

EXPRESSÃO NUCLEAR DO P53 EM CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA¹

NUCLEAR EXPRESSION OF P53 PROTEIN IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER

José Anastácio Dias Neto²
Antonio Carlos Pereira Martins³
Mônica T. Pastorello⁴
Haylton Jorge Suaid³
Silvio Tucci Jr³
Adauto José Cologna³

RESUMO

Objetivo - Investigar a expressão imuno-histoquímica da p53 com fator de risco em carcinoma de células transicionais da bexiga (CCT). **Métodos** - Foram estudados retrospectivamente 90 pacientes com CCT com idade média de 71 anos: G1 – 45, G2 – 29, G3 – 16, pTa-1 – 62 e pT2-4 – 28. Entre os pacientes com tumores não invasivos houve recidiva vesical em 35 casos (55,5%). Os tumores superficiais foram tratados por ressecção trans-uretral associados ao BCG (>G1), e os invasivos por cistectomia radical. O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 55 meses e 25 deles faleceram da doença. A expressão imuno-histoquímica foi estudada em peças preservadas em formol 10% e blocos de parafina pelo método da avidina-biotina-*immunoperoxidase*. Considerou-se p53 positivo o tumor com índice de marcação nuclear superior a 10%. **Resultados** - A expressão da p53 mostrou associação com o grau do tumor e com o estágio da lesão primária ($p=0,01$), mas não com o tamanho do tumor vesical ($p=0,25$) ou com a taxa de recidiva dos tumores superficiais ($p=0,81$). Houve forte correlação entre o padrão de marcação da p53 com metástases ($p=0,002$) e com a sobrevida dos pacientes ($p=0,003$). **Conclusão** - A expressão da p53 mostrou valor preditivo para grau tumoral, estágio, incidência de metástases e sobrevida dos pacientes, mas não para recidiva vesical dos tumores superficiais. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

Descritores – p53, carcinoma da bexiga, carcinoma de células transicionais da bexiga

ABSTRACT

Objective - To investigate the immunoeexpression of p53 protein as a risk factor in transitional cell carcinoma of the bladder (TCC). **Methods** - We analyzed retrospectively 90 patients with TCC and mean age of 71 years: G1 – 45, G1 – 29, G3 – 16, pTa-1 – 62 and pT2-4 – 28. The superficial TCC were treated TUR plus intravesical BCG (>G1), and the invasives by radical cystectomy and urinary diversion. The mean time of followup was 55 months and 25 patients died of the disease. The rate or recurrence in superficial tumors was 55.5%. The p53 immunoeexpression was determined in formalin fixed paraffin embedded tumors sections by the avidin-biotin-*immunoperoxidase* method (DO – 7, Dako). We considered p53 positive TCC when the labeling nuclear index was >10%. **Results** - P53 immunoeexpression exhibited a positive association with tumor grade and stage ($p=0.01$), but not with the size of primary lesion ($p=0.25$) or rate of recurrence of pTa-1 tumors ($p=0.81$). A strong correlation was seen with metastases ($p=0.002$) and survival ($p=0.003$). **Conclusion**: A positive reaction for p53 showed correlation with tumor grade, T stage, metastases rate and patient survival, but had no predictive value for local recurrence rate of superficial tumors.

1 Trabalho realizado na Divisão de Urologia, FMRP-USP, com apoio FAPESP

2 Médico Residente do HCFMRP-USP.

3 Docente da FMRP-USP

4 Médico Assistente do HCFMRP-USP

Key Words - p53, bladder carcinoma, transitional cell carcinoma of the bladder.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células transicionais da bexiga (CCT) é uma patologia de história natural variável. Está bem estabelecido que suas características histológicas não são suficientes para prever sua evolução¹. Torna-se, então, importante investigar o potencial prognóstico de novos marcadores tumores.

O gene supressor tumoral p53, mapeado no cromossomo humano 17p13.1, é onde mais frequentemente são encontradas as mutações em câncer humano^{2,3,4}. O p53 mutante é mais estável e menos degradável, conseqüentemente mais detectado no estudo imunohistoquímico^{5,6}.

