

RICARDO LAIER FRANCO

**Expressão tumoral da glutathione -transferase Pi e
sobrevida global e livre de doença em mulheres
com carcinoma de mama**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

**Unicamp
2008**

RICARDO LAIER FRANCO

**Expressão tumoral da glutathiona -transferase Pi e
sobrevida global e livre de doença em mulheres
com carcinoma de mama**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

**Unicamp
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F848e Franco, Ricardo Laier
Expressão tumoral da glutathione S-transferase Pi e
sobrevida global e livre de doença em mulheres com
carcinoma de mama / Ricardo Laier Franco.
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador : Maria Salete Costa Gurgel
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mamas - cancer. 2. Glutathione transferase.
3. Sobrevida. 4. Imuno-histoquímica. I. Gurgel,
Maria Salete. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Glutathione S-transferase Pi expression in invasive breast cancer and clinical outcome

Keywords:

- Breast cancer
- Glutathione transferase
- Survival
- Immunohistochemistry

Titulação: Mestre em Tocoginecologia
Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel
Prof. Dr. José Vassallo
Profa. Dra. Sylvia Michelina Brenna

Data da defesa: 22 - 08 - 2008

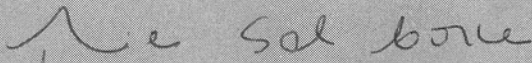
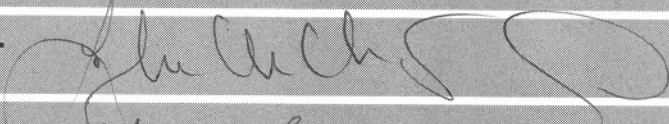
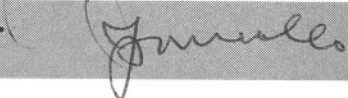
Diagramação e arte final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: RICARDO LAIER FRANCO

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

Membros:

1. 
2. 
3. 

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

Data: 22/08/2008

*Dedico este trabalho a Deus,
que me deu a chance de estudar,
ter uma profissão...*

Agradecimentos

Aos meus pais, Gesu e Margarida, por tudo que fizeram por mim na vida.

À minha esposa Laura, pelo estímulo, compreensão e carinho.

À Dr^a. Salete, pelo conhecimento e oportunidade.

Aos meus sogros, Ivanhoé e Maria Teresa, pelo incentivo.

À Natália e André Schenka, pela grande amizade e imenso suporte técnico.

À Rogéria e Gislaine, que me deram todo apoio no SAME.

À Marisa e Júlio, que foram primordiais para a realização deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM.

Ao Lúcio e à Sirlei, pela grande ajuda.

*A todos aqueles que não foram citados, mas estiveram comigo neste momento, meu
MUITO OBRIGADO.*

Agradecimentos Institucionais

Ao Departamento de Anatomia Patológica por ter cedido os blocos de parafina para a realização deste estudo.

Este estudo foi parcialmente financiado pelo Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX), solicitação: 69/2007, e pelo Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Summary.....	xi
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Publicação.....	23
4. Conclusões.....	45
5. Referências Bibliográficas.....	46
6. Anexos.....	51
6.1. Anexo 1 – Ficha de coleta de dados.....	51
6.2. Anexo 2 – Carta de aprovação pela Comissão de Pesquisa.....	53
6.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	54

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DP – Desvio-padrão

DTG – Departamento de Tocoginecologia

INCA – Instituto Nacional do Câncer

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – Significância estatística

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

WHO – World Health Organization

Resumo

Introdução: A glutathione S-transferase (GST) é um sistema enzimático localizado no citosol celular e é responsável pela eliminação de toxinas. Estudos realizados *in vitro* mostraram que a presença deste sistema nas células do carcinoma de mama pode promover a eliminação do quimioterápico, levando assim à diminuição da eficácia desta modalidade terapêutica em mulheres com carcinoma de mama que expressam tal sistema enzimático em suas células.

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre a expressão da enzima GST Pi em células tumorais e a sobrevida global e livre de doença em mulheres com carcinoma de mama submetidas a tratamento quimioterápico. **Sujeitos e Métodos:** Entre janeiro de 1995 e junho de 1997,

554 pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico para câncer de mama no CAISM-UNICAMP. Destas, 160 tinham entre 18 e 70 anos ao diagnóstico, doença não metastática, foram submetidas à quadrantectomia/mastectomia com margens livres e linfadenectomia axilar, seguida de quimioterapia adjuvante, e foram acompanhadas até agosto de 2006. Os blocos de parafina estavam disponíveis para 95 destas pacientes. Neles foi realizada a pesquisa da GST Pi através da reação de imuno-histoquímica e sua expressão foi correlacionada

com os dados clínicos obtidos de seus respectivos prontuários. **Resultados:** Dos 95 casos, 36 (38%) foram positivos para a expressão da GST Pi e 59 (62%) negativos. A expressão da GST Pi nas células tumorais não mostrou associação com a idade ao diagnóstico, tipo histológico do tumor, estágio da doença e expressão de receptores de estrogênio e progesterona. Os cânceres de mama com positividade para a enzima GST Pi mostraram associação significativa com tumores de grau histológico I e negatividade para a expressão da proteína HER-2. Não se observou associação com a sobrevida livre de doença e sobrevida global, após seguimento médio de 10,68 anos. **Conclusões:** Os achados deste estudo indicam que pacientes com tumores positivos para a enzima GST Pi têm o mesmo prognóstico do que pacientes com tumores negativos para GST Pi após serem tratados com quimioterapia.

Palavras-chave: Câncer de mama, glutathione S-transferase, sobrevida, imuno-histoquímica.

Summary

Introduction: The glutathione S-transferase is an enzymatic system located in the cytosol of the cells and it is responsible for the elimination of toxins. 'In vitro' studies showed that the presence of this enzymatic system in breast carcinoma cells can accelerate the elimination of the drug used in the chemotherapy. This would decrease the efficacy of this kind of treatment in women with GST Pi - positive breast cancer cells. **Objectives:** The scope of the present study was to evaluate the association between GST Pi-positive breast cancer and overall and disease free-survival in women with breast carcinoma submitted to chemotherapy. **Methods:** Between January, 1995 and July, 1997, 554 patients were undergone to breast cancer surgical treatment at CAISM-UNICAMP. Out of 554 patients, 160 were between 18 and 70 years old in the diagnosis, did not have metastatic disease, were submitted to quadrantectomy/mastectomy with free surgical margins and axillary dissection followed by adjuvant chemotherapy and had complete follow-up until August, 2006. The paraffin blocks were available for 95 of these patients. The immunohistochemical reactions were done and the GST Pi expression was correlated with the clinical data obtained from their respective medical records. **Results:** Of the 95 cases studied, 36 (38%) were positive for

the GST Pi expression and 59 (62%) did not express the enzymatic system. The expression of GST Pi in breast cancer cells showed no relation with age, histological type, stage of disease and estrogen and progesterone receptor status. The GST Pi-positive breast cancers showed a significant relation with lower histological grade tumors and with negativity of the expression of HER-2. Also, the expression of GST Pi had no relation with overall and disease free survival after a median follow-up of 10.68 years. **Conclusions:** The findings of this study indicate that patients with GST Pi-positive tumors have the same prognosis as patients with GST Pi-negative tumors after chemotherapy.

Key words: Breast cancer, glutathione S-transferase, survival, immunohistochemistry.

1. Introdução

O câncer de mama apresenta alta incidência e significativo índice de mortalidade entre as mulheres no Brasil. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimam-se que em 2008 ocorrerão 49.400 novos casos de câncer de mama em mulheres. Isto o torna o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil no ano de 2008 entre as mulheres, sendo superado apenas pelo câncer de pele não melanoma, cuja previsão para este ano são de 59.120 novos casos (INCA, 2007).

Como o câncer de mama possui entre seus fatores de risco a menarca precoce, a menopausa tardia, a primeira gestação após os 30 anos, a nuliparidade, a não amamentação, o uso de terapia de reposição hormonal, entre outros (Harris et al., 2000) - que são características mais comumente observadas em mulheres que vivem em países desenvolvidos - sua incidência é ainda maior nos países de Primeiro Mundo. Nos Estados Unidos da América, a previsão para o ano de 2008 é de 182.460 casos novos e 40.480 óbitos devido à

neoplasia (Jemal et al., 2008). Diante de tais números existe uma preocupação mundial quanto ao seu diagnóstico precoce e tratamento.

