

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CLÍNICA MÉDICA

CLARICE MARTINS FEYH BIRNFELD

**EXPRESSÃO DE HSP27 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E
APOPTOSE EM CARCINOMA DE MAMA COM E SEM METÁSTASES AXILARES**

Porto Alegre
2014

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

**EXPRESSÃO DE HSP27 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR E APOPTOSE EM CARCINOMA DE MAMA COM E SEM
METÁSTASES AXILARES**

Autor: CLARICE MARTINS FEYH BIRNFELD

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

*Dissertação submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre ao
Programa de Pós-Graduação em medicina e
ciências da saúde, da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.*

Porto Alegre
2014

Ficha Catalográfica

B619e Birnfeld, Clarice Martins Feyh

Expressão de HSP27 e razão entre os índices de proliferação celular e apoptose em carcinoma de mama com e sem metástases axilares / Clarice Martins Feyh Birnfeld . – 2017.

43 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

1. Carcinoma Ductal de Mama. 2. Proliferação de células. 3. Apoptose. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Teixeira CRB-10/1974

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Dr Vinícius Duval da Silva, pelo acolhimento e disponibilidade em aceitar mais este desafio, contribuindo imensamente na realização deste projeto.

Ao Tiago Giulianni, que com paciência e dedicação colaborou para alcançar os resultados.

Às pacientes anônimas que contribuíram com seus dados.

Ao meu marido Heitor, pelo incansável apoio e dedicação na conquista deste trabalho, foste meu maior incentivador e compartilho contigo esta vitória.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a expressão de Hsp27 (HspB1) em amostras teciduais de carcinomas ductais invasores em mulheres com e sem presença de metástase em linfonodo sentinela axilar e estudar a relação da taxa de proliferação celular e apoptose, através da avaliação imunohistoquímica da expressão das proteínas Hsp27, Ki-67 e caspase 3 em carcinomas ductais invasores de mulheres com e sem presença de metástase linfonodal, tratadas em um hospital de ensino, comparado com amostras de pacientes diagnosticadas com alteração fibrocística no tecido mamário.

Material e Métodos: Foi realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionadas para este trabalho pacientes tratadas no Hospital São Lucas da PUCRS no período entre setembro de 2001 e outubro de 2009 cujas biópsias foram divididas em três grupos: 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase linfonodal; e 25 pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase linfonodal. Para constituição do grupo controle foi realizada a seleção aleatória de 25 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama. Através da técnica de imunohistoquímica, também foram avaliadas as expressões de Hsp27, caspase 3 e Ki67 por análise de imagem digital e calculada a razão entre a taxa de proliferação (Ki-67) e apoptose (caspase 3) dos grupos estudados.

Resultados: O presente estudo evidenciou a expressão aumentada da Hsp27 em carcinomas ductais invasores sem metástase axilar, quando comparados ao grupo dos carcinomas ductais invasores com metástase axilar e grupo controle. A expressão de Hsp 27 foi maior no grupo com carcinoma invasor sem metástase axilar tanto no tecido da neoplasia primária ($p < 0,001$) quanto no respectivo tecido linfonodal comparado ao grupo com carcinoma com metástase axilar ($= 0,003$). Houve diferença na expressão da proteína Ki-67 e razão entre proliferação celular e apoptose entre os grupos de pacientes com carcinoma ductal invasor com e sem metástases quando comparados ao grupo controle, porém não houve diferença significativa da expressão de Ki-67 e da razão entre proliferação e apoptose entre os grupos com carcinoma invasor com e sem metástase, ou entre a expressão de caspase 3 nos três grupos quando comparados entre si.

Conclusão: A análise quantitativa da Hsp27 demonstrou maior expressão da proteína nos tecidos da neoplasia primária e nos linfonodos em carcinomas sem metástase em linfonodo sentinela axilar. Embora a metodologia empregada e o número de casos estudados nesse trabalho não permitam concluir que esse comportamento na doença metastática seja um achado constante, esse resultado justifica a necessidade de avaliar esse achado em estudos futuros.

Palavras-chave: Hsp27; caspase3; Ki67; carcinoma de mama; proliferação celular; apoptose.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the expression of Hsp27 by immunohistochemistry in tissue samples of invasive ductal carcinoma in women with and without the presence of metastasis in sentinel axillary lymph node compared to samples from patients diagnosed with fibrocystic changes in breast tissue. In addition, to study the relationship between the rate of cell proliferation and apoptosis by evaluating the expression of Ki-67 protein and caspase-3 by immunohistochemistry.

Material and Methods: A cross-sectional study was designed to select patients treated at Hospital São Lucas of PUCRS between September 2001 and October 2009. The patients were divided in three groups: 25 patients diagnosed with invasive ductal carcinoma of breast with axillary lymph node metastasis, 25 patients with invasive ductal carcinoma of breast without axillary lymph node metastasis and a control group composed by tissue samples of 25 patients diagnosed with fibrocystic change of the breast. The expression of Hsp27, Ki-67 and caspase 3 expression was evaluated by image analysis and the rate of proliferation (Ki-67) and apoptosis (caspase 3) was calculated for the three groups.

Results: The present study showed an increased expression of Hsp27 in the group of invasive ductal carcinomas without metastasis as compared to the control group. There was no significant difference of expression of Hsp27 between the group of ductal carcinoma with axillary metastasis and the control group. The expression of Hsp27 was significantly higher in the group without axillary metastasis as compared to the group with metastasis in both the primary tumor (<0.001) and the respective lymph node tissue samples ($=0.003$). The expression of Ki-67 and the rate of proliferation (ki-67) and apoptosis (caspase 3) were significantly higher in the groups with invasive ductal carcinoma as compared to the control group. There was no difference in the expression of Ki-67 and the rate of proliferation and apoptosis between the two groups of invasive ductal carcinoma. There was no significant difference in the expression of caspase 3 among the three groups.

