

# Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático\*

## *Molecular markers associated with node negative breast cancer*

Daniela de Melo e Silva<sup>1</sup>, Vera Aparecida Saddi<sup>2</sup> e Euza Guimarães Momotuk<sup>3</sup>

### Resumo

O câncer de mama é considerado a mais freqüente neoplasia que acomete mulheres em todo o mundo. No Brasil, representa a primeira neoplasia em incidência na mulher, sendo que a maioria dos casos relatados encontra-se na região Sul (67%). Recentemente tem ocorrido um grande interesse na identificação de marcadores moleculares de valor prognóstico. Neste trabalho, tanto a proteína p53 quanto o produto do oncogene c-erbB-2 foram avaliados em 61 pacientes com câncer de mama sem comprometimento axilar. Tais pacientes foram diagnosticadas em Goiânia-Goiás, no Hospital Araújo Jorge, de 1992 a 1998. Blocos de parafina contendo tecidos tumorais das pacientes foram obtidos dos arquivos do Laboratório de Histopatologia do Hospital Araújo Jorge para a análise imuno-histoquímica. A expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 foi avaliada através do complexo da streptoavidina-biotina-imunoperoxidase (SABC). Para a análise estatística foi utilizado o teste do  $\chi^2$ , através do programa SPSS. Houve associação significativa entre as expressões de p53 e c-erbB-2 ( $p=0.02$ ). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para se estimar as curvas de sobrevida e estas foram comparadas através do teste log-rank. De acordo com os resultados encontrados, os marcadores p53 e c-erbB-2 não mostraram associações significativas com os dados clínico-patológicos das pacientes ou com a sobrevida das pacientes, sugerindo que outros marcadores moleculares devem ser investigados na elucidação da etiopatogenia e evolução do câncer de mama não metastático.

**Palavras-chave:** neoplasias mamárias; marcadores biológicos de tumor; cirurgia; p53; c-erbB-2.

---

\*Trabalho realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica - Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Goiás, Mestrando em Biologia.

<sup>2</sup>Mestre em Biologia Molecular, Professora Adjunta da Universidade Católica de Goiás, Pesquisadora do Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás.

<sup>3</sup>Doutora em Biologia Molecular, Professora Adjunta da Universidade Federal de Goiás. *Enviar correspondência para E.G.M.* Universidade Federal de Goiás, Depto de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas I, Caixa Postal 131; 74001-190 Campus Samambaia, Goiânia, GO - Brasil. *E-mail:* momotuk@icb1.ufg.br

*Recebido em janeiro de 2001.*

## Abstract

*Breast cancer is the most frequent female cancer in the world, both in terms of incidence and mortality. In Brazil, it is the female neoplasm of highest incidence, being most frequent in the South Region of the country (67%). Recently, a huge interest in the identification of molecular markers with significant prognostic value in breast cancer has been demonstrated. In this study, both p53 and c-erbB-2 proteins were evaluated in 61 node negative breast cancer patients. These patients were diagnosed from 1992 to 1998 at the Araujo Jorge Hospital, Goiânia-Goiás. Paraffin-embedded tissues of the patients were obtained from the Histopathology Laboratory and analyzed by immunohistochemistry. The expression of p53 protein and c-erbB-2 were evaluated by streptavidin-biotin complex (SABC). Statistical analysis was performed using the Chi-Square test, with SPSS package. No significant association between p53, c-erbB-2 and clinicopathological features was detected; however, there was a significant association between p53 and c-erbB-2 expression ( $p=0.02$ ). The Kaplan-Meier survival curves were used to estimate overall survival curves and comparisons were made using log-rank statistics. According to the results, p53 and c-erbB-2 expression was not significantly associated to clinicopathological features or overall survival curves of the patients, suggesting that further markers should be investigated in order to clarify the natural history and development of node negative breast cancer.*

**Key words:** breast neoplasms; biological tumor markers; surgery; p53; c-erbB-2.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado a mais freqüente neoplasia que acomete mulheres em todo o mundo, tanto em termos de incidência quanto de mortalidade.<sup>1</sup> Distribui-se em praticamente todas as partes do mundo, aparecendo com mais freqüência em alguns países europeus, na América do Norte e em alguns países sul-americanos, inclusive no Brasil.<sup>2</sup> Na população feminina de Goiânia, a incidência e mortalidade por câncer de mama tem aumentado, apresentando taxas elevadas. Os valores de incidência já superam os de câncer de colo uterino que durante muitos anos representaram o tipo de tumor mais incidente nesta população.<sup>3</sup>