Apesar da incidência do carcinoma mamário permanecer elevada nos dias atuais, sua taxa de mortalidade vem diminuindo ao longo do tempo (Sant et al., 2004). Esse fato é atribuído basicamente a dois fatores: a realização do rastreamento do câncer de mama com a utilização da mamografia, possibilitando o diagnóstico em estágios mais precoces e aos grandes avanços no tratamento (Jones, 2005). O tratamento é, hoje, realizado por equipe multidisciplinar onde são integradas a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a hormonioterapia e, mais recentemente, a terapia-alvo com anticorpos monoclonais (Goldhirsch et al., 2003).

A quimioterapia é cada vez mais utilizada como uma arma terapêutica no tratamento do câncer de mama. Nos dias atuais, é preconizado o tratamento quimioterápico para quase todas as pacientes com tumores iguais ou maiores que um centímetro, independentemente de outros dados prognósticos, e em alguns tumores entre meio e um centímetro, com características de mau prognóstico (presença de alto grau histológico, invasão vaso-linfática, negatividade para receptores hormonais e expressão de HER-2), mesmo com linfonodos axilares isentos de neoplasia (NCCN, 2008).

No entanto, verifica-se resposta muito heterogênea dos tumores ao tratamento quimioterápico instituído (Mauri et al., 2005). Seria um grande progresso descobrir quais pacientes responderiam ou não à quimioterapia e qual o quimioterápico mais indicado para cada caso. Uma das opções cada vez mais

utilizadas para verificar se o tumor é, *in vivo*, sensível ou não ao medicamento indicado, é a quimioterapia pré-operatória (Kaufmann et al., 2003).

No câncer de mama, o tratamento adjuvante ou primário com quimioterapia já provou prolongar a sobrevida livre de doença e a sobrevida global através, possivelmente, da eliminação de focos de micrometástases indetectáveis pelos exames rotineiros. No entanto, pacientes no mesmo estágio clínico e que foram submetidas ao mesmo tratamento quimioterápico, tanto podem ficar muitos anos livres da doença como podem ter uma recidiva tumoral em curto espaço de tempo, mostrando, assim, a heterogeneidade da resposta ao tratamento (EBCTCG, 2005). Não se sabe exatamente a razão pela qual isso ocorre; supõe-se que seja devido a características intrínsecas do tumor (Colleoni et al., 2001).

Atualmente são publicados muitos estudos tentando individualizar o comportamento dos carcinomas de mama através de características próprias do tumor, como receptores hormonais, grau histológico, expressão do HER-2, painel genético, entre outras, tentando assim prever se a neoplasia responderá ou não ao tratamento quimioterápico proposto (Hamilton e Hortobagyi, 2005).

A descoberta do trastuzumabe – um exemplo de sucesso da terapia-alvo com anticorpos monoclonais – foi um grande avanço no sentido de individualização do tratamento das mulheres com carcinoma de mama que superexpressam a proteína HER-2. Dois importantes estudos mostraram que pacientes com tumores HER-2 positivo - que receberam a quimioterapia adjuvante tradicional associada ao trastuzumabe - tiveram significativamente menor chance de

recidiva em relação às pacientes que receberam somente a quimioterapia tradicional (Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005).

Esses dados mostram a importância da expressão destas proteínas pelas células tumorais, direcionando o desenvolvimento de medicamentos com ação específica sobre determinadas características das células tumorais. Uma característica que vem sendo avaliada como fator preditivo de resposta à quimioterapia é a expressão da glutathione S-transferase pelas células tumorais (Chen e Waxman, 1995).

A Glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas localizadas no interior das células e divididas em cinco grupos principais, com suas respectivas subunidades: Alfa (A1, A2, A3 e A4), Mu (M1, M2, M3, M4 e M5), Pi (P1), Theta (T1 e T2), e Zeta; (Board et al., 1997; Lizard-Nacol et al., 1999). Essa família de enzimas - localizada no citosol celular - impede a ação de toxinas endógenas e exógenas sobre as células, evitando assim danos ao DNA celular (Mannervik, 1985). O sistema enzimático GST impede a lesão celular, catalizando a conjugação de moléculas eletrofílicas reativas com a glutathione, facilitando o metabolismo e excreção das toxinas, impedindo assim mutações no DNA das células (Ketterer, 1988).

Para as células normais dos seres humanos, a presença do sistema GST serve como uma arma de defesa contra substâncias mutagênicas, impedindo assim o desenvolvimento de determinados cânceres (Gudmundsdottir et al., 2001). Alguns estudos relacionaram a presença de determinados polimorfismos

do sistema GST a maior predisposição de desenvolvimento de determinados cânceres como, por exemplo, o de pulmão (Gallegos-Arreola et al., 2003-2004). Neste estudo, pacientes que tinham o genótipo GST T1 nulo tiveram maior risco de ocorrência de câncer de pulmão.

Em outro estudo, 416 pacientes que tinham o polimorfismo GST T1 nulo associado ao polimorfismo GST M1 nulo tiveram 2,6 vezes mais chance de ocorrência de câncer de tireóide (Morari et al., 2002). Também se verificou maior chance de desenvolver câncer colorretal em pacientes com o genótipo GST M1 nulo associado ao genótipo GST M3 variante B (Lokotionov et al., 2001).

Em recente estudo desenvolvido no CAISM/UNICAMP, foram avaliados 177 casos de câncer de mama e 169 controles sadios, com determinação das freqüências das deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* no sangue periférico pelo PCR. Dos casos e controles, respectivamente, 46% e 45% não apresentaram qualquer deleção, 37% e 35% apenas do *GSTM1*, 11% e 10% apenas do *GSTT1*, 6% e 9% apresentaram ambos os genes deletados. Observou-se que mulheres com câncer de mama e antecedente de miscigenação com etnia negra tiveram menor freqüência da deleção do *GSTM1* ($p=0,1128$), $OR=0,48$ (0,24 – 0,98), enquanto os tumores com grau de diferenciação nuclear mais favorável relacionaram-se à deleção do *GSTT1* ($p=0,04$), $OR=0,37$ (0,15 - 0,90). Já as pacientes com pelo menos um dos genes deletados apresentaram maior risco de tumores que não expressam receptores hormonais ($p=0,0300$), $OR_{adj}=2,25$ (1,03 – 4,90), e a deleção combinada de ambos os genes associou-se ao

aumento de risco para tipo histológico não ductal clássico ($p=0,0571$), $OR_{adj}=12,09$ (1,03 – 142,03) (Cardoso Filho et al., 2008).

Todos estes resultados demonstram a possível influência das variações genotípicas do sistema GST na eficácia protetora a agentes promotores de mutações celulares.

Ao mesmo tempo em que a ocorrência de determinados genótipos do sistema GST nas células normais pode diminuir a chance de desenvolvimento de determinadas neoplasias, pode também, nas pacientes que desenvolvem um câncer, oferecer maior resistência ao tratamento quimioterápico. A droga quimioterápica seria identificada como uma toxina exógena e teria maior eliminação pelo sistema GST com genotipagem de maior poder de detoxificação, agindo assim com menor eficácia nas células tumorais (Hayes e Pulford, 1995).

Neste sentido, estudos avaliando diferentes polimorfismos do sistema GST têm mostrado respostas diferentes para o mesmo tipo de tratamento quimioterápico. Yang et al. (2004) observaram maior sobrevida global em cinco anos em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia que apresentavam o genótipo GST P1 Val\Val em relação às pacientes que tinham o genótipo GST P1 Ile\Ile.

Outro estudo, também com pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia e/ou radioterapia, mostrou maior sobrevida livre de doença para pacientes que possuíam o genótipo GST P1 Val\Val em relação às que possuíam o genótipo Ile\val e destas em relação às que possuíam o genótipo

Ille. Neste estudo, foi extraído DNA de tecido normal através dos blocos de parafina armazenados, para verificação dos polimorfismos na GST P1 (Sweeney et al., 2000), enquanto no estudo de Yang et al. (2004) o DNA foi extraído de amostras de sangue periférico.