Conclusion: The quantitative analysis of Hsp27 demonstrated increased expression of this protein in carcinomas without axillary metastases, with a significantly higher expression in the primary tumor and lymph node tissue samples of this group as compared to the group without axillary metastasis. Although the methodology employed and the number of cases evaluated in this work do not allow one to conclude that such behavior in metastatic ductal carcinomas of breast is constant, such finding warrants further investigation.

Keywords: Hsp27; caspase3; Ki67; breast carcinoma; cell proliferation; apoptosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição absoluta e relativa da positividade para anticorpo anti-Hsp27 para os três grupos considerando o número de casos onde a expressão foi detectada e expressão ausente.	15
Tabela 2: Medidas de tendência central e de variabilidade da expressão de Hsp27 para tecido mamário e linfonodo para os grupos Tumor+LNF+, Tumor+LNF- e grupo controle por análise quantitativa.	16
Tabela 3: Resultados da análise quantitativa da expressão de Ki-67 no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados.	17
Tabela 4: Resultados da análise quantitativa da expressão de caspase 3 no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados.	17
Tabela 5: Avaliação da razão entre proliferação celular por Ki-67 (proliferação celular) e caspase 3 (apoptose) no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados.	18

SIGLAS E ABREVIATURAS

HSP - Proteína de choque de calor (*Heat Shock Protein: Hsp*)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

kDA. - Kilodalton

NK-kB – Fator de transcrição nuclear kappa B

RE – Receptor de estrogênio

RP - Receptor de progesterona

SPSS - *Statistical Package for the Social Science*

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

TNM – *Classification of Malignant Tumours*

TP53 - Gene supressor tumoral TP53

VEGF- Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	V
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VI
SUMÁRIO.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Proteínas de choque térmico.....	4
1.2 Hsp 27 (HspB1).....	5
1.3 Apoptose e caspase -3.....	7
1.4 As caspases e a proteína p53.....	7
2 OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Delineamento do estudo.....	11
3.2 Aspectos éticos.....	11
3.3 Seleção das pacientes.....	11
3.4 Cálculo do tamanho amostral.....	12
3.5 Confecção das lâminas histológicas.....	12
3.6 Imunoistoquímica.....	12
3.7 Análise das imagens.....	13
3.8 Análise estatística	14
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSSÃO.....	19
6 CONCLUSÕES.....	22
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
ANEXO – Artigo.....	28

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento dos fatores de relevância sobre o comportamento biológico do câncer de mama, da evolução de suas classificações diagnósticas e de novas modalidades de tratamento tem sido objeto crescente de vários estudos, já que se trata da neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2013) dentre todos os tipos de câncer, o carcinoma de mama é o segundo tipo mais freqüente no mundo e esta doença representa cerca de 22% de novos casos de câncer em mulheres no Brasil a cada ano.

A incidência não está igualmente distribuída em todo o território brasileiro, sendo mais alta nas regiões Sul e Sudeste, onde se identifica maior desenvolvimento sócio-econômico. Em relação à distribuição por estágio das pacientes ao diagnóstico, mais de 60 % dos casos são identificados em estágios avançados, o que claramente se reflete nas curvas de mortalidade por câncer de mama, que se mantêm em ascensão no Brasil, em contraste com a redução da mortalidade vista em países desenvolvidos, onde a detecção da doença tende a ser mais precoce (INCA 2013).

O Câncer de mama acomete principalmente mulheres a partir dos 40 anos, com maior incidência na sexta década de vida (ANDERSON, B. P. 2005, KROMAM N, A. PK e MELBIE M. 2005). As pacientes com idade mais avançada apresentam a doença de forma mais heterogênea, por conta de uma exposição maior durante a vida a diferentes fatores ambientais. O câncer de mama é uma doença com localização predominante em quadrantes súpero-externos e região subareolar, que correspondem em conjunto a cerca de 70% da topografia dos casos e, apesar da topografia constante, o carcinoma de mama permanece uma doença de diagnóstico precoce difícil mesmo em países desenvolvidos e, depois de detectado, pode apresentar-se em diferentes estágios de evolução histopatológica e clínica (INCA, 2013).

As formas de identificação e diagnóstico iniciam pela biópsia (exame anatomopatológico), onde será possível estabelecer o diagnóstico e definir o tipo de tumor, em paralelo com estudos imunoistoquímicos complementares (Bonassa, E. M. A., 2005(Rakha, Starczynski et al. 2014) (Hammond, Hayes et al. 2010)).

Depois de diagnosticada, a neoplasia deverá ser estadiada, pelo mapeamento anatômico da extensão da doença de acordo com o American Joint Committee on Cancer (AJCC), baseado no sistema TNM – Classification of Malignant Tumours. O conceito básico

do sistema, criado nos anos 40 por Pierre Benoix, baseia-se na avaliação de três componentes: T - a extensão do tumor primário; N - ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; M - ausência ou presença de metástase à distância (AJCC, 2010, INCA, 2013).

Este sistema inclui os achados clínicos e patológicos da doença, sendo dividido em estadiamento clínico, que leva em conta toda a informação avaliável antes do tratamento definitivo a ser realizado e é útil na seleção e avaliação das possibilidades terapêuticas e em estadiamento patológico, que inclui os dados do estadiamento clínico, da cirurgia, os achados anatomopatológicos e perfil imunoistoquímico da neoplasia, sendo importante por apresentar dados mais precisos para determinar prognóstico e possibilidades de resposta terapêutica. (AJCC 2010).

A condição dos linfonodos axilares no momento do diagnóstico, apresenta como característica ser tempo-dependente, sendo, portanto, limitada e insuficiente para prognosticar completamente a evolução do câncer de mama (Eisenberg, 2004). Entretanto, apesar dessa limitação, o status dos linfonodos axilares permanece ainda como o mais forte fator prognóstico independente para o carcinoma de mama.

Em relação ao tipo histológico, os carcinomas infiltrativos ductais e lobulares, tanto em sua forma pura ou combinada com outros tipos histológicos, são as formas mais comuns de câncer de mama. A prevalência do carcinoma ductal invasor de tipo não especial varia de 50 a 75% e, a do lobular invasor, de 5 a 15% de todos os carcinomas invasivos da mama, dependendo dos critérios diagnósticos histopatológicos utilizados, assim como dos diagnósticos das formas de tipos histológicos associados. Pacientes com tumores ductais infiltrativos e lobulares apresentam maior incidência de linfonodos axilares positivos e piores prognósticos clínicos que as pacientes com os tipos histológicos especiais, que correspondem a um número de carcinomas menos frequente, entre 5 e 10% (Albain, Allred *et al.*, 1994), como o medular e o tubular, dentre outros. É também importante o conhecimento de fatores preditivos, que são definidos como qualquer medida associada a uma resposta ou à sua falha em uma terapia particular. Exemplos de fatores preditivos são o estado dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) no tumor, que preveem a probabilidade de resposta à terapia com tamoxifeno ou inibidores de aromatase (Clark, 2002) (Hammond, Hayes *et al.* 2010).

Cerca de dois terços dos carcinomas de mama expressam receptores hormonais, sendo, então, considerados positivos para receptores hormonais (RH). O valor prognóstico da expressão de receptores hormonais é maior nas mulheres após a menopausa. Pacientes com carcinomas positivos para receptores hormonais mostram um maior intervalo de tempo livre de doença e maior sobrevida. Os tumores positivos para receptor de estrogênio estão associados a uma maior sobrevida livre de doença e, também, a maior probabilidade de resposta à terapia hormonal, sendo os métodos de avaliação e critérios de positividade para estes receptores objetos de contínua discussão (Eisenberg, 2001) (Hammond, Hayes et al. 2010, Deyarmin, Kane et al. 2013).

O processo de formação do tumor é complexo e envolve múltiplos fatores que facilitam as mutações nas células, o que determina a expressão de oncogenes e a supressão de genes que previnem o desenvolvimento da doença, bem como os processos de sinalização celular entre as células neoplásicas e o estroma. As diferentes mutações conferem diversas vantagens seletivas para as células tumorais, permitindo seu crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000, (Cheung and Ewald 2014)).

A maioria das terapias antitumorais não-cirúrgicas disponíveis tem como alvo as células que estão proliferando rapidamente, também afetando as células normais, resultando em efeitos colaterais que limitam a tolerância ao tratamento. Assim, novas estratégias de terapia são necessárias. Atualmente está bem definido que o sistema imune pode reconhecer as células tumorais, e este fenômeno foi mais recentemente denominado de imunoeedição (Dunn, Koebel *et al.*, 2006; Bui e Schreiber, 2007). Conseqüentemente, várias novas estratégias de terapia estão sendo estudadas, visando mediar respostas imunes anti-tumorais eficientes, a fim de eliminar a neoplasia.

Estas diferentes estratégias têm demonstrado que é possível gerar respostas imunes antitumorais nos pacientes. Entretanto, a eficácia destas novas terapias ainda não está atingindo os parâmetros esperados. Diversos fatores podem ser responsáveis pela baixa eficiência, mas o que provavelmente ocorre é o desenvolvimento de tolerância pela neoplasia à resposta imune (Rabinovich, Gabrilovich *et al.*, 2007). Embora esses resultados sugere que a imunoterapia contra neoplasias malignas, dentre elas o carcinoma de mama, possa ser muito promissora, um melhor entendimento de todo o processo envolvido na resposta imune tumoral é necessário a fim de aprimorar as estratégias primeiramente propostas e fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas terapias (Mohit, Hashemi et al. 2014).

Neste trabalho foram estudados fatores relacionados com a interação entre o sistema imunológico e o carcinoma de mama com potencial de fornecer dados na terapia anti-tumoral através de um delineamento de pesquisa translacional apropriado para aplicabilidade clínica com baixo custo, utilizando-se o método imunoistoquímico. Assim, foram avaliadas a expressão de proteínas importantes do ciclo tumoral, mais particularmente a proteína de choque de calor (*Heat Shock Protein: Hsp*) Hsp27, em tecidos de pacientes com câncer de mama com e sem presença de metástase em linfonodos axilares, utilizando-se como controle biópsias de pacientes com alteração fibrocística da mama (Grzegrzolka, Kurnol et al. 2012), com posterior cálculo entre os índices de proliferação celular e apoptose na população estudada.

1.1 Proteínas de Choque Térmico

Em 1962, Ritossa descobriu que a exposição de algumas células ao calor produzia o surgimento, de um novo padrão de espessamento cromossômico que representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas. Este estresse térmico ou químico induzia a expressão de genes, os quais faziam com que estas células sob dano celular sintetizassem uma classe de proteínas que foram denominadas *Heat Shock Proteins* (Hsp) ou Proteínas do Choque Térmico (Ritossa, 1962).

As Hsp são uma classe de proteínas altamente conservada, desde os primitivos procaríotos até eucariotos modernos, o que é um indício de seu papel ao longo da evolução. Estas proteínas podem ser agrupadas em famílias: Hsp27, Hsp 47, Hsp60, Hsp 70, Hsp 90 e Hsp 110 (Jaattela, 1992). As Hsps possuem como principal mecanismo de ação, mediante o qual conferem proteção, a atuação como “chaperonas moleculares”, definidas como qualquer proteína que interage com, estabiliza ou auxilia outra proteína a adquirir sua conformação funcional ativa, sem que esteja presente na estrutura final desta proteína (Hartl 1996) (Hartl, Bracher et al. 2011) (Wang, Chen et al. 2014).

São várias as aplicações clínicas potenciais das Hsps (Horwich 2014) que poderão tornarem-se fundamentais em diversas doenças, como neoplasias malignas (Belkacemi and Hebb 2014) e doenças auto-imunes. Várias pesquisas relacionadas a estas proteínas estão em andamento, com 40 artigos indexados no PubMed em 2009 utilizando o termo “Hsp”, 42 em 2010, 37 em 2011, 44 em 2012, 38 em 2013 e 31 até setembro de 2014. Há ainda muito a se

descobrir sobre as Hsps e a relevância do tema justifica o seu estudo (Wang, Chen et al. 2014).

Entre as proteínas de choque térmico (Hsp), a Hsp27, Hsp70 e Hsp90 são mais estudadas no estresse celular induzido em resposta a uma grande variedade de danos ambientais e adaptações celulares fisiológicas, permitindo assim que as células sobrevivam a condições potencialmente letais, chegando ao ponto de irreversibilidade do dano celular com base nas suas efetivas funções citoprotetoras. Funções distintas das Hsps foram descritas para explicar seus papéis na manutenção da integridade arquitetural e funcional das células, incluindo seus papéis mais básicos como chaperoninas moleculares, que é a de regular o dobramento de proteínas, transporte, translocação e montagem, especialmente ajudando no redobramento de proteínas deformadas, bem como o seu papel em rotas de sinalização celular anti-apoptóticas (Belkacemi and Hebb 2014, Seemampillai, Germack et al. 2014). Em células neoplásicas, a expressão das três Hsps supracitadas é elevada, e está possivelmente associada com o aumento potencial da carcinogênese, do potencial metastático de células neoplásicas e da resistência à agentes quimioterápicos. Em essência, dados sugerem que as Hsp27, Hsp70 e Hsp90, dentre outras, são alvos adequados para a modulação de vias de morte celular (Rappa, Farina et al. 2012). Como chaperoninas moleculares, as Hsp podem atuar de três maneiras: elas catalisam o processo de conformação correta e permitem a agregação proteica. Segundo: são proteínas com potencial anti-apoptótico, interferindo nos mecanismos apoptóticos em diferentes etapas, ligando-se a caspases. Em terceiro lugar, as Hsps fornecem estabilidade a degradação de proteossomas, proteínas selecionadas para eliminação sob condições de estresse (processo de triagem de proteína), contribuindo assim para a sobrevivência da célula (Gaetan 2013).

1.2 Hsp 27 (HspB1)

A Hsp27, também denominada HspB1, pertence à família de Hsps de baixo peso molecular. Está associada à proteção celular contra fenômenos de apoptose, interferindo em etapas específicas do processo apoptótico e com uma variedade dos seus mediadores, ligando-se a eles e condicionando a sua ação no processo. A Hsp27 também está associada à manutenção da integridade do citoesqueleto celular, especificamente dos filamentos intermediários e da actina (Mournier e Arrigo, 2002). Está implicada na inibição da apoptose ativada por caspases, ao manter da integridade das mitocôndrias, e podendo ligar-se

diretamente ao citocromo C (Gabai e Sherman, 2002) impedindo a sua posterior ligação a outras moléculas. Esta Hsp é expressa de forma constitutiva pela maior parte das células de mamíferos, embora que o seu nível de expressão e o estado de fosforilação variem em função da exposição a vários fatores.

A Proteína de Choque Térmico 27 foi recentemente transformada em um alvo promissor para o tratamento de carcinomas. Ela está associada ao crescimento tumoral e apresenta resistência a quimioterapia e ao tratamento radioterápico. Esta proteína também já foi associada com marcadores de tumores agressivos e diminuição da sobrevida em pacientes com câncer de mama. Além de apresentar superexpressão em outros tipos de neoplasias. (Straume O et al, 2012).

Como apresentado acima, a Hsp27 está descrita na neutralização de vias de apoptose e sua expressão elevada está associada ao aumento da agressividade de determinados tumores primários. Contudo, os seus papéis na fase posterior da progressão do tumor e mais especificamente, durante a etapa de disseminação metastática de diferentes neoplasias malignas ainda é desconhecida (Gibert B et al, 2012)

Os mecanismos subjacentes modificar o ciclo celular de células neoplásicas em G_0 , também denominado como “dormência celular”, tornando-as ativas, ainda não estão bem caracterizados. Modelos experimentais para o estudo de dormência de tumores humanos e o papel da angiogênese nesse processo mostraram através da análise dos genes diferencialmente expressos que a Hsp27 teve expressão significativamente aumentada em células angiogênicas em comparação com células não angiogênicas (Lee, Wu et al. 2014). O efeito da redução da expressão da Hsp27 também foi avaliado em linhagens de células, modelos de murinos e em conjuntos de dados clínicos de pacientes com carcinoma de mama e melanoma. Significativamente, esses tumores aparentemente não saem do estado de dormência sem a expressão Hsp27. A sub-expressão da Hsp27 foi associada com a redução da proliferação de células endoteliais e a diminuição da secreção de VEGF-A, VEGF-C, e do factor de crescimento de fibroblastos (Wei, Liu et al. 2011, Straume, Shimamura et al. 2012). Por outro lado, um aumento na expressão de Hsp27 em células não angiogênicas resultou no crescimento do tumor *in vivo*, o que mostra a complexidade do papel das Hsps na sinalização celular em diferentes células e microambientes. Por validação clínica, uma forte expressão da proteína Hsp27 foi associada com marcadores de tumores agressivos e diminuição da sobrevida em pacientes com câncer de mama e melanoma (Straume, Shimamura et al. 2012,

Xu, Yang et al. 2014, Zimmermann, Mueller et al. 2014). Esses trabalhos sugerem um papel para Hsp27 no equilíbrio entre a dormência tumoral e progressão tumoral, mediada possivelmente por interações vasculares tumorais (Lee, Hong et al. 2012).

1.3 Apoptose e caspase -3

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo fundamental para eliminar células supérfluas ou defeituosas. É um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características, que incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos, visíveis à microscopia óptica (Grivicich, 2007).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou à investigação sistemática dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação potencial no tratamento do câncer (Nicholson 2000).

1.4 As caspases e a proteína p53

O desenvolvimento de tumores envolve um desequilíbrio nas vias de sobrevivência e de morte celular. Muitos fármacos têm como finalidade induzir a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose, objetivando inibir o crescimento celular descontrolado. O processo celular da apoptose envolve determinadas proteases, chamadas de caspases. Elas pertencem à família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que tem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (Nicholson 2000).

As caspases sinalizam as vias extrínseca e intrínseca da apoptose, clivando os substratos e levando à condensação e fragmentação nuclear e exposição de fosfolipídios de membrana celular que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos (Nicholson 1997 e Boatright 2003).

São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis participam diretamente da apoptose: caspases 3, 6, 7, 8, 9, 10 (Boatright 2003) e a classificação das caspases varia de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose, por exemplo: as caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. As caspases efetoras já possuem seu pró-domínio curto ou inexistente, sendo responsáveis pela clivagem de substratos (Rupnarain, 2004). Parrish et al. (Parrish, Freel et al. 2013) apresentaram uma excelente revisão do papel das caspases e suas implicações no câncer e outras doenças.

A fisiologia normal e a fisiopatologia envolvidas no mecanismo de carcinogênese apresentam mecanismos similares para iniciar a apoptose através da ativação da via intrínseca, em resposta aos sinais intracelulares de estresse e/ou dano ou da via extrínseca, responsável pelos acontecimentos extracelulares. A via extrínseca inicia com a implicação de alguns dos numerosos receptores de morte situados na superfície celular quando, sobre eles, atua o ativador correspondente. A grande maioria dos receptores de morte celular envolvidos nessa via pertencem à superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), caracterizada por conter o domínio de morte (DD), um domínio citoplasmático implicado nas interações proteína-proteína (Locksley 2001).

Os receptores de morte mais conhecidos são o receptor de TNF do tipo 1 (TNFR1) e a proteína relacionada, denominada Fas. A apoptose é uma via muito rápida, baseada no recrutamento de moléculas adaptadoras através de seus DD, cuja única função é aproximar e ativar uma caspase iniciadora, a caspase 8 ou a caspase 10, as quais, por sua vez, ativam (por proteólise) as caspases executoras ou efetoras, tais como as caspases 3 e 7 (CHINNAIYAN 1995). Essa via de apoptose pode ser inibida por uma proteína denominada FLIP, que se une com a pró-caspase-8. Alguns vírus e células produzem FLIP e utilizam este inibidor para proteger as células infectadas e normais da apoptose (Lavrik 2005).

Há também um outro gene bem conhecido envolvido no processo de morte e proliferação celular que é o gene supressor tumoral TP53. Este gene é o mais frequentemente mutado na maioria dos tipos de câncer (Anazetti, 2007). A proteína p53, cujo nome se refere à massa molecular, é amplamente conhecida como produto do gene supressor tumoral, indutora de parada do ciclo celular e de apoptose (Haupt 1995).

A proteína p53 tem uma meia-vida curta e é geralmente alvo de degradação por MDM2, uma ubiquitina ligase que compete com a sequência de DNA onde liga-se o p53 e co-ativadores. Tem uma série de gatilhos, que incluem a luz ultravioleta, raios-X, dano ao DNA,

baixo pH extracelular, hipóxia e choque térmico (Cummins 2005).

A indução de aumento nos níveis da proteína p53 em cultura inibe a proliferação celular, sendo assim, a célula permanece na fase G1 do ciclo celular, o chamado ponto de checagem da integridade do material genético, impedindo sua transição para a fase S. As células que ficam expostas a irradiação e que não codificam a proteína p53 continuam dividindo-se e replicando o DNA, sem pausa para o reparo das lesões do DNA (Vermeulen, 2003 e Haupt 2003).

O gene TP53 foi descoberto em estudos de tumores em 1979 por dois grupos de pesquisadores (Lane and Crawford 1979) (Linzer and Levine 1979) e suas funções e isoformas são objeto de estudo e novas descobertas há quase quatro décadas (Gorrini 2014). Sabe-se que o surgimento do câncer tem relações óbvias com mutações nos genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose. Células mutantes que não codificam este gene, não sofrem apoptose, acabam sobrevivendo por mais tempo e acumulando mais mutações, multiplicando-se fora de controle e gerando neoplasias. E por impedir a proliferação de células com mutações, o gene p53 é denominado supressor tumoral (Bennet, 1999).

Este trabalho investigou a expressão da Hsp27 em pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama com e sem metástases axilares pelo método imunoistoquímico, relacionando essa expressão com a atividade proliferativa da neoplasia através da proteína Ki-67 e da apoptose através da caspase 3.

2 OBJETIVOS

Principal: avaliar a expressão de Hsp27 em amostras teciduais carcinomas ductais invasores de mama de mulheres com e sem presença de metástases em linfonodos axilares.

Secundário: estudar a razão entre a taxa de proliferação celular e apoptose através da avaliação imunoistoquímica das proteínas Ki-67 e caspase 3 (Ki-67 / caspase 3) em carcinomas ductais invasores de mama de mulheres com e sem presença de metástase em linfonodo axilar, tratadas em um hospital terciário de ensino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados para este trabalho casos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástases em linfonodos axilares tratadas no Hospital São Lucas da PUCRS no período entre setembro de 2001 e outubro de 2009.

3.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo CEP/CONEP através da base nacional de pesquisa: Plataforma Brasil, com registro número (CAAE) 34425514.6.0000.533, através do Comitê Institucional de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) não foi aplicado devido tratar-se de um estudo retrospectivo de revisão de prontuário e lâminas, porém foram preservados os preceitos de confidencialidade e confiabilidade.

3.3 Seleção das pacientes

As pacientes foram divididas em três grupos da seguinte forma: 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase em linfonodo sentinela axilar; e 25 pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase em linfonodo sentinela axilar. E para constituição do grupo controle foi realizada a seleção aleatória de 25 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama, processo benigno de elevada prevalência entre a população feminina.

A seleção dos casos obedeceu aos seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- Mulheres adultas;
- Carcinoma de mama ductal invasor de qualquer grau histológico;
- Estadiamento clínico II e III;
- Grupo com metástase axilar;
- Grupo sem metástase axilar;

Critérios de Exclusão:

- Pacientes que não dispunham de material disponível para estudo imunoistoquímico ou tecido tumoral escasso;
- Pacientes com história conhecida de carcinoma de mama em familiar de primeiro grau e síndromes relacionadas a aumento de incidência de carcinoma de mama.

3.4 Cálculo do Tamanho Amostral

Foi realizado cálculo de tamanho amostral que estimou um N mínimo de vinte e cinco casos por grupo para detecção de diferença significativa ($p < 0,005$).

3.5 Confeção das lâminas histológicas

As lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Os blocos de parafina contendo as peças foram retirados do arquivo de material do serviço e realizados cortes de $3\mu\text{m}$ de espessura com micrótomo. Foi confeccionada uma lâmina histológica para cada marcador. As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com objetiva neofluar de 40X. Para captura das imagens foi utilizada câmera Retiga 2000R (Qimaging, Surrey, BD, Canadá) acoplada ao microscópio e a um microcomputador padrão IBM-PC. Cada imagem foi capturada sob luz normal de lâmpada halógena com controle de voltagem, para posterior quantificação das células com expressão dos marcadores estudados pelo método imunoistoquímico.

3.6 Imunoistoquímica

Para o preparo das lâminas e posterior análise imunoistoquímica, foram feitas secções de $3\mu\text{m}$ de espessura, obtidas em micrótomo rotativo (Leica, RM2165, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas com carga positiva (Dako, Glostrup, Dinamarca) e levadas à estufa a 60°C por 1h.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura, foi realizada no pTLink (Dako, Glostrup, Dinamarca)

programado com o tempo de 40 minutos de incubação à 98°C com tampão pH alto. Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H₂O₂ em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH7.2.

Os cortes foram incubados com os anticorpos anti-HspBp1 (clone ab3858, ABCAM, Cambridge, MA, EUA) diluído a 1:100 em solução de diluição (*Antibody Diluent with background reducing components*), Dako), Ki-67 (clone NCL-KI67-MM1, Novocastra, UK) diluído a 1:250 e caspase 3 (clone 3CSD01, Neomarkers, EUA), diluído a 1:100. O processo de incubação foi realizado pela metodologia de capilaridade através da estação de imunocoloração Dako Autostainer, (Dako, Glostrup, Dinamarca). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3 passagens de tampão PBS, pH7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se o sistema validado Envision Flex HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (*Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System*, Dako, Glostrup, Dinamarca) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante, e incubadas em solução de amônia a 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA).

3.7 Análise das Imagens

As expressões de Hsp27, Ki-67 e caspase 3 foram avaliadas após a confecção de lâminas histológicas das peças de tecido mamário das pacientes selecionadas que encontravam-se arquivadas no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Foram obtidas dez imagens aleatórias e não sobrepostas em 400 aumentos de cada lâmina, sendo os arquivos gravados em formato TIFF sem compressão, como mostra a figura 1. O sistema de captura foi previamente calibrado antes de cada sessão e teve a voltagem da iluminação controlada e a óptica do microscópio ajustada pelo método de Koehler. Todas as mensurações foram realizadas com paleta de cores padronizada e armazenada pelo programa

Image Pro Plus, garantindo a uniformidade de seleção de cores. Os resultados foram exportados para planilhas Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

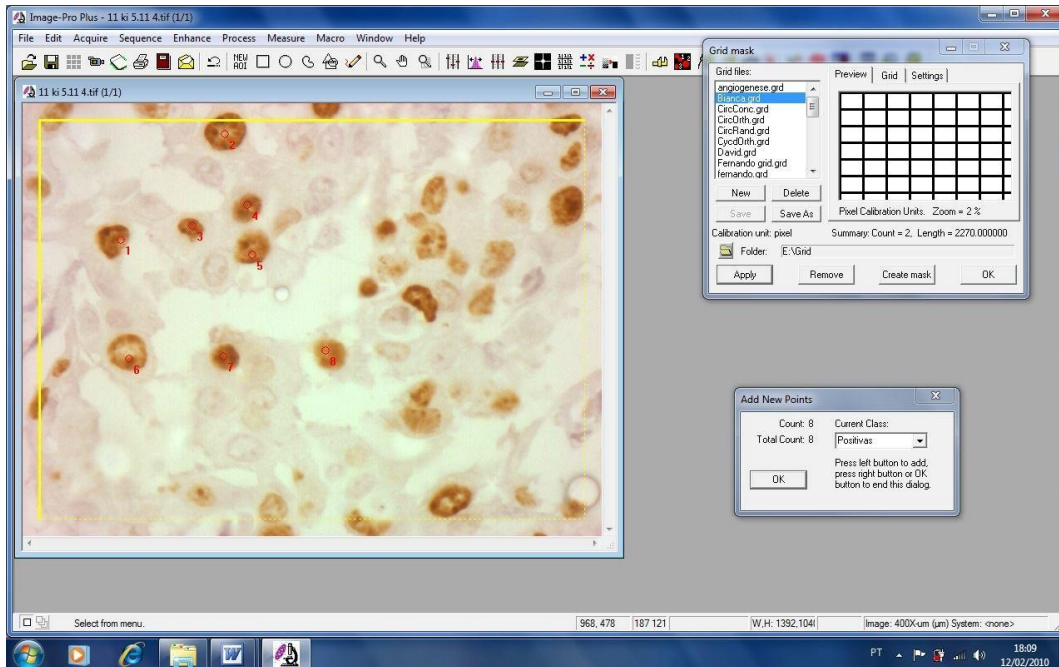


Figura 1: Imagem da tela do programa Image Pro Plus 6.0 com arquivo com células marcadas em marrom com o anticorpo Ki-67. Cada campo teve o número de células e a área corada contados. Corante DAB, 400X.

3.8 Análise estatística

1. TÉCNICAS ESTATÍSTICAS EMPREGADAS

A análise descritiva foi realizada pelas medidas de dispersão (desvio padrão e amplitude), de tendência central (média mediana) e por distribuição de frequências, n(%). Para o estudo da distribuição de dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$). Na comparação da expressão de positividade foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn e Mann Whitney.

Para as análises que envolveram as comparações sobre as variáveis categóricas entre os grupos foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson. Para critérios de decisão estatística foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Science*[®] (SPSS), versão 17.0.

4 RESULTADOS

O grupo com câncer de mama com presença de metástase em linfonodos axilares apresentou 52% de prevalência pelo acometimento da mama esquerda, enquanto que o grupo com carcinoma de mama sem presença de metástase axilar apresentou 56% de prevalência pela mama esquerda. A média de idade para o grupo com carcinoma de mama e metástases linfonodais foi de 54,2 anos de idade, sendo que a paciente mais jovem apresentava 22 anos e a de maior idade 76 anos. No grupo de pacientes com carcinoma de mama sem metástase, a média de idade foi de 55,8 anos de idade, variando entre 30 e 81 anos de idade. No grupo controle, a média de idade foi de 25,9 anos, variando entre 18 e 30 anos de idade.

Os resultados apresentados na tabela 1 descrevem a avaliação da expressão da proteína Hsp27 de 75 casos distribuídas em três grupos denominados: grupo carcinoma com linfonodo sentinela axilar positivo (TUMOR+LFN+), carcinoma de mama com linfonodo axilar sentinela negativo (TUMOR+LFN-) e grupo controle.

Sobre estes grupos, verificou-se que tanto para os dados referentes ao tumor quanto para aqueles do linfonodo, a maior parte das lesões apresentaram expressão positiva, porém mais constante no grupo TUMOR + LFN+), como se pode observar nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Distribuição absoluta e relativa da positividade para anticorpo anti-Hsp27 para os três grupos considerando o número de casos onde a expressão foi detectada e expressão ausente (zero) (n=75).

Grupo	TUMOR			LINFONODO	
	total	casos	%	casos	%
TUMOR + LFN (+)	25				
Expressão detectada		21	84%	25	100%
Expressão não detectada		4	16%	0	0%
TUMOR + LFN(-)	25				
Expressão detectada		25	100%	20	80%
Expressão não detectada		0	0%	4	20%
Controle	25				
Expressão detectada		24	96%	–	–
Expressão não detectada	1	4%	–	–	
Total	75				

Sobre os resultados da avaliação quantitativa referentes ao tumor, apresentados na tabela 2, verificou-se que para o LNF(+) o mínimo foi de 0,3 e o máximo de 31.213,4; com média de 5.995,7 ($\pm 8.291,2$) e mediana de 3.304,6. Para o LNF(-), a amplitude de variação foi de 635,8 a 108.006,0, com média de 34.124,6 ($\pm 30.909,5$) e mediana de 22.660,2. Nos dados do grupo controle, a expressão de positividade ficou entre 86,5 e 31.268,8, com média de 4.755,9 ($\pm 6.346,6$) e mediana de 12.946,7. Comparando-se os três grupos, foi detectada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) de forma que, o grupo TUMOR+LNF(-) apresentou média significativamente mais elevada quando comparada aos grupos TUMOR+LNF(+) e Controle. Sendo que, entre estes dois últimos grupos citados não foram detectadas diferenças significativas.

No que se refere aos dados dos linfonodos, no grupo TUMOR+LNF+ o mínimo foi de 749,2 e o máximo de 58.107,6; com média de 17.729,2 ($\pm 14.333,2$) e mediana de 12.946,7. Para o grupo TUMOR+LNF- o mínimo registrado foi de 27,6 e o máximo de 106,805,4; com média de 15.420,5 ($\pm 31.283,3$) e mediana de 932,6.

Comparando-se as expressões de positividade detectadas nos linfonodos entre os grupos TUMOR+LNF+ e TUMOR+LNF-, os resultados mostraram expressão significativamente mais elevada no grupo TUMOR+LNF+ ($p = 0,003$), quando comparada ao grupo TUMOR+LNF-.

Tabela 2: Expressão de Hsp27 para tecido mamário e linfonodo sentinela para os grupos Tumor+LNF+, Tumor+LNF- e grupo controle por análise quantitativa (valores em μm^2).

Expressão de positividade					
Tecido	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
Tecido mamário	TUMOR+LNF+	25	5995,7 _a	8291,2	<0,001§
	TUMOR+LNF-	25	34124,6 _b	30909,5	
	Controle	25	4755,9 _a	6346,6	
Linfonodo	TUMOR+LNF+	25	17729,2	14333,2	=0,003¥
	TUMOR+LNF-	25	15420,5	31283,3	

§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

¥: Teste de Mann Whitney.

A tabela 3 apresenta o resultado da análise quantitativa da positividade para a proteína Ki-67 no tecido mamário dos três grupos, onde não houve diferença significativa entre o tecido mamário de pacientes com ou sem metástases em axila, enquanto a expressão da proteína foi significativamente maior nos tecidos neoplásicos comparados aos tecidos do grupo controle. Os resultados foram coerentes com o comportamento biológico esperado nos diferentes grupos.

Tabela 3: Resultados da análise quantitativa da expressão de Ki-67 no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados (valores em μm^2).

Expressão de positividade					
Tecido	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
Tecido mamário	TUMOR+LFN+	25	2140,2 _a	1559,4	
	TUMOR+LFN-	25	2589,3 _a	1666,2	<0,001§
	Controle	25	755,9 _b	346,5	

§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

A tabela 4 mostra os resultados da avaliação da expressão de caspase 3 por método quantitativo no tecido mamário, que não apresentou diferença significativa entre os três grupos.

Tabela 4: Resultados da análise quantitativa da expressão de caspase 3 no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados (valores em μm^2).

Expressão de positividade					
Tecido	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
Tecido mamário	TUMOR+LFN+	25	2389,5,2 _a	1094,0	
	TUMOR+LFN-	25	1945,3 _a	1579,2	0,134§
	Controle	25	2299,7 _a	1354,6	

§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

A tabela 5 apresenta a razão entre a expressão de ki-67 e caspase 3, estimando a relação entre a taxa de proliferação e apoptose entre os três grupos. Os resultados mostram que houve diferença entre o grupo TUMOR+LFN- e TUMOR+/LFN- quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença na comparação entre os dois grupos de tecido tumoral (TUMOR+LFN- e TUMOR+LFN+).

Tabela 5: Avaliação da razão entre proliferação celular por Ki-67 (proliferação celular) e caspase 3 (apoptose) no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados.

Tecido	Grupo	Expressão de positividade			
		n	Média	Desvio padrão	p
Tecido mamário	TUMOR+LFN+	25	0,3051 _a	0,1914	
	Controle	25	0,0463 _b	0,0304	0,0301§
	TUMOR+LFN-	25	0,2858 _a	0,1896	
	Controle	25	0,0455 _b	0,0297	0,0441§
	TUMOR+LFN+	25	0,2834	0,2030	
	TUMOR+LFN-	25	0,2799	0,1865	0,9950§

§Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a expressão aumentada da Hsp27 em carcinomas ductais invasores, proteína que também é expressa na alteração fibrocística da mama (Grzeżzolka, Kurnol et al. 2012). A análise quantitativa da Hsp27 demonstrou maior expressão da proteína em carcinomas sem metástases axilares, enquanto não houve diferença na expressão dessa proteína entre o grupo de carcinomas com metástases em linfonodo sentinela axilar e o grupo controle. Embora a metodologia empregada e o número de casos estudados nesse trabalho não permitam concluir que esse comportamento na doença metastática seja um achado constante, torna-se evidente a necessidade de explorar melhor esse achado em estudos futuros. Da mesma maneira, estudar a relação entre a expressão de Hsp27 com receptores hormonais, HER2/neu e p53 em um número bem maior de pacientes, dentre várias outras possibilidades é uma interessante perspectiva futura a partir dos achados deste trabalho. Essa mudança no imunofenótipo da neoplasia talvez resulte da emergência de novos subclones com capacidades de imunomodulação diferentes durante a história natural da doença, e há evidências de que a supressão da Hsp27 diminua a taxa de proliferação celular dos carcinomas de mama (Straume, Shimamura et al. 2012), o que torna os achados desse trabalho, particularmente a redução da expressão da Hsp27 no tecido da neoplasia primária no grupo com metástases axilares, particularmente interessante para investigação futura. Sabe-se que a Hsp27, ou HspB1 tem relatos na literatura de vários diferentes papéis na sinalização celular em carcinomas, junto com a HspB5 (Arrigo and Gibert 2014). Essa característica pleiotrópica muito possivelmente deriva da capacidade dessas proteínas ligarem-se, exercerem o papel de chaperoninas moleculares e modularem a atividade ou a meia-vida de vários alvos proteicos que envolvem a regulação celular, tais como a apoptose, etapas de processos oncogênicos e de formação de metástases. Essas proteínas se caracterizam por suas complexas estruturas oligoméricas, que permitem que elas interajam entre si e formem estruturas homo e hetero-oligoméricas de tamanhos dinâmicos, que podem atingir até 700 kDA. Além disso, a Hsp27, HspB4 e HspB5 contém vários sítios de serina que podem ser fosforilados por quinases específicas, incluindo as quinases de estresse e as MAP-quinases. Tanto a fosforilação como as possibilidades de organização oligomérica dessas proteínas são dinâmicas e modificadas por alterações no ambiente celular. Um exemplo é a reorganização do estado de fosforilação e oligomerização da Hsp27 dependendo do indutor de apoptose, o que sugere que esta proteína pode se modificar de várias formas para inibir o processo de apoptose (Arrigo

and Gibert 2014). Mudanças em pequenas Hsps como a Hsp27 podem gerar cerca de trezentas diferentes formas estequiométricas que interagem de maneiras diferentes com seus alvos proteicos. Essa plasticidade estrutural poderia facilitar o reconhecimento de proteínas “clientes” que favoreceriam o processo de desenvolvimento de novas características agressivas de células neoplásