

IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING FOR p53 PROTEIN IN PATIENTS WITH LOCALIZED PROSTATE CANCER

EDGAR THORELL, ANTONIO A. HARTMANN, CARLOS ARY DE VARGAS SOUTO,
CLAUDIO O. P. ALEXANDRE

Federal Foundation School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

Purpose: To assess the incidence of positive staining for p53 protein in localized prostate cancer and to relate these results to clinical and histopathologic staging parameters.

Material and Methods: The retrospective study was made using 72 samples of surgical material. Patients were screened in an outpatient basis and underwent radical prostatectomy after staging of localized prostate cancer. Protein p53 was detected by immunohistochemical staining. Patient average age was 64.2 years. PSA values varied from 1.8 to 5.7 ng/ml, and were over 4.0 ng/ml in 93% of the cases. Of the studied patients, 22.2% were in clinical stage T3, and 30.6% had a Gleason score equal or over 7.

Results: Positive nuclear reaction for p53 was detected in 6.9% of the cases, but none of them presented homogenous reactivity throughout the slide. Among the patients whose Gleason score was equal to or over 7, 13.6% showed positive reactivity for p53, while among the patients who had a Gleason score lower than 7, only 4% had positive reaction. However, these values had no significant statistical difference ($p = 0.386$, Fisher exact test). There were no significant statistical differences between positivity for p53 and the levels of pre-surgery PSA or the Gleason score values.

Conclusion: These results indicate that immunohistochemical positivity for p53 protein correlates poorly with prostatic cancer.

Key words: prostate, p53 protein, prostate cancer, prognosis, immunohistochemistry
Braz J Urol, 26: 270-275, 2000

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata tem recebido atenção especial por ser a neoplasia mais freqüente após os 50 anos de idade nos países ocidentais (1,2). A alta freqüência desta doença justifica os esforços na busca do aperfeiçoamento de métodos de detecção precoce e de marcadores prognósticos, com a conseqüente melhora no planejamento terapêutico. Como acontece com outras neoplasias, tem sido constatada a importância de mutações na carcinogênese e na progressão da doença. O acúmulo da proteína p53 no núcleo das células tumorais, tem sido apontado como mutação importante na carcinogênese e na progressão neoplásica. Este evento está fortemente associado a mutações puntiformes no gene TP53, sendo estas alterações as

lesões genéticas mais freqüentemente observadas nos diferentes tipos de câncer, incluindo as neoplasias urológicas (3-6). Alterações no produto deste gene podem ser detectadas por técnica imuno-histoquímica, que se baseia na evidência de que a meia-vida da proteína p53 mutada está aumentada, podendo ser detectada nas células neoplásicas (7). Vários estudos apontam a expressão da proteína p53 alterada como um marcador independente na evolução dos carcinomas de mama, cólon, reto, pulmão e próstata (8).

O objetivo deste trabalho foi avaliar retrospectivamente a freqüência de reações imuno-histoquímicas positivas para a proteína p53 em tumores de próstata, em pacientes submetidos à prostatectomia radical e examinar a relação com variáveis clinicopatológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 72 peças cirúrgicas de prostatectomia radical, do arquivo de material do Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas Porto Alegre (FFFCMPA). Os pacientes foram atendidos no ambulatório do Serviço de Urologia do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, no período compreendido entre 1993 e 1997, E submetidos à prostatectomia radical por adenocarcinoma da próstata, estádios T1N0M0 e T2N0M0.

Os espécimes cirúrgicos foram submetidos a cortes seriados, compreendendo fatias com 0,5 cm de espessura de toda a glândula, obedecendo à rotina e ao protocolo do Departamento de Patologia do Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas da FFFCMPA. O material foi previamente embebido em tinta nanquim para melhor identificação e avaliação das margens cirúrgicas. As fatias representativas dos cortes macroscópicos foram submetidas a inclusão em parafina para realização de cortes histológicos de 3 m de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina. Uma vez estabelecido o diagnóstico pelo patologista, foram separados os blocos de parafina das áreas neoplásicas a serem estudadas.