Além da expressão do sistema GST em células de tecido normal, proteínas integrantes deste sistema podem ser expressas também em células de alguns carcinomas de mama. Essa expressão foi verificada através da avaliação imuno-histoquímica, e foi encontrado que a expressão da GST Pi por células epiteliais neoplásicas ocorre em cerca de 47% dos cânceres de mama, a GST alpha em 19% e a GST mu em 42% em uma amostra de 74 carcinomas primários (Cairns et al., 1992).

A expressão do sistema enzimático da GST pelas células neoplásicas pode diminuir diretamente a ação do quimioterápico sobre o tumor (Salinas e Wong, 1999). Trabalhos realizados *in vitro* com células de câncer de mama MCF-7 mostraram maior resistência das células que expressavam o sistema GST a quimioterápicos, como a ciclofosfamida (Gamesik et al., 1995; Chen e Waxman, 1995) e a doxorrubicina (Wang et al., 1999). Sendo assim, é importante esclarecer se pacientes com carcinomas mamários que expressam o sistema GST em suas células poderiam ter maior resistência ao tratamento quimioterápico e conseqüentemente menor sobrevida livre de doença.

Até o presente momento são conhecidos apenas dois estudos que avaliaram a relação da expressão do sistema GST em células tumorais de carcinoma mamário e a sobrevida livre de doença (Peters et al., 1993; Huang et al., 2003).

No estudo de Peters et al. (1993) foram avaliados espécimes tumorais de 139 pacientes com carcinoma de mama que foram submetidas à quimioterapia. Nestas espécimes tumorais foi avaliada a expressão da GST Mu, Alfa e Pi. Com o acompanhamento médio de quatro anos, não houve diferença na sobrevida livre de doença entre pacientes que expressavam ou não qualquer um dos três subtipos de enzimas da família GST. Os autores concluíram que a expressão de qualquer um destes três grupos da família GST estudados não constituíam um fator preditivo de menor resposta à quimioterapia, contrariando assim os resultados dos estudos realizados *in vitro* (Gamesik et al., 1995; Wang et al., 1999).

Já no estudo de Huang et al. (2003) foram avaliados 116 casos de carcinoma mamário para a expressão da GST Pi, incluindo tanto pacientes que receberam tratamento quimioterápico (71 pacientes) como as que não foram submetidas a tal tratamento (45 pacientes). O acompanhamento médio foi de cerca de três anos, a verificação da expressão da GST Pi foi através da imuno-histoquímica e a positividade para presença da enzima foi considerada quando mais de 10% das células tumorais exibissem coloração citoplasmática ou nuclear. Tal estudo demonstrou maior sobrevida livre de doença para as pacientes que não expressavam a GST Pi. O mais interessante é que essa melhor sobrevida para pacientes GST Pi negativo foi não somente para as expostas à quimioterapia como também para aquelas que não se submeteram

ao tratamento quimioterápico. Logo, os autores concluíram que a expressão da GST Pi parece ser um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama. Diante deste resultado, os autores sugeriram a adição da GST Pi à lista de novos e promissores fatores prognósticos como angiogênese tumoral e receptor do fator de crescimento epidérmico.

Como o câncer de mama é uma neoplasia de grande incidência (Jemal, 2007; INCA, 2008;) existe grande esforço para tentar melhorar a sobrevida das pacientes com esta neoplasia. Um caminho que as pesquisas têm tomado é a individualização das características das células tumorais e resposta aos tratamentos realizados.

Diante da escassez de estudos publicados e da importância do tema é importante uma avaliação melhor, com acompanhamento mais longo, da expressão da GST Pi em células tumorais de carcinoma mamário, e a sobrevida global e livre de doença em pacientes com câncer de mama que foram submetidas a tratamento quimioterápico para melhor individualização do esquema terapêutico e melhoria nos índices de sobrevida.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre a expressão da enzima glutathione S-transferase Pi em células tumorais e a sobrevida global e livre de doença em mulheres com carcinoma de mama submetidas a tratamento quimioterápico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar e quantificar a expressão da enzima glutathione S-transferase Pi pelas células do carcinoma mamário.
- Comparar a sobrevida global e livre de doença entre as mulheres com carcinomas mamários que expressam ou não a enzima glutathione S-transferase Pi.

3. Publicação

23rd Jun 2008

Manuscript number: MP-2008-0330

Dear Dr. Franco,

Thank you for submitting your Original Article to Modern Pathology. We subject all manuscripts to peer-review, and therefore we will be forwarding your manuscript to a panel of referees for their comments.

This process normally takes between eight and twelve weeks to complete, after which we will contact you with our decision. If you have any queries before this time, please feel free to contact the Editorial office. It will help if you provide your manuscript reference number listed above.

To view the progress of your manuscript please click on the URL below:

<<http://mts-mpa.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A1Bg2CVE7A4HCf6J1A9HIZHpb9dqbsf5Q38tyiyKwZ>>

Again, thank you for your submission.

Yours sincerely,

Modern Pathology Journal Office

Visit us online at: www.nature.com/mpa

Subscribe at: www.nature.com/mpa/prices.html

Submit at: www.mts-mpa.nature.com

Telephone: +1 317 274 2476

Email: modpath@iupui.edu

PS - Next time you are logged in, if you have not already done so, please update your profile information. There is space on this online form to indicate whether you are a member of USCAP, if you wish. Thank you.

Glutathione S-Transferase Pi Expression in Invasive Breast Cancer and Clinical Outcome

Ricardo Laier Franco, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Natália Guimarães de Moraes Schenka, MD, PhD

Department of Pathology, School of Medical Sciences,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

André Almeida Schenka, MD, PhD

Department of Pathology, School of Medical Sciences,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Maria Salete Costa Gurgel, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Address correspondence and reprint requests to:

Ricardo Laier Franco

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Caixa Postal: 6081

CEP 13083-370

Campinas – SP, Brazil

E-mail: laier.franco@gmail.com

Running title: GST Pi in Breast Cancer

Abstract

Glutathione S-transferase (GST) is a cytosolic enzymatic system involved in cellular detoxifying process. 'In vitro' studies have shown that the presence of this enzymatic system in breast carcinoma cells can accelerate the elimination of drugs commonly used in chemotherapy, thereby decreasing its efficacy. The aim of the present study was to evaluate the association between GST Pi expression by breast carcinoma cells and disease-free and overall survival. Ninety-five female patients with invasive breast carcinoma submitted to surgical treatment and adjuvant chemotherapy from January, 1995 to June, 1997 at the Universidade Estadual de Campinas, Brazil and followed until August, 2006 were evaluated. The expression of GST Pi in breast carcinoma cells, determined by immunohistochemistry, was correlated with several clinical and pathological parameters of prognostic significance. There were 36 (37,9%) GST Pi-positive cases. GST Pi immunoexpression was not significantly correlated with patient's age, histological tumor type, clinical staging, hormone receptor status and survival. On the other hand, GST Pi positivity showed a significant correlation with a lower histological grade/C-erb-B2 negative breast carcinoma phenotype. So far, the findings suggest that GST Pi expression does not constitute a satisfactory prognostic factor in breast cancer.

Key words: Breast cancer, glutathione S-transferase, prognosis, survival, immunohistochemistry.

Introduction

Breast cancer is the second most common neoplasia affecting women in Brazil. The incidence for 2008 is expected to be 49,400 new cases (1). In the United States the estimate for 2008 is 182,460 new cases with 40,480 deaths due to this disease (2). In spite of the high incidence, mortality is decreasing due to screening with mammography and advances in treatment (3). Nowadays, the treatment is performed under a multidisciplinary approach and combines different strategies including surgery, radiation therapy, hormone therapy and chemotherapy.

Patients with breast cancer have heterogeneous response to drugs used in chemotherapy (4) and this is partially related to certain biological features of the tumor, most of which are yet to be established (5). The expression of several molecules has been tested as possible prognostic/predictive factor in breast cancer. Recently, it has been suggested that glutathione S-transferase (GST) system may be one of the most promising molecules in this respect (6, 13).