Contudo, diversos critérios morfológicos têm sido utilizados para descrever ou nomear a agressividade de um tumor. Dentre estes critérios incluem-se o tipo histológico, o grau de polimorfismo nuclear, a presença ou ausência de resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos, dentre outros.<sup>4</sup> No que diz respeito aos tumores de mama, o método semi-quantitativo de graduação

histológica da malignidade proposto por Bloom e Richardson (1957)<sup>5</sup> enfatiza o índice mitótico, o polimorfismo nuclear e a presença ou não de formação tubular.

Com a utilização das técnicas moleculares, os eventos envolvidos no processo de carcinogênese têm sido gradativamente esclarecidos, resultando na geração de uma série de novas informações que vêm sendo absorvidas pelos oncologistas clínicos, influenciando suas condutas e tomada de decisões.<sup>4</sup> Recentemente, tem ocorrido um grande interesse na identificação de marcadores moleculares de valor prognóstico significativo, uma vez que alguns tumores com características clínicas indicativas de boa evolução revelam mudanças inesperadas na progressão da doença.<sup>6</sup>

Alguns marcadores são reconhecidos como fatores prognósticos bastante característicos, como o status de receptores hormonais,<sup>7</sup> marcadores de proliferação celular, tais como a ploidia do DNA e fração S, fatores de angiogênese peritumoral, além de produtos protéicos de genes supressores de tumor e oncogenes.<sup>6</sup> A relação entre aspectos clínico-patológicos do câncer de

mama e mutações no gene p53, avaliadas através de técnicas moleculares, ou seu acúmulo visualizado pela técnica imunohistoquímica, além da expressão de marcadores como o c-erb-B2 (HER-2/neu), tem sido estudada intensamente.<sup>8-11</sup>

Os eventos genéticos encontrados mais freqüentemente associados com as neoplasias humanas são as alterações no gene e na proteína p53.<sup>12-17</sup> O gene p53 localiza-se no cromossomo 17p13, possui aproximadamente 20 Kb e origina um transcrito primário (mRNA) de 2.8 Kb.<sup>18</sup> Este gene foi descoberto em 1979, sendo proposto inicialmente como um oncogene.<sup>12</sup> Posteriormente, verificou-se que a atividade oncogênica deste gene dependia de mutações no código de leitura, e que o gene não mutado produzia uma proteína de 53 KDa, apresentando uma função de “guardião do genoma” ao reconhecer danos no DNA e controlar crescimento e morte celular.<sup>18</sup> Deste modo, esta proteína controla a proliferação celular, exercendo um papel fundamental na supressão do desenvolvimento tumoral.<sup>12-17</sup>

Um outro fator bastante estudado em tumores de mama, o oncogene c-erbB-2 (Her-2/neu) localiza-se no cromossomo 17q21 e codifica um receptor glicoprotéico transmembrana denominado p185neu/p285erbB-2.<sup>17,19</sup> Aproximadamente 20%-25% dos tumores de mama apresentam amplificação deste oncogene, mas os índices aumentam para 40% quando pacientes linfonodo positivas são incluídas.<sup>14</sup>

A oncoproteína c-erb-B2 funcional é um dímero, sendo classificada como uma glicoproteína transmembrana de 185 KDa, contendo um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina cinase.<sup>19</sup> A expressão aumentada da oncoproteína c-erb-B2 acarreta autofosforilação do receptor específico e subsequente ativação de cinases envolvidas em mecanismos de transdução de sinais, o que eventualmente afeta a transcrição de genes reguladores da progressão do ciclo celular.<sup>19</sup> Esta superexpressão pode estar associada com pior prognóstico e falta de resposta a determinadas drogas anti-tumorais em pacientes com câncer de mama.<sup>20</sup>

Neste trabalho, tanto a proteína p53 quanto o produto do oncogene c-erbB-2 fo-

ram avaliados em pacientes com câncer de mama sem comprometimento axilar, com o intuito de compreender alguns eventos moleculares envolvidos na progressão da neoplasia mamária.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Grupo de estudo*

O grupo é composto de 61 pacientes com câncer de mama não metastático, com idades abaixo de 50 anos e que não receberam nenhum tipo de terapia adjuvante antes da cirurgia. As pacientes foram atendidas junto ao Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Araújo Jorge no período de 1992 a 1998. Dados relativos às pacientes, incluindo nome, idade na época do diagnóstico, tabagismo, atividade profissional, antecedentes familiares, e as características tumorais, como tipo histológico e graduação histológica de acordo com Bloom e Richardson,<sup>5</sup> lado do tumor e tamanho do tumor foram colhidos dos prontuários das respectivas pacientes e anotados em formulários apropriados.

### *Amostras teciduais*

Blocos de parafina, contendo tecidos das 61 pacientes selecionadas, foram obtidos dos arquivos do Laboratório de Histopatologia do Hospital Araújo Jorge. A partir de cada bloco, foram obtidos três cortes de 3mm de espessura, sendo que dois dos cortes foram colhidos em lâminas previamente preparadas com organossilano para análise imunohistoquímica. Um dos cortes foi utilizado para a confecção de uma lâmina, corada por hematoxilina-eosina (HE) e reavaliada por um patologista.

### *Análise imuno-histoquímica*

A expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 foi avaliada com o auxílio da técnica imunohistoquímica da streptoavidina-biotina-imunoperoxidase. Os cortes de 3mm de espessura foram estendidos em lâminas preparadas com adesivo à base de 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Co, St Louis, MO USA). Inicialmente, os cortes foram incubados por 24 horas em estufa a 55°C e depois desparafinados em três

banhos de xilol, a 60 °C, 55 °C e à temperatura ambiente, durante 60, 30 e 20 minutos, respectivamente. A seguir, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, seguidos por lavagens em água corrente. As seções teciduais foram submetidas, a seguir, à recuperação antigênica utilizando-se panela de pressão (calor úmido) em solução de tampão citrato 10mM/pH 6.0.<sup>21</sup> Posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase tecidual endógena por meio de três passagens de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes. Em seguida, os cortes foram submetidos à incubação com os anticorpos primários, anti-p53 (Dako, DO-7; 1/100) e c-erbB-2 (Dako, policlonal, 1/600), por 24 horas. Os anticorpos foram diluídos em solução salina fosfato pH 7.2 (PBS) com 1% de albumina sérica bovina, em câmara úmida a 4°C. Depois de três lavagens em tampão PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo biotilado, em solução pronta para uso (Dako; CA, USA). As seções teciduais foram lavadas novamente três vezes em tampão PBS pH 7.2, por 5 minutos. Logo depois, foi aplicado o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase em solução pronta para uso (Dako, CA, USA), durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Para a revelação da reação foi utilizada a solução de diaminobenzidina (Dako, CA, USA) e tampão salina fosfato pH 7.2 (0.015g de diaminobenzidina para cada 25ml de PBS pH 7.2). Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente e foram coradas em hematoxilina. Os cortes foram desidratados em álcool absoluto por cinco vezes, 2 minutos em cada etapa, depois foram colocados em banhos de xilol por três vezes. As lâminas foram montadas em resina do tipo *Entellan* (Merck KgaA). Todas estas etapas foram feitas com a utilização de controles positivos, tecidos de carcinoma de mama com padrão de revelação já conhecido para p53 e c-erbB-2.

#### *Análise estatística*

Os resultados obtidos dos prontuários das respectivas pacientes, assim como os da análise imuno-histoquímica da proteína p53

e da oncoproteína c-erbB-2 foram tabulados em planilhas, constituindo um banco de dados. As pacientes foram divididas em grupos, de acordo com a expressão das proteínas p53 e c-erbB-2, visando a obtenção da curva de sobrevida, calculada pelo método de Kaplan-Meier.<sup>22</sup> As prováveis diferenças entre estas curvas foram avaliadas pelo teste log-rank, com a utilização do programa SPSS, em 1993. As associações entre as expressões da proteína p53 e da oncoproteína c-erbB-2, com o tamanho dos tumores na palpação, graduação histológica, tipo histológico e outros aspectos clínico-patológicos foram calculadas através do teste do  $\lambda^2$ , a um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### *Aspectos clínico-patológicos do grupo de estudo*

As pacientes apresentaram em média, 43 anos de idade (DP=  $\pm 5.16$ ), sendo que o diagnóstico dos tumores e a ausência de metástases em linfonodos axilares foram comprovados por análise anatomopatológica. Das 61 pacientes analisadas, 44 (72%) apresentaram tumores maiores que 3cm, com predominância do tipo histológico correspondente ao Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI), com 57 casos (93%). O grau de diferenciação histológica mais encontrado foi o grau II, perfazendo 60% (37 casos). Vinte pacientes (33%) apresentaram recorrência familiar do câncer de mama, 45 (74%) eram múltiparas e 17 (28%) pacientes eram tabagistas. Foram encontradas recidivas em 18 pacientes (30%) e destas, cinco foram a óbito (28%).

### *Expressão imuno-histoquímica*

A expressão da proteína p53 foi considerada positiva, em células com reação restrita ao núcleo e a expressão da oncoproteína c-erbB-2 foi detectada em células com reação de membrana, ambas de coloração acastanhada, o suficiente para a diferenciação entre células positivas e negativas.

Das 61 pacientes analisadas, 27 (44%) apresentaram imunodeteção da proteína

p53, 18 (29%) apresentaram expressão de c-erbB-2 e em 12 pacientes (20%) foram evidenciadas a expressão dos dois marcadores avaliados.

### Análise estatística

Associações entre p53 e aspectos clínico-patológicos

Possíveis associações entre a imunodeteção da proteína p53 e as características clínico-patológicas descritas foram investigadas através

do teste do  $\lambda^2$ , a um nível de significância de 5%. Nenhuma associação significativa entre a expressão de p53 e tais características pode ser evidenciada, como observado na Tabela 1.

Associações entre c-erbB-2 e aspectos clínico-patológicos

Associações entre a imunodeteção da oncoproteína c-erbB-2 e os dados clínico-patológicos das pacientes também foram investigados (Tabela 2). Nenhuma associação significativa entre a expressão de c-erbB-2 e

Tabela 1. Imunodeteção de p53 e parâmetros clinicopatológicos de pacientes com câncer de mama não metastático.

Parâmetros	Imunodeteção de p53 (%)			Valor P
	-	+	Total	
<b>A – Tamanho do Tumor</b>				
< 3 cm	7 (21%)	10 (37%)	17 (28%)	0,15 (NS)
> 3 cm	27 (79%)	17 (63%)	44 (72%)	
<b>B – Graduação Histológica</b>				
I	3 (9%)	3 (11 %)	6 (10%)	0,79 (NS)
II	23 (68 %)	16 (59 %)	39 (64%)	
III	8 (23%)	8 (30%)	16 (26%)	
<b>C – Tipo Histológico</b>				
CDI	31 (91%)	25 (93%)	56 (92%)	0,84 (NS)
Outros	3 (9%)	2 (7%)	5 (8%)	
<b>D – História Familiar</b>				
Presença	8 (23%)	9 (33%)	17 (28%)	0,39 (NS)
Ausência	26 (77%)	18 (67%)	44 (72%)	
<b>E – Recidivas</b>				
Presença	11 (32%)	7 (26%)	18 (30%)	0,58 (NS)
Ausência	23 (68%)	20 (74%)	43(71%)	

NS: não significativo/CDI: carcinoma ductal infiltrante

Tabela 2. Imunodeteção de c-erbB-2 e parâmetros clinicopatológicos de pacientes com câncer de mama não metastático.

Parâmetros	Imunodeteção de c-erbB-2 (%)			Valor P
	-	+	Total	
<b>A – Tamanho do Tumor</b>				
< 3 cm	13 (30%)	4 (22%)	17 (28%)	0,52 (NS)
> 3 cm	30 (70%)	14 (78 %)	44 (72%)	
<b>B – Graduação Histológica</b>				
I	6 (14%)	0 (0%)	6 (10%)	0,24 (NS)
II	26 (60%)	13 (72%)	39 (64%)	
III	11 (26%)	5 (28%)	16 (26%)	
<b>C – Tipo Histológico</b>				
CDI	38 (88%)	18 (100%)	56 (92%)	0,30 (NS)
Outros	5 (12%)	0 (0%)	5 (8%)	
<b>D – História Familiar</b>				
Presença	13 (30%)	4 (22%)	17 (28%)	0,52 (NS)
Ausência	30 (70%)	14 (88%)	44 (72%)	
<b>E – Recidivas</b>				
Presença	15 (35%)	3 (17%)	18 (30%)	0,15 (NS)
Ausência	28 (65%)	15 (83%)	43( 70%)	

NS: não significativo/CDI: carcinoma ductal infiltrante

os dados clínico-patológicos das pacientes foi verificada.

Associações entre as expressões das proteínas c-erbB-2 e p53

As expressões das proteínas p53 e c-erbB-2 foram comparadas, através do teste do  $\lambda^2$ , sendo detectada uma associação significativa ( $p < 0.05$ ) entre a imunodeteção de c-erbB-2 e da proteína p53 (Tabela 3).

Curvas de sobrevida

Curvas de sobrevida, de acordo com o método proposto por Kaplan e Meier<sup>22</sup> foram confeccionadas visando observar o valor prognóstico dos dois marcadores analisados. O acompanhamento das 61 pacientes foi realizado durante 36 meses após o diagnóstico. As pacientes que não retornaram ao serviço de ginecologia e mama do Hospital Araújo Jorge no tempo previsto foram excluídas desta análise (censuradas).

As 27 pacientes p53 positivas tiveram uma sobrevida média de 33 meses (IC 95%) e ao final dos 36 meses de acompanhamento, 76% das pacientes estavam vivas. Com relação às pacientes p53 negativas (n=34), 82% estavam vivas no final do acompanhamento, apresentando uma sobrevida média de 33 meses (IC 95%). (Figura 1)

Apesar da diferença existente entre os índices de sobrevida observados para as pacientes p53 positivas e negativas vivas, 76% e 82%, respectivamente, o teste estatístico

log-rank, não detectou diferenças significativas entre estas curvas ( $p=0.60$ ), observação já registrada por outros autores.<sup>23,24</sup>

As 18 pacientes c-erbB-2 positivas apresentaram, em média, uma sobrevida de 36 meses (IC 95%). No final do tempo de acompanhamento, 94% das pacientes estavam vivas (Figura 2). Apenas 01 (5%) paciente, com super-expressão deste marcador, apresentou recidiva.

As 43 pacientes c-erbB-2 negativas apresentaram uma sobrevida média de 32 meses (IC 95%), sendo que 73% destas pacientes estavam vivas no final dos 36 meses de acompanhamento (Figura 2) e 11 (25% dos casos) apresentaram recidivas. Em contraste com outros trabalhos<sup>25,26</sup> as pacientes deste estudo que não expressaram c-erbB-2, tiveram menores índices de sobrevida (73%) do que pacientes com super-expressão deste marcador (94%), entretanto, a análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre estas curvas ( $p=0.06$ ). Os dois marcadores analisados não foram detectados em 28 pacientes (46%), que apresentaram uma sobrevida média de 32 meses (IC 95%). A imunodeteção dos dois marcadores foi evidenciada em 20% dos casos (n=12), e ao final do período de acompanhamento (36 meses), 92% destas pacientes não apresentavam evidências da doença (Figura 3). O curto prazo de acompanhamento destas pacientes pode ter contribuído para tais achados, uma vez que a

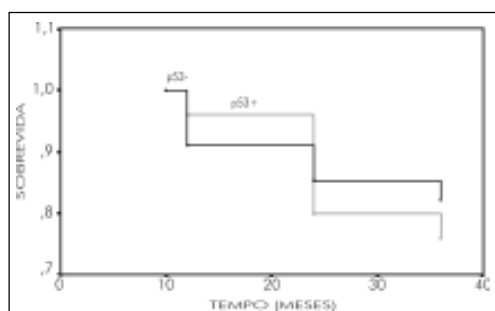


Figura 1. Curva de sobrevida das 61 pacientes com câncer de mama não metastático, de acordo com a expressão da proteína p53.

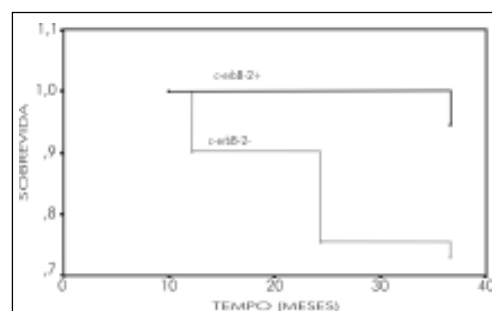


Figura 2. Curva de sobrevida de 61 pacientes com câncer de mama não metastático de acordo com a expressão de c-erbB-2.

Tabela 3. Imunodeteção de p53 e super-expressão de c-erbB-2 em pacientes com câncer de mama não metastático.

	Imunodeteção de p53 (%)		Total	Valor P
	-	+		
c-erbB-2				
Expressão negativa	28 (82%)	15 (55%)	43 (70%)	0,02 (S)
Expressão positiva	6 (18%)	12 (45%)	18 (30%)	

S: *significativo*

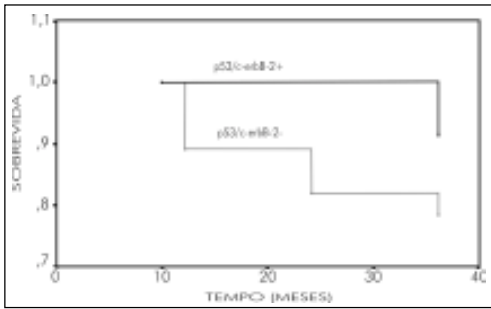


Figura 3. Curva de sobrevida de 61 pacientes com câncer de mama não metastático de acordo com a expressão dos dois marcadores analisados, p53 e c-erbB-2.

presença de recidivas em pacientes com câncer de mama pode envolver períodos mais longos, de pelo menos 10 anos.<sup>8,9,14,18</sup>

## DISCUSSÃO

O câncer de mama, apesar das novas estratégias terapêuticas e diagnósticas empregadas, continua sendo um desafio na área médica. Em função de problemas sócio-econômicos e culturais no Brasil, as pacientes que buscam os serviços públicos de mastologia apresentam na maioria das vezes tumores avançados, o que dificulta o diagnóstico e acarreta tratamentos mais agressivos. Entretanto, uma parcela das mulheres atendidas na rede pública, provavelmente em função das crescentes campanhas de prevenção do câncer de mama, apresenta tumores intermediários, com perfis aparentemente menos agressivos e que demandam a investigação detalhada de todos os aspectos que possam auxiliar na definição do protocolo terapêutico, no sucesso da evolução do quadro e na cura da paciente.

Os fenômenos moleculares que acompanham a carcinogênese, a interpretação e adaptação destas informações vêm sendo estudadas e têm auxiliado os médicos na tomada de decisões. Para melhor se estudar a evolução desta neoplasia e para tratá-la mais convenientemente surgiu a necessidade de informações mais detalhadas sobre os fatores capazes de influenciar o desenvolvimento desta doença.

Este trabalho diz respeito a tumores de mama englobados no estágio clínico I, ou seja, carcinomas de mama não metastáticos, sem comprometimento axilar. Geralmente, tais tumores apresentam boa evolução, sendo de

bom prognóstico, ocorrendo em pacientes com idades mais avançadas, que apresentam tipos histológicos menos agressivos, receptores hormonais positivos e ausência de história familiar.<sup>17</sup> Contudo, algumas pacientes apresentando este tipo tumoral evoluem de forma semelhante àquelas que possuem câncer de mama bastante agressivo, daí a necessidade premente de se avaliar outros marcadores que auxiliem na evolução clínica das pacientes. Aproximadamente 30% das pacientes com câncer de mama sem comprometimento axilar morrem devido a esta neoplasia;<sup>8</sup> assim, marcadores biológicos tais como as proteínas p53 e c-erbB-2 têm sido relacionados com a progressão tumoral, apresentando um valor prognóstico controverso.<sup>8,26</sup>

No presente estudo, a imuno-expressão de dois marcadores biológicos, p53 e c-erbB-2 não apresentou correlação com os parâmetros clínico-patológicos das pacientes, como tamanho do tumor, graduação histológica da malignidade, proposta por Bloom e Richardson,<sup>5</sup> tipo histológico e presença de história familiar. Tumores que expressaram tais marcadores não apresentaram fenótipos mais ou menos agressivos quando analisados estatisticamente. A precocidade do estágio clínico considerado e a homogeneidade do grupo de estudo em questão podem ter contribuído com os resultados aqui apresentados, apesar de contrariar alguns estudos já publicados.<sup>20,25,26</sup>

Como indicado por este e outros estudos realizados em pacientes jovens com câncer de mama sem comprometimento axilar, a expressão de p53, detectada pela técnica imuno-histoquímica, não apresentou valor como marcador prognóstico.<sup>8,23,27,28</sup> A associação entre o acúmulo da proteína p53 e a sobrevida destas pacientes também não foi evidenciada. Estes achados estão de acordo com outros trabalhos,<sup>8,11,29,30</sup> pois o grupo de estudo desta pesquisa foi constituído de pacientes com idades abaixo de 50 anos, sugerindo que a ocorrência desta neoplasia nesta faixa etária pode estar relacionada com eventos genéticos distintos, ainda não elucidados. A grande maioria dos trabalhos que mostram associação da proteína p53 e dados clínico-patológicos de pacientes com câncer de mama, incluem grupos mais

heterogêneos, com idades avançadas, comprometimento axilar ou até mesmo metástases disseminadas. Além disto, outros métodos de análise são utilizados, como o estudo de mutações gênicas, através de técnicas moleculares de análise de DNA.

A técnica de imuno-histoquímica é bastante utilizada neste tipo de estudo por se tratar de um ensaio rápido, simples e capaz de avaliar as características tumorais de maneira clara e eficiente. Entretanto, a análise imuno-histoquímica de p53 apresenta diversas limitações que merecem destaque. Mutações no gene p53, geralmente resultam em proteínas alteradas, que se acumulam no núcleo das células tumorais, sendo facilmente detectadas.<sup>31</sup> Contudo, alguns dos anticorpos utilizados são incapazes de discriminar entre os tipos selvagem e mutante da proteína p53, como no caso do anticorpo DO-7 utilizado neste trabalho. Além disso, aproximadamente 20% das mutações no gene p53 resultam em proteínas truncadas, que não são identificadas pela técnica imuno-histoquímica.<sup>18,31</sup> A interpretação dos resultados desta técnica, em tumores de mama no estágio inicial, pode se tornar ainda mais difícil, devido ao número reduzido de núcleos de células tumorais corados.<sup>18</sup> Isto pode ocorrer na formação dos primeiros clones mutantes, responsáveis pela progressão tumoral, ou durante o acúmulo da própria proteína normal em células não neoplásicas, como resposta a agentes genotóxicos (luz UV), hipóxia ou por outras mudanças biológicas do ambiente celular.<sup>31</sup>

Quanto ao c-erbB-2, o outro marcador analisado neste trabalho, também não foram demonstradas associações entre a super-expressão desta oncoproteína com os parâmetros clínicos clássicos das pacientes. Diversos estudos detectaram a super-expressão de c-erbB-2 em 31% dos casos analisados,<sup>32</sup> outros em 17% de pacientes com câncer de mama (27%). Estudos mais recentes evidenciaram a super-expressão de c-erbB-2 em 10% e 33%, de tumores de mama do tipo ductal infiltrante, respectivamente.<sup>8,20</sup> De uma maneira geral, a super-expressão de c-erbB-2 pode ser encontrada em 10% a 40% dos tumores de mama não metastáticos, e no presente estudo, 18 pacientes (29%) apresentaram super-

expressão de c-erbB-2. Neste trabalho, a imunodeteção de p53 esteve associada com a super-expressão da oncoproteína c-erbB-2, como evidenciado por outros grupos (10,14,17,33), principalmente em pacientes jovens, com câncer de mama invasivo.

Os resultados deste trabalho sugerem que a presença ou ausência dos marcadores p53 e c-erbB-2 não refletiram aspectos histopatológicos mais ou menos agressivos deste grupo de estudo. Isto pode ser explicado pelas características do próprio grupo, formado por pacientes relativamente jovens, média de idade de 43 anos. Além disto, os parâmetros clinicopatológicos analisados foram bastante homogêneos, sendo que a maioria dos tumores apresentou grau nuclear II (64%), o tipo histológico predominante foi o CDI (92%) e o tamanho dos tumores foi em média 3cm. A homogeneidade deste grupo de pacientes foi a principal razão para a investigação de fatores que pudessem auxiliar na maneira de evolução clínica das mesmas. Os achados deste e de outros grupos podem indicar a necessidade de se avaliar outros parâmetros, como a associação entre a imunodeteção da proteína p53 e a presença de mutações no gene p53, ou ainda a associação dos dois marcadores analisados, p53 e c-erbB-2, com outros fatores prognósticos descritos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Persson I, Bergstrom R, Sparen P, Thorn M, Adami Ho. Trends in breast cancer incidence in Sweden 1958-1988 by time period and birth cohort. *Br J Cancer* 1993;68:1247-53.
2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa de incidência e mortalidade por câncer de mama no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 1999.
3. Associação de Combate ao Câncer em Goiás (Brasil). Registro de câncer de base populacional de Goiânia. Goiânia; 1997.
4. Paes R. Marcadores prognósticos em neoplasias mamárias. In: Wakamatsu A, Simões AB, Kanamura CT, Pinto GA, Metzke IL, Vassalo J, et al. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1995. p. 62-9.



5. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;9:359-77.
6. Philips K, Andrulis L, Goodwin P. Breast carcinoma arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? *J Clin Oncol* 1999;17:3653-63.
7. American Society of Clinical Oncology (ASCO). 1997 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:793-5.
8. Reed W, Hannisdal E, Boehler P, Gundersen S, Host H, Nesland J. The prognostic value of p53 and c-erb b-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2000;88:804-13.
9. Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. p53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. *Pathol Res Pract* 1998;194:815-9.
10. Slooten V, Vivjer V, Borresen A. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 1999;189:504-13.
11. Gentile M, Jungstrom B, Olsen KE, Soderkvist P, Wingren S. p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer* 1999;35:1202-7.
12. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
13. Milner JA. Conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth and in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;245:85-158.
14. Han S, Yun I, Noh D, Choe K, Song S, Chi J. Abnormal expression of four molecular markers represents highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *J Surg Oncol* 1997;65:22-7.
15. Bernes E, Staveren I, Look M, Smid M, Klijn J, Foekens J. Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor outcome in human primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1130-6.
16. Iacopetta B, Grieu F, Powell B, Soong R, Mccaul K, Seshadri R. Analysis of p53 gene mutation by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism provides independent prognostic information in node negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1597-602.
17. Fiche M, Avet-Loiseau H, Heymann MF, Moussaly F, Digabel C, Joubert M, et al. Genetic alterations in early-onset invasive breast carcinomas: correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *Int J Cancer* 1999;84:511-5.
18. Sidransky D, Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Ann Rev Med* 1996;47:285-301.
19. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:1129-35.
20. Sharma BK, Ray A, Kaur S, Gupta S. Immunohistochemical co-expression of c-erbB-2/Neu oncoprotein, altered tumor suppressor (p53) protein, EGF-R and EMA in histological subtypes of infiltrating duct carcinoma of the breast. *Indian J Exp Biol* 1999;37:223-7.
21. Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high temperature heat denaturation (pressure-cooking): a simple and effective method of antigen retrieval of routinely processed tissues. *J Pathol* 1994;173:371-9.
22. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
23. Bianchi S, Calzolari A, Vezzosi V, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, et al. Lack of prognosis value of p53 protein expression in node-negative breast cancer. *Tumori* 1997;83:669-72.
24. Colomer R. Relationship of tissue and circulating c-erbB-2 with prognosis in primary breast cancer. *Symp Proc* 1998;105-8.
25. Cobleigh M. More than one way to look for HER2. *Clin Pathol Today* 1999;13:46.
26. Stoll BA. Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:693-7.
27. Lukas J, Niu N, Press Mf. p53 mutations and expression in breast carcinoma in situ. *Am J Pathol* 2000;156:183-91.
28. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1109-14.
29. Porter PL, Malone K, Heagerty P. Expression of cell-cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with sur-

- vival in young breast cancer patients. *Nature* 1997;3:222-5.
30. Bertheau P, Steinberg S, Merino M. c-erbB-2, p53 and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathological correlation. *Hum Pathol* 1998;29:323-9.
  31. Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999;80:1968-73.
  32. Lipponen P, Ji H, Aaltoma S, Syrjanen S, Syrjanen K. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993;55:51-6.
  33. Shimizu C, Fukutomi T, Tsuda H, Tanaka-Akashi S, Watanabe T, Sugihara K. c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol* 2000;73:17-20.