

JULIA YORIKO SHINZATO

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 COMO INDICADORA DA RESPOSTA
À QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA DO CARCINOMA MAMÁRIO:
ESTUDO CLÍNICO E CORRELAÇÃO COM TAMANHO TUMORAL,
GRAU NUCLEAR E RECEPTOR DE ESTRÓGENO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Doutor em Medicina, área
de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS TEIXEIRA
CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

UNICAMP
1998

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: JULIA YORIKO SHINZATO

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS TEIXEIRA

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 08/05/98

DEDICO ESTA TESE ...

Aos meus pais

Tomi e Shinzato,

***por compartilharem
cada momento da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira e Prof^a. Dr^a. Maria Salete Costa Gurgel pela inestimável colaboração em todas as etapas da tese.

Ao Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti pela valiosa contribuição à minha formação em mastologia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, pela contribuição na revisão de lâminas e coordenação dos testes imuno-histoquímicos.

À Prof^a. Dr^a. Kazue Panetta e Prof. Dr. Henrique Benedito Brenelli pelo incentivo e apoio.

À Dr^a. Glauce Aparecida Pinto e Dr^a. Sívia Pierre Irazusta e técnica Fernanda Paula de Oliveira, pela colaboração na execução e leitura dos testes imuno-histoquímicos.

Ao estatístico Hélio José de Abreu, pela presteza e competência na realização da análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto. Neto e Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, pela amizade e incentivo.

Aos colegas da Área de Oncologia, particularmente do Serviço de Mastologia, pela amizade e colaboração.

Aos colegas, residentes e alunos do DTG/UNICAMP, pela amizade e estímulo.

Aos amigos da ASTEC e da secretaria da Área de Oncologia, pela colaboração durante a elaboração da tese.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP), da UNICAMP pelo financiamento do projeto.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASTEC	Assessoria Técnica e Científica
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CMF	Ciclofosfamida, Methotrexate, Fluorouracil
DAB	3,3 Tetra-Hidrocloroeto Diaminobenidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTG	Departamento de Tocoginecologia
FAC	Fluorouracil, Adriamicina, Ciclofosfamida
FACV	Fluorouracil, Adriamicina, Ciclofosfamida, Vincristina
FAEP	Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa
GN	Grau Nuclear
HE	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
kDa	Kilo-Dalton
MDR	Multi-resistência às drogas
n	Número de casos
OMS	Organização Mundial da Saúde

p	Significância estatística
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão Salina de Fosfato)
p-gp	Glicoproteína P
QT	Quimioterapia
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
?	Erro tipo I

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a correlação da expressão da proteína p53 com a resposta tumoral à quimioterapia primária em pacientes portadoras de carcinoma da mama ressecável. Estabeleceu-se também sua correlação com outras características da paciente e do tumor, como: estado menstrual, tamanho tumoral, grau nuclear e receptor de estrógeno. Finalmente, estudou-se a possível interferência da quimioterapia no padrão da expressão da proteína p53, comparando-se a expressão inicial com a final. Foi um estudo clínico, analítico, parcialmente retrospectivo e prospectivo, num total de 65 pacientes atendidas no Ambulatório de Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas, submetidas a três ciclos de quimioterapia seguida de cirurgia. A expressão da proteína p53 e o receptor de estrógeno foram avaliados através do método imuno-histoquímico utilizando os anticorpos monoclonais D07 e 1D5, respectivamente. Não se observou influência da expressão da proteína p53 na taxa de resposta à quimioterapia primária. A expressão da proteína p53 correlacionou-se com pacientes na fase da pós-menopausa, maior tamanho tumoral, grau nuclear indiferenciado e receptor de estrógeno negativo, embora

sem diferença estatisticamente significativa. A quimioterapia modificou o padrão da expressão da proteína p53 em cerca de 20% do total de casos; entretanto, comparando o padrão final da expressão da proteína p53 com o prévio à quimioterapia, observou-se negatização em 43,8% dos casos inicialmente positivos contra 10,5% de positividade naqueles previamente negativos, porém, sem significância estatística.

SUMÁRIO

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 Tipo de Estudo	20
3.2 Tamanho Amostral	20
3.3 Critérios e procedimentos para a seleção de pacientes.....	20
3.4 Variáveis e Conceitos.....	22
3.5 Instrumento para a Coleta dos Dados	28
3.6 Aspectos éticos.....	32
3.7 Processamento dos dados	32
3.8 Análise dos dados	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Resultados descritivos.....	35
4.2 Resultados analíticos	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	56
7. SUMMARY	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES	75
10. ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

A detecção das neoplasias mamárias nas suas fases iniciais, decorrente da utilização cada vez maior da mamografia, levou ao surgimento de novas abordagens terapêuticas do carcinoma da mama. O tratamento habitual da doença aparentemente restrita à mama é, para a maioria dos casos, curativo. Entretanto, cerca de 25% das pacientes voltarão a apresentar atividade da neoplasia nos dez anos subseqüentes ao tratamento (VALAGUSSA, BONADONNA, VERONESI, 1978). Essa falha deve-se à presença de micrometástases à distância, desde o momento do tratamento inicial, ou a um inadequado procedimento terapêutico locorregional. A radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia adjuvantes têm sido utilizadas e têm promovido um aumento substancial nas sobrevidas livre de doença e total dessas pacientes (BONADONNA et al., 1986; FISHER et al., 1989; MANSOUR et al., 1989).

Embora o tratamento adjuvante, principalmente a quimioterapia, venha sendo empregado rotineiramente, nem todas as pacientes dele necessitam (McGUIRE et al, 1990). Seria conveniente que aquelas que poderiam ser beneficiadas com esse tratamento pudessem ser previamente identificadas.

Uma possibilidade estudada foi administrar a quimioterapia antes da cirurgia, identificando-se o grupo de mulheres portadoras de tumores quimiossensíveis (HARRIS & SWAIN; 1996). Essa avaliação não é possível com a quimioterapia adjuvante, pois somente no decorrer da evolução da doença será evidenciada a eficácia das drogas em eliminar completamente a doença microscópica (BONADONNA, ROSSI, VALAGUSSA, 1985).

Com o advento da quimioterapia neo-adjuvante para os casos localmente avançados, observou-se respostas diferentes às drogas, possibilitando a seleção dos esquemas mais efetivos (DE LENA et al., 1978; BONADONNA, 1989;). Para pacientes com doença em estádios I e II, além da redução do volume tumoral e da extensão do procedimento cirúrgico, a quimioterapia neo-adjuvante permite orientar a escolha do esquema auxiliar a ser utilizado posteriormente, de acordo com a resposta (HARRIS & SWAIN, 1996).

As falhas observadas com esse tratamento podem estar relacionadas com a metabolização, distribuição nos diferentes tecidos e excreção das drogas, mas os fatores que mais relacionam-se com a resposta dependeriam de características do próprio tumor ou das células tumorais, considerando-se que a intervenção médica, representada pela escolha do esquema, cálculo adequado das doses e intervalo entre os ciclos estivessem corretas.

As características tumorais envolvidas na resposta à quimioterapia estão relacionadas com a neovascularização, células da defesa imunológica, dinâmica das células tumorais, como seu tempo de duplicação, e alterações

dos elementos citoplasmáticos e nucleares, sendo possível avaliar a sensibilidade do tumor às drogas pela análise e correlação entre estes fatores.

Existem vários métodos para tal avaliação, como a análise da ploidia e fração S, que poderiam estar relacionados com a eficácia das drogas (REMKOS et al, 1989). Outros procedimentos menos complexos também podem ser empregados, como o estudo do grau nuclear e a utilização da imuno-histoquímica, para avaliarem o receptor de estradiol e a proteína p53.

O grau nuclear geralmente correlaciona-se com a evolução da doença. Os achados do *National Surgical Adjuvant Breast Project* (NSABP), demonstraram que pacientes portadoras de tumores com grau nuclear 3 ou indiferenciados têm maior freqüência de recidivas e que mesmo aquelas com metástase axilar, mas com grau nuclear 1, apresentam maior sobrevida livre de doença (FISHER et al., 1988).

A presença da proteína nuclear receptora de estradiol define um grupo de células tumorais relativamente diferenciadas em sua função e, portanto, com o ciclo celular próximo da normalidade e com clones provavelmente pouco sensíveis à quimioterapia e com melhores respostas à endocrinoterapia (BONADONNA et al., 1986; BAUM & AFIFI, 1991). As pacientes que não apresentam receptor de estradiol, principalmente quando na pré-menopausa, são beneficiadas com a quimioterapia (FISHER et al., 1989).

O estado cinético das células tumorais, que seria um indicador da eficácia das drogas, poderia ser determinado pela porcentagem de células na fase de síntese do DNA, ou fase S, ou pelo estado de ploidia do tumor

(diploidia X aneuploidia), ambos determinados pela técnica da citometria de fluxo. A ploidia é considerada como medida da estabilidade genética do tumor, considerando-se a aneuploidia como rearranjos, amplificações ou deleções na seqüência gênica, que conferem maior proliferação e quimiossensibilidade ao tumor (MERKEL & OSBORNE, 1989).

Recentemente tem-se estudado o gene p53, também considerado como um gene supressor do tumor, devido a sua função reguladora da proliferação celular (LANE, 1990). Presente nas células normais na forma “wild” ou não-mutante, tem a função de bloquear a divisão celular, agindo como mediador da apoptose se ocorrerem alterações no genoma. Quando esse gene torna-se mutante, a célula perde o controle do ciclo celular e, como conseqüência, ocorre a sobrevivência de células com alto conteúdo de mutação (SYMONDS et al., 1994). A quimioterapia, devido a sua ação genotóxica, poderia ter seu efeito influenciado pelo gene p53 (KAUFMANN, 1989; SORENSON, BARRY, EASTMAN; 1990).

Assim considerando, o grau nuclear, o receptor de estrógeno e a proteína p53 poderiam estar relacionados com a resposta à quimioterapia. Se esta relação for verdadeira, poderá ser utilizada para aplicar a quimioterapia primária de uma maneira mais selecionada.

Quimioterapia como tratamento primário

Com o objetivo de realizar um maior número de cirurgias conservadoras e aumentar as sobrevidas das pacientes portadoras de carcinomas considerados ressecáveis, iniciou-se, a partir do final da década de 80, a utilização da quimioterapia como primeira abordagem no tratamento dessas pacientes (BONADONNA et al., 1990; JACQUILLAT et al., 1990).

Este tipo de tratamento tem recebido os nomes de neo-adjuvante (RAGAZ, 1986; JACQUILLAT et al., 1990; BÉLEMBAOGO et al., 1992; SCHOLL et al., 1994 SMITH et al., 1995; CHOLLET et al., 1997); quimioterapia pré-operatória (FISHER et al., 1997) e quimioterapia primária (BONADONNA et al., 1990; ANDERSON et al., 1991). O termo quimioterapia primária parece ser o mais adequado, pois sugere a utilização de uma seqüência de agentes citotóxicos como tratamento inicial (HARRIS & SWAIN, 1996.). O termo neo-adjuvante foi inicialmente utilizado em contrapartida a adjuvante e destinado aos casos locorregionalmente avançados, sendo até o momento empregado nessas situações (DE LENA et al., 1978), e o pré-operatório é restritivo, pois nem sempre a cirurgia é realizada após a quimioterapia (MAURIAC et al., 1991; BÉLEMBAOGO et al., 1992; SCHOLL et al., 1994).

Ao avaliar-se os diferentes estudos referentes à quimioterapia primária, observa-se que devido a variabilidade na metodologia utilizada quanto à seleção de pacientes, esquema de quimioterapia, número de ciclos, critério de avaliação da resposta, grupo-controle e tratamento pós-quimioterapia primária, seus resultados não podem ser totalmente comparáveis (BONADONNA & VALAGUSSA, 1996). Considerando-se as respostas clínicas observadas, essas

foram muito variadas e dependeram, principalmente, do esquema utilizado e do número de ciclos aplicados. Numa análise de diferentes trabalhos, a resposta objetiva, isto é, uma taxa de redução maior que 50% em relação ao volume inicial, variou de 63% a 85% (BONADONNA et al.,1995).

A maioria dos estudos não é randomizada, e neles a redução clínica completa variou de 17% a 66%, conforme os diferentes esquemas utilizados (BONADONNA et al., 1990; SMITH et al., 1995). Obteve-se altas taxas de resposta completa com a potencialização dos esquemas ao acrescentar a droga vinorelbine - ocorrendo a recuperação medular com fatores de crescimento mielopoéticos - ou a droga cisplatina (SMITH et al., 1995; CHOLLET et al, 1997). Entretanto, a resposta completa histopatológica não seguiu os índices da resposta clínica, variando de 3% a 27%, isto é, aproximadamente dois terços dos casos com redução clínica completa apresentavam tumor residual quando avaliados histologicamente (BONADONNA et al, 1990; SMITH et al, 1995).

Embora as taxas de resposta histológica tenham variado conforme os diferentes esquemas e número de ciclos de quimioterapia, os resultados não são muito diferentes quando os esquemas utilizam a adriamicina, seja com três ou quatro ciclos e sendo a taxa de resposta relacionada com tamanho do tumor e ausência do receptor de estrógeno (BONADONNA et al., 1990).

Quando o principal objetivo da quimioterapia primária é a redução na extensão da cirurgia permite-se a realização do tratamento conservador em 64% a 92% das vezes (BONADONNA et al., 1990; SMITH et al., 1995;

CHOLLET et al., 1997; FISHER et al, 1997). Em alguns estudos a resposta clínica completa eliminou a cirurgia, sendo utilizada apenas a irradiação como forma de tratamento locorregional (MAURIAC et al., 1991; SCHOLL et al., 1994).

Um dos pontos polêmicos na literatura é a forma de avaliação da resposta à quimioterapia primária. Historicamente, atribui-se a ANSFIELD, do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América, a elaboração dos critérios de avaliação da resposta ao tratamento do câncer da mama (ANSFIELD, 1973). Os critérios que atualmente são adotados foram propostos, parcialmente pelo British Breast Group (1974) e modificados pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) em 1977. (HAYWARD et al., 1977). Graduava a resposta ao tratamento em: resposta completa, resposta parcial, doença estacionária e doença em progressão, baseando-se na mensuração uni ou bidimensional das lesões e, nesse caso, considerando como resultado o produto final das duas dimensões.

Considera-se resposta objetiva à quimioterapia uma redução maior de 50% em relação ao tamanho inicial, o que inclui as respostas completas e parciais. A avaliação do tamanho tumoral na mama pode ser realizada pelo exame clínico através da palpação, mamografia e ultra-sonografia. As medidas obtidas por esses métodos não são sempre coincidentes e ao estabelecer-se uma correlação macroscópica após a ressecção cirúrgica, houve coincidência em 71% de casos através da mamografia, 77% pela ultra-sonografia e 58% pelo exame clínico (MEDEN et al., 1995). Resultado semelhante foi encontrado

por FORNAGE, TOUBAS, MOREL, (1987), cujo estudo demonstrou uma superestimação do tamanho tumoral pelos três exames, sendo o ultra-som aquele que mais se aproximou do tamanho ao exame anatomopatológico do tumor.

Se existe discrepância na avaliação do tamanho tumoral nos casos submetidos inicialmente à cirurgia, com a interferência da quimioterapia primária esta mensuração torna-se mais difícil. A maioria dos autores utiliza como critério de avaliação da resposta o tamanho clínico ou mamográfico, alguns utilizando o produto dos dois diâmetros e outros o volume (BONADONNA et al., 1990; BÉLEMBAOGO et al., 1992). A avaliação da resposta tumoral à quimioterapia primária utilizando os três métodos propedêuticos, evidencia diferentes taxas de resposta objetiva, sendo de 86% pelo exame clínico, 75% pelo ultra-som e 59% pela mamografia (BÉLEMBAOGO et al., 1992).

Se, por um lado, a palpação superestima a redução tumoral após a quimioterapia primária, a mamografia tende a subestimá-la (MOSKOVIC et al., 1993), sendo o exame anatomopatológico aquele que define exatamente a resposta (FOROUHI et al., 1994). Essas considerações permitiram que fosse sugerido como critério de resposta, além da medida do tumor, a avaliação qualitativa do aspecto mamográfico (VINNICOMBE et al., 1996).

Assim, se o objetivo da quimioterapia primária for a conservação da mama e a redução na extensão da cirurgia, a avaliação da resposta deve considerar a mensuração clínica e mamográfica e, para assegurar a completa

resseccão com margens de segurança, o exame histológico das margens da ferida operatória deve ser preconizado.

Proteína p53

O crescimento normal das células é regulado por proteínas nucleares e citoplasmáticas codificadas por proto-oncogenes. A mutação dos proto-oncogenes origina oncogenes que expressam produtos protéicos que podem não mais regular a proliferação e diferenciação das células. Várias alterações nesses proto-oncogenes têm sido associadas com o desenvolvimento do câncer de mama. No braço curto do cromossoma 17 encontra-se um alelo que regula negativamente o crescimento das células, chamado de gene supressor ou guardião do genoma (ISOBE et al, 1986), que codifica uma proteína de peso molecular 53 kilo-Daltons (53 kDa) e é habitualmente chamado de gene supressor p53. Suas mutações estão associadas ao câncer da mama (THOMPSON et al., 1992), assim como superexpressão de outros genes estão relacionadas com as características evolutivas da doença (BALLARE et al., 1991; LUNDY et al., 1991; HEGG, 1992; ALLRED et al., 1993;).

Como foi citado anteriormente, o gene p53 está localizado no braço curto do cromossoma 17 (ISOBE et al., 1986) e codifica uma fosfoproteína de 53 kDa, presente em níveis muito baixos em quase todas as células humanas, atuando como reguladora do crescimento celular normal (MILNER, 1991). Essa proteína funciona como fator de transcrição, isto é, liga-se à região reguladora do gene, indispensável para a indução da transcrição pela RNA polimerase,

exercendo um efeito inibidor sobre a proliferação celular (KERN et al.; 1991; FARMER et al., 1992; LANE, 1992).

Demonstrou-se, em fibroblastos de ratos, que o tipo não-mutante do gene p53 diminui a frequência de transformações e inibe o crescimento celular (FINLAY, HINDS, LEVINE, 1989). Foi evidenciado também em células tumorais humanas que a transfecção, ou seja, a transferência do tipo não-mutante do gene p53, reduziu o crescimento tumoral *in vitro* (CHEN et al., 1990). A ocorrência de mutações no gene p53 resulta na síntese de uma proteína anormal, que perde sua capacidade em ligar-se às seqüências específicas do DNA, ocasionando uma perda do controle da proliferação celular (LANE, 1992).

Nas células normais a concentração da proteína p53 é geralmente muito baixa, não sendo possível sua detecção pelos métodos imuno-histoquímicos. Entretanto, os tumores com formas mutantes do gene p53 expressam altos níveis da proteína, de maior vida-média, sendo portanto, passíveis de detecção imuno-histoquímica. (LANE & BENCHIMOL, 1990). Assim, parece existir correlação entre a expressão da proteína p53 e a mutação do gene p53, embora nem sempre essa correlação seja verdadeira (LOHMANN et al., 1993; HURLIMANN, CHAUBERT; BENHATTAR; 1994).

No câncer da mama o acúmulo de proteína p53 é considerado um fator de mau prognóstico (ISOLA et al., 1992; THOR et al., 1992; ALLRED et al., 1993; SILVESTRINI, BENINI, DARDONE; 1993; STENMARK-ASKMALM et al., 1994), pois significa que ela está inativa quanto a sua função controladora do crescimento celular, permitindo a sobrevivência de células com alto conteúdo

mutante (SYMONDS et al., 1994) e com as alterações de ploidia (LANE, 1992; YIN et al., 1992). Os tumores malignos humanos freqüentemente perdem essa atividade normal da proteína p53 (VOLGESTEIN, 1990).

A proteína do gene não-mutante possui uma meia-vida fugaz, de 20 a 30 minutos (RAYCROFT, WU, LOZANO, 1990), sendo a forma mutante mais estável, com meia-vida de aproximadamente 20 horas (LANE, 1992), fato que torna possível a sua detecção pelo método imuno-histoquímico (LANE & BENCHIMOL, 1990), embora outras técnicas como reação em cadeia da polimerase, polimorfismo na conformação da cadeia simples e citometria de fluxo também possam ser utilizadas. O método imuno-histoquímico é o mais freqüentemente utilizado em estudos clínicos, ressaltando-se que nem sempre a superexpressão da proteína está associada a mutações (ANDERSEN et al., 1993; MARCHETTI et al., 1993; HALL & LANE, 1994; SESHADRI et al., 1996).

O acúmulo da proteína p53 no carcinoma da mama foi descrito com freqüências que variam de 13% (MARTINAZZI et al., 1993) a 58% (LIPPONEN & AALTOMAA, 1993), não sendo detectada no tecido normal ou em lesões benignas (BARTEK et al., 1990). Essa grande variação poderia ser devido às propriedades dos diferentes anticorpos utilizados, variando de 34% a 43% com a utilização dos anticorpos DO7, 240 e 1801 (BROTHERICK et al., 1995) e de 15,5% a 45,5% quando utiliza-se os anticorpos 421 e 1801 (CATTORETTI et al., 1988).

A elevada expressão da proteína p53, que sugere alterações no genoma das células, pode estar associada com ausência de receptores de estrógeno e

progesterona (CATTORETTI et al., 1988; ALLRED et al., 1993; FRIEDERICHS et al., 1993; BECK et al., 1995; ELLEDGE et al., 1995; SESHADRI et al., 1996), com alto grau histológico e nuclear (ISOLA et al., 1992; CIESIELSKI et al., 1995; GÖHRING et al., 1995; SESHADRI et al., 1996); com alto índice de DNA (ISOLA et al., 1992), com alta fração de células na fase "S" (CHEN et al., 1990; STENMARK-ASKMALM et al., 1994; ELLEDGE et al., 1995) e com a superexpressão de c-erbB-2 (POLLER et al., 1992; THOR et al., 1992; MARTINAZZI et al., 1993; STENMARK-ASKMALM et al., 1994).

Os dados sugerem que a proteína p53 mutante pode estar envolvida no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, podendo ter significado prognóstico e, eventualmente, terapêutico. Em recentes estudos retrospectivos foi encontrada uma associação direta entre a super-expressão da proteína p53 e características de agressividade nos tumores de mama (ISOLA et al., 1992; THOR et al., 1992; ALLRED et al., 1993; BARNES et al., 1993; CALEFFI et al., 1994; GASPARINI et al., 1994; WILTCHKE et al., 1994; ROSEN et al., 1995). Entretanto, o valor prognóstico independente de p53 é ainda contraditório. Alguns autores observaram que a expressão de p53 estava associada com mau prognóstico e evolução desfavorável (ISOLA et al., 1992; THOR et al., 1992; ALLRED et al., 1993; GASPARINI et al., 1994), resultados não confirmados por outros (CALEFFI et al., 1994; JACQUEMIER et al., 1994; ROSEN et al., 1995). Talvez a discrepância desses resultados seja decorrente, em parte, da natureza retrospectiva da amostragem, variações técnicas ou tratamentos recebidos pelos pacientes.

Quimioterapia primária e proteína p53

Considerando o papel fisiológico da proteína p53 como guardião do genoma (LANE, 1992), carcinomas com gene p53 mutante teriam diminuída sua capacidade de reparo do DNA, e conseqüentemente, maior susceptibilidade aos agentes nocivos ao DNA. Assim, pacientes portadoras de tumores com esta alteração poderiam beneficiar-se de uma terapia sistêmica precoce e, talvez, mais agressiva. Portanto, sua detecção seria clinicamente útil no planejamento do tratamento da paciente (GÖHRING et al., 1995).

Como o efeito terapêutico de várias drogas antitumorais decorre dos danos provocados no DNA ou por indução da apoptose celular, (KAUFMANN, 1989; SORENSON, BARRY, EASTMAN; 1990), poder-se-ia utilizar a detecção da proteína p53 como marcador de uma eventual resposta às drogas (GORCZYCA et al., 1993; LOWE et al., 1994).

Por outro lado, a instabilidade decorrente da perda da função do gene p53 não-mutante permitiria a amplificação de outros genes, como o MDR 1, que está associado com a expressão de uma glicoproteína de 170 kilo-Daltons, a proteína p170 (BODEY et al, 1997). Essa proteína é responsável pela resistência do tumor a vários agentes citotóxicos como antraciclinas e alcalóides da vinca, sendo conhecido como fenômeno da resistência às múltiplas drogas (MDR) (VAN KALKEN, PINEDO, GIACCONE, 1991).

Assim, haveria uma correlação direta entre a presença da proteína p170 nas células do carcinoma da mama e má resposta à quimioterapia (BODEY et al., 1997). Estudos recentes apresentaram evidências de que a expressão da

proteína p53 mutante está correlacionada com expressão da glicoproteína p-gp, concluindo assim indiretamente, que o gene p53 mutante poderia estar relacionado com resistência a drogas e com recidivas precoces (LINN et al., 1996).

Poucos trabalhos clínicos relacionam a superexpressão da proteína p53 com a quimioterapia. Em estudo realizado com carcinomas mamários localmente avançados, mostrou-se uma associação entre a positividade do p53 e a baixa taxa de resposta à quimioterapia neo-adjuvante, embora sem diferença estatisticamente significativa (FAILLE et al., 1994). LINN et al., (1997), em estudo semelhante, também não encontraram valor preditivo da expressão da proteína p53 de resposta à quimioterapia neo-adjuvante.

Outras duas análises retrospectivas abordaram pacientes tratadas com quimioterapia adjuvante, demonstrando que naquelas com metástase axilar, o grupo que apresentava superexpressão da proteína p53 foi mais beneficiado com a quimioterapia (ALLRED et al., 1993). Em outro trabalho, pacientes sem metástase axilar e sem aumento da expressão da proteína p53 apresentaram maior resposta à quimioterapia.(ELLEEDGE et al., 1995).

Numa avaliação *in vitro* utilizando tecidos tumorais de pacientes com carcinoma da mama, encontrou-se uma correlação entre a concentração da proteína p53 mutante e a quimiorresistência (KOECHLI et al., 1994). Entretanto, outro estudo realizado não encontrou diferença significativa na resposta à quimio-endocrinoterapia primária em pacientes que eram p53 positivo ou negativo. (MAKRIS et al., 1995). Mais recentemente, MacGROGAN

et al., (1996) ao analisarem fatores prognósticos em pacientes que receberam quimioterapia primária, não encontraram influência da expressão da proteína p53 na resposta à quimioterapia.

Outro aspecto ainda não esclarecido é o efeito da quimioterapia sobre os oncogenes. RASBRIDGE et al. (1994), descreveram os efeitos da quimioterapia na morfologia, proliferação celular, apoptose e expressão de oncogenes em pacientes com carcinoma avançado da mama tratadas com quimioterapia. Encontraram, como alteração mais significativa, a positividade da expressão da proteína p53 após a quimioterapia, interpretada como acúmulo de proteína normal em resposta ao dano genotóxico ocasionado pelas drogas antitumorais e não ao aparecimento de novas mutações. Porém, estudo semelhante realizado em pacientes portadoras de tumores de até 30mm de diâmetro e submetidas a três ciclos de quimioterapia primária com o esquema FACV, mostrou que houve alteração no padrão do p53 em cerca de 39% dos casos. (MOLL et al., 1995).

Assim, considerando-se a importância da quimioterapia primária na redução do volume tumoral, redução da extensão do procedimento locorregional, controle da doença microscópica sistêmica e a sensibilidade, avaliada *in vivo*, ao esquema de drogas, torna-se pertinente o desenvolvimento da análise dos fatores que se correlacionam com a eventual eficácia deste tratamento. A experiência acumulada no Serviço de Patologia Mamária do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, permitiu que se procurasse estabelecer a

correlação entre a expressão da proteína p53 com alguns fatores prognósticos e com a quimioterapia primária no carcinoma da mama ressecável.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar, em pacientes com carcinoma da mama ressecável, a expressão da proteína p53 como um indicador da resposta à quimioterapia primária através da sua correlação com o tamanho tumoral, grau nuclear e receptor de estrógeno, e a possível interferência deste procedimento no seu padrão de expressão.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e o estado menstrual da paciente.
2. Avaliar a correlação da expressão inicial da proteína p53 com o tamanho clínico do tumor.
3. Avaliar a correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e o grau nuclear das células tumorais.

4. Avaliar a correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e o receptor de estrógeno das células tumorais.
5. Avaliar a correlação entre a expressão inicial da proteína p53 das células tumorais e a resposta à quimioterapia primária.
6. Comparar a expressão da proteína p53 pré e pós-quimioterapia primária.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Participaram, inicialmente deste estudo, 112 pacientes do Ambulatório de Patologia Mamária do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas, no período de abril de 1994 a abril de 1995 e de maio de 1996 a agosto de 1997. Todas eram portadoras de carcinoma da mama, cujo tumor media acima de 15mm à mamografia, com diagnóstico realizado através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e ou punção por agulha grossa ou biópsia incisional, e submetidas a três ciclos de quimioterapia primária e posterior cirurgia.

Durante o desenvolvimento desta pesquisa foram excluídas 47 pacientes por apresentarem apenas PAAF como único método de diagnóstico ou recusa em prosseguir o tratamento preconizado ou por material inadequado de corte histológico feito por biópsia de agulha grossa. Assim, o tamanho final da população foi reduzido para 65 casos.

3.1 Tipo de Estudo

Este estudo foi clínico e analítico, executado parcialmente de forma retrospectiva no período compreendido entre o mês de abril de 1994 e abril de 1995, e prospectiva no período entre o mês de maio de 1996 e agosto de 1997.

3.2 Tamanho Amostral

Considerando a freqüência da expressão da proteína p53 no carcinoma da mama variando de 13% (MARTINAZZI et al., 1993) a 58% (LIPPONEN & AALTOMAA; 1993), com uma média de 35% utilizando o anticorpo monoclonal D0 7, estabeleceu-se uma aceitação de erro amostral de 10% e erro tipo I (?) de 10%, chegando-se a um tamanho amostral de 62 pacientes.

3.3 Critérios e procedimentos para a seleção de pacientes.

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas pacientes:

- ? Até 70 anos de idade, portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama diagnosticados por PAAF, biópsia por agulha grossa ou biópsia incisional.
- ? Apresentando tumores acima de 15mm no seu maior diâmetro à mamografia, mensuráveis clínica e radiologicamente.
- ? Sem evidência de metástase à distância.

- ? Com ou sem comprometimento linfonodal axilar ao exame clínico, e quando presente, os linfonodos deveriam ser iguais ou menores que 20mm, sem aderência entre si ou a estruturas vizinhas.
- ? Que haviam recebido tratamento inicial com quimioterapia primária num total de três ciclos com o esquema de drogas contendo 5-fluorouracil na dose de 500mg/m², Adriamicina, 50mg/m² e ciclofosfamida, 500mg/m² (FAC) ou na falta de condições clínicas para este esquema, ciclofosfamida na dose de 500mg/m², methotrexate, 50mg/m² e 5-fluorouracil, 500mg/m² (CMF).
- ? Que haviam sido submetidas posteriormente a um tratamento cirúrgico: quadrantectomia e linfadenectomia axilar ou mastectomia radical, dependendo do tamanho tumoral final.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas pacientes que apresentaram:

- ? Carcinoma bilateral sincrônico ou assincrônico.
- ? Outro tipo histológico do tumor da mama que não carcinoma.
- ? Tumores multifocais.
- ? Presença de comprometimento da pele ao exame clínico.
- ? Biópsia excisional prévia.
- ? Lâminas de PAAF e de histologia não adequadas para a avaliação da expressão da proteína p53.
- ? Tratamento quimioterápico incompleto proposto e recusa do tratamento cirúrgico posterior à quimioterapia.

3.4 Variáveis e Conceitos

3.4.1 Variável de controle

- ? *idade* - calculada em anos completos de vida, desde a data do nascimento até a data do diagnóstico.

Variáveis independentes e dependentes

Este estudo foi dividido em duas etapas e as variáveis foram agrupadas de acordo com a etapa do estudo. Na primeira, avaliamos a correlação da expressão inicial da proteína p53 com estado menstrual, tamanho clínico inicial do tumor, grau nuclear e receptor de estrógeno. Na segunda etapa, analisamos a correlação da resposta tumoral à quimioterapia e a expressão final da proteína p53, com a expressão inicial da expressão da proteína p53.

3.4.2 Variáveis independentes da primeira etapa

- ? *estado menstrual* - classificado em duas categorias: pré e pós-menopausa. Foram consideradas na pós-menopausa as pacientes que relataram estar em amenorréia há mais de 12 meses, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981), ou acima de 50 anos para as hysterectomizadas, no momento do diagnóstico.
- ? *Tamanho clínico do tumor* - Avaliado através da mensuração clínica utilizando-se uma régua milimetrada e considerando-se a sua maior dimensão, tendo o seu valor expresso em milímetros.
- ? *Grau nuclear* - Avaliado nas lâminas do exame histopatológico, coradas através do método da hematoxilina e eosina (HE) referente à biópsia por agulha grossa ou incisional prévios à quimioterapia. Todas as lâminas foram revisadas por um mesmo médico patologista e

classificadas em três categorias de acordo com a modificação do sistema BLACK & SPEER (1957) e BLACK, BARCLAY, HANKEY (1975) em: grau nuclear 1- células contendo núcleos bem diferenciados, pequenos, uniformes, cromatina frouxa, sem nucléolos ou mitoses; grau nuclear 3- células com núcleo grande, nucléolo proeminente, cromatina grosseira e abundantes mitoses; grau nuclear 2- o intermediário entre os dois.

? *Receptor de hormônio estrogênico* - Avaliado nas lâminas recortadas dos blocos de parafina correspondentes às biópsias realizadas previamente à quimioterapia (biópsia por agulha grossa ou incisional), através do método imuno-histoquímico. O resultado foi classificado em duas categorias:

negativo: ausência de células com os seus núcleos corados ou coloração até 10% das células por campo à microscopia óptica;

positivo: presença de mais de 10% de células com seus núcleos corados por campo (FIGURA 1).



Figura 1. Carcinoma ductal invasivo revelando positividade nuclear para receptor de estrógeno em 100% das células neoplásicas com linfócitos no fundo (aumento 400x).

3.4.3 Variáveis dependentes da primeira etapa

? *expressão inicial da proteína p53*

Foi avaliada pelo método imuno-histoquímico nas lâminas de citologia nas pacientes que apresentavam PAAF como único método diagnóstico e nas lâminas recortadas do bloco de parafina referentes às biópsias por agulha grossa ou incisional, todos prévios à quimioterapia. O resultado da leitura, tanto na citologia como no corte histológico foi classificado em duas categorias:

negativo nenhuma ou presença de menos de 10% de células por campo ao microscópio óptico, contendo seus núcleos corados

positivo: + de 10% a 25% de células coradas
++ de 25% a 50% de células coradas
+++ de 50% a 75% de células coradas
++++ de 75% a 100% de células coradas.

3.4.4 Variáveis independentes da segunda etapa

? *Expressão inicial da proteína p53*

Conforme descrito acima.

3.4.5 Variáveis dependentes da segunda etapa

? *Resposta tumoral* - Para o cálculo da resposta tumoral à quimioterapia, foi utilizado o critério preconizado pela UICC, em que se comparam os produtos dos valores inicial e final do tumor (HAYWARD et al., 1977). Foram consideradas como medida inicial o tamanho bidimensional à mamografia e como medida final o tamanho bidimensional à macroscopia da peça cirúrgica. Foi considerada redução total a ausência de neoplasia invasora à microscopia. Para o

cálculo da resposta foram comparados os valores dos produtos inicial e final. A resposta foi então classificada em quatro categorias:

- 1) Resposta completa: redução de 100% ou presença de área de somente CIS.
- 2) Resposta parcial: redução entre 50% e 100%
- 3) Estacionária: redução < 50% ou aumento < 25%
- 4) Progressão: aumento > 25% ou aparecimento.

Para a análise dos dados foram agrupadas ainda em duas categorias:

- 1) Com resposta objetiva - 1+2
- 2) Sem resposta objetiva - 3+4

? *Expressão final da proteína p53* - Avaliada nas lâminas recortadas dos blocos de parafina correspondentes ao exame histopatológico após a quimioterapia e cirurgia. Foi avaliada em 54 casos, não tendo sido possível realizar nas pacientes que apresentaram redução total histológica. A leitura do resultado baseou-se conforme descrito acima (FIGURA 2).

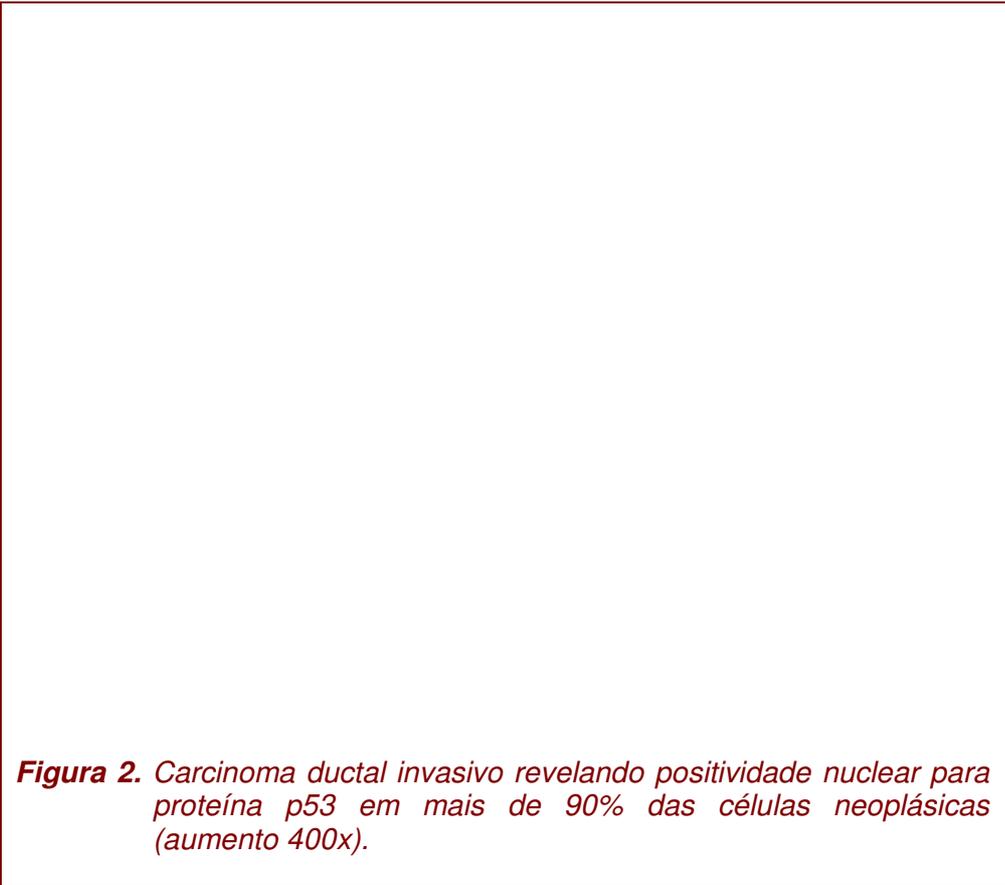


Figura 2. Carcinoma ductal invasivo revelando positividade nuclear para proteína p53 em mais de 90% das células neoplásicas (aumento 400x).

3.5 Instrumento para a Coleta dos Dados

A coleta de dados foi realizada através do preenchimento de uma ficha criada especialmente para este estudo (ANEXO 1). Para cada caso foi atribuído um número de identificação.

Todos os dados foram obtidos através do prontuário médico das pacientes. Foram levantados os números das lâminas de citopatologia e de histopatologia de cada caso para avaliação do receptor de estrógeno antes do efeito da quimioterapia, e da expressão da proteína p53 antes e após a quimioterapia, através da técnica da imuno-histoquímica descrita a seguir, cujos resultados foram compilados para a ficha do ANEXO 1.

3.5.1 Identificação dos casos

Inicialmente foram levantadas todas as lâminas de corte histopatológico coradas pelo método de HE e os blocos de parafina correspondentes de cada caso, nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica e todas as lâminas de citopatologia de PAAF, nos arquivos do Laboratório de Citopatologia. Estas lâminas foram examinadas pelo médico patologista que realizou uma revisão das citopatologias e histopatologias, sendo nestas últimas, revistos o grau nuclear do tumor. A seguir foram selecionados os blocos correspondentes às lâminas onde o material era mais representativo das lesões. Dos blocos, então, foram confeccionados cortes de 4mm. Os melhores cortes foram escolhidos para a realização das reações de imuno-histoquímica

(IHQ) para receptor de estrógeno (RE-clone 1D5), e para proteína p53 (clone DO-7- Dako, cod. M7001). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (HSU, RAINE, FANGER, 1981), com modificações.

3.5.2 Técnica da Imuno-Histoquímica

Foi realizada nas lâminas de citologia e de histologia.

Foram utilizados dois anticorpos primários monoclonais, o 1D5 e o DO-7, para os antígenos a serem pesquisados; anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário, conjugado à biotina, e o complexo de peroxidase conjugado à estreptavidina e biotina. A estreptavidina contém quatro sítios para ligação da biotina, sendo que um deles vai ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros três sítios serão acoplados ao complexo biotina peroxidase da solução.

O procedimento foi realizado conforme os passos descritos sumariamente a seguir:

? *Cortes histológicos:* Cortes de 4mm realizados nos blocos de parafina foram colocados em lâminas previamente tratadas com solução de organossilano (3-aminopropil-trietoxi-silano -Sigma, cod. A3648) a 2% em acetona. As lâminas foram deixadas a 60°C, em estufa, por 48 horas, para a secagem dos cortes.

Os procedimentos abaixo foram realizados tanto para lâminas de citologias como de histologias:

- ? *Desparafinação dos cortes histopatológicos e remoção da lamínula das citopatologias:* um banho de xilol à 60°C (15 minutos) e dois banhos de xilol à temperatura ambiente (dez minutos cada) para retirar o excesso de parafina e a remoção da lamínula.
- ? *Hidratação:* Realizada em gradiente decrescente de álcoois (três banhos de álcool absoluto, dois minutos cada (todos à temperatura ambiente). Seguiu-se lavagem de água corrente por dois minutos e passagem em água destilada.
- ? *Inibição da peroxidase endógena:* Banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol, por 15 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem por água destilada. Passagem para tampão PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,6).
- ? *Desmascaramento de antígenos:* Foi feito pelo método de microondas, que consiste na imersão das lâminas, em cuba plástica apropriada para microondas contendo tampão citrato 1M, pH 6,0 , por três ciclos de sete minutos cada, na potência máxima. Posteriormente, deixou-se esfriar dentro do forno de microondas, durante dez minutos.
- ? *Reação antígeno-anticorpo primário:* Incubação com os anticorpos primários 1D5 (dil. 1:2000) e DO-7 (dil. 1:100), ambos monoclonais, produzidos em camundongo. A diluição foi feita em soro albumina-bovina 0,1% em PBS com azida sódica a 0,2%, para os dois anticorpos. A incubação foi "overnight" a 4°C, em câmara úmida, após o que, o excesso desse anticorpo foi retirado, seguindo-se três lavagens em PBS, de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.

- ? *Reação com o anticorpo secundário biotinilado:* Este anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra, produzido em porco, Kit Multilink Dako, cod. E453) foi dirigido contra o anticorpo primário (cadeia pesada), usado na diluição de 1:200 em tampão PBS com azida sódica a 0,5%. A incubação foi de 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, retirou-se o anticorpo secundário procedendo-se três lavagens em PBS, de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
- ? *Reação com o complexo S-ABC:* Incubação com o complexo S-ABC (Kit Dako, cod. K377), na diluição de 1:100 em tampão TRIS 0,05M, por período de 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em PBS.
- ? *Coloração:* Realizada em DAB (3,3'tetra-hidrocloro diaminobenzidina, Sigma, cod. D5637), um cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorre a reação. As lâminas foram imersas numa solução (DAB em tampão PBS a 0,4%, com peróxido de hidrogênio a 0,012%), por dois a três minutos, ou até visualização da coloração levemente acastanhada dos cortes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada.
- ? *Contra-coloração:* Foi feita pela passagem das lâminas em Hematoxilina de Mayer, durante um minuto à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a lavagem em água amoniacal (algumas gotas de amoníaco na água de lavagem), para melhor evidenciar a contra-coloração. Seguiu-se lavagem em água corrente e água destilada.
- ? *Desidratação:* Foi feita em álcool absoluto (três banhos) e xilol (três banhos). Em seguida as lâminas foram montadas com resina Entellan (Merck, cod. 7961).

? *Leitura dos resultados:* Foi realizada em microscópio óptico comum, no aumento de 400X, sendo considerados positivos todos os núcleos corados de marrom, independente da sua intensidade, para ambos os marcadores. Serviram de controles positivos dois tecidos tumorais de mama conhecidamente positivos para anticorpo anti-receptor de estrógeno e antiproteína p53, respectivamente. Cada lâmina foi analisada por dois observadores sem conhecimento prévio do diagnóstico pelo HE, a fim de se verificar a concordância interobservadores. Foram considerados positivos os casos que apresentaram pelo menos 10% de células com seus núcleos corados por campo de microscopia óptica.

3.6 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado através da análise de prontuários, mamografias e lâminas de citopatologia e histopatologia, respeitando-se o sigilo da fonte de informações, de acordo com a Declaração de Helsinki (1990), sendo cada caso identificado apenas por um número. A quimioterapia primária faz parte da rotina assistencial do Ambulatório de Patologia Mamária desde o mês de abril de 1994, baseado no estudo realizado no período compreendido entre o mês de junho de 1991 a junho de 1993, quando as pacientes assinaram o termo de consentimento (SHINZATO, 1995).

3.7 Processamento dos dados

As fichas foram preenchidas e revisadas manualmente para detecção de possíveis erros de seleção e preenchimento, junto aos prontuários. Esses

dados foram armazenados num arquivo de um microcomputador, em programa de DBASE. Em seguida, foram conferidos, confrontando-os com a ficha respectiva para detectar os possíveis erros de digitação.

Após o término da digitação e correção de todos os casos, realizou-se a verificação de sua consistência. Os erros detectados foram corrigidos, recorrendo-se à ficha original e, em alguns casos, ao prontuário.

3.8 Análise dos dados

Inicialmente fizeram-se tabelas descritivas e de freqüência de todas as variáveis no grupo de pacientes. Realizou-se então análise estatística univariada.

A correlação da variável dependente (expressão inicial da proteína p53) com a variável independente (estado menstrual) foi verificada pelo teste de Qui-Quadrado, com correção de Yates. Para as demais variáveis independentes (tamanho tumoral, grau nuclear e receptor de estrógeno) foi utilizado o teste exato de Fisher.

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

A comparação da expressão final da proteína p53 com a inicial foi verificada pela prova de McNemar, através da qual analisou-se a modificação da variável independente com a ação da quimioterapia. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

Estes procedimentos foram desenvolvidos utilizando-se o Programa Estatístico *Statistical Analysis System (SAS) versão 6.12*.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados descritivos

A média de idade das pacientes foi de 48,9 anos com um desvio-padrão de 9,64. A idade mediana foi de 49 anos, sendo que 55,4% das pacientes encontravam-se na fase da pré-menopausa, 75% apresentavam grau nuclear 2 e 70% receptor de estrógeno negativo (TABELA 1).

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO ESTADO MENSTRUAL,
GRAU NUCLEAR E RECEPTOR DE ESTRÓGENO

<i>características</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
pré-menopausa	36/65	55,4
grau nuclear 3	7/28	25
receptor de estrógeno negativo	21/30	70

A expressão da proteína p53 foi avaliada previamente à quimioterapia primária no material de citologia ou de histologia num total de 65 casos, tendo sido encontrada positividade em 22 casos (33,8%) (TABELA 2).

TABELA 2
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO A EXPRESSÃO INICIAL DA PROTEÍNA p53

<i>p53</i>	<i>n</i>	%
Negativo	43	66,2
Positivo	22	33,8
Total	65	100

Dos 65 casos em estudo foi possível avaliar a expressão da proteína p53 após a ação da quimioterapia primária, em um total de 54 casos, encontrando-se positividade em 24,1% (TABELA 3).

TABELA 3
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 APÓS A QUIMIOTERAPIA

<i>p53</i>	<i>n</i>	%
Negativo	41	75,9
Positivo	13	24,1
Total	54	100

A quimioterapia primária proporcionou a 60% das pacientes uma resposta objetiva, ou seja, redução maior ou igual a 50% em relação ao tamanho inicial. (TABELA 4).

TABELA 4
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO A
RESPOSTA TUMORAL À QUIMIOTERAPIA

<i>Resposta Objetiva</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Ausente	26	40,0
Presente	39	60,0
Total	65	100

4.2 Resultados analíticos

4.2.1 Correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e alguns fatores prognósticos

Ao avaliar-se a correlação da expressão da proteína p53 segundo o estado menstrual das pacientes, observou-se uma proporção maior de positividade (41,4%) entre os casos diagnosticados na fase da pós-menopausa, embora sem significância estatística ($p=0,249$) (TABELA 5).

TABELA 5
CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
E O ESTADO MENSTRUAL

<i>p53</i>	<i>pré-menopausa</i>		<i>pós-menopausa</i>	
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Negativo	26	(72,2)	17	(58,6)
Positivo	10	(27,8)	12	(41,4)
Total	36	(100)	29	(100)

Teste Qui-Quadrado
 $p= 0,249$

Observou-se que a positividade da proteína p53 aumentava de acordo com o aumento do tamanho tumoral (25% X 31,2% X 40%), porém, sem significado estatístico (P=0,708) (TABELA 6).

TABELA 6
CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
E O TAMANHO CLÍNICO INICIAL DO TUMOR

<i>p53</i>	<i>Tamanho Tumoral (mm)</i>		
	≤ 30	$> 30 \text{ e } \leq 50$	> 50
Negativo	6 (75,0))	22 (68,8)	15 (60,0)
Positivo	2 (25,0)	10 (31,2)	10 (40,0)
Total	8 (100)	32 (100)	25 (100)

Teste Exato de Fisher
p= 0,708

A relação entre a expressão da proteína p53 com o grau nuclear do tumor mostrou uma maior positividade no grau nuclear indiferenciado (GN3) do que no moderadamente diferenciado (GN 2), embora sem significância estatística. ($p=0,142$) (TABELA 7).

TABELA 7
CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
E O GRAU NUCLEAR DAS CÉLULAS TUMORAIS

<i>p53</i>	<i>Grau Nuclear</i>			
	2		3	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)
Negativo	17	(81)	3	(42,9)
Positivo	4	(19)	4	(57,1)
Total	21	(100)	7	(100)

Teste Exato de Fisher
 $p= 0,142$

Ao avaliar-se a correlação da expressão inicial da proteína p53 com o receptor de estrógeno, observou-se maior expressão nos tumores sem receptor (33,3% X 22,2%), diferença esta sem significância estatística (P=0,681) (TABELA 8).

TABELA 8
CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
E O RECEPTOR DE ESTRÓGENO

<i>p53</i>	<i>Receptor de Estrógeno</i>			
	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>	
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Negativo	14	(66,7)	7	(77,8)
Positivo	7	(33,3)	2	(22,2)
Total	21	(100)	9	(100)

Teste Exato de Fisher
p= 0,681

4.2.2 Correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e resposta à quimioterapia primária

As respostas à quimioterapia primária ocorreram igualmente entre os dois grupos, independentemente da expressão da proteína p53 (60,5% X 59,1%) (TABELA 9).

TABELA 9
CORRELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA TUMORAL À QUIMIOTERAPIA
E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53

<i>Resposta Objetiva</i>	<i>p53</i>			
	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>	
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Ausente	17	(39,5)	9	(40,9)
Presente	26	(60,5)	13	(59,1)
Total	43	(100)	22	(100)

Teste Qui-Quadrado
p= 0,915

4.2.3 Comparação da expressão final da proteína p53 com a expressão inicial em relação à quimioterapia

Ao avaliar-se a ação da quimioterapia sobre a expressão da proteína p53 observou-se que do total, 11 casos (20%) modificaram o padrão da expressão da proteína p53. Dos casos inicialmente p53 positivos, 43,8% apresentaram negatificação após a quimioterapia, contra 10,5% dos previamente negativos que positivaram. Entretanto, avaliando através do teste de McNemar, não encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,548$) nesses resultados (TABELA 10).

TABELA 10
CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
ANTES E APÓS A QUIMIOTERAPIA

<i>p53 pós- quimioterapia</i>	<i>p53 pré-quimioterapia</i>			
	<i>negativo</i>		<i>positivo</i>	
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Negativo	34	(89,5)	7	(43,8)
Positivo	4	(10,5)	9	(56,3)
Total	38	(100)	16	(100)

Teste de McNemar
 $p= 0,549$

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, entre os casos de neoplasia da mama tratados no CAISM/UNICAMP, a expressão da proteína p53 de forma mutante, pelo método imuno-histoquímico, nas células tumorais provenientes das pacientes portadoras de carcinoma mamário ressecável e que foram submetidas à quimioterapia primária. Analisamos sua correlação com o estado menstrual da paciente, tamanho tumoral, grau nuclear, receptor de estrógeno e com a resposta ao tratamento. Por fim, estudamos a expressão da proteína p53 após o efeito da quimioterapia, estabelecendo uma correlação com o padrão inicial.

O gene p53 está presente nas células normais na forma “wild” e expressa baixos níveis de proteína envolvida na transcrição do gene, síntese e reparo do DNA, na regulação do genoma e na morte celular programada (MONTENARH, 1992). Essa proteína forma complexo com outras proteínas celulares e algumas oncoproteínas virais podem dar origem à forma mutante, com perda da capacidade de controlar o ciclo celular. Essa forma mutante do gene p53 expressa altos níveis de proteína que podem ser detectadas através da técnica imuno-histoquímica (HALL & LANE, 1994).

No presente estudo, ao avaliarmos a expressão da proteína p53 nas células tumorais de 65 casos, antes da ação da quimioterapia, utilizando o anticorpo monoclonal D07, encontramos uma frequência de 34% de positividade ou superexpressão desta proteína. Essa frequência está de acordo com os dados da literatura que avaliaram o mesmo anticorpo, tendo sido encontrado em 45% e 34% dos casos, por JACQUEMIER et al. (1994); BROTHERIK et al., (1995) e respectivamente.

Correlacionando sua expressão com o estado menstrual, encontramos uma maior proporção de casos positivos, embora sem significância estatística, nos tumores de mulheres na pós-menopausa. Não há uma explicação definida sobre a frequência da superexpressão da proteína p53 com o estado menstrual e os dados da literatura são controversos e ainda não conclusivos. O mesmo resultado que observamos, uma associação com idade maior que 50 anos e pós-menopausa, foi encontrado por OSTROWSKI et al. (1991). Por outro lado, os estudos de CALEFFI et al. (1994); CIESIELSKI et al. (1995); STENMARK-ASKMALM et al. (1995) e SESHADRI et al. (1996) demonstraram uma associação significativa com idade inferior a 50 anos ou fase de pré-menopausa, e THOMPSON, et al., (1992); CUNNINGHAN et al. (1994) MARKS et al. (1994); e GÖHRING et al. (1995) não encontraram associação entre estes dois fatores e a expressão da proteína p53.

O tamanho do tumor continua sendo um importante fator prognóstico e existe uma relação linear entre o diâmetro tumoral e o envolvimento linfonodal

axilar em câncer da mama e, conseqüentemente, com a evolução da doença. (FISHER et al, 1969; CARTER, ALLEN, HENSON, 1989)

De acordo com o tamanho inicial do tumor, embora sem uma significância estatística, encontramos correlação direta entre a positividade da expressão da proteína p53 e o tamanho do tumor. ANDERSEN et al. (1993); MARTINAZZI et al. (1993); FAILLE et al. (1994); MARKS et al. (1994); STENMARK-ASKMALM et al. (1994) também demonstraram que quanto maior o tamanho do tumor maior a expressão da proteína p53, que poderia ser explicada pelo crescimento não mais controlado pelo gene p53 não-mutante das células tumorais. De fato, parece existir uma relação deste com a proliferação celular e a progressão tumoral, que devem ocorrer em maior taxa nos tumores de maior tamanho.

Tal associação, entretanto, não foi encontrada em outros estudos (THOMPSON et al., 1992; FRIEDRICKS at al., 1993; CALEFFI et al., 1994; CUNINGHAN et al., 1994; CIESIELSKI et al., 1995; GÖHRING et al., 1995; SESHADRI et al., 1996).

Todos os tumores que avaliamos tinham células com grau nuclear 2 ou 3, isto é, ou eram moderadamente diferenciados ou indiferenciados e, embora sem significância estatística, encontramos uma correlação maior da superexpressão da proteína p53 com o grau nuclear 3. Esta relação, descrita em diferentes trabalhos (THOR et al.,1992; CUNNINGHAN et al., 1994; ELLEDGE et al., 1995; SESHADRI et al., 1996), sugere que a indiferenciação nuclear está relacionada com a superexpressão da proteína p53. A dificuldade

na avaliação desse fator deve-se à falta de objetividade na sua leitura pelos patologistas. Apesar de estarem bem descritos e definidos os critérios para a classificação do grau nuclear, implicam na análise subjetiva, levando a discordância entre os patologistas, quando se avalia um mesmo caso (BLACK & SPEER; 1957; BLACK, et al., 1975; GILCHRIST et al., 1985; McGUIRE, 1988).

No presente estudo conseguimos avaliar o receptor de estrógeno antes da ação da quimioterapia através do método imuno-histoquímico em apenas 30 casos. Destas, somente 30% apresentaram positividade para tal receptor, resultado inferior aos descritos na literatura, decorrente, talvez, do tamanho da amostra. A superexpressão da proteína p53 foi mais freqüente nos tumores sem o receptor de estrógeno, embora sem diferença estatisticamente significativa.

Na literatura, o receptor de estrógeno é o fator mais citado e correlacionado com o p53, talvez por tratar-se de um dos fatores prognósticos mais estudados e conhecidos e da sua grande aplicabilidade na prática clínica. Vários autores relatam a associação significativa da superexpressão da proteína p53 com a ausência do receptor de estrógeno (DAVIDOFF et al., 1991; THOMPSON et al., 1992; FRIEDRICHS et al., 1993; CUNNINGHAN et al., 1994; MARKS et al., 1994; STENMARK-ASKMALM et al., 1994; CIESIELSKI et al., 1995; ELLEDGE et al., 1995; STENMARK-ASKMALM et al., 1995; SESHADRI et al., 1996). Entretanto, observa-se alguns resultados discordantes (GÖHRING et al., 1995). Como a ausência da proteína receptora

de estradiol é considerada uma indiferenciação celular, a superexpressão da proteína p53 significaria também uma indiferenciação e maior agressividade tumoral.

Face ao exposto observa-se uma tendência a correlacionar a superexpressão da proteína p53 com outros fatores prognósticos desfavoráveis em câncer da mama. De fato, verificou-se também uma associação entre essa superexpressão e curtas sobrevidas, principalmente nas pacientes com envolvimento linfonodal axilar (CUNNINGHAM et al., 1994; MARKS et al., 1994; BECK et al., 1995).

Os resultados da expressão da proteína p53 que observamos, assim como as divergências encontradas na literatura, devem-se, provavelmente, às diferentes metodologias de exame utilizadas. A frequência da expressão da proteína p53 é variável conforme a técnica utilizada, se imuno-histoquímica ou reação em cadeia de polimerase.

A técnica da imuno-histoquímica é a mais comumente utilizada, consistindo na detecção da expressão aumentada da proteína p53 mutante, que tem meia-vida mais longa em comparação com a forma “wild” .

Em análise de 84 estudos utilizando essa técnica chegou-se a uma média de sensibilidade de 75% e a um valor preditivo positivo de 63% (GREENBLATT et al., 1994). Já a técnica da reação em cadeia de polimerase, que inclui o polimorfismo na conformação da cadeia simples e eletroforese de gradiente de gel denaturante, identifica a mutação do gene na banda do DNA. Possui uma sensibilidade de aproximadamente 90% em detectar mutações

confirmadas através da seqüência do DNA. (GREENBLATT et al., 1994) Uma comparação da técnica da imuno-histoquímica com a reação em cadeia da polimerase, demonstrou uma concordância de 83% nos casos p53 positivos. (MARCHETTI et al., 1993).

Outro fator que pode influenciar nas variações no nível de detecção pela imuno-histoquímica é a utilização de diferentes anticorpos monoclonais, como DO-7, Pab 1801, Pab 240 e Pb 421 e a reação imuno-histoquímica não reflete necessariamente uma mutação do gene p53 (JACQUEMIER et al., 1994; BROTHERICK, et al., 1995). A técnica da imuno-histoquímica pode também oferecer problemas de interpretação; alguns autores consideram também positivos a coloração do citoplasma e não somente do núcleo (BARTEK et al., 1990; STENMARK-ASKMALM et al., 1994). No nosso estudo, consideramos apenas a coloração nuclear. A literatura diverge também em relação à interpretação da positividade, sendo que alguns autores consideram qualquer porcentagem de células com seus núcleos corados como positivos (FRIEDRICHS et al., 1993) e outros, como no presente estudo, estabelecem um valor de corte para positividade de no mínimo 10% das células coradas por campo.

Neste estudo tivemos as mesmas dificuldades e discrepâncias encontradas por diversos autores na avaliação da resposta tumoral (BÉLEMBAOGO et al., 1992; MOSKOVIC et al., 1993; FOROUHI et al., 1994; VINNICOMBE et al., 1996). Considerando o trabalho de MacGROGAN et al., (1996) que define como ideal a confirmação da regressão tumoral pela análise

microscópica, realizamos a avaliação da resposta tumoral com base no exame anatomopatológico. Portanto, para efeito do cálculo da resposta, consideramos como tamanho inicial as duas medidas do nódulo através da mamografia e, para avaliação do tamanho final após a ação da quimioterapia, a medida anatomopatológica obtida com a ressecção cirúrgica. Acreditamos assim que a avaliação da resposta tumoral à quimioterapia primária aproximou-se mais da realidade.

Quando correlacionamos a expressão da proteína p53 com a resposta à quimioterapia primária, observamos que cerca de 60% das pacientes, tanto das que tinham tumores p53 positivos como p53 negativos, apresentaram resposta objetiva ao tratamento. Portanto, aparentemente, a avaliação da proteína p53 não prediz resposta à quimioterapia.

Entretanto, dos seis casos de redução completa histológica de neoplasia invasora, três sem doença residual e três com carcinoma *in situ*, quatro (66,6%) apresentavam superexpressão da proteína p53 (ANEXO 3 - TABELA A6). Apesar deste pequeno número de casos, acreditamos que tumores com gene p53 mutante, tenham maior possibilidade de apresentar redução total com a quimioterapia.

MAKRIS et al. (1995), ao avaliarem a expressão da proteína p53 nas pacientes submetidas à quimioterapia primária em conjunto com endocrinoterapia, não encontraram uma diferença estatisticamente significativa quanto a resposta ao tratamento e, MacGROGAN et al.(1996) também não

encontraram associação da expressão da proteína p53 com resposta à quimioterapia primária.

FAILLE et al., (1994), em estudo utilizando quimioterapia neo-adjuvante em pacientes portadoras do carcinoma localmente avançado da mama, relataram baixa taxa de resposta nas mulheres que apresentavam expressão aumentada da proteína p53, embora sem significância estatística, sendo que a associação significativa relatada foi verificada *in vitro*, entre a superexpressão da proteína p53 com a quimiorresistência (KOECHLI et al., 1994).

Entretanto, os resultados com quimioterapia adjuvante são ainda mais contraditórios. Pacientes com carcinoma apresentando metástase axilar e superexpressão da proteína p53 têm uma maior resposta à quimioterapia adjuvante (ALLRED et al., 1993), e aquelas sem metástases axilar e sem essa superexpressão apresentam uma tendência a um maior benefício da quimioterapia (ELLEEDGE et al., 1995). Por outro lado, outro estudo não encontrou essa mesma correlação, mesmo utilizando quimioterapia em altas doses (MUSS et al., 1994).

Apesar dos dados controversos, o gene p53 do tipo “wild”, selvagem, natural ou não mutante, desempenha papel importante na manutenção da estabilidade do genoma, tanto da célula normal como da célula tumoral. Age como fiscalizador do ciclo celular, de maneira que quando ocorre um dano do DNA, ele bloqueia transitoriamente o ciclo na fase G1 ou conduz a célula à apoptose ou morte celular programada. Já o gene p53 mutante perderia esta função de fiscalização, ocasionando um descontrole do ciclo celular, permitindo

a indução de uma seleção clonal pela ação da quimioterapia (MOLL et al., 1995).

Em relação aos efeitos da quimioterapia sobre o padrão de expressão da proteína p53 existem poucos relatos na literatura. No nosso estudo, fizemos uma análise apenas qualitativa da expressão da proteína p53 antes e após a ação da quimioterapia. A maior parte (89,5%) dos tumores inicialmente p53 negativos permaneceram negativos após a ação da quimioterapia e, em contrapartida, 43,8% dos tumores inicialmente p53 positivos apresentaram negatificação da expressão da proteína p53, embora a análise estatística não tenha mostrado significância. Neste último grupo, provavelmente, a quimioterapia favoreceu a seleção de clones celulares menos agressivos. Somente um seguimento destas pacientes, traria informações sobre a sua evolução.

Outro estudo relata também as mudanças no padrão do p53 associados à quimioterapia, ocorrendo em 39% dos casos (12/31), sendo a maioria delas dos tipos inicialmente mutantes do gene p53. Segundo esse trabalho, as células tumorais com gene p53 alterado seriam genomicamente menos estáveis e sofreriam um rearranjo clonal sob a ação das drogas (MOLL et al., 1995). Apesar disso, esses autores não conseguiram relacionar p53 com a resposta à quimioterapia.

Nossos dados divergem do trabalho de RASBRIDGE et al. (1994), que ao estudarem, num grupo de 35 pacientes, os efeitos da quimioterapia sobre a expressão da proteína p53, encontraram como alterações mais relevantes a

positivação da expressão da proteína nos tumores inicialmente p53 negativos. Tal fato foi atribuído a um aumento do nível da proteína normal em resposta ao dano genotóxico causado pelas drogas e não ao aparecimento de novas mutações do gene p53. Essa explicação vai contra o estudo de MOLL et al. (1995), o qual infere que os níveis aumentados da proteína decorrentes do efeito da droga são transitórios, atingindo o máximo em 16 a 24 horas, sofrendo, posteriormente, um declínio. A avaliação da expressão da proteína p53, que é realizada quatro semanas após a exposição às drogas quimioterápicas refletiriam, portanto, a expressão real e permanente da proteína p53 (MOLL et al., 1995).

É necessário que mais pesquisas sejam realizadas para aprofundar os conhecimentos em relação ao comportamento em nível celular do câncer da mama. Apesar dos inúmeros relatos sobre os fatores indicativos do prognóstico, ainda não está definido seu valor, individual ou em associação com outros, pois num mesmo tumor pode-se encontrar fatores de bom e de mau prognóstico.

Ainda são poucos os fatores utilizados na prática clínica, os considerados como fatores bem estabelecidos - tamanho tumoral, estado linfonodal axilar, receptor de estrógeno e invasão vascular linfática - como base para indicação da terapêutica sistêmica complementar nos casos do câncer da mama considerados ressecáveis. Assim, esses fatores prognósticos podem indicar a necessidade de tratamentos mais agressivos devido a possibilidade de recidivas, porém, a necessidade não significa resposta ao tratamento.

Apesar da realização da quimioterapia, muitas pacientes ainda vão apresentar recidiva da doença. É necessário, portanto, o conhecimento de fatores que possam prever a resposta à quimioterapia ou mais ainda, a resposta a determinadas drogas antitumorais. Na prática existem poucos marcadores clínicos e biológicos que podem prever resposta à quimioterapia, ao contrário da endócrina (SMITH & POWLES, 1991).

Até a década de 80, os resultados sobre a eficácia da quimioterapia adjuvante nos tumores ressecáveis eram analisados retrospectivamente após um longo período de seguimento. Assim, a quimioterapia adjuvante mostrou-se eficaz, aumentando a sobrevida das pacientes com axila positiva, na fase da pré e pós-menopausa, e naquelas com axila negativa cujos tumores não tinham receptor de estrogênio (BONADONNA et al., 1986; FISHER et al., 1989).

A partir de então começou-se a utilizar a quimioterapia como tratamento inicial do câncer da mama operável, com os objetivos de promover a redução do volume tumoral e possibilitar a realização de cirurgias menos extensas, ou mesmo não realizá-las, empregando apenas a radioterapia como tratamento locorregional e iniciar precocemente o tratamento sistêmico.

Com essa nova modalidade de tratamento, surgiu a possibilidade de avaliar-se em modelo humano o efeito imediato da quimioterapia. Assim, a quimioterapia primária permitiu a análise do comportamento de alguns fatores prognósticos com relação a resposta ao tratamento, resultando no conhecimento de que tumores de menor tamanho, sem receptor de estrogênio e com alto índice de proliferação celular responderam melhor à quimioterapia

(BONADONNA et al., 1990). No presente estudo, a expressão da proteína p53 não exerceu influência na resposta à quimioterapia primária, não tendo demonstrado valor na seleção de pacientes que poderiam responder ao tratamento. A superexpressão da proteína p53 poderia ser utilizada como mais um fator prognóstico da evolução da paciente e a sua associação com outros fatores de mau prognóstico, poderia servir para indicação de tratamentos sistêmicos mais agressivos. Portanto, faz-se necessário, ainda, que mais estudos sejam realizados para definir melhor o real valor do gene p53 mutante no câncer da mama, e sua importância em relação a outros fatores prognósticos.

6. CONCLUSÕES

1. A expressão da proteína p53 foi mais freqüente em pacientes na pós-menopausa, embora sem significância estatística .
2. A expressão da proteína p53 aumentou progressivamente de acordo com o tamanho do tumor, mas sem significância estatística.
3. Os tumores com grau nuclear indiferenciados (GN 3) apresentaram uma maior freqüência de positividade da expressão da proteína p53, embora sem significância estatística.
4. Os tumores sem receptor de estrógeno apresentaram uma maior freqüência de positividade da expressão da proteína p53, mas sem significância estatística.
5. Não houve correlação entre a expressão inicial da proteína p53 e a resposta à quimioterapia primária.
6. A quimioterapia negatizou a expressão da proteína p53 de uma maneira não estatisticamente significativa.

7. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the correlation of p53 protein expression and the tumor response to the primary chemotherapy in patients presenting resectable breast carcinoma. A correlation was established also between other characteristics of the patients and the tumors, such as, menstrual status, tumor size, nuclear grade and estrogen receptor. Finally, the possibility of the chemotherapeutic influence on the p53 protein expression pattern was studied by comparing the initial expression with the final expression. This study was clinical, experimental, partially retrospective and prospective, and performed in a total of 65 patients. These patients were seen at the Breast Disease Outpatient Clinic of University of Campinas and submitted to three cycles of chemotherapy followed by surgery. The p53 protein expression and the estrogen receptor were evaluated through the immunohistochemical technique by utilizing the monoclonal antibodies D07 and 1D5, respectively. The influence of p53 protein expression on the response degree to the primary chemotherapy was not observed. p53 protein expression presented higher correlation to postmenopausal patients, to the tumors size, to high nuclear grades, to the negative estrogen receptors, although without significant

statistical difference. The chemotherapy modified the p53 protein expression pattern, in about 20% of the cases. Comparing the final with the initial patterns of the p53 protein expression, it was observed that from the initially positive cases, 43.8% became negative after the chemotherapy, against 10,5 % of the initially negative that became positive, but without statistical significance.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.; FUQUA, S.A.W.; BROWN, R.W.; CHAMNESS, G.C.; OSBORNE, C.K.; McGUIRE, W.L. - Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, **85**: 200-6, 1993.

ANDERSEN, T.I.; HOLM, R.; NESLAND, J.M.; HEIMDAL, K.R.; OTTESTAD, L.; BORRENSEN, A-L. - Prognostic significance of Tp53 alterations in breast carcinoma. **Br. J. Cancer**, **68**: 540-8, 1993.

ANDERSON, E.D.C.; FORREST, A.P.M.; HAWKINS, R. A., ANDERSON, T.J.; LEONARD, R.C.F.; CHETTY, U. - Primary systemic therapy for operable breast cancer. **Br. J. Cancer**, **63**:561-6, 1991.

ANSFIELD, F.J. - **Chemotherapy of malignant neoplasms**. Ch. C. Thomas Books, Springfield, 1973, p. 193.

BALLARE, C.; BRAVO, A.I.; SORIN, I.; GUSMAN, N.; SCHIAFFI, J.A.; YOMHA, R.; BAGNATI, A.; LEMA, B.; MORDOH, J. - The expression of progesterone receptors coincides with arrest of DNA synthesis in human breast cancer. **Cancer**, **67**: 1352-8, 1991.

- BARNES, D.M.; DUBLIN, E.A.; FISHER, C.J.; LEVISON, D.A.; MILLIS, R.R -
Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an
important new independent indicator of prognosis? **Hum. Pathol.**, **24**:469-
76, 1993.
- BARTEK, J.; BARTKOVA, J.; VOJTESEK, B.; STASKOVA, Z.; REJTHAR, A;
KOVARIK, J.; LANE, D.P. - Patterns of expression of the tumor supressor
in human breast tissues and tumors *in situ* and *in vitro*. **Int. J. Cancer**, **46**:
839-44, 1990.
- BAUM, M. & AFIFI, R. - Adjuvant endocrine therapy. In: POWLES, T.J. &
SMITH, I.E. - **Medical Management of Breast Cancer**. **J.B. Lippincott
Co., Philadelphia**, 1991, p.231-42.
- BECK, T.; WELLER, E.E.; WEIKEL, W.; BRUMM, C.; WILKENS, C.; KNAPSTEIN,
P.G. - Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of
breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with
the proliferation marker, MIB -1. **Gynecol. Oncol.**, **57**:96-104, 1995.
- BÉLEMBAOGO, E.; FEILLEL, V.; CHOLLET, P.; CURÉ, H.; VERRELLE, P.;
KWIATKOWSKI, F; ACHARD, J.L.; LE BOUEDEC, G.; CHASSAGNE, J.;
BIGNON, Y.J.; LATOUR, M.; LAFAYE, C.; DAUPLAT, J. - Neoadjuvant
chemotherapy in 126 operable breast cancer. **Eur. J. Cancer**, **28**:896-
900, 1992.
- BLACK, M.M.& SPEER, F.D. - Nuclear structure in cancer tissues. **Surg.
Gynecol. Obstet.**, **105**:97-102, 1957.
- BLACK, M.M.; BARCLAY, T.H.C.; HANKEY, B.F. - Prognosis in breast cancer
utilizing histologic characteristics of the primary tumor. **Cancer**, **36**:2048-
55, 1975.

- BODEY, B.; BODEY, B. JR.; GROGER, A.M.; LUCK, J.V.; SIEGEL, S.E.; TAYLOR, C.R.; KAISER, H.E. - Immunocytochemical detection of the p170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cells: clinical and therapeutical significance. **Anticancer. Res.**, **17**:1311-8, 1997.
- BONADONNA, G.; ROSSI, A.; VALAGUSSA, P. - Adjuvant CMF chemotherapy in operable breast cancer: ten years later. **World Surg.**, **9**:707-13, 1985.
- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; TANCINI, G.; ROSSI, A.; BRAMBILLA, C.; ZAMBETTI, M.; BIGNAMI, P.; DI FRONZO, G.; SIVESTRINI, R. - Current status of Milan adjuvant chemotherapy trials for node-positive and node-negative breast cancer. **N.C.I. Monogr.**, **1**:45-9, 1986.
- BONADONNA, G. - Conceptual and practical advances in the management of breast cancer. Karnofsky Memorial Lecture. **J. Clin. Oncol.**, **7**:1380-97, 1989.
- BONADONNA, G., VERONESI, U.; BRAMBILLA, C.; FERRARI, L.; LUINI, A.; GRECO, M.; BARTOLI, C.; YOLDI, G.C.; ZUCALI, R.; RILKE, F.; ANDREOLA, S.; SILVESTRINI, R.; DI FRONZO, G.; VALAGUSSA, P. - Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**:1539-45, 1990.
- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; ZUCALI, R.; SALVADORI, B. - Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. **CA. Cancer J. Clin.**, **45**:227-43, 1995.
- BONADONNA, G. & VALAGUSSA, P. - Primary chemotherapy in operable breast cancer. **Sem. Oncol.**, **23**:464-74, 1996.

- BRITISH BREAST GROUP. - Assessment of response to treatment in advanced breast cancer. **Lancet**, **2(7871)**:38-9, 1974.
- BROTHERICK, I.; SHENTON, B.K.; COWAN, W.K.; ANGUS, B.; HORNE, C.H.W.; HIGGS, M.J.; LENNARD, T.W.J. - p53 expression measured by flow cytometry. A comparison of three monoclonal antibodies and the relation ship with grade and DNA ploidy in breast cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, **41**:146-50, 1995.
- CALEFFI, M.; TEAGUE, M.W.; JENSEN, R.A.; VNENCAK-JONES, C.L.; DUPONT, W.D.; PARL, F.F. - p53 mutations and steroid receptor status in breast cancer. **Cancer**, **73**: 2147-56, 1994.
- CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E.- Relation of tumor size, limph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, **63**:181-7, 1989.
- CATTORETTI, G.; RILKE, F.; ANDREOLA, S.; D'AMATO, L.; DELIA, D. - p53 expression in breast cancer. **Int. J. Cancer**, **41**:178-83, 1988.
- CHEN, P.; CHEN, Y.; BOOKSTEIN, R.; LEE, W. - Genetic mechanisms of tumor supression by the human p53 gene. **Science**, **250**:1576-80, 1990.
- CHOLLET, P.; CHARRIER, S.; BRAIN, E.; CURE, H.; VAN PRAAGH, I.; FEILLEL, V.; DE LATOUR, M.; DAUPLAT, J.; MISSET, J.L.; FERRIERE, J.P. - Clinical and pathological response to primary chemotherapy in operable breast cancer. **Eur. J. Cancer**, **33**:862-6, 1997.
- CIESIELSKI, D.; DZIEWULSKA-BOKINIEK, A.; ZOLTOWSKA, A.; ROSKIEWICZ, A.; KOPACZ, J.; WOJTACKI, J. - p53 expression in breast cancer related to prognostic factors. **Neoplasma**, **42**:235-7, 1995.

- CUNNINGHAM, J.M.; INGLE, J.N.; JUNG, S.H.; CHA, S.S.; WOLD, L.E.;
FARR, G.; WITZIG, T.E.; KROOK, J.E.; WIEAND, H.S.; KOVACH, J.S. -
p53 gene expression in node-positive breast cancer: relationship to DNA
ploidy and prognosis. **J. Natl. Cancer Inst.**, **86**:1871-3, 1994.
- DAVIDOFF, A.M.; HERNDON II, J.E.; GLOVER, N.S.; KERNS, B.M.; PENCE, J.C.;
IGLEHART, J.D.; MARKS, J.R. - Relation between p53 overexpression and
established prognostic factors in breast cancer. **Surgery**, **110**:259-64, 1991.
- DECLARACIÓN DE HELSINKI. Recomendaciones para guiar a los medicos en
la investigacion biomedica en seres humanos. **Bol. Of. Sanit. Panam.**,
108:626-37, 1990.
- DE LENA, M.; ZUCALI, R.; VIGANOTTI, G.; VALAGUSSA, P.; BONADONNA,
G. - Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced
(T3b-T4) breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, **1**:53-9, 1978.
- ELLEDGE, R.M.; GRAY, R.; MANSOUR, E.; YU, Y.; CLARK, G.M.; RAVDIN, P.;
OSBORNE, C.K.; GILCHIRIST, K.; DAVIDSON, N.E.; ROBERT, N.; TORMEY,
D.C.; ALLRED, D.C. - Accumulation of p53 protein as a possible predictor
of response to adjuvant combination chemoterapy with cyclophosphamide,
methotrexate, fluoracil, and prednisone for breast cancer. **J. Natl. Cancer
Inst.**, **87**:1254-8, 1995.
- FAILLE, A.; DE CREMOUX, P.; EXTRA, J.M.; LINARES, G.; ESPIE, M.;
BOURSTYN, E.; DE ROCQUANCOURT, ^a; GIACCHETTI, S.; MARTY, M.;
CALVO, F. - p53 mutations and overexpression in locally advanced breast
cancers. **Br. J. Cancer**, **69**:1145-50, 1994.
- FARMER, G.; BARGONETTI, J.; ZHU, H.; FRIEDMAN, P.; PRYWES, R.;
PRIVES, C. - Wild-type p53 activates transcription in vitro. **Nature**,
358(6381):83-6, 1992.

FINLAY, C. A. ; HINDS, P.W.; LEVINE, A.J.- The p53 proto-oncogene can act as a supressor of transformation. **Cell**, **57**:1083-93, 1989.

FISHER, B.; SLACK, N.H.; BROSS, I.D.J.; COOPERATIVE INVESTGATORS. - Cancer of the breast: size of neoplasma and prognosis. **Cancer**, **24**:1071-80, 1969.

FISHER, B.; REDMOND, C.; FISHER, E.R.; CAPLAN, R.; NSABP INVESTIGATORS. - Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. **J. Clin. Oncol.**, **6**:1076-87, 1988.

FISHER, B.; REDMOND, S.C.; DIMITROV, N.V.; BOWMAN, D.; LEGAULT-POISSON, S.; WICKERHAM, L.; WOLMARK, N.; FISHER, E.R.; MARGOLESE, R.; SUTHERLAND, C.; GLASS, A; FOSTER, R.; CAPLAN, R.; E.; and others. - A randomized clinical trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. **N. Engl. J. Med.**, **320**:473-8, 1989.

FISHER, B.; BROWN, A.; MAMOUNAS, E.; WIEAND, S.; ROBIDOUX, A.; MARGOLESE, R.G.; CRUZ, A.B.; FISHER, E.R.; WICKERHAM, D.L.; WOLMARK, N.; DeCILLIS, A.; HOEHN, J.L.; LEES, A.W.; DIMITROV, N.V. - Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer; findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **J. Clin. Oncol.**, **15**:2483-93, 1997.

FORNAGE, B.D.; TOUBAS, O.; MOREL. M. - Clinical, mammographic, and sonographic determination of preoperative breast cancer size. **Cancer**, **60**:765-71, 1987.

FOROUHI, P.; WALSHI, J.S.; ANDERSON, T.J.; CHETTY, U. - Ultrasonography as a method of measuring breast tumour size and monitoring response to primary systemic treatment. **Br. J. Surg.**, **81**:223-5, 1994.

FRIEDRICHS, K.; GLUBA, S.; EIDTMANN, H.; JONAT, W. - Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. **Cancer**, **72**:3641-7, 1993.

GASPARINI, G.; WEIDNER, N.; BEVILACQUA, P.; MALUTA, S.; PALMA, P.D.; CAFFO, O.; BARBARESCHI, M.; BORACCHI, P.; MARUBINI, E.; POZZA, F. - Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumor lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, **12**:454-66, 1994.

GILCHRIST, K.W.; KALISH, L.; GOULD, V.E.; HIRSCHL, S.; IMBRIGLIA, J.E.; LEVY, W.M.; PATCHEFKY, A.S.; PENNER, D.W.; PICKREN, J.; ROTH, J.A. - Interobserver reproducibility of histopathological features in stage II breast cancer: An ECOG study. **Breast Cancer Res. Treat.**, **5**:3-10, 1985.

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. Gynecol. Obstet.**, **256**: 139-46, 1995.

GORCZYCA, W.; BIGMAN, K.; MITTELMAN, A.; AHMED, T.; GONG, J.; MELAMED, M.R.; DARZYNKIEWICZ, Z. - Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemia. - **Leukemia**, **7**: 659-70, 1993.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. - Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, **54**: 4855-78, 1994.

- HALL, P.A. & LANE, D.P. - p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? - Revisited! **J. Pathol.**, **172**:1-4, 1994.
- HARRIS, L. & SWAIN, S.M. - The role of primary chemotherapy in early breast cancer. **Sem. Oncol.**, **23**:31-42, 1996.
- HAYWARD, J.L.; CARBONE, P.P.; HEUSON, J.C.; KUMAOKA, S.; SEGALOFF, A.; RUBENS, R.D. - Assessment of response to therapy in advanced breast cancer: a project of the Programme on Clinical Oncology of the International Union Against Cancer, Geneva, Switzerland. **Cancer**, **39**:1289-94, 1977.
- HEGG, R. - **Superexpressão do oncogene HER-2/NEU em carcinomas de mama, Análise clínica e imuno-histoquímica.** São Paulo, 1992. Tese de Livre-Docência - Universidade de São Paulo.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.** **75**:734-8, 1981.
- HURLINANN, J.; CHAUBERT, P.; BENHATTAR, J. - p53 alterations and p53 protein accumulation in infiltrating ductal breast carcinomas: correlations between immunohistochemical and molecular biology techniques. **Mol. Pathol.** **7**:423-8, 1994.
- ISOBE, M.; EMANUEL, B.S.; GIVOL, D.; OREN, M.; CROCE, C.M. - Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, **320**:84-5, 1986.
- ISOLA, J.; VISAKORP, T.; HOLLI, K.; KALLIONIEMI, O.P. - 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.**, **84**:1109-14, 1992.

JACQUEMIER, J.; MOLÈS, J.P.; PENAULT-LLORCA, F.; ADÉLAIDE, J.; TORRENTE, M.; VIENS, P.; BIRNBAUM, D.; THEILLET, C. - p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. **Br. J. Cancer**, **69**: 846-52, 1994.

JACQUILLAT, C.; WEIL, M.; BAILLET, F.; BOREL, C.; AUCLERC, G.; MAUBLANC, M. A.; HOUSSET, M.; FORGET, G.; THILL, L.; SOUBRANE, C.; KHAYAT, D. - Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. **Cancer**, **66**:119-29, 1990.

KAUFFMANN, S.H. - Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. **Cancer Res.**, **49**:5870-8, 1989.

KERN, S.E.; KINZLER, K.W.; BRUSKIN, A.; JAROSZ, D.; FRIEDMAN, P.; PRIVES, C.; VOLGESTEIN, B. - Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. **Science**, **252**:1708-11, 1991.

KOECHLI, O.R.; SCHAER, G.N.; SEIFERT, B.; HORNUNG, R.; HALLER, U.; EPPENBERGER, U.; MUELLER, H. - Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. **Lancet**, **344**:1647-8, 1994.

LANE, D.P. & BENCHIMOL, S. - p53: oncogene or anti-oncogene? **Genes Dev.**, **4**:1-8, 1990.

LANE, D.P. - p53 guardian of the genome. **Nature**, **358**:15-6, 1992.

- LINN, S.C.; HONKOOOP, A.H.; HOEKMAN, K.; VAN DER VALK, P.; PINEDO, H.M.; GIACCONE, G. - p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer. **Br. J. Cancer**, **74**: 63-8, 1996.
- LINN, S.C.; PINEDO, H.M.; VAN ARK-OTTE, J.; VAN DER VALK, P.; HOEKMAN, K.; HONKOOOP, A.H.; VERMORKEN, J.B.; GIACCONE, G. - Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. **Int. J. Cancer**, **71**:787-95, 1997.
- LIPPONEN, P.; JI, H.; AALTOMAA, S. - p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. **Int. J. Cancer**, **55**:51-6, 1993.
- LOHMANN, D.; RHUNI, C.; SCHIMITT, M.; GRAEFF, H. - Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation on breast cancer. Occurrence of false-positives and false negatives. **Diagnost. Mol. Pathol.**, **2**:36-41, 1993.
- LOWE, S.W.; BODIS, S.; McCLATCHEY, A.; REMINGTON, L.; RULEY, H.E.; FISHER, D.E.; HOUSMAN, D.E.; JACKS, T. - p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. **Science**, **266**: 807-10, 1994.
- LUNDY, J.; SCHUSS, A.; STANICK, D.; McCOMACK, E.S.; KRAMER, S.; SORVILLO, J.M. - Expression of *neu* protein, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in breast cancer. **Am. J. Pathol.**, **138**:1527-34, 1991.
- MacGROGAN, G.; MAURIAC, L.; DURAND, M.; BONICHON, F.; TROJANI, M.; DE-MASCAREL, L.; COINDRE, J.M. - Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection

of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, pS2, MiB-1 and GSTpi. **Br. J. Cancer**, **74**:1458-65, 1996.

MAKRIS, A.; POWLES, T.J.; DOWSETT, M.; ALLRED, C. - p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. **Lancet**, **345**:1181-2, 1995.

MANSOUR, E.G.; GRAY, R.; SHATILA, A.H.; OSBORNE, C.K.; TORMEY, D.C.; GILCHRIST, K.W.; COOPER, M.R.; FALKSON, G. - Efficacy of adjuvant chemotherapy in high risk node-negative breast cancer: An intergroup study. **N. Engl. Med.**, **320**:485-90, 1989.

MARCHETTI, A.; BUTTITTA, F.; PELLEGRINI, S.; CAMPANI, D.; DIELLA, F.; CECCHETTI, D.; CALLAHAN, R.; BISTOCCHI, M. - p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. **Cancer Res.**, **53**:4665-9, 1993.

MARKS, J.R.; HUMPHREY, P.A.; WU, CATHERINE; BERRY, D.; BANDARENKO, N.; KERNS, B.J.M.; IGLEHART, J.D. - Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. **An. Surg.**, **219**:332-41, 1994

MARTINAZZI, M.; CRIVELLI, F.; ZAMPATTI, C; MARTINAZZI, S. - Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, **100**:213-7, 1993.

MAURIAC, L.; DURAND, M.; AVRIL, A.; DILHUYDY, J.M. - Effects of primary chemotherapy in conservative treatment of breast cancer patients with operable tumors larger than 3 cm. **Ann. Oncol.**,**2**:347-54, 1991.

McGUIRE, W.L. - Estrogen receptor versus nuclear grade as prognostic factors in axillary node negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, **6**:1071-2, 1988.

McGUIRE, W.L.; TANDON, A.K.; ALLRED, D.C.; CHAMNESS, G.C.; CLARK, G.M. - How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**:1006-15, 1990.

MEDEN, H.; NEUES, K.P.; ROBEN-KAMPKEN, S.; KUHN, W. - Aclinical, mammographic, sonographic and histologic evaluation of breast cancer. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, **48**:193-9, 1995.

MERKEL, D.E & OSBORNE, C.K. - Prognostic factors in breast cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, **3**:641-52, 1989.

MILNER, J. - The role of p53 in normal control of cell proliferation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **3**: 282-6, 1991.

MOLL, U.M.; OSTERMEYER, A.G.; AHOMADEGBE, J.C.; MATHIEU, M.C.; RIOU, G. - p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage; a preliminary study in matched pairs of breast cancer biopsies. **Hum. Pathol.**, **26**:1293-301, 1995.

MONTENARH, M. - Functional implications of the growth-suppressor/oncoprotein p53. **Int. J. Oncol.** **1**:37-45, 1992.

MOSKOVIC, E.C.; MANSI, J.L.; KING, D.M.; MURCH, C.R.; SMITH, I.E. - Mammography in the assessment of response to medical treatment of large primary breast cancer. **Clin. Radiol.**, **47**:339-44, 1993.

MUSS, B.H.; THOR, A.D.; BERRY, D.A.; KUTE, T.; LIU, E.T.; KOERNER, F.; CIRRICIONE, C.T.; BUDMAN, D.R.; WOOD, W.C.; BARCOS, M.; HENDERSON, C. - c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, **330**:1260-6, 1994.

- OSTROWSKI, J.L.; SAWAN, A.; HENRY, L.; WRIGHT, C.; HENRY, J. A.; HENNESSY, C.; LENNARD, T.J.W.; ANGUS, B.; HORNE, C.H.W. - p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. **J. Pathol.**, **164**:75-81, 1991.
- POLLER, D.N.; HUTCHINGS, C.E.; GALEA, M.; BELL, J.A.; NICHOLSON, R.A.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R.W.; ELLIS, I.O. - p53 protein expression in human breast carcinoma: relationship to expression epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein overexpression and oestrogen receptor. **Br. J. Cancer**, **66**: 583-8, 1992.
- RASBRIDGE, S.A.; GILLET, C.E.; SEYMOUR, A.M.; PATEL, K.; RICHARDS, M.A.; RUBENS, R.D.; MILLIS, R.R. - The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. **Br. J. Cancer**, **70**:335-41, 1994.
- RAGAZ, J. - Emerging modalities for adjuvant therapy of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy. **N. C. I. Monogr.** **1**:145-52, 1986.
- RAYCROFT, L.; WU, H.; LOZANO, G. - Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. **Science**, **249**: 1049-51, 1990.
- REMYKOS, Y.; BEUZEBOC, P.; ZAJDELA, A.; VOILLEMOT, N.; MAGDELÉNAT, H.; POILLART, P. - Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, **81**:1383-7, 1989.

- ROSEN, P.P.; LESSER, M.L.; ARROYA, C.D.; CRANOR, M.; BORGEN, P.; NORTON, L. - p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. **J. Clin. Oncol.**, **13**: 821-30, 1995.
- SCHOLL, S.M.; FOURQUET, A.; ASSELAIN, B.; PIERGA, J.Y.; VILCOQ, J.R.; DURAND, J.C.; DORVAL, T.; PALANGIÉ, T.; JOUVE, M.; BEUZÉBOC, P.; GARCIO-GIRALT, E.; SALMON, R.J.; ROCHEFORDIÈRE, A.; CAMPANA, F.; POUILLART, P. - Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumours considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomised trial: S6. **Eur. J. Cancer**, **30A**: 645-52, 1994.
- SESHADRI, R.; LEONG, A.S.Y.; McCAUL, K.; FIRGAIRA, F.A., SETLUR, V.; HORSFALL, D.J. - Relationship between p53 gene abnormalities and other tumor characteristics in breast-cancer prognosis. **Int. J. Cancer**, **69**: 135-41, 1996.
- SHINZATO, J.Y. - **Efeito da quimioterapia primária no carcinoma da mama com diâmetro entre 21 e 50mm: avaliação clínica, mamográfica e anatomopatológica.** Campinas, 1995. ?Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP?
- SILVESTRINI, R.; BENINI, E.; DARDONE, M.G. - p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. **J. Natl. Cancer Inst.**, **85**: 965-70, 1993.
- SMITH, I.E.; POWLES, T.J. - Chemotherapy: general principles. In POWLES, T.J.; SMITH, I.E. **Medical Management of Breast Cancer.** **J. B. Lippincott Co., Philadelphia**, 1991, p.125-32.

SMITH, I.E.; WALSH, G.; JONES, A.; PRENDIVILLE, J.; JOHNSTON, S.; GUSTERSON, B.; RAMAGE, F.; ROBERTSHAW, H.; SACKS, N.; EBBS, S.; MCKINNA, J.A.; BAUM, M. - High complete remission rates with primary neoadjuvant infusional chemotherapy for large early breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, **13**:424-9, 1995.

SORENSEN, C.M.; BARRY, M.A.; EASTMAN, A. - Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**: 749-55, 1990.

STENMARK-ASKMALM, M.; STÄL, O.; SULLIVAN, S.; FERRAUD, L.; SUN, X.F.; CARSTENSEN, J.; NORDENSKJÖLD, B. - Cellular accumulation of p53 protein: an independent prognostic factor in stage II breast cancer. **Eur. J. Cancer**, **30A(2)**:175-80, 1994.

STENMARK-ASKMALM, M.; STÄL, O.; OLSEN, K.; NORDENSKJÖLD, B. - p53 as a prognostic factor in stage I breast cancer. **Br. J. Cancer**, **72**: 715-9, 1995.

SYMONDS, H.; KRALL, L.; REMINGTON, L.; SAENZ-ROBLES, M.; LOWE, S.; JACKS, T.; VAN DYKE, T. - p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression *in vivo*. **Cell**, **78**: 703-11, 1994.

THOMPSON, A.M.; ANDERSON, T.J.; CONDIE, A.; PROSSER, J.; CHETTY, U.; CARTER, D.C.; EVANS, H.J.; STTEEL, C.M. - p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathological parameters. **Int. J. Cancer**, **50**: 528-32, 1992.

THOR, A.D.; MOORE, D.H.; EDGERTON, S.M.; KAWASAKI, E.S.; REIHSAN, E.; LYNCH, H.T.; MARCUS, J.N.; SHWARTZ, L.; CHEN, L.C.; MAYALL, B.H.; SMITH, H.S. - Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, **84**: 845-54, 1992.

- VALAGUSSA, P.; BONADONNA, G.; VERONESI, U. - Patterns of relapse and survival in operable breast carcinoma with positive and negative axillary nodes. **Tumori**, **64**:241-58, 1978.
- VAN KALKEN, C.K.; PINEDO, H.M.; GIACCONE, G. - Multidrug resistance from the clinical point of view. **Eur. J. Cancer**, **27**:1481-6, 1991.
- VINNICOMBE, S.J.; MacVICAR, A.D.; GUY, R.L.; SLOANE, J.P.; POWLES, T.J.; KNEE, G.; HUSBAND, J.E. - Primary breast cancer: mammographic changes after neoadjuvant chemotherapy, with pathologic correlation. **Radiology**, **198**:333-40, 1996.
- VOLGESTEIN, B. - A deadly inheritance. **Nature**, **348**: 681-2, 1990.
- WILTSCHKE, C.; KINDAS-MUEGGE, I.; STEININGER, A.; REINER, A.; REINER, G.; PREIS, P.N. - Coexpression of HER-2/*neu* and p53 is associated with a shorter disease free survival in node-positive breast cancer patients. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **120**: 737-42, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Research on the menopause. **WHO - Technical report**. Geneva, WHO, 1981.
- YIN, Y.; TAINSKY, M.A.; BISHOFF, F.Z.; STRONG, L.C.; WAHL, G.M. - Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell**, **70**: 937-48, 1992.

9. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses.
Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/
PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.

5. Tratamento Quimioterápico - Esquema: ? FEC ? CMF

6. Exames após a quimioterapia:

6.1. Tamanho tumoral clínico: ?? x ?? mm

6.2. Tamanho mamográfico: ?? X ?? mm

7. Resultado anatomopatológico após a cirurgia:

7.1. Tamanho: ?? x ?? mm

7.2.. Avaliação da resposta : 7.2.1. ? com resposta objetiva

? completa

? parcial ? 50%

7.2.2. ? sem resposta objetiva

? estacionária

? progressão

7.3. Tipo histológico: _____

7.4. Grau nuclear: 7.4.1. ? GN1 7.4.2. ? GN2 7.4.3. ? GN3

7.5. Linfonodos invadidos - N⁰ ?? :

7.6. Invasão vascular linfática: 7.6.1. ? presente 7.6.2. ? ausente

7.7. Receptor de estrógeno: 7.7.1. ? positivo 7.7.2. ? negativo

7.8. Expressão final da proteína p53: 7.8.1. ? Negativo

7.8.2. ? Positivo

? +

? ++

? +++

? ++++

ANEXO 3

Tabelas descritivas.

Do total de 65 pacientes da população em estudo, a idade variou de 26 a 68 anos com uma média de 49 anos. Quando estratificado por faixas etárias, a frequência maior ocorreu entre 45 e 54 anos (36,9%) (TABELA A1).

TABELA A1
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA

<i>Idade (anos)</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
25 - 34	4	6,2
35 - 44	18	27,7
45 - 54	24	36,9
55 - 64	14	21,5
65 - 70	5	7,7
Total	65	100

De acordo com o estado menstrual, a distribuição foi semelhante nas duas categorias, sendo que 55,4% das pacientes encontravam-se na fase da pré-menopausa (TABELA A2).

TABELA A2
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO O ESTADO MENSTRUAL

<i>Estado menstrual</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
pré-menopausa	36	55,4
pós-menopausa	29	44,6
Total	65	100

Avaliado em 28 casos, nenhum apresentou GN1, a maior parte (75%) tratava-se de grau nuclear moderadamente diferenciado (GN2) e o restante indiferenciado (GN3) (TABELA A3).

TABELA A3
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO O GRAU NUCLEAR
DO TUMOR PRÉVIO À QUIMIOTERAPIA

<i>Grau Nuclear</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
2	21	75
3	7	25
Total	28	100

Com relação ao receptor hormonal estrogênico, este foi avaliado em 30 casos, dos quais, a maior parte (70%) tratava-se de receptor negativo (TABELA A4).

TABELA A4
DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES SEGUNDO O RECEPTOR
DE ESTRÓGENO PRÉVIO À QUIMIOTERAPIA

<i>Receptor de Estrógeno</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
negativo	21	70
positivo	9	30
Total	30	100

Ao correlacionar-se a resposta objetiva à quimioterapia baseado nas modificações do padrão da expressão da proteína p53 com a quimioterapia, observou-se maior frequência desta resposta (61,7%) nas pacientes sem a expressão desta proteína inicialmente, que mantiveram inalteradas

TABELA A5
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DE ACORDO COM A MUDANÇA DO
PADRÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 APÓS QUIMIOTERAPIA

<i>p53</i>		<i>Total de casos</i>	<i>Resposta Objetiva</i>	
<i>pré QT</i>	<i>pós QT</i>		<i>n</i>	<i>n (%)</i>
Negativo	Negativo	34	21	(61,7)
Positivo	Positivo	9	4	(44,4)
Positivo	Negativo	7	3	(43,0)
Negativo	Positivo	4	2	(50,0)
Total		54	30	(55,5)

TABELA A6
EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM TUMORES COM
RESPOSTA COMPLETA À QUIMIOTERAPIA PRIMÁRIA

<i>p53</i>	<i>Receptor de Estrógeno</i>			
	<i>sem neoplasia</i>		<i>CIS</i>	
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>
Negativo	2	(66,7)	2	(66,7)
Positivo	1	(33,3)	1	(33,3)
Total	3	(100)	3	(100)