The human glutathione S-transferase is a multigene, isoenzyme family. Cytosolic GST isoenzymes can be classified by their substrate specificities, isoelectric points and amino acid sequence homologies into major classes termed Alpha, Mu, Pi, Theta and Zeta, which are encoded by a superfamily of genes located at different loci (7, 8). These enzymes are responsible for blocking the deleterious action of toxins over cellular DNA (9), by catalyzing the conjugation of eletrofilic reactive molecules with glutathione. By acting so, GST enhances toxin metabolism and excretion, therefore preventing cellular DNA mutation (10).

Since GST system can increase cellular detoxification, a hypothesis was proposed, firstly through 'in vitro' studies, in which the presence of this system in breast cancer cells could accelerate the conjugation and elimination of the chemotherapy drug and consequently decreasing their efficiency (11, 12). These 'in vitro' studies demonstrated that breast cancer cells expressing GST were more resilient to anti-neoplastic drugs such as cyclophosphamide (11) and doxorubicin (12), commonly used in breast cancer adjuvant treatment.

To the best of our knowledge, only two studies have evaluated the expression of GST Pi in breast carcinoma and disease-free survival (6,13). Of notice, not only are they based on short follow-up, but also, their results are contradictory. Huang et al. (6), studying 116 cases of breast cancer, demonstrated that patients with GST Pi positive cancers had a significantly worse disease-free survival. On the other hand, Peters et al. (13), evaluating 139 cases of breast cancer, showed no difference in disease-free survival between patients with GST Pi positive and negative cancers.

Considering that GST Pi expression is demonstrated by immunohistochemistry in about 50% (14) of breast carcinomas and that it may represent a useful prognostic and/or predictive factor, it could be of great value to solve the controversy concerning the action role of this enzyme in breast cancer outcome and management.

The present study has evaluated the expression of GST Pi in breast cancer cells by immunohistochemistry and its correlation with several clinical and pathological variables of prognostic relevance (including global and disease-free survival) in a longer follow-up period than former studies.

Material and Methods

Case Selection

Medical records of 95 women diagnosed with invasive breast carcinoma, who underwent surgical treatment at the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brazil, between January 1995 and June 1997 were evaluated. Only patients ranging from 18 to 70 years old, without any other malignancies, and subjected to mastectomy/quadrantectomy with free surgical margins, axillary dissection and adjuvant chemotherapy/radiotherapy were included. Moreover, the corresponding paraffin block had to be available for evaluation. Patients with distant metastasis at diagnosis, submitted to neoadjuvant chemotherapy or who received incomplete adjuvant chemotherapy, radiotherapy or hormone therapy were excluded. Patients with an incomplete follow-up were also excluded.

Follow-up

The patients follow-up was performed according to local Institutional protocol which is summarize as follows. Clinical examination was carried out every 3 months post-surgery in the first 2 years, twice a year between the third and fifth year and annually thereafter. At least once a year, patients were subjected to mammography, chest x-ray, abdominal ultra-sonography and bone scintigraphy.

Immunohistochemical Technique

All H&E-stained and immunostained slides were reviewed by two experts in breast pathology and immunohistochemistry (N.G.M.S., A.A.S.), the tumors

were re-classified according to the Scarf-Bloom and Richardson grading system modified by Elston and Ellis (15-17) and the scoring released by consensus.

All tissue samples were formalin-fixed paraffin embedded blocks selected from each case, containing representative tumor samples and, if possible, normal breast tissue. Deparaffinized 4- to 5- μ m sections of the selected blocks were rehydrated and either stained with H&E or subjected to antigen retrieval (10mM citrate buffer, pH 6.0, at 100° C, 30') optimized for anti-GST Pi monoclonal antibody (NCL-438, 1:600, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, U.K.). Positive and negative controls were respectively liver and a tumor sample with the omission of the primary antibody. Others primary antibodies included anti-estrogen receptor (ER) (M7047, 1:300, Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-progesterone receptor (PR) (M3569, 1:800, Dako) and anti-C-erb-B2 (A0485, 1:600, Dako). All primary antibodies were incubated overnight at room temperature, thoroughly washed, and treated for 30 minutes with ready-to-use Novolink (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, U.K.) using standard manual procedures. The reactions were developed with diaminobenzidine (DAB) as chromogen. In addition, the sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in a series of ethanols and mounted with Enthelan[®] (Merck, Darmstadt, Germany).

Scoring of Immunoreactivity Patterns

GST Pi expression was assessed in terms of frequency of positive cells and staining intensity. The frequency of positive cells was graded and scored as follows: negative= 0, 1-10%= 1 point, 11-50%= 2 points and $\geq$ 51%= 3 points.

The intensity was estimated and scored as follows: negative= 0, weak= 1 point, moderate= 2 points and strong= 3 points. A final GST Pi score was obtained by adding the points achieved on each parameter. The cases were considered positive for GST Pi with a final score of at least 4 points. All the GST Pi positive cases showed nuclear and cytoplasmic immunostaining. Hormone receptors and C-erb-B2 immunoexpression was scored as described elsewhere (18, 19).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software for Windows (release 8.0). Association between GST Pi expression and other clinicopathological variables (local, regional and distant recurrences, as well as death by disease) was determined by using the Fisher exact test or the χ^2 test as appropriate. Survival curves were plotted by the Kaplan-Meier method and the differences between the curves were evaluated by log-rank test and hazard function. A *p* value of <.05 was considered significant.

Results

The age of the 95 patients ranged between 33 and 70 years (median 50.33). Forty-six of the patients were 50 or fewer years old and 49 were more than 50 years old at the time of the diagnosis. All axillary dissections were performed without prior sentinel node dissection. In 12 cases, the disease was diagnosed in stage I; in 38 cases, in stage II and in 45 in stage III. The positivity rates for ER and PR were 77% and 75% respectively. Eleven cases were positive for C-erb-B2 (3+), 10 were indeterminate (2+) and 74 were negative (0/1+).

There were 36 (37,9%) GST Pi-positive breast tumors (Figure 1) and 59 (62,1%) negative. The cases were well balanced according to age, pathological stage and scheme of chemotherapy, hormone therapy and radiotherapy. GST P-positive tumor cells were characterized by nuclear and cytoplasmic positivity. Clinical and pathological data are summarized in Table 1.

No correlation was found between GST Pi expression and histological type or between the hormone receptor status. On the other hand, GST Pi positivity was significantly associated with grade I ductal carcinoma ($p = .041$). Ten out of 17 grade I tumors were positive for GST Pi (59%) while only 19 out of 60 grade II/III tumors were GST Pi positive (32%).

Seventy-four tumors (78%) were negative for C-erb-B2 (0/1+) and 21 tumors (22%) were either 2+ (indeterminate) or 3+ (positive). A significantly higher frequency of GST Pi-positive cases were found among C-erb-B2 negative cases (89%) in contrast to indeterminate/C-erb-B2 positive tumors (11%) ($p = .044$).

Patient follow-up ranged from 9.16 to 11.66 years, with a median follow-up of 10.68 years. In a preliminary analysis the GST Pi positivity was significantly correlated with regional ($p = .024$) but not with local/distant recurrence. All three regional recurrences in this study occurred in patients with GST Pi-positive tumors.

Kaplan-Meier overall and disease free survival curves revealed no significant difference between GST Pi-positive and GST Pi-negative cases (Figures 2). The lack of difference in terms of overall survival and disease-free survival persisted even when analyzing stages II and III separately (Figures 3 and 4). Analysis of stage I patients was hampered by the small number of cases

(6 GST Pi-positive and 6 GST Pi-negative) and because of the small number of events (data not shown).

Discussion

In the present study GST Pi expression was detected in 37.9% of breast invasive carcinomas. This percentage is slightly lower than those found in previous studies which ranged from 47-52% (6, 14). This may be due to methodological differences, especially those concerning the quantification of GST Pi staining and the definition of GST Pi positivity (cutoff point). The GST family has long been implicated in chemotherapeutic drug resistance (11, 12), so not only the number of cells with GST Pi expression but also the intensity of this expression must be important in terms of drug chemotherapy detoxification. For that matter, in this study we combined the assessment of percentage of positive cells and staining intensity in a single score.

The results of this study on 95 breast cancer patients with an average of more than 10 years follow-up showed that GST Pi expression bears no relationship with neither disease free-survival nor overall survival. These results are in agreement with Peters et al. (13) which evaluated 139 patients with an average follow-up of 4 years. On the other hand, our study and the latter are in contrast to Huang et al. (6) who evaluated 116 patients and found a significantly worse disease-free survival, with a mean follow-up of 3 years. Of note, these two contradictory studies are the only ones that have evaluated this matter so far.

It is important to mention that our findings are not only based on a homogeneous sample but also on the longest follow-up ever to be published (to the best of our knowledge).

Breast cancer is a clinically heterogeneous disease; individuals with the same stage and similar pathological diagnoses can experience very different clinical courses (4). During the last years an effort has been made to try to identify a molecular fingerprint for a group of individuals with breast cancer that could benefit from specific treatment (20, 21). Lately, an increasing number of molecular markers have been shown to predict resistance to drugs commonly used in chemotherapy and this fact has intensified research towards the development of target drugs. A good example of such a molecular marker would be the expression of C-erb-B2 in breast cancer cells, which is a well-known predictor of response to trastuzumab (22, 23).

The expression of GST Pi in cancer cells has been advocated as a predictor of chemotherapy resistance in several solid tumors (24, 25). Nevertheless, this matter is still extremely controversial. For ovarian cancers, some studies have shown shorter survival among patients with GST Pi-positive tumors (26,27) while another study has shown no prognostic significance (28). In gastric cancers, the controversy remains with studies showing contradictory results (29,30).

The hypothesis that tumor cell resistance could be increased by the expression GST Pi enzymatic system is supported by the conjugation of the chemotherapeutic with glutathione leading to its faster elimination (31). The fact that, in our study, the tumor GST Pi expression was significantly associated with low histological grade/C-erb-B2 negative cancers, which are well-known good

prognostic factors (32), probably explains the lack of association between GST Pi positive breast cancers and worse overall and disease free survival.

Despite the fact that our study is retrospective, it had the longest average follow-up (10.68 years) and it showed that there was no correlation between GST Pi positivity in breast cancer cells and disease free survival. In this study the only proven data in terms of prognosis is that GST Pi expression was positively correlated with regional recurrences in a preliminary univariate analysis. Nevertheless, the significance of this finding should be better evaluated in a larger series.

In conclusion, although the expression of the enzyme GST Pi in breast cancer cells is associated with a low grade/C-erb-B2 negative phenotype, which is usually associated with better prognosis, we could not demonstrate the association between these molecular marker and longer disease free/overall survival. Prospective studies with a longer follow-up and larger series should be conducted to better evaluate the matter of the GST Pi expression in breast cancer and chemotherapy resistance.

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest

The authors indicated no potential conflicts of interest

References

1. National Cancer Institute: Cancer incidence estimation in Brazil for 2008.
Available in: www.inca.gov.br/estimativa/2008. Accessed in 02/20/2008.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
3. Jones AL. Reduction in mortality from breast cancer [editorial]. *BMJ* 2005;330:205-6.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-717.
5. Colleoni M, Gelber RD, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A. How to improve timing and duration of adjuvant chemotherapy. *The Breast* 2001;10 Suppl 3:101-5.
6. Huang J, Tan P, Thiyagarajan J, Bay B. Prognostic significance of glutathione S-transferase-Pi in invasive breast cancer. *Mod Pathol* 2003;16:558-65.
7. Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, Riedinger JM, Fargeot P, Brunet-Lecomte P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 1999;1:81-7.

8. Board PG, Baker RG, Chelvanayagam G, Jermin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J* 1997;328:929-35.
9. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. *Adv Enzymol* 1985;57:357-417.
10. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;202:343-61.
11. Gamesik MP, Millis KK, Colvin OM. Noninvasive detection of elevated glutathione levels in MCF-7 cells resistant to 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Res* 1995;55:2012-6.
12. Wang K, Ramji S, Bhathena A, Lee C, Riddick DS. Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. *Xenobiotica* 1999;29:155-70.
13. Peters WHM, Roelofs HMJ, Putten WLJ, Jansen JBMJ, Klijn JGM, Foekens JA. Response to adjuvant chemotherapy in primary breast cancers: no correlation with expression of glutathione S-transferase. *Br J Cancer* 1993;68:86-92.
14. Cairns J, Wright C, Cattan AR, Hall AG, Cantwell BJ, Harris AL, et al. Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas. *J Pathol* 1992;166:19-25.

15. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer 1957;11:359-77.
16. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognosis factors in breast cancer: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. Histopathology 1991;19:403-10.
17. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000;124:966-78.
18. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, et al. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. Am J Clin Pathol 2002;11; 408-17.
19. College of American Pathologists. Available in www.cap.org. Accessed in 02/20/2008.
20. Morris SR, Carey LA. Molecular profiling in breast cancer. Rev Endocr Metab Disord 2007;8:185-98.
21. Pusztai L. Current status of prognostic profiling in breast cancer. The Oncologist 2008;13:350-60.

22. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *NEJM* 2005;353:1659-72.
23. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *NEJM* 2005;353:1673-84.
24. Bai F, Nakanishi Y, Kawasaki M, Takayama K, Yatsunami J, Pei XH, et al. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1996;78:416-21.
25. Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, Trock B, Johnston PG, Forastiere AA, et al. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:4097-104.
26. Hirazono K, Shinozuka T, Kuroshima Y, Itoh H, Kawai K. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase pi (GST-pi) and chemotherapy response in malignant ovarian tumors. *J Obstet Gynaecol* 1995;21:305-12.
27. Hamada S, Kamada M, Furumoto H, Hirao T, Aono T. Expression of glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 1994;52:313-9.

28. Saip P, Tuzlali S, Demir K, Sakar B, Yavuz E, Berkman S, et al. Value of glutathion-S transferase pi as a prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 2005;26:90-4.
29. Kwon HC, Roh MS, Oh SY, Kim SH, Kim MC, Kim JS, et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. Ann Oncol 2007;18:504-9.
30. Monden N, Abe S, Sutoh I, Hishikawa Y, Kinugasa S, Nagasue N. Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-S-transferase-pi, and P-glycoprotein in curatively resected gastric cancer. Oncology 1997;54:391-9.
31. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995;30:445-600.
32. National Comprehensive Cancer Network: NCCN clinical practice guidelines in oncology. Breast cancer – version 1.2008. Available in: www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf. Accessed in [20/02/2008](#).
33. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol 2002;20:3628-36.

Table 1. Distribution of GST Pi expression according to clinical data and tumor histological type, grade, hormone receptor and C-erb-B2 status.

	GST Pi expression	
	Positive	Negative
Clinical Data		
Age (years)		
≤50	17	29
>50	19	30
Staging [#]		
I	6	6
II	14	24
III	16	29
Chemotherapy		
CMF	9	23
FAC/FEC	27	36
Hormone therapy	5	4
Radiotherapy	33	51
Histological Type		
Ductal	27	45
Lobular classic	2	8
Lobular pleomorphic	1	2
Tubular/coloide	4	1
Mixed ductal and lobular	1	2
Mixed ductal and coloide	1	1
Histological Grade		
I	10	7*
II	8	25
III	11	16
Hormone Receptor		
Estrogen +	28	45
Estrogen –	8	14
Progesterone +	25	46
Progesterone -	11	13
C-erb-B2		
0/1+	32*	42
2/3+	4	17

* Statistically significant (p<.05) # American Joint Committee³³

CMF = cyclophosphamide/ methotrexate/ 5-fluorouracil

FAC = 5-fluorouracil/ adriamycin/ cyclophosphamide

FEC = 5-fluorouracil/ epirubicin/ cyclophosphamide

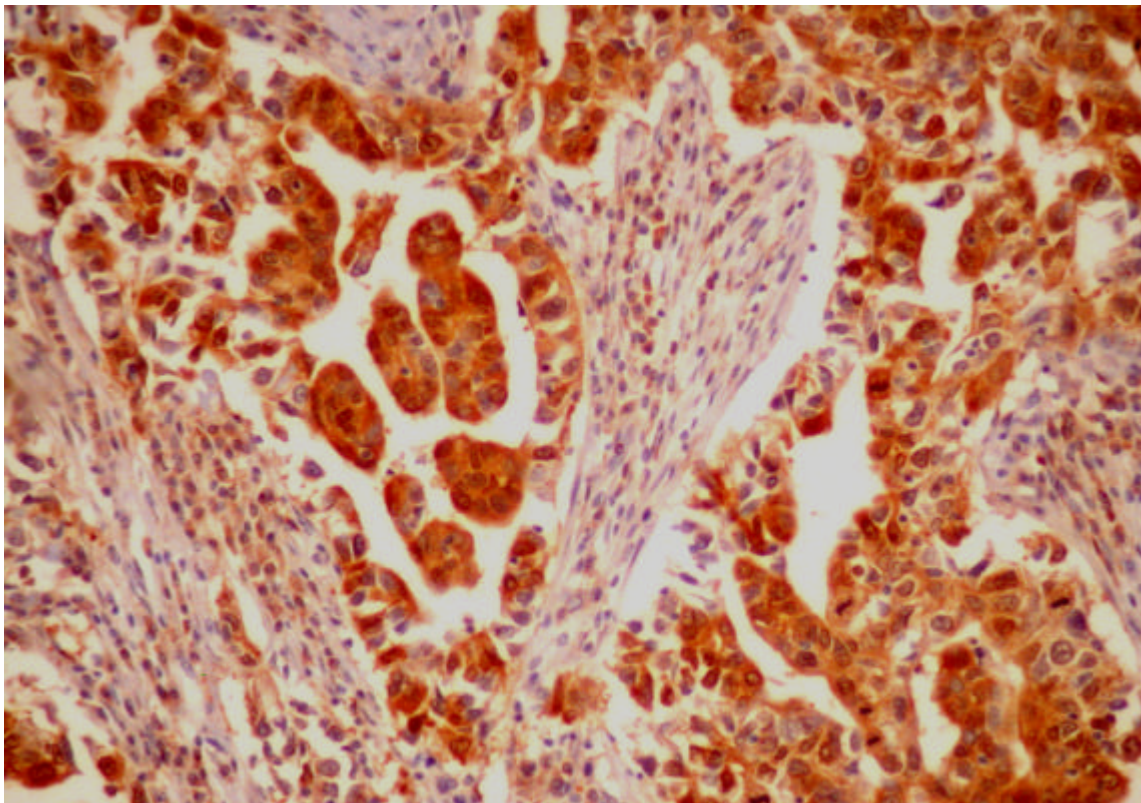


Figure 1. Breast carcinoma showing nuclear and cytoplasmic immunostaining for GST Pi (original magnification x100)

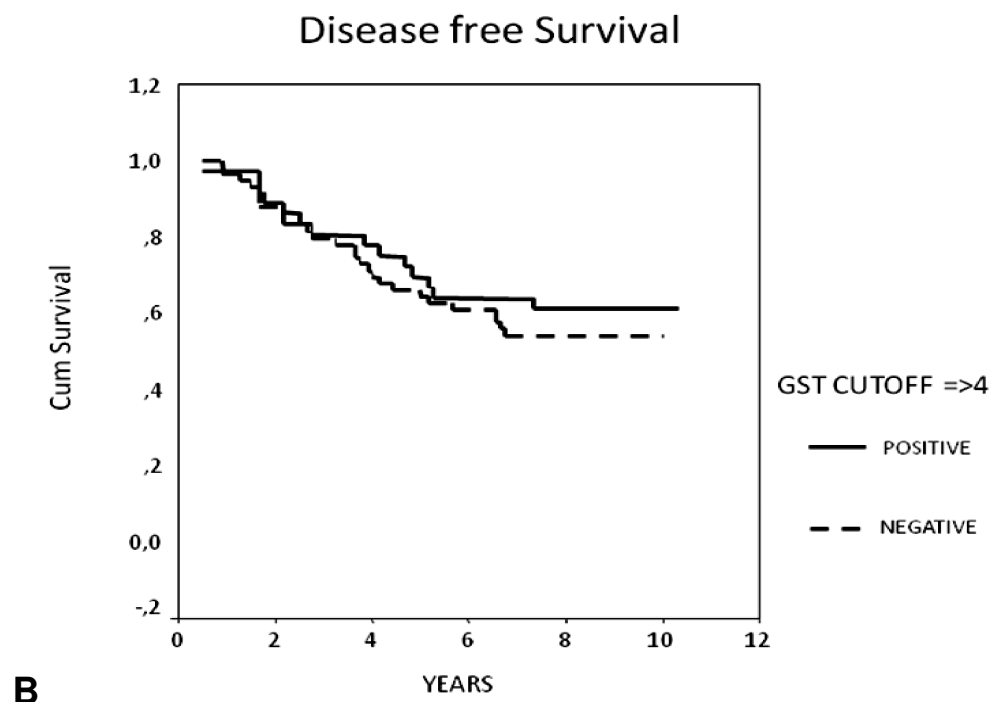
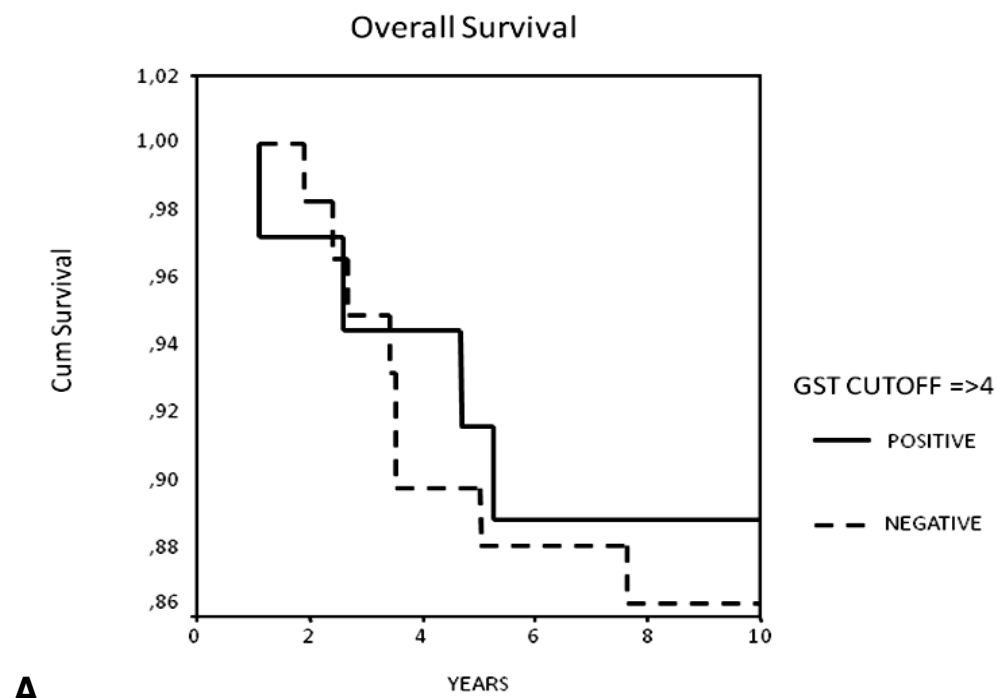


Figure 2. Patients with GST Pi positive and negative breast carcinomas (N = 95) and overall (A) and disease free (B) survival (p = NS).

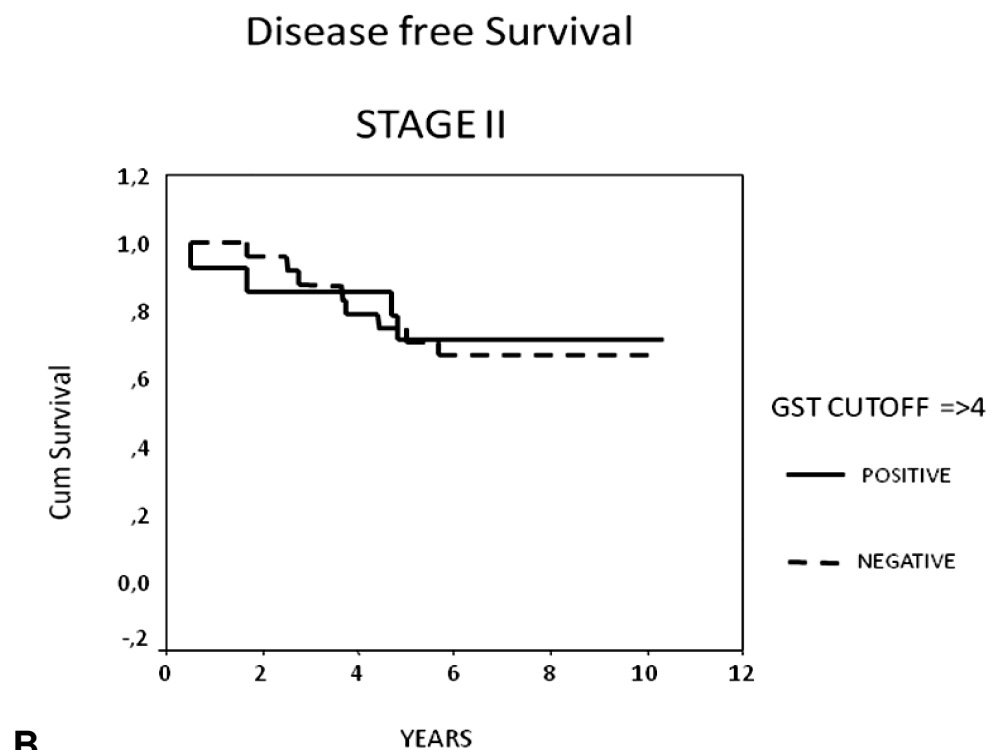
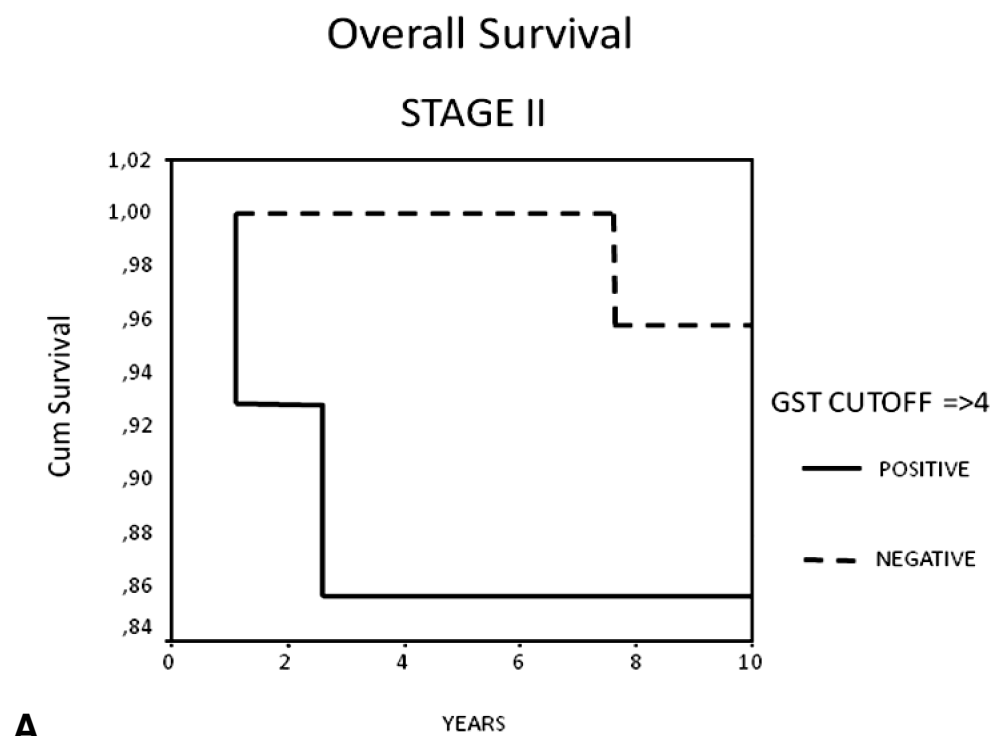
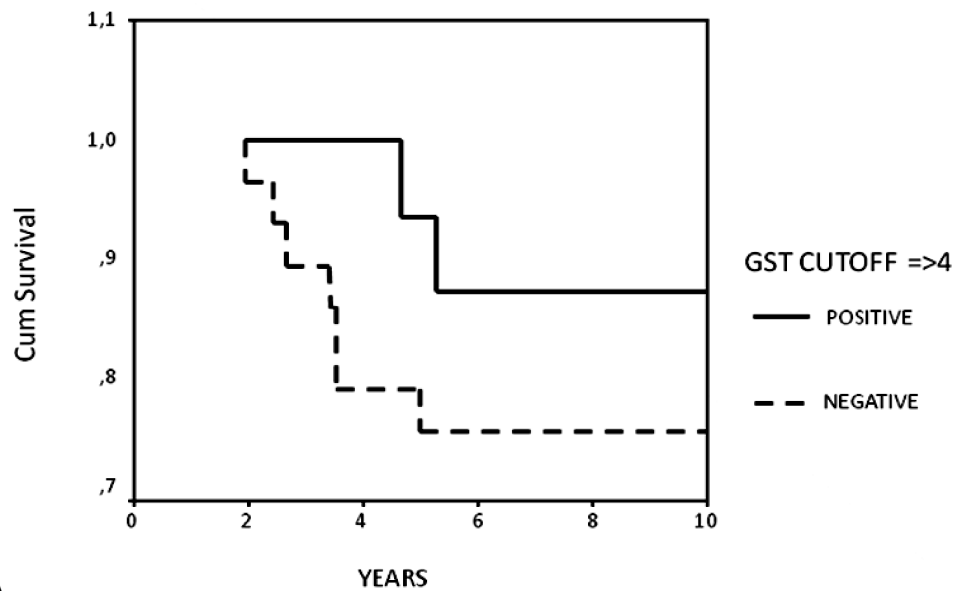


Figure 3. Patients with stage II GST Pi positive and negative breast carcinomas (n = 38) and overall (A) and disease free (B) survival (p = NS).

Overall Survival

STAGE III



Disease free Survival

STAGE III

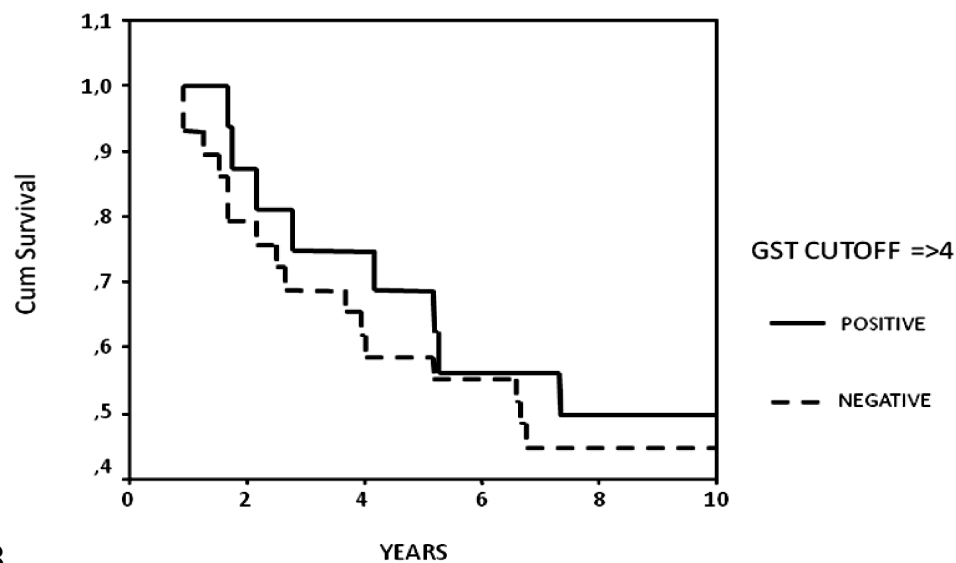


Figure 4. Patients with stage III GST Pi positive and negative breast carcinomas (n = 45) and overall (A) and disease free (B) survival (p = NS).

4. Conclusões

- Cerca de 38% dos carcinomas invasivos de mama expressaram a enzima Glutation S-transferase Pi através da técnica imuno-histoquímica.
- As pacientes com carcinomas de mama com expressão positiva para a enzima Glutation S-transferase Pi e submetidas à quimioterapia adjuvante apresentaram, após seguimento médio de 10,68 anos, sobrevida global e livre de doença semelhante à das pacientes com carcinomas de mama que não expressaram a enzima Glutation S-transferase Pi, independentemente do estadiamento da doença. Em análise univariada preliminar observou-se correlação positiva entre a ocorrência de recidiva regional e positividade para GST Pi.

5. Referências Bibliográficas

Board PG, Baker RG, Chelvanayagam G, Jermin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J* 1997;328:929-35.

Cairns J, Wright C, Cattan AR, Hall AG, Cantwell BJ, Harris AL, et al. Immunohistochemical demonstration of glutathione S-transferases in primary human breast carcinomas. *J Pathol* 1992;166:19-25.

Cardoso Filho C, Lourenço G, Shinzato JY, Zeferino LC, Costa FF, Lima CSP, et al. Clinical and pathological implications of *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions in sporadic breast cancer. *Oncol Rev* 2008; 2:36-43.

Chen G, Waxman DJ. Identification of glutathione S-transferase as a determinant of hydroperoxycyclophosphamide resistance in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1691-701.

Colleoni M, Gelber RD, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A. How to improve timing and duration of adjuvant chemotherapy. *The Breast* 2001;10 Suppl 3:101-5.

EBCTCG. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-717.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histologic grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.

Gallegos-Arreola MP, Gomez-Meda BC, Morgan-Villela G, Arechavaleta-Granell MR, Arnaud-Lopez L, Beltran-Jaramillo TJ, et al. GSTT1 gene deletion is associated with lung cancer in Mexican patients. *Dis Markers* 2003-2004;19:259-61.

Gamesik MP, Millis KK, Colvin OM. Noninvasive detection of elevated glutathione levels in MCF-7 cells resistant to 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Res* 1995;55:2012-6.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3357-65.

Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, Eyfjord JE. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:1169-73.

Hamilton A, Hortobagyi G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 2005;23:1760-75.

Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast*. 2nd ed. Lippincott Williams&Wilkins; 2000.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600.

Huang J, Tan P, Thiagarajan J, Bay B. Prognostic significance of glutathione S-transferase-Pi in invasive breast cancer. *Mod Pathol* 2003;16:558-65.

Inca. Instituto Nacional do Câncer: Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2008. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2008. Acessado em 20/02/2008.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.

Jones AL. Reduction in mortality from breast cancer [editorial]. BMJ 2005;330:205-6.

Kaufmann M, Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. J Clin Oncol 2003;21:2600-8.

Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. Mutat Res 1988;202:343-61.

Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, Riedinger JM, Fargeot P, Brunet-Lecomte P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. Breast Cancer Res 1999;1:81-7.

Loktionov A, Watson MA, Gunter M, Stebbings WSL, Speakman CTM, Bingham SA. Glutathione-S-Transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. Carcinogenesis 2001;22:1053-60.

Mannervik B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. Adv Enzymol 1985;57:357-417.

Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:188-94.

Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, et al. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:229-36.

Morari EC, Leite JLP, Granja F, Assumpção LVM, Ward LS. The null genotype of glutathione S-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002;11:1485-88.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network: NCCN clinical practice guidelines in oncology. Breast cancer – version 1.2008. Disponível em: www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf. Acessado em 20/02/2008.

Peters WHM, Roelofs HMJ, Putten WLJ, Jansen JBMJ, Klijn JGM, Foekens JA. Response to adjuvant chemotherapy in primary breast cancers: no correlation with expression of glutathione S-transferase. *Br J Cancer* 1993;68:86-92.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *NEJM* 2005;353:1659-72.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *NEJM* 2005;353:1673-84.

Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases – a review. *Curr Med Chem* 1999;6:279-309.

Sant M, Allemani C, Berrino F, Coleman MP, Aareleid T, Chaplain G, et al. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer* 2004;100:715-22.

Singletary ES, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.

Sweeney C, McClure GY, Fares MY, Stone A, Coles BF, Thompson PA, et al. Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile¹⁰⁵ Val polymorphism. *Cancer Res* 2000;60:5621-24.

Wang K, Ramji S, Bhathena A, Lee C, Riddick DS. Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. *Xenobiotica* 1999;29:155-70.

Yang G, Shu X, Ruan Z, Cai Q, Jin F, Gao Y, et al. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer* 2005;103:52-58.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Ficha de coleta de dados

Expressão da Glutation S-Transferase em Células Tumorais e Sobrevida Global e Livre de Doença em Mulheres com Carcinoma de Mama

Ficha nº _____

HC nº _____

1-Data de nascimento _____/_____/_____

2-Data do diagnóstico _____/_____/_____

3-Expressão da GST Pi _____

4-Tipo de cirurgia: () mastectomia () quadrantectomia

5-Grau nuclear: () 1 () 2 () 3

6-Diferenciação de túbulos: () 1 () 2 () 3

7-Índice mitótico: () 1 () 2 () 3

8-Grau histológico final: () 1 () 2 () 3

9-Tipo histológico: _____

10-Receptor de estrogênio: () presente () ausente

11-Receptor de progesterona: () presente () ausente

12-Her-2 _____+

13-Estadiamento patológico: T__N__M__ Estágio: _____

14-Quimioterapia: () CMF () FAC

15-Radioterapia: () sim () não

16-Hormonioterapia: () sim () não

17-Recidiva local: () sim () não Data ____/____/____

18-Recidiva regional: () sim () não Data ____/____/____
Local: _____

19-Recidiva a distância: () sim () não Data ____/____/____
Local: _____

20-Óbito: () sim () não Data ____/____/____
 () Ca de mama () Outra

6.2. Anexo 2 – Carta de aprovação pela Comissão de Pesquisa



Campinas, 21 de fevereiro de 2006

O protocolo de pesquisa "EXPRESSÃO DA GLUTATION S-TRANSFERASE EM CÉLULAS TUMORAIS E SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇAS EM MULHERES COM CARCINOMA DE MAMA " do pesquisador Ricardo Laer Franco, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/Unicamp

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva
Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Tocoginecologia - DTG/FCM/UNICAMP

6.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 17/04/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 026/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0009.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSÃO DA GLUTATION S-TRANSFERASE EM CÉLULAS TUMORAIS E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA EM MULHERES COM CARCINOMA DE MAMA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ricardo Laier Franco

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/02/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/03/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a associação entre a expressão do sistema glutathione S-transferase (GST) em células tumorais e a sobrevida livre de doença em mulheres com carcinoma de mama submetidas ao tratamento quimioterápico.

III - SUMÁRIO

O estudo será realizado em prontuários médicos de mulheres com carcinoma de mama que foram submetidas a tratamento cirúrgico no CAISM-UNICAMP (entre janeiro e dezembro de 1995), sendo a expressão da glutathione S-transferase Mu e Pi nas células tumorais dessas pacientes avaliada através da reação de imunohistoquímica padrão utilizando anticorpos monoclonais (empregando-se os blocos de parafina do arquivo de anatomia patológica da instituição). O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na taxa de sobrevida ao longo de 10 anos de cada um dos estágios e na proporção de expressão das enzimas a serem estudadas. Isso levou à definição do número da amostra em 120, assim distribuída: 9 pacientes do estágio I (com 3 eventos ao longo de 10 anos), 68 pacientes do estágio II (com 31 eventos ao longo de 10 anos) e 43 pacientes do estágio III (com 26 eventos ao longo de 10 anos). O protocolo apresenta um orçamento de R\$ 9.515,20.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de estudo de relevância científica e social, com objetivos, hipóteses e metodologia bem definidos, que se pretende realizar pelo acesso aos arquivos (prontuários e blocos de parafina) da instituição (CAISM-Unicamp). Comprometem-se, os pesquisadores, com a garantia do sigilo acerca da identidade das pacientes e solicitam dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ao qual somos favoráveis por tratar-se de estudo retrospectivo.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tenente Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111

PHONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

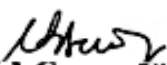
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.


Prof. Dr. Carmen/Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP