

Estudo do biomarcador p16 no carcinoma de mama de mulheres submetidas à endocrinoterapia primária de curta duração com tamoxifeno e anastrozol

Study of p16 biomarker after short-period primary endocrinotherapy with tamoxifen and anastrozole in postmenopausal women with breast carcinoma

Alexandre Santos Melitto¹, André Mattar¹, Karine Angélica Cintra¹,
Fernando Augusto Soares¹, Ângela Flavia Logullo Waitzberh¹, Luiz Henrique Gebrim¹

Descritores

Neoplasias da mama
Receptores estrogênicos
Receptores de progesterona
Tratamento neoadjuvante
Tamoxifeno
Inibidores da aromatase
Genes p16

Keywords

Breast neoplasms
Receptors, estrogen
Receptors, progesterone
Neoadjuvant therapy
Tamoxifen
Aromatase inhibitors
Genes, p16

RESUMO

Introdução: Frequentes deleções e mutações têm sido descritas no gene p16 em diversos tipos de tumores, mas pouco se sabe sobre o valor preditivo do p16 na hormonioresistência ao tratamento do câncer de mama. **Objetivos:** Estudar a expressão do p16 e dos receptores de estrogênio e progesterona (RE e RP) em pacientes com carcinoma de mama RE e/ ou RP (+) após curto período (26 dias) de tratamento com tamoxifeno, anastrozol e placebo. **Métodos:** Estudo prospectivo randomizado duplo-cego realizado com 58 pacientes na pós-menopausa diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios II e III, que no período pré-operatório foram subdivididas em três grupos: P (placebo, n = 25), T (tamoxifeno 20 mg/dia, n = 15) e A (anastrozol 1 mg/dia, n = 18). A biópsia foi realizada no momento do diagnóstico e após a cirurgia definitiva (26º dia). Realizou-se o estudo semiquantitativo utilizando-se os critérios de Allred. **Resultados:** A positividade do p16 variou de 22 para 17%, respectivamente no pré e no pós-tratamento com anastrozol; variou de 8 para 4% no grupo placebo e não houve variação, com 7% de positividade, no grupo que recebeu tamoxifeno. A comparação entre grupos e tempos não apresentou relação significativa para o p16 (p = 0,17). Não foi encontrada correlação entre a positividade do p16 e o status hormonal (RE e RP). **Conclusão:** Não houve diferença estatística significativa entre os três grupos estudados. Outros biomarcadores deverão ser pesquisados para se identificar precocemente a hormônio-resistência e a especificidade terapêutica.

ABSTRACT

Background: Frequent deletions or mutations of the *INK4* gene, which encodes the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor *p16INK4a*, have been documented in various human cancers, but little is known about the role of this tumor suppressor gene in primary breast cancer, and there is a lack of reports in the literature about its expression behavior in neoadjuvant endocrinotherapy with tamoxifen or anastrozole. **Objective:** To analyze *p16INK4a* expression in patients with invasive ductal carcinomas (IDC) prior to tamoxifen and anastrozole neoadjuvant treatment and the possible correlation with estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR). **Methods:** We examined *p16INK4a* expression and its relationship in short period (26 days) neoadjuvant endocrine therapy with tamoxifen and anastrozole in 58 primary breast cancers with palpable HR-positive IDC. They were double-blind randomized in three neoadjuvant treatment groups: Anastrozole 1

Trabalho realizado no Hospital São Paulo, São Paulo (SP), Brasil e Hospital Pérola Byington de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

¹ Departamento de Ginecologia e Patologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo (SP), Brasil; Departamento de Mastologia do Hospital Pérola Byington, São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Alexandre Santos Melitto – Avenida Indianópolis, 219 – CEP 04063-000 – São Paulo (SP), Brasil – e-mail: melitto@hotmail.com

Recebido em: 7/12/2009. Aceito em: 8/1/2010

mg/day (n = 17), Placebo (n = 25) and Tamoxifen 20 mg/day (n = 15). Biomarkers status (ER, PgR and p16) were obtained by comparing single immunohistochemical evaluation of pre and post-surgery samples using Allred's method. Results: Variation in p16 was from 22% to 17% in anastrozole group, 8% to 4% in placebo group, but there was no variation in tamoxifen group, standing in 7%. There was no significant statistical difference in p16INK4a expression between groups (p = 0,17). There was no significant statistical correlation between p16 expression and hormonal status (RE and RP). Conclusion: There were no significant differences between the three studied groups. Other biomarkers should be studied to identify early endocrine resistance and specific treatments.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama representa um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental¹. Apesar da redução na mortalidade de 30% pela hormonioterapia com tamoxifeno e anastrozol, cerca de 40% das pacientes com receptores hormonais positivos desenvolvem resistência e má resposta à endocrinoterapia com estas drogas.

O gene p16 é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 9p21 e seu produto é a proteína de mesmo nome, cuja função é inibir a proliferação celular, mantendo a célula em G1 e inibindo a sua progressão para a fase S da mitose². Sua atividade está inibida em diversos tumores, incluindo o câncer de mama³.

Diversos trabalhos procuram demonstrar a relação entre o p16 e o câncer de mama em seus diversos estágios, com o objetivo de estabelecer associações causais, preditivas e prognósticas^{4,5}. Ichikawa et al. estudaram células de carcinoma de mama após exposição ao tamoxifeno, confirmando aumento na população de células na fase G1 e G2 e decréscimo no número de células na fase S. Observaram também aumento da expressão do p53 e p21, enquanto a expressão do p16 não apresentou variação, alterações dose e tempo-dependentes⁶. Não há dados disponíveis na literatura sobre a expressão de p16 e terapia endócrina neoadjuvante com anastrozol.

O objetivo deste estudo foi verificar a expressão de p16 em pacientes acometidas por carcinoma de mama antes e após 26 dias de tratamento com tamoxifeno ou anastrozol, buscando compreender melhor os mecanismos de ação e resistência destas drogas e assim determinar possíveis fatores prognósticos ou preditivos, bem como identificar possíveis correlações com a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídas 58 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama nos estádios IIb e III atendidas nos

Hospitais São Paulo e Pérola Byington de São Paulo. O estudo foi prospectivo, duplo-cego envolvendo pacientes que foram randomizadas em três grupos: Placebo (n = 25); Tamoxifeno (n = 15; 20 mg/dia) e Anastrozol (n = 18; 1 mg/dia). Foram excluídas as pacientes com hipersensibilidade conhecida aos medicamentos, previamente submetidas à quimioterapia e com tumores inoperáveis.

As pacientes, após tomarem conhecimento do estudo e concordarem em participar assinando o termo de consentimento livre e informado previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dos Hospitais São Paulo e Pérola Byington, foram submetidas à biópsia incisional do nódulo mamário suspeito sob anestesia local e randomizadas em um dos grupos. Os Comitês de Ética em Pesquisa de ambas as Instituições aprovaram o estudo.

Após a randomização, realizada por uma auxiliar externa ao estudo, cada paciente recebeu um frasco lacrado e identificado com nome fantasia, contendo comprimidos idênticos, para serem ingeridos na posologia de um comprimido por dia durante 26 dias. Ao término da medicação, cada paciente foi internada para realização de tratamento cirúrgico definitivo (quadrantectomia ou mastectomia).

Parte do material obtido no diagnóstico e após o tratamento definitivo foi fixado em solução de formol líquido saturado a 10%, impregnado pela parafina líquida em estufa e, posteriormente, foram confeccionadas lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para confirmar o diagnóstico de carcinoma de mama segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981).⁽⁷⁾ A outra parte do material foi enviada para análise imunoistoquímica dos marcadores tumorais por meio da técnica de *tissue microarray* para avaliação dos biomarcadores pré e pós-tratamento.

Método imunoistoquímico

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita com ampla aceitação pela literatura mundial. Com um conceito extremamente simples, agrupa um grande número de amostras teciduais em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marca-

dores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos⁸.

O estudo imunistoquímico foi realizado com anticorpos para p16 (Dako- OA315), RE (Neomarkers- M7047) e RP (Dako- M3569).

Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado um protocolo de cálculos específicos para cada situação. Foi definido um erro alfa de 0,05 para todos os testes, ou seja, um Intervalo de Confiança de 95%.

As frequências de p16 entre os grupos, até mesmo das pacientes tratadas como controles (placebo), foram calculadas de forma simples, em percentuais, considerando-se os casos positivos sobre o total dos casos. Comparou-se a imunorreação de p16 antes e depois do tratamento com tamoxifeno, anastrozol e com os controles (placebos). Esta comparação foi realizada da mesma forma para os casos-controle nas amostras iniciais e nas obtidas no momento da cirurgia. Para comparar as medidas (positivo e negativo) entre tempos e grupos, foi utilizado o GEE (*General Estimating Equations*). Para comparar as medidas (medida) entre tempos e grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas com transformação por postos, buscando-se encontrar mudança de comportamento entre as amostras pareadas em dois momentos distintos de um mesmo indivíduo.

Os escores das imunorreações de p16 foram categorizados em negativo (escore = 0 ou 1) ou positivo (escore 2 ou 3), e os escores para imunorreações de receptores de estrogênio e progesterona foram categorizados como negativo (escore entre 0 e 2) ou positivo (escore entre 3 e 8) e analisados através do teste Exato de Fisher.

RESULTADOS

Com as amostras das 58 pacientes efetivamente incluídas no estudo, foram montados dois blocos distintos de TMA: um contendo as amostras colhidas para avaliação em todas as amostras no momento “pré”, ou seja, no diagnóstico e avaliação clínica inicial quando foram colhidos os dados e realizadas as biópsias incisionais das pacientes, e outro distinto onde foram alocadas as amostras pós-tratamento. Em ambos os espécimes, avaliou-se a expressão do gene p16.

Para comparar as medidas categóricas (positivo e negativo) entre tempos e grupos, foi utilizado o teste estatístico GEE. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Ao analisar a Tabela 1, a positividade do p16 variou de 22% para 17%, respectivamente no pré e pós-tratamento com anastrozol, de 8% para 4% no grupo placebo. Não houve variação, com 7% de positividade, no

Tabela 1. Positividade do p16 nos três grupos pré e pós-tratamento (anastrozol, placebo e tamoxifeno)

Grupo	Pré		Pós	
	Positivo	Total	Positivo	Total
A	4 22%	18	3 17%	18
P	2 8%	25	1 4%	25
T	1 7%	15	1 7%	14
Total	7 12%	58 100%	5 9%	57 100%

A: anastrozol; T: tamoxifeno; P: grupo placebo.

Variáveis	Valor de p
Grupo	0,1713
Tempo	0,6246
Grupo x Tempo	0,9225

grupo que recebeu tamoxifeno. A comparação entre grupos e tempos não apresentou relação significativa para o p16 ($p = 0,17$).

Na comparação entre os grupos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão de p16 nos grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo):

Comparação entre grupos	Valor de p*
A x P	0,0658
A x T	0,1166
P x T	1,0000

* valor de p corrigido para comparações múltiplas (Bonferroni)

A: anastrozol; T: tamoxifeno; P: grupo placebo.

Ao compararmos os grupos que receberam anastrozol e tamoxifeno com o grupo que recebeu placebo, não houve diferença significativa entre os tempos (Tabela 3).

A expressão “pré” de p16 foi significativamente maior ($p = 0,02$) nos três grupos estudados (Gráfico 1).

Não foi encontrada diferença significativa nas expressões “pré” e “pós” por grupos (Tabela 4).

Na análise comparativa de expressão entre os receptores de estrogênio e progesterona com o p16, não foi encontrada relação estatística significativa ($p = 0,2$).

Tabela 3. Variação de expressão do p16 entre grupos e tempos, agrupando-se os grupos anastrozol e tamoxifeno frente ao grupo placebo

Variável	Tempo	Grupo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
p16	Pré	P	25	0,44	0,65	0	0	2
		A/T	33	0,73	0,80	0	1	3
		Total	58	0,60	0,75	0	0	3
p16	Pós	P	25	0,28	0,54	0	0	2
		A/T	32	0,41	0,71	0	0	2
		Total	57	0,35	0,64	0	0	2

A: anastrozol; T: tamoxifeno; P: grupo placebo. DP: desvio padrão

Variáveis	Valor de p
Grupo	0,1524
Tempo	0,0289
Grupo x Tempo	0,4067

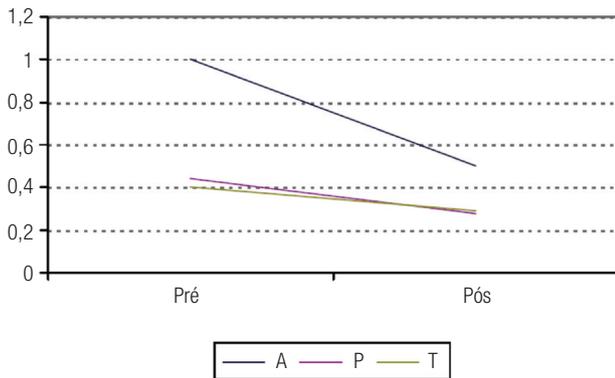


Gráfico 1. Comparação entre os grupos (anastrozol, tamoxifeno e placebo) e tempos (pré e pós-tratamento).

Tabela 4. Variação da expressão do p16 e comparação entre os grupos anastrozol e tamoxifeno em relação ao grupo placebo

Grupo	Pré/ Pós			Total
	Aumento	Inalterado	Redução	
P	3 12%	15 60%	7 28%	25
A+T	5 16%	13 41%	14 44%	32
Total	8 14%	28 49%	21 37%	57 100%

Teste Exato de Fisher: valor de p = 0,3556
A: anastrozol; T: tamoxifeno; P: grupo placebo

DISCUSSÃO

A terapêutica hormonal com tamoxifeno foi um dos mais importantes fatores responsáveis pela redução da mortalidade nas pacientes com câncer de mama. Esta droga se mostrou eficaz

também na redução da taxa de recidiva local, aumento do intervalo livre de doença e redução na incidência de carcinoma contralateral⁹⁻¹⁰.

Nas últimas décadas, os inibidores da aromatase surgiram como uma alternativa ao tamoxifeno para o tratamento hormonal adjuvante e paliativo de pacientes na pós-menopausa, com câncer de mama com receptores hormonais positivos. Essas drogas agem bloqueando a atividade da aromatase, tornando os níveis circulantes de estrógenos praticamente indetectáveis.

Entretanto, o mecanismo de ação dessas drogas não está ainda totalmente estabelecido, e um dos objetivos deste estudo foi verificar se existe alguma relação entre a exposição *in vivo* de células tumorais ao tamoxifeno e ao anastrozol com alguns reguladores da proliferação celular que pudessem sinalizar preditividade de resposta e prognóstico.

Para estabelecer marcadores preditivos de resposta terapêutica, bem como fatores prognósticos, são necessários estudos clínicos prolongados que avaliem intervalo livre de doença e sobrevida. A definição de que pacientes RE+ são beneficiadas pela terapia antiestrogênica mudou a evolução da doença em um grupo de pacientes com câncer de mama, mas existe um subgrupo que não obtém o benefício esperado.

Como o tamoxifeno e o anastrozol estão ligados ao complexo mecanismo de proliferação e apoptose celular, definir alguma proteína como marcador preditivo de resposta traria vantagens na definição do subgrupo não-responsivo. Contudo, um marcador tem valor preditivo apenas se sua expressão ou ausência sinalizar sensibilidade a uma terapia determinada.

Pela escassez de dados na literatura em relação à expressão de p16 e terapia endócrina neoadjuvante, buscou-se avaliar a expressão do gene p16 antes e após a exposição ao tamoxifeno e anastrozol por curto período (26 dias), por meio de comparação com um Grupo Controle (placebo).

Neste estudo, buscou-se qualificar a positividade das imunoreações de uma forma mais objetiva, associando dois critérios: a intensidade de coloração e a fração de células coradas sobre as amostras, adotando-se o escore de Allred¹¹⁻¹².

Para cálculo da variação das médias, os grupos foram avaliados separadamente antes e após 26 dias. O estudo buscou demonstrar diferença na expressão de p16 entre os tratamentos

neoadjuvantes utilizados, mas não encontrou diferença entre os grupos ($p = 0,17$).

Estes resultados estão de acordo com a literatura se comparados ao estudo de Ichikawa et al., de 2008, que estudaram essa expressão após quatro dias de endocrinoterapia, porém sem demonstrarem alteração na expressão da proteína do gene p16. Este resultado poderia ser atribuído ao tempo de exposição à medicação⁶.

No presente estudo, houve tendência à redução no grupo tratado com anastrozol ($p = 0,06$), o que significaria dizer que talvez, com um número maior de pacientes estudadas ou com aumento no tempo de tratamento, houvesse redução significativa.

Pela escassez de dados disponíveis na literatura que relacionem inibidores de aromatase e p16, fica clara a necessidade de mais estudos.

O que poderia ser questionado é se existe alguma diferença entre as amostras, pelo fato de serem obtidas em margens tumorais opostas, ou trauma cirúrgico que justifique a pequena redução do biomarcador nos três grupos. A manipulação prévia do tumor talvez desencadeie liberação de fatores teciduais de ação intracelular com interferência no ciclo celular, modificando a expressão da proteína p16.

Uma maneira de responder a essas dúvidas seria a pesquisa de RNA mensageiro (RNAm) em material tumoral fresco, ou outros biomarcadores para avaliar uma possível falha nos comandos celulares para efetivação da produção proteica se realmente não houve incentivo nuclear (à partir do DNA) para desencadear a produção da proteína ou se apenas não ocorreu o período celular necessário para que houvesse a expressão antigênica. Em tumores, a expressão fisiológica pode ser comprometida, tornando-se irregular e heterogênea.

Como a superexpressão do p16 se relaciona com prognóstico desfavorável, poderia se deduzir que há uma correlação com os receptores de estrogênio e progesterona. Entretanto, a expressão do p16 não variou significativamente em nosso estudo, no qual foram analisadas apenas amostras RE ou RP positivas. Estes achados estão em concordância com a literatura, que também não traz evidências de correlação entre a expressão de p16 e o *status* hormonal¹³.

Ressalta-se que, embora o p16 tenha sido relacionado à positividade do receptor de estrogênio, não houve variação conforme a intensidade da expressão nos grupos RE e RP positivos. No nosso estudo não foi possível fazer tal comparação, já que não foram incluídos tumores receptores negativos¹⁴.

Em síntese, a pouca variação na positividade da proteína p16 após uma exposição *in vivo* ao tamoxifeno e ao anastrozol por 26 dias induz a uma reflexão sobre a possibilidade de a alteração desta proteína não ocorrer de forma precoce na resposta celular precoce da endocrinoterapia. É possível que tal proteína seja destituída de valor preditivo de resposta precoce à endocrinoterapia.

Futuros estudos com métodos moleculares poderão esclarecer dúvidas suscitadas a respeito do tempo de exposição à droga necessária para interferir nos biomarcadores e proteínas oriundas da transcrição gênica relacionadas com a proliferação celular.

Referências

1. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2008 [Internet] [citado 2010 Fev 15]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2008
2. Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marzita MC, Carcagno AL, Sirkin PF et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007;59(7):419-26.
3. McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol*. 2006;4(3):e51.
4. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol*. 2001;194(1):35-42.
5. Liu T, Niu Y, Feng Y, Niu R, Yu Y, Lv A et al. Methylation of CpG islands of p16(INK4a) and cyclinD1 overexpression associated with progression of intraductal proliferative lesions of the breast. *Hum Pathol*. 2008;39(11):1637-46.
6. Ichikawa A, Ando J, Suda K. G1 arrest and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in tamoxifen-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Hum Cell*. 2008;21(2):28-37.
7. World Health Organization. *Histological Typing of Breast Tumours*. 2nd ed. Geneva: WHO; 1981. p.15-25.
8. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
9. Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med*. 1989;320(8):479-84.
10. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(18):1371-88.
11. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11(2):155-68.
12. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-81.
13. Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4):R57.
14. Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2006;37(8):989-99.