A gradação histológica foi estabelecida segundo os critérios de Gleason (9). A reação imunohistoquímica para a detecção do acúmulo da proteína p53 obedeceu ao protocolo usado no Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas da FFFCMPA. Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água destilada. O material foi colocado em uma solução de citrato (pH = 6,0) e levado ao forno de microondas em temperatura média-máxima por 15 minutos, sendo após retirado e deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. Após adicionar sobre o material uma solução tampão PBS (pH = 7,6) procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, incubando-se os cortes em uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol, por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se um ciclo de lavagem com água destilada e incubou-se o material por 30 minutos numa solução contendo 4% de soro normal em PBS. O anticorpo primário anti-

p53 (DO-7, Dako A/s, Dinamarca), foi preparado a uma diluição 1:50 em PBS e incubado com os cortes durante 12 horas em câmara úmida. Após um novo ciclo de lavagens os cortes foram novamente colocados em câmara úmida para a incubação, por 30 minutos, com o anticorpo secundário biotilado de camundongo anti-IgG (Vectastain, Vector Lab., CA, USA) diluído 1:600 em PBS. Após outro ciclo de lavagens, o material foi incubado em câmara úmida por 60 minutos com o complexo avidina/biotina (Strepto ABC, Vectastain, Vector Lab. CA, USA), com diluição 1:800 em PBS. A coloração da reação da imunoperoxidase foi realizada por meio da imersão, por 8 minutos, em uma solução contendo o cromógeno DAB (tetra-hidrocloro de 3,5-diamino-benzidina) e peróxido de hidrogênio. Após lavar em água corrente foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 2 minutos. A cada grupo de cortes submetidos à análise foram incluídos controles positivos e negativos. A leitura da reação foi feita em microscópio óptico e foram observados os critérios para positividade utilizados por outros autores, ou seja, um percentual mínimo de 5% de células coradas, por campo de grande aumento (X400) (7,10).

Os grupos de pacientes com reação positiva ou negativa ao antígeno p53 foram comparados quanto às variáveis estudadas por testes não paramétricos: U de Mann-Whitney e exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de $p = 0,05$ e as análises foram executadas com o auxílio do programa SPSS V6.0.

RESULTADOS

A idade dos pacientes variou de 40 a 74 anos, com uma média de 64,2 anos. A distribuição dos níveis de PSA variou de 1,8 a 57,0 ng/ml, sendo que em 93 % dos casos o PSA foi superior a 4,0 ng/ml.

O estágio clínico T3 foi identificado em 22,2% (16/72) dos pacientes e o escore de Gleason, foi igual ou superior a 7 em 30,6% (22/72) dos casos. De maneira consistente com os dados da literatura, os estádios clínicos mais avançados foram acompanhados pelos valores da gradação histológica de Gleason mais elevados (Tabela-1).

Tabela 1 - Distribuição dos dados de estágio clínico e da mediana do escore de Gleason dos 72 casos.

Estádio	N	Mediana dos Escores de Gleason
T2a	17	3 (2 a 7)
T2b	13	5 (5 a 7)
T2c	26	5 (2 a 9)
T3a	2	8 (5 a 10)
T3c	14	7 (5 a 10)

Entre os 72 casos analisados, 6,9% (5/72) apresentaram reação nuclear positiva. Em nenhum destes casos a positividade foi homogênea em toda a lâmina (Figura-1). Embora 22 pacientes tivessem escore de Gleason maior ou igual a 7, apenas 13,6%

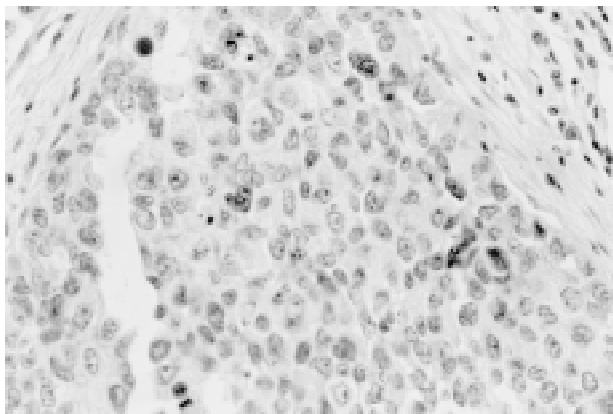


Figura 1 – Núcleos de células neoplásicas, apresentando reação imuno-histoquímica positiva para a proteína p53, em áreas de pouca diferenciação (imunomarcção, X400).

(3/22) apresentaram reação p53 positiva. Os pacientes com o escore menor que 7 tiveram apenas positividade de 4,0% (2/50) e estes índices não foram significativos ($p = 0,386$; teste exato de Fischer) (Tabela 2). Não foi observado associação significativa

Tabela 2 - Frequência dos casos com reação imuno-histoquímica positiva ou negativa para p53 em relação ao escore de Gleason.

Escore de Gleason	Reação Imuno-histoquímica p53	
	Positiva	Negativa
≥ 7	13,6% (3/22)	86,4% (19/22)
< 7	4,0% (2/50)	96,0% (48/50)

$p = 0,386$

tiva entre a positividade para o antígeno p53 e os níveis de PSA pré-cirúrgico ($p = 0,515$; Mann-Whitney) ou os valores do escore de Gleason ($p = 0,137$, Mann-Whitney) (Tabela-3).

Tabela 3 - Distribuição da mediana e da amplitude dos valores do PSA pré-cirúrgico (ng/ml) e dos valores da graduação histológica de Gleason dos casos com reação imuno-histoquímica positiva ou negativa para a proteína p53.

Fatores	Reação Imuno-histoquímica p53		p
	Positiva	Negativa	
PSA	16,1 (7,9 - 45,3)	12,0 (1,8 - 57,0)	0,515
Gleason	5 (7 - 10)	3 (5 - 10)	0,137

DISCUSSÃO

A história natural do carcinoma de próstata mostra comportamento biológico heterogêneo, variando de uma forma indolente até uma forma agressiva com ocorrência de metástase precoce (1,11).

Os mecanismos que levam o tumor de próstata a se desenvolver ainda são pouco conhecidos. Os esforços na elucidação dos mecanismos moleculares do processo da carcinogênese prostática, não identificaram nenhum marcador biológico que esteja ligado aos estádios iniciais. Surge, por essa razão, a necessidade da realização de pesquisas para identificar um marcador que possa oferecer melhores informações prognósticas do que as rotineiramente usadas e que são baseadas na avaliação clínica e anatomopatológica.

Alguns autores descreveram uma associação significativa entre a alteração na expressão da proteína p53 nuclear e o câncer de próstata (10,12,13). Embora estes trabalhos tenham relacionado este fenômeno como um evento favorável no acompanhamento de pacientes com câncer de próstata submetidos a prostatectomia radical, existe um número significativo de outros estudos que não confirmam tais resultados (7,14-16). Por outro lado, são escassos os trabalhos desta natureza em nossa população.

Em nosso estudo observamos uma baixa frequência de tumores apresentando acúmulo nuclear da

proteína p53 (6,9%). Esta observação está de acordo com diversos estudos que sugerem que a mutação do p53 é um evento tardio na carcinogênese prostática. A confirmação destes resultados, portanto, inviabiliza a utilização da detecção imuno-histoquímica desta proteína como um marcador independente, com propósitos prognósticos.

Entre as variáveis clinicopatológicas utilizadas na avaliação da evolução dos tumores, a gradação de Gleason é o parâmetro de melhor valor preditivo para definir o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de próstata. O escore igual ou maior que 7 indica pior prognóstico (17). Em nosso trabalho não pudemos demonstrar associação significativa entre a frequência de reações imuno-histoquímicas positivas do p53 com esta variável ($p = 0,137$).

Apesar dos trabalhos publicados relacionando a proteína p53 e o câncer de próstata, o entusiasmo inicial, que adveio com a identificação do gene TP53, parece ter diminuído com o passar dos anos, arrefecendo a esperança de que este pudesse se tornar um marcador independente para evolução do carcinoma de próstata, pois a sua manifestação é de ocorrência tardia. O marcador ideal seria aquele que já demonstrasse positividade tecidual em estádios iniciais e assim pudesse prever o quadro evolutivo, melhor do que o fazem a gradação histológica pelo método de Gleason, o PSA, e o estadiamento TNM (18). Como a detecção imuno-histoquímica desta proteína mostra evidências de estar associada aos estádios avançados da doença, onde na maioria das vezes a gradação de Gleason é alta, o que sugere pior prognóstico, este evento perde o seu significado como um indicador preditivo independente de prognóstico.

Devemos assinalar, por outro lado, que a positividade pela imuno-histoquímica não indica necessariamente a presença de proteína mutada, já que ela pode acumular-se no núcleo por outras razões como, por exemplo, anormalidades em outros genes envolvidos no metabolismo e regulação do gene TP53 ou a presença de antígenos virais (19,20). Também, nem todos os tumores com mutação do gene TP53 serão detectados pela reação imuno-histoquímica. Alguns tipos de mutação podem resultar na expressão de uma proteína truncada que não apresentaria sítio antigênico para ser reconhecido pelos anticorpos comumente usa-

dos (20). Entretanto alguns estudos mostram que o acúmulo nuclear da proteína p53 correlaciona-se bem com a presença de mutações no gene TP53, sugerindo que esta técnica simples e rápida pode ser adequada a este tipo de estudo (21,22). Em nosso trabalho, foi realizada apenas a caracterização da positividade pela técnica imuno-histoquímica, não identificando-se a possível mutação.

Projeto de Pesquisa apoiado pela CAPES

REFERÊNCIAS

1. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 47: 5-27, 1997.
2. Boring CC, Squires TS, Tony T: *Cancer Statistics*, 44: 7-15, 1994.
3. Bishop JM, Weinberg RA (eds.): *Scientific American Molecular Oncology*. New York: Scientific American Incorporated, 1996.
4. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D: The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer*, 69: 409-416, 1994.
5. Chang F, Syrjänen S, Sirjänen K: Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 13: 1009-1022, 1995.
6. Curtis, CH, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 28: 1318-1327, 1993.
7. Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR, Fuks ZVI, Cardo CC: Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, 151: 1276-1280, 1994.
8. Stricken HJ, Jonathan KJ, Michael DL, Amin MB: Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology*, 152: 366-396, 1996.
9. Gleason DF, Mellinger GT: Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, 111: 58-64, 1974.

10. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostoffi KF, Macleod DG, Srivastava S, Moul JW: p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*, 1: 1295-1300, 1995.
11. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA: Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol*, 23: 211-222, 1992.
12. Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J: Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst*, 84: 883-887, 1992.
13. Kallakury BVS, Figge J, Ross JS, Fisher HUG, Jennings T: Association of p53 immunoreactivity with high Gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*, 25: 92-97, 1994.
14. Thomas DJ, Robinson M, King P, Hasan R, Charlton R, Martin J, Carr TW, Neal DE: p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br J Urol*, 72: 778-781, 1993.
15. Effert P, Maccoy RH, Walther PJ, Liu ET: p53 gene alteration in human prostate carcinoma. *J Urol*, 150: 257-261, 1993.
16. Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JP, Weghorst CM, Buzard GS, Moul JW, Srivastava S: Alteration of the tumor suppressor gene p53 in high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol*, 154: 414-421, 1995.
17. Partin AW, Yoo JK, Carter HB: The use of prostate-specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol*, 20: 713-725, 1993.
18. Epstein JI, Carmichael M, Partin AW: AO-519 (Fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic stage in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*, 45: 81-86, 1995.
19. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, Lawton CA, Hammond EH, Pilepich MV, Mesic J, Fu KK, Abrams RA, Pajak TF, Shipley WU, Cox JD: p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Nat Cancer Inst*, 89: 158-165, 1997.
20. Harris CC: The 1995 Walter Hubert Lecture - molecular epidemiology of human cancer: Insights from the mutational analysis of the p53 tumor-suppressor gene. *Br J Cancer*, 73: 261-269, 1996.
21. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC Jr., Berchuk A: Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 51: 2979-2983, 1991.
22. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Doglioni C, Pelucchi S, Barzan L, Grandi E, Boiocchi M: High frequency of p53 gene alterations associate with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene*, 7: 1159-1184, 1992.

Received: October 18, 1999

Accepted after revision: April 26, 2000

RESUMO

DETECÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA LOCALIZADO DA PRÓSTATA

Objetivo: Avaliar a frequência de reações positivas para a proteína p53, no câncer localizado de próstata e examinar a relação com os parâmetros de estadiamento clínico e anatomopatológicos.

Material e Métodos: Foram avaliadas retrospectivamente 72 peças cirúrgicas do arquivo de material do Instituto de Pesquisas Cito-Oncológicas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas, de pacientes atendidos no ambulatório do Serviço de Urologia do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e que foram submetidos à prostatectomia radical, tendo sido estagiados no pré-operatório como

portadores de carcinoma localizado. A detecção da proteína p53 foi realizada por meio de técnica imuno-histoquímica.

Resultados: A idade média dos pacientes foi de 64,2 anos. O valor do PSA foi superior a 4,0 ng/ml em 93% dos casos, apresentando uma amplitude de 1,8 a 57,0 ng/ml. Entre os pacientes da amostra, 22,2% estavam no estágio clínico T3 e 30,6% apresentaram escore de Gleason igual ou superior a 7. A reação nuclear positiva para proteína p53 foi detectada em 6,9% dos casos, sendo que em nenhum deles a reatividade foi homogênea em toda a lâmina. Dentre os pacientes em que o escore de Gleason era igual ou superior a 7, 13,6 % manifestaram reatividade positiva para a proteína p53, enquanto que dos que tiveram o escore de Gleason inferior a 7, apenas 4 % demonstraram reação positiva. Estes valores, entretanto, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,386$, teste exato de Fisher). Da mesma forma não observamos diferenças estatisticamente significativas entre a positividade para a p53 e os níveis de PSA pré-cirúrgico ou os valores do escore de Gleason ($p = 0,515$ e $p = 0,137$, respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Conclusão: Estes resultados mostram que a proteína p53, não é um marcador independente no câncer de próstata neste grupo de pacientes.

Unitermos: próstata, câncer de próstata, proteína p53, prognóstico, imuno-histoquímica
Braz J Urol, 26: 270-275, 2000

Correspondence address:

Edgar Thorell

Rua Tomaz Gonzaga,430 / casa 13

Porto Alegre, RS, 91340-480, Brazil

Fax: ++ (55) (51) 328-9237

E-mail: thorell@zaz.com.br