Mutações do gene p53 são comuns no CCT^{3,7,8,9}. Estudos prévios mostraram uma correlação entre a expressão do p53 e a progressão dos tumores de bexiga^{10,11}.

Nosso objetivo é estudar a correlação da expressão do p53, com características histopatológicas dos tumores de bexiga e seu comportamento biológico.

MÉTODOS

População de Pacientes: Revisamos os prontuários e respectivas lâminas histológicas de 90 pacientes com CCT operados no HCFMRP-USP no período de 1980-2000. A idade média da amostra foi de 71 anos, com variação de 29 a 93 anos. Setenta (77,8%) eram homens e 20 (22,2%) mulheres. O tempo médio de seguimento foi de 55 meses (2-231 meses). Encontramos 45 (50%) tumores com grau I (G1), 29 (32,2%) com grau II (G2) e 16 (17,8%) com grau III (G3). As proporções de pacientes segundo o estágio tumoral foram: pT_A - 54 (60%), pT₁ - 8 (8,9%) e pT₂₋₄ - 28 (31,1%). Os tumores superficiais foram tratados por ressecção trans-uretral associados ao BCG (>G1), e os invasivos por cistectomia radical. Entre os pacientes com tumores não invasivos, houve recidiva em 35 pacientes (55,5%).

Imunohistoquímica: As lâminas das peças cirúrgicas foram revistas no método hematoxilina-eosina para a seleção de áreas de melhor representatividade tumoral com seus respectivos blocos de parafina arquivados no Departamento de Patologia do HC-FMRP-USP. Resumidamente, secções de 4µm foram desparafinizadas com xilol e rehidratadas em álcoois decrescentes. Após recuperação antigênica com tampão citrato e aquecimento em “steamer” inativou-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H2O2 a 3%). Os cortes

foram incubados com soro normal de cavalo na temperatura ambiente por 20 minutos, com anticorpo primário contra proteína p53 – clone DO-7 da Novo Castra Laboratories (NCL-p53-DO7) na diluição 1/100 por 2 horas, depois com o anticorpo secundário anti-camundongo (Dako) na diluição 1/200 por 30 minutos e subseqüentemente com streptavidin (Dako) diluição 1/100 por 30 minutos, e finalmente utilizado a diaminobenzidina como cromógeno. Utilizamos sempre lavagens com salina fosfato tamponada (PBS, PH7,4) entre os passos. Por último contracoramos com hematoxilina de Harris por 30 segundos.

Contagem de Células Marcadas: Todas as lâminas foram examinadas pelos mesmos observadores, utilizando aumento de 400X, e pelo menos 500 células foram contadas em campos bem preservados de tumores, sem conhecimento prévio de suas características. O grau de expressão do p53 foi relatado como porcentagem de células marcadas com o anticorpo entre as células contadas. Consideramos os limite inferior de 0% quando não havia células marcadas, e superior como igual ou maior que 80% (>80%).

Análise Estatística: O acúmulo da proteína p53 e os parâmetros clínico-patológicos foram comparados entre todos os pacientes. As diferenças entre os grupos foram analisadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney usando o programa Instat, versão 3.0. Intervalos livres de recorrência, livre de metástase e de sobrevivência foram definidos como o tempo entre a data da primeira biópsia com diagnóstico de carcinoma de células transicionais de bexiga e a data da recorrência, metástase e morte devido ao câncer, respectivamente. O ponto final, para os demais paciente, foi a data da última cistoscopia. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para comparar estes eventos relacionados com o tempo, e o teste logrank^{12,13} para comparar curvas, através do programa GraphPad Prism, versão 3.0.

RESULTADOS

A proteína p53 nuclear foi detectada em 61 (67,7%) dos 90 pacientes estudados, com o índice variando entre 0 e >80% (média = 23,7%, mediana = 5%, SD = 29,92).

A média de marcação dos tumores pT₂₋₄ foi estatisticamente diferente da observada em tumores pT_{A-1} (P = 0,01).

A expressão da p53 não foi significativamente diferente entre os tumores de G1 e G2 (P=0.09) apesar da média mais alta de marcação em G2 (Tabela 1). Entretanto foi altamente significativa a diferença entre

os graus G1 e G3 (P= 0.0004) e também significativa entre G2 e G3 (P=0.001).

O p53 não se correlacionou bem com o tamanho dos tumores (P=0.25), que foram subdivididos em maiores que 2cm e menores que 2cm, apesar da média e mediana mais altas entre os tumores maiores.

Para analisar os eventos relacionados com o tempo, foi adotado como ponto de corte para separar tumores p53-positivos e p53-negativos, a proporção de 10% de núcleos marcados. Este valor teve valor estatístico mais significativo que a mediana de 5% quando aplicado no presente estudo.

Tabela 1 - Correlação entre características clínico-patológicas e marcação com p53.

Fator		N	Marcação média ±SD	Valor P
Estádio	pT _{A-1}	62	18,4±27,2	0,01
	pT ₂₋₄	28	35,5±32,6	
Grau (1X2)	1	45	16,0±27,9	0,09
	2	29	20,1±24,5	
Grau (1X3)	1	45	16,0±27,9	0,0004
	3	16	51,9±28,9	
Grau (2X3)	2	29	20,1± 24,5	0,001
	3	16	51,9±28,9	
Tamanho	<2cm	14	13,0±21,4	0,25
	>2cm	64	25,7±30,4	

Pacientes com índice p53 maior que 10%, apresentaram sobrevida significativamente reduzida, quando comparados aos de marcação menor ou igual a 10% (P=0.0003), como mostra a Figura 1.

A comparação entre as curvas de recidiva dos tumores pT_{a-1} relacionadas ao tempo, falharam em demonstrar significância estatística (P=0.81) entre indivíduos p53 positivos e p53 negativos (Figura 2).

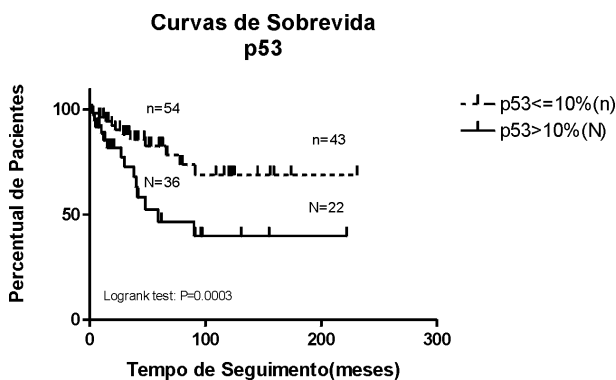


Figura 1 - Curvas de sobrevida conforme marcação do p53.

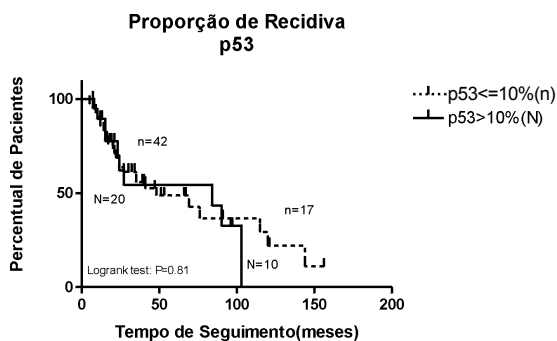


Figura 2 – Marcação do p53 e recidiva tumoral na bexiga.

A diferença estatística entre as curvas de intervalos livres de metástase foi muito significativa ($P=0.002$), conforme Figura 3.

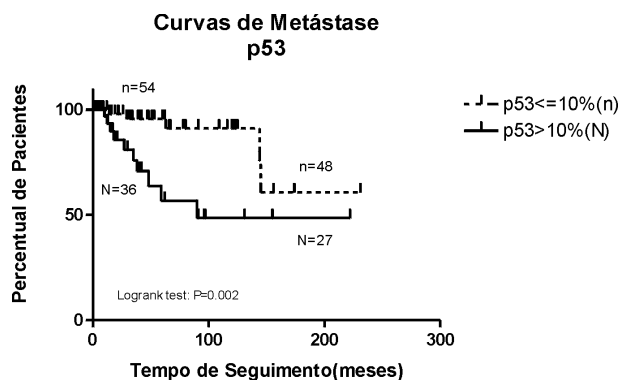


Figura 3 – Expressão da p53 e incidência de metástases.

DISCUSSÃO

A proporção de tumores que expressaram o p53 (67,7%) em nossa amostra é comparável à relatada em alguns estudos já publicados^{14,15,16}. Em nossa amostra encontrou-se correlação entre a marcação imunohistoquímica do p53 com o estágio e o grau do CCT. Mas, em outros estudos essa correlação nem sempre foi encontrada^{10,15,17,18}. As discrepâncias podem ocorrer por conta de diferenças nas amostragens ou decorrer de pequenas variações técnicas como tipo de anticorpo utilizado, estado de conservação das peças cirúrgicas e critérios de leitura dos núcleos marcados.

Sarkis et al.¹⁹ avaliaram o valor prognóstico da expressão da proteína p53 em tumores invasivos e mostrou sobrevida mais curta em indivíduos com alta expressão, mas não encontrou correlação entre o p53 e os achados patológicos. Lipponen¹⁷ correlacionou o p53 com progressão tumoral e pior prognóstico. De modo contrário, Thomas et al.¹⁴ relataram menor sobrevida dos pacientes com tumores p53 positivos mas sem diferença estatística. Usando a técnica do PCR para identificar mutações do gene p53, Fujimoto et al.³ mostraram que a incidência de mutações do p53 é maior em CCT invasivo e de alto grau do que em superficial de baixo grau.

A amostra agora estudada, não exibiu relação entre a expressão do p53 e a recidiva vesical, mas nela observou-se boa correlação entre a positividade do p53 com a progressão da doença caracterizada pela maior incidência de metástases e pela menor sobrevida. Isto ocorreu inclusive para os tumores pTa-1 no momento do diagnóstico. Estes dados permitem questionar o

tratamento conservador (ressecção transuretral) de tumores superficiais em que o p53 é positivo.

CONCLUSÃO

Na amostra estudada a expressão imunohistoquímica do p53 não mostrou relação com a recidiva vesical de tumores superficiais. Essa relação foi observada com o grau, o estágio, a incidência de metástases e a sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083-6. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
2. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
3. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1393-8.
4. Isobe M, Emmanuel BS, Givol D. Location of the gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320: 84-5.
5. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-9.
6. Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65: 765-74.
7. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.
8. Esrig D, Spruck CH III, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene tumor grade and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 1389-97.
9. Wright C, Mellon K, Johnston P. Expression of mutant p53, c-erb-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer* 1991 63: 967-70.
10. Sarkis AS, Dalbagni G, Gordon-Cardo C. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-9.
11. Serth J, Kuczyk MA, Bokemeyer C. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1995; 71: 201-7.
12. Simon RM. Design and conduct of clinical trials. In: DeVita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer principles and practice of oncology*. Volume 1. 3rd edition. Philadelphia : Lippincott, 1989. p.396-420.
13. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977; 35: 1-39.
14. Thomas DJ, Robinson MC, Charlton R. P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1993; 73: 533-7.

15. Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK. The role of BCL-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J. Urol* 2000; 163: 758-60.
16. Popov Z, Hoznek A, Colombel M. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; 80: 1472-81.
17. Lipponen PK. Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993; 53: 365-70.
18. Gradiner RA, Walsh MD, Allen V. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumor progression. *Br J Urol* 1994; 73: 526-32.
19. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE. Prognostic value of p53 nuclear over expression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1384-90.

Endereço para correspondência

Antonio Carlos Pereira Martins

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Divisão de Urologia

Av. Bandeirantes nº 3900, Ribeirão Preto, SP,

CEP – 14048-900.

e-mail: acpmartins@convex.com.br