

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF P53 GENE EXPRESSION IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER

SÍLVIO HENRIQUE MAIA DE ALMEIDA, DANIELA DERROSSI, MARCO AURÉLIO FREITAS RODRIGUES, MARCOS LIBONI, RENATA DINARDI BORGES, HORÁCIO ALVARENGA MOREIRA

Department of Surgery, Section of Urology and Section of Applied Pathology, State University of Londrina, Paraná, Brazil

ABSTRACT

Purpose: There is evidence that the p53 gene expression has prognostic value in patients with bladder transitional cell carcinoma (TCC). We evaluated the p53 expression, by means of immunohistochemistry, as a prognostic factor in the TCC of the bladder in our Institution and compared our findings with those reported in the literature.

Material and Methods: A retrospective study of 80 patients with bladder TCC (65 male and 15 female) aged 18 to 81 years old (mean = 62) was performed. Mean follow-up time was 33 months. Representative tumor sections were stained with an anti-p53 antibody. Chi-square and Fisher's exact test were used, and survival curves were plotted and analyzed using the Kaplan-Meier method. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Of the 80 patients studied, 41 were at stage Ta/T1 (51.2%) and 39 at stage T2/T4 (48.8%). Fifty-two (65%) had histological grade 2 or less and 28 (35%) had grade 3 or 4. Tumors with less differentiated histological grades correlated with recurrence ($p = 0.001$), progression and tumor-related death ($p = 0.005$). Increased expression of p53 was observed in 38 cases (47.5%) and was associated with higher grades and advanced stages, but not with recurrence, progression or tumor-related death ($p = 0.01$ and $p = 0.045$, respectively). Histological grade was the most significant factor for recurrence. Patient survival after diagnosis was lower for the group with histological grade greater than 2 ($p = 0.015$). Histological grade greater than 2 and advanced stages were also related with earlier recurrence.

Conclusion: The results confirm the importance of histological grade as a prognostic factor. The immunohistochemical expression of p53 was not found to be a prognostic marker, possibly due to tumor-related variations and method limitations. Nevertheless, the results suggest that the evaluation of p53 may bring additional information to the traditional prognostic factors currently in use.

Key words: bladder, bladder neoplasms, transitional cell, p53 protein, genes, prognosis

Braz J Urol, 26: 378-384, 2000

INTRODUÇÃO

Em 1991 descreveu-se a associação das mutações do gene p53 com casos de carcinoma do epitélio transicional da bexiga (CET) de alto Grau histológico e invasivos, e sugeriu-se um possível valor clínico para a detecção da proteína p53 através da técnica de imuno-histoquímica (1).

Sarkis et al. testaram a reação imuno-histoquímica da proteína p53 em 43 carcinomas

vesicais estágio T1 (2). Detectaram que pacientes com aumento de expressão da proteína p53, ou seja, aqueles portadores de tumores com mutação do gene p53, têm alta probabilidade de progressão. Porém, reafirmaram a necessidade de novos estudos para confirmar os resultados e justificar o uso do método clinicamente. Existem dados na literatura conflitantes a esses, e persiste a dúvida quanto ao papel da expressão da gene p53 como fator independente no prognóstico de carcinomas vesicais (3-6).

Diante das contradições da literatura elaborou-se um estudo para comparar a expressão imunohistoquímica da proteína p53 com os tradicionais fatores prognósticos do carcinoma do epitélio transicional vesical (CET): Grau histológico e estágio clínico. Pretendeu-se ainda, analisar as possíveis diferenças entre os resultados da literatura sobre o tema.

MATERIAL E MÉTODOS

A população consistiu de 80 pacientes tratados entre 1986 e 1997, sendo 15 (18.8%) mulheres e 65 (81.3%) homens, acompanhados em média por 33 meses, com variação de 2 a 144 meses. A idade variou entre 18 anos e 81 anos, com média de 62 anos.

As variáveis estudadas foram estágio clínico, Grau histológico e expressão imunohistoquímica da proteína p53 no momento do diagnóstico.

Sem conhecimento do diagnóstico prévio, estágio e da evolução do doente um patologista revisou todas as lâminas das peças cirúrgicas, em busca da amostra mais significativa de cada tumor, dividindo-se a graduação histológica em 2 grupos: grupo A com tumores de Grau I e II e grupo B com tumores acima de Grau II (classificação da OMS).

A análise imunohistoquímica foi realizada com tecidos deparafinados da lâmina com o padrão celular mais representativo de cada paciente, e processados com o anticorpo anti-p53 PAb 1801 (anticorpo murino, classe IgG1, Vector Labs, Burlingame, CA). Usou-se como controles positivos da técnica fragmentos de carcinoma de mama com p53 positivos, e epitélio normal, linfócitos e células estromais como controles negativos intra-teciduals.

Considerou-se como positivo para a expressão da proteína p53 tumores com pelo menos 10% das células reagentes, conforme protocolo anterior na literatura (7).

Os resultados foram ordenados em 2 grupos: carcinomas positivos e negativos para a proteína p53.

A classificação do estágio clínico dividiu a população em outros 2 grupos: tumores superficiais (até T1) e tumores infiltrativos ou metastáticos (acima de T1).

As análises das variáveis foram verificadas pelo Teste do Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher.

As curvas para o tempo livre da doença foram obtidas através da técnica de Kaplan-Meier e comparadas pelos testes de Cox-Mantel e Wilcoxon. Adotou-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Quarenta e um pacientes classificaram-se no grupo de estágio Ta/T1 (51.2%) e 39 pertenceram ao grupo T2 a T4 (48.8%), sendo ambos os grupos uniformes para a idade e sexo. Cinquenta e dois pacientes (65%) incorporaram-se ao grupo A de Grau menor ou igual a II e 28 (35%) entre aqueles de Grau histológico maior que II (grupo B).

Quarenta e três pacientes apresentaram recorrências tumorais (53.7%) e desses, 13 progrediram e evoluíram para o óbito (16.3%). Não existiram diferenças entre os grupos com e sem recorrências em relação à idade e tempo de acompanhamento. Casos com Graus histológicos maior que II apresentaram uma maior probabilidade de recidiva e de progressão com óbito, com $p = 0.001$ e $p = 0.005$ respectivamente.

A expressão aumentada da proteína p53 foi observada em 38 casos (47.5%). Essa porcentagem não se alterou mesmo quando elevou-se o índice de positividade nuclear para 20%.

Tabela 1 – Distribuição das variáveis em relação a incidência de recorrências progressão e óbitos.

Variáveis	Recorrências		p*
	Presentes	Ausentes	
Grau ≤ II	21	31	
Grau > II	22	06	0.001*
p53 (+)	15	23	
p53 (-)	22	20	0.248
Estádio ≤ T1	19	22	
Estádio > T1	24	15	0.170
	Progressão e Óbitos		
Grau ≤ II	04	48	
Grau > II	09	19	0.008*
p53 (+)	09	29	
p53 (-)	04	38	0.086
Estádio ≤ T1	02	39	
Estádio > T1	11	28	0.005*

Houve uma associação entre tumores Grau III (grupo B) e p53 positivo ($p = 0.001$), e também, entre tumores com estágio T2 a T4 e p53 positivos ($p = 0.045$). Não existiu associação entre casos p53 positivos e recorrência tumoral ($p = 0.24$) ou com os casos que progrediram ao óbito ($p = 0.086$). A distribuição das variáveis quanto à incidência de recorrências e óbitos está ilustrada na Tabela-1.

O grupo com Grau histológico maior que II apresentou um menor tempo de sobrevida após o diagnóstico ($p = 0.015$). A curva de sobrevida em relação ao Grau histológico está representada na Figura-1. A expressão do gene p53 não se relacionou com menor tempo de sobrevida ($p = 0.273$).

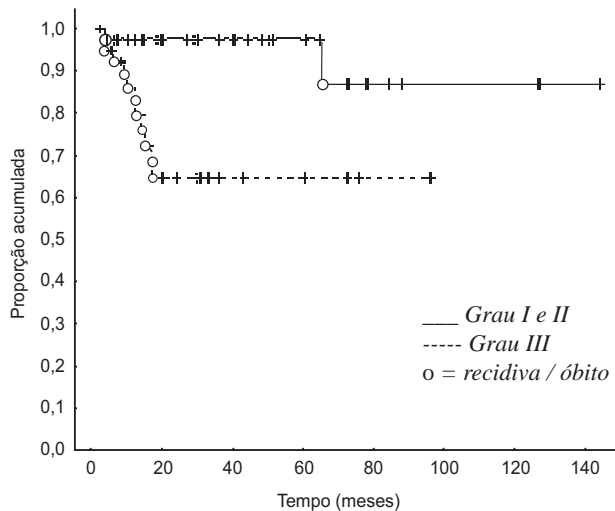


Figura 1 - Curva de progressão e sobrevida segundo o grau histológico ($p = 0.0015$).

