No 07-6215, Bethesda, MD, 2007. Disponível em URL <<http://seer.cancer.gov/publications> [22 fev 2008].

Robbins P. p53 and breast cancer. **Int J Surg Patholog.** 1996; 4(2):93-110.

de Roos MA, de Bock GH, de Vris J, van der Vegt B, Wesseling J. p53 overexpression is a predictor of local recurrence after treatment for both *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast. **J Surg Res.** 2007; 140(1):109-14.

Silva DM, Saddi V, Momotuck EG. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Rev Bras Cancerol.** 2002; 48(1): 39-48.

Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Cappelletti V, et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst.** 1993; 85(12): 965-70.

Silvestrini R, Benini E, Veneroni S, Daidone MG, Tomasic G, Squicciarini P, et al. p53 and bcl-2 Expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. **J Clin Oncol.** 1996; 14(5):1604-10.

Silvestrini R, Daidone MG, Benini E, Faranda A, Tomasic G, Boracchi P, et al. Validation of p53 accumulation as a predictor of distant metastasis at 10 years of follow-up in 1400 node-negative breast cancers. **Clin Cancer Res.** 1996; 2(12):2007-13.

Song HS, Do YR, Kang SH, Jeong HY, Kim YS. Prognostic significance of immunohistochemical expression of p53 gene product in operable breast cancer. **Cancer Res Treat.** 2006; 38(4):218-23.

Soontrapornchai P, Chanvitan A, Koontongkaew S, Sunpaweravong S. The prognostic value of p53 immunostaining in node-negative breast carcinoma. **J Med Assoc Thai.** 2007; 90(9):1833-7.

Soussi T. Analysis of p53 gene alterations in cancer: a critical view. In: P. Hainnaut, P & Wilman K.G., editors. 25 years of p53 research. Netherlands: Springer; 2005. p.259-96.

Soussi T, Asselain B, Hamroum D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, et al. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. **Clin Cancer Res.** 2006; 12(1):62-9.

Soussi T, Kato S, Levy PP, Ishioka C. Reassessment of the TP53 mutation databases in human disease by data mining with a library of TP53 missense

mutation. **Hum Mutat.** 2005; 25(1):6-17.

Stenmark-Askmal M, Stal O, Olsen K, Nordenskjöld B, South-East Sweden Breast Cancer Group. p53 as a prognostic factor in stage I breast cancer. **Br J Cancer.** 1995; 72(3):715-9.

Stoklosa T, Golag J. Prospects for p53-based cancer therapy. **Acta Biochim Pol.** 2005; 52(2): 321-8.

Sunpaweravong S, Sunpaweravong P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. **Asian J Surg.** 2005; 28(1):71-5.

Sutcliffe JE, Brehm A. Of flies and men: p53, a tumor suppressor. **FEBS Lett.** 2004; 567(1):86-91.

Styblo TM, Wood WC. Prognostic factors for breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, editors. The breast. Comprehensive management of benign and malignant diseases. 2^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company;1998. p.419-26.

Tavassoli FA, Deville P, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. Lyon : IARC press; 2003. p.10.

Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs D, editor. Diagnostic immunohistochemistry. 2^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p.3-43.

Thor AD, Liu S, Moore DH, Shi Q, Edgerton SM. p21(WAF1/CIP1) Expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. **Breast Cancer Res Treat .** 2000; 61(1):33-43.

Thor AD, Moore II DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. **J Natl Cancer Inst.** 1992; 84(11):845-55.

Thor AD, Yandell DW. Prognostic significance of p53 overexpression in node-

negative breast carcinoma: preliminary studies support cautious optimism. **J Natl Cancer Inst.** 1993; 85(3): 176-7.

Viacava P, Naccarato AG, Bevilacqua G. Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. *J Pathol* 1999; 188(3): 245-51.

Vogel VG. Primary prevention of breast cancer. "In": Bland KI, Copeland EM, editores. *The breast. Comprehensive management of benign and malignant diseases.* 2ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p.352-69.

Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is strong prognostic molecular marker in breast cancer. **Breast Cancer Res.** 2003; 6(1):R24-R30.

Würl P, Taubert H, Meye A, Berger D, Lautenschläger C, Holzhausen H-J, et al. Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. **J Cancer Res Clin Oncol.** 1997; 123(9): 502-8.

Zellars RC, Hilsenbeck GM, Allred DC, Herman TS, Chamnes GC, Elledge RM. Prognostic value of p53 for local failure in mastectomy-treated breast cancer patients. **J Clin Oncol.** 2000;18 (9):1906-13.

Zhang G-J, Tsuda H, Adachi I, Fukutomi T, Yamamoto H, Hirohashi S. Prognostic indicators for breast cancer patients with one to three regional lymph node metastases, with special reference to alterations in expression levels of bcl-2, p53 and cerbB-2 proteins. **Jpn Clin Oncol** 1997; 27(6):371-7.

Anexo 1: Ficha de coleta de dados

Nº paciente no estudo:					
Idade:					
Data do diagnóstico:					
Antec. Ca de mama:					
Antec. outras neoplasias:					
Localização da lesão:	(1)DIR	(2)ESQ	(3)AMBAS		
Estadiamento clínico:	(1) 0	(2) I	(3) II	(4) III	(5) IV (6) NR
Qt neoadjuvante	(1)SIM	(2)NÃO			
Tipo histológico:	(1) in situ	(2)CDI	(3)MEDULAR	(4)TUBULAR	(5)LOBULAR (6)MUCINOSO (7)OUTRO
Grau de anaplasia:	(1)NA	(2) I	(3) II	(4) III	
RE	(1)NA	(2) NEGATIVO	(3)POSITIVO	(4)INCONCLUSIVO	
RP	(1)NA	(2) NEGATIVO	(3)POSITIVO	(4)INCONCLUSIVO	
C-erbB-2	(1)NA	(2) NEGATIVO	(3)POSITIVO	(4)INCONCLUSIVO	
p53	(1)NA	(2) NEGATIVO	(3)POSITIVO	(4)INCONCLUSIVO	
Tamanho do tumor (cm)	(1)≤ 2	(2)>2 e ≤ 5	(3)> 5	(4)NR	
Nºlinfonodos comprometidos	(1) 0	(2)1 - 3	(3) 4-9	(4) ≥ 10	(5) NR
Data da última consulta					
Status na última consulta	(1)ÓBITO	(2)VIVO/SED	(3)VIVO/CED		
Nº meses após diagnóstico quando recidivou					
Local de metástase					

Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em pesquisa:CEPACCG

CEPACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 010/06

Goiânia, 24/07/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Deidimar Cássia Batista Abreu

TÍTULO: Sub-Projeto: Avaliação de marcadores imunohistoquímicos em tumores de mama – Imunodeteção da proteína P53 em pacientes portadoras de câncer de mama.

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: ACCG/HAJ – Setor de Anatomia Patológica

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, está ciente de que trata-se de um sub projeto do protocolo n. 010/06, sob a responsabilidade da Dra. Vera Aparecida Saddi anteriormente aprovado. O supracitado sub projeto está em acordo com os princípios éticos vigentes.

***Lembramos que os sub-projetos devem ser submetidos para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEP/ACCG

Rua 239 nº 181 - Setor Universitário - Goiânia - Goiás CEP.74 605-070
Fone: (62) 3243-7050