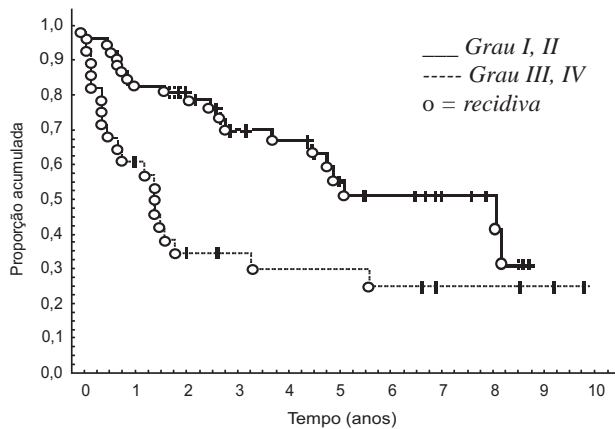


Figura 2 - Curva para tempo de recidiva segundo o grau histológico ($p = 0.002$).

O Grau histológico maior que II também constituiu-se em fator significativo para a distribuição da recorrência ao longo do tempo ($p = 0.002$) com tendência a recorrências antes dos 2 anos de acompanhamento (Figura-2). O mesmo existiu para estágios avançados ($p = 0.001$) (Figura-3).

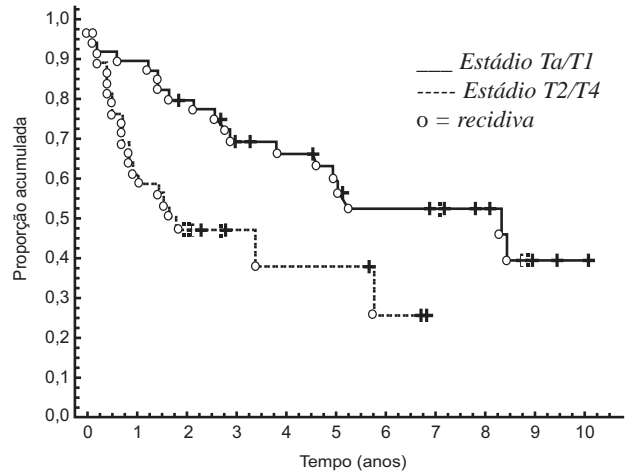


Figura 3 - Curva para tempo de recidiva segundo o estágio ($p = 0.001$).

Apenas 2 tumores com p53 positivo recorreram após 2 anos de acompanhamento, em contraste aos tumores p53 negativos com distribuição de recorrências mais uniforme ao longo do tempo ($p = 0.013$). A Figura-4 sumariza as recorrências ao longo do tempo de acordo com a expressão do gene p53.

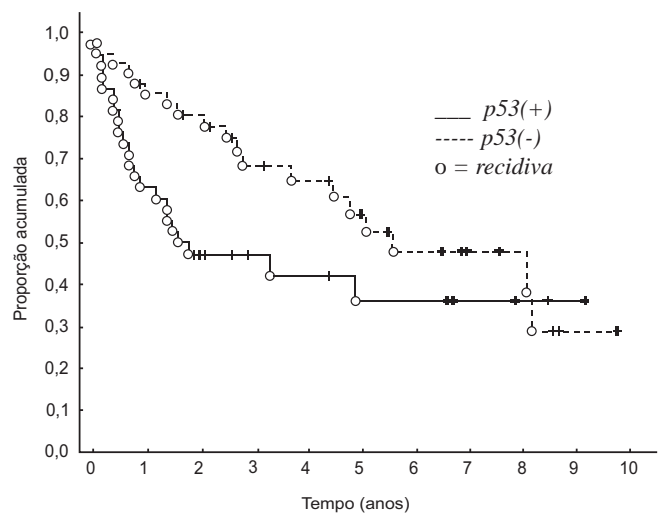


Figura 4 - Curva para o tempo de recidiva conforme a expressão do gene p53 ($p = 0.013$).

DISCUSSÃO

Não existem pesquisas prospectivas sobre o gene p53 no carcinoma do epitélio transicional vesical, existindo assim, a possibilidade de erros metodológicos inerentes aos diversos estudos retrospectivos.

Uma possível explicação para os resultados conflitantes da literatura a respeito da função do gene p53 no CET é a dificuldade de padronização das diferentes técnicas de detecção das mutações do gene p53, já que nenhuma delas têm sensibilidade de 100% (3). Por exemplo, existe uma relação inversa entre o tamanho do fragmento de DNA e a sensibilidade da reação em cadeia da enzima polimerase. Em um fragmento com 155 pares de bases a sensibilidade é de 97%, para um fragmento de 420 pares é de 58% e apenas 3% para 600 pares (8).

A proteína p53 mutada tem uma meia-vida maior que a proteína natural, permitindo sua identificação através da reação com anticorpos específicos. Assim na técnica de imuno-histoquímica, resultados falsos positivos podem ocorrer sem a mutação do gene p53, pelo aumento da transcrição em células rapidamente proliferativas ou pela inativação de um fator necessário para a degradação da proteína p53, desencadeando uma quantidade relativa maior da proteína p53 natural. E, embora considere-se que 90% das mutações possam ser detectadas por imuno-histoquímica, falsos negativos ocorrem em mutações que produzem proteínas p53 muito alteradas, que não respondem aos receptores nucleares (8).

Outra explicação às controvérsias seria a diferente expressão dos vários anticorpos, que comparados ao PAb 1801, apresentam resultados inferiores na detecção das mutações em tecidos fixados em formalina. Por outro lado, o grau de concordância entre a imuno-histoquímica com o anticorpo Pab1801 em material a fresco e parafinado está torno de 92% a 96% (9). Contudo, comparando-se 3 anticorpos: CM1, PAb1801 e D07, em exames a fresco (10 casos) e em parafina (21 casos), observou-se que o principal fator de discordância é a expressão variável da proteína p53 dentro de uma mesma amostra tumoral, independente do anticorpo utilizado (10).

Considerou-se o índice de 10% de positividade nuclear como ponto de corte para a ex-

pressão do gene p53, porém não existiram mudanças na porcentagem de casos positivos quando aumentou-se esse índice para 20%. A literatura contém estudos com índices de corte de 5% a 40%, porém a maioria dos autores adota 10% ou 20% (11-13). Assim, sugere-se que o índice adotado como critério de positividade não deva influir como causa para os diferentes resultados da literatura.

Além das questões técnicas ou metodológicas, existem também dúvidas sobre a biologia tumoral. Uma origem policlonal para o CET pode explicar a expressão imuno-histoquímica heterogênea dentro de um mesmo tumor, limitando assim a utilidade do método. Outra hipótese é a própria ação do gene p53 que se efetua por fatores apenas parcialmente por ele controlado. Por exemplo, a proteína p53 normal ativa complexos ciclina-dependentes bloqueando o ciclo celular em G1, porém, existem mecanismos que também bloqueiam a fase G1, mesmo na presença da proteína p53 mutada. A expressão imuno-histoquímica tumoral provavelmente reflete apenas uma parte da complexa interação entre genes e fatores de ativação (14). O estudo dessa "cascata" molecular poderia explicar melhor a discordância da literatura (3-6).

A expressão aumentada do gene p53 não foi fator prognóstico, mas alguns aspectos observados sugerem uma participação dessa variável na evolução da neoplasia. A mutação do gene p53 relacionou-se com alto Grau histológico e estágio avançado. Do mesmo modo, as recidivas de casos p53 (+) foram mais precoces.

Pode-se contrapor a esses resultados, a idéia de que eles apenas refletem os já demonstrados pelo Grau histológico. Mas não se deve esquecer, de que a definição do Grau depende da interpretação pessoal do patologista sobre as diversas características morfológicas celulares, e que nem sempre laudos de diferentes patologistas são concordantes.

Uma alternativa seria estudar a concomitância da mutação do gene p53 com outros genes e fatores celulares, procurando assim outras interações no ciclo celular. Porém, também essas correlações demonstram resultados duvidosos quanto ao seu valor clínico (5,15).

Sabe-se que geralmente recorrências superficiais ocorrem com tumores diplóides e p53 mutante negativo e, tumores com metástases são aneuplóides e p53 positivos, porém, ambos sem vantagens prognósticas sobre os índices de proliferação celular (15). Outros autores estudaram a associação de ambos fatores e ainda que com casuísticas pequenas, 33 e 87 casos, respectivamente, sugeriram vantagens na detecção prognóstica da associação entre aneuploidia e expressão aumentada da proteína p53 (5,16).

Um segundo efeito cooperativo estudado foi do gene p53 e gene do retinoblastoma (Rb). A concomitância da perda do gene Rb e a expressão aumentada do gene p53 foi relacionada com o aumento da fração de crescimento celular em CET (9). A progressão foi rápida e a sobrevida diminuiu sobremaneira quando houve a associação da alteração do p53 e pRb em 59 pacientes estudados por Cordon-Cardo; resultado não repetido em outras séries (14,17).

Um único trabalho obteve com a combinação em duplas ou triplas de genes alterados (p53, MIB-1, C-erb B2, fator de crescimento epitelial e bcl-1) resultados superiores aos do Grau histológico (18). Outras correlações foram estudadas, mas sua utilização em clínica como fatores prognósticos ainda aguarda estudos randomizados, prospectivos e com amostra suficiente de pacientes. Além disto o custo eleva- do justifica seu uso somente em pesquisas (19,20).

CONCLUSÃO

A expressão aumentada do gene p53 relacionou-se com alto Grau histológico, estágio avançado e um tempo precoce para recorrências, mas não se relacionou com óbitos ou recorrências.

Os resultados encontrados neste trabalho reafirmam a importância dos fatores prognósticos tradicionais, principalmente o Grau histológico, único fator prognóstico relacionado simultaneamente com recorrência, progressão e óbitos.

A expressão imuno-histoquímica do gene p53 não alterou a importância desses fatores; e sua positividade na condução dos casos de carcinomas do epitélio transicional veio somar informações ao diagnóstico.

Necessita-se compreender melhor a relação entre os vários agentes atuantes na biologia tumoral, aprimorar e padronizar técnicas de detecção para uma conclusão definitiva sobre o papel clínico da expressão do gene p53.

REFERÊNCIAS

1. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Volgestein B: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers urine samples. *Science*, 252: 706-709, 1991.
2. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang Z, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*, 85: 53-59, 1993.
3. Lipponen PK: Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer*, 53: 365-370, 1993.
4. Bernardini S, Adessi GL, Billerey C, Chezy E, Carbillet JP, Bittard H: Immunohistochemical detection of protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas. *J Urol*, 162: 1496-1501, 1999.
5. Nakopoulou L, Constantinides C, Papan-dropoulos J, Theodoropoulos G, Tzonou A, Giannopoulos A, Zervas A, Dimopoulos: Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: comparison with DNA ploidy. *Urology*, 46: 334-340, 1995.
6. Têtu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P: Prevalence and clinical significance of HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol*, 155: 1784-1788, 1996.
7. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Suchiu Chen MS, Peter W, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl J Med*, 331: 1259-1264, 1994.
8. Uchida T, Wada C, Ishida H, Wang C, Egawa S,

- Yokoyama E, Kameya T, Koshiha K: p53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J Urol*, 153:1097-1104, 1995.
9. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*, 152: 388-392, 1994.
 10. Gardiner R A, Walsh MD, Aleen S, Rahman S, Samaratunge MLTH, Seymour GJ, Lavin MF: Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumor progression. *Br J Urol*, 73: 526-532, 1994.
 11. Kuczyk MA, Bokemeyer C, Serth J, Henvartin C, Oelke M, Hofner K, Tan HK, Jones U: p53 overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur Journal of Cancer*, 31: 2243-2247, 1995.
 12. Burkhand FC, Markwalder R, Thalmann GN, Studer EU: Immunohistochemical determination of p53 overexpression. *Urol Res*, 25: 31-35, 1997.
 13. Cassetta G, Gontero P, Russo R, Pacchioni D, Tizzani A: p53 expression compared with others prognostic factors in OMS grade-I stage-Ta transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*, 32: 229-236, 1997.
 14. Jahnson S, Karlsson MG: Predictive value of p53 and pRb immunostaining in locally advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J Urol*, 160: 1291-1296, 1998.
 15. Raitanen MP, Teuvo L, Tammela J, Kallioinen M, Isola J: p53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol*, 157: 1250-1253, 1997.
 16. Mellon K, Wilkinson S, Vickers J, Robinson MC, Shenton BK, Neal DE: Abnormalities in p53 and DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol*, 73: 522-525, 1994.
 17. Cordon-Cardo C, Zhang Z, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu S, Xu H, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Research*, 57: 1217-1221, 1997.
 18. Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson ML: Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histological grade and expression of p53, MIB-1, c-erb B2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer*, 82: 715-723, 1998.
 19. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG, Cote RJ: Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 89: 219-227, 1997.
 20. Schmitz-Drager BJ, Kushima M, Goebell P, Jase TW, Gerharz CD, Bultel H, Schulz WA, Elbert T, Ackermann R. p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer. *Eur Urol*, 32: 487-493, 1997.

Received: February 23, 2000

Accepted after revision: July 19, 2000

COMENTÁRIO EDITORIAL

Com o avanço da biologia molecular, vários cromossomos, genes e proteínas vêm sendo pesquisados e alguns como o p53, PCNA, Ki67, BCL-2, c-ERB e outros vem tendo importância no prognóstico e seguimento de vários tumores urológicos.

A literatura é controversa ainda em vários pontos, com trabalhos mostrando importância na expressão do p53 quanto ao prognóstico dos tumores uroteliais vesicais superficiais, e outros não conseguindo mostrar essa diferença. Na discussão o autor abordou com propriedade que a heterogenicidade das séries e dos métodos podem ser responsáveis pelos diferentes resultados. O fato da maioria das séries apresentarem casuísticas retrospectivas e com material colhido da parafina também são fatores que podem contribuir para resultados controversos.

Múltiplas anormalidades moleculares têm sido identificadas no carcinoma urotelial de bexiga, entre eles a perda de material genético do cromossomo 9, provocando a inativação de gens supressores

de tumor. As alterações do cromossomo 9 parecem ser secundárias nessas lesões, sendo que a inativação do p53 geralmente ocorre antes da perda do cromossomo 9.

Certamente os passos da tumorigênese da bexiga são vários e alguns desconhecidos, porém com

o avanço da genética molecular, importantes aspectos da gênese, diagnóstico, tratamento e seguimento desses tumores serão entendidos e poderão ser utilizados na prática clínica.

Flávio Hering
Escola Paulista de Medicina (UNIFESP)

RESUMO

IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA DA EXPRESSÃO DO GENE P53 NO CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA

Objetivo: Verificar a importância prognóstica do gene p53 através de imuno-histoquímica no carcinoma do epitélio transicional, comparando-o com Grau histológico e estágio clínico.

Métodos: Estudo retrospectivo com 80 pacientes acompanhados por 33 meses em média. Empregou-se o anticorpo PAb 1801 em peças deparafinadas. Utilizou-se o teste do Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher; as curvas de sobrevida foram analisadas com a técnica de Kaplan-Meier, com $p < 0.05$.

Resultados: Quarenta e um pacientes classificaram-se como estágio Ta/T1 (51.2%) e 39 como T2/T4 (48.8%); 52 deles (65%) apresentaram Grau histológico menor ou igual a II e 28 pacientes (35%) Grau maior que II. Tumores com Graus histológicos indiferenciados relacionaram-se com recorrências ($p = 0.001$), progressão e óbitos ($p = 0.008$), e estádios avançados com progressão e óbitos ($p = 0.005$). A expressão aumentada da proteína p53 esteve presente em 38 casos (47.5%) e associou-se à altos Graus e estádios avançados ($p = 0.001$ e $p = 0.045$), mas não com recorrência ou progressão e óbito ($p = 0.24$ e $p = 0.086$). Ao longo do tempo a expressão aumentada do p53 apresentou uma tendência de recorrência mais precoce do que no grupo p53 negativo ($p = 0.013$). O grupo com Grau histológico maior que II mostrou uma sobrevida mais curta ($p = 0.015$). O Grau histológico maior que II e estádios avançados também constituíram-se em fatores significativos para a precocidade da recorrência ($p = 0.002$ e $p = 0.001$).

Conclusão: Nossos resultados reafirmam a importância do Grau histológico como fator prognóstico. A expressão imuno-histoquímica do gene p53 não representou um marcador prognóstico, provavelmente por fatores inerentes ao tumor e também pelas limitações do método. Entretanto, os resultados sugerem que ela possa somar novas informações aos fatores prognósticos tradicionais.

Unitermos: bexiga, carcinoma de bexiga, células transacionais, p53, prognóstico

Braz J Urol, 26: 378-384, 2000

Correspondence address:

Sílvio Henrique Maia de Almeida
Rua Paes Leme, 1081/301
Jardim Ipiranga, Londrina, PR, 86010-520
Fax: ++ (55) (43) 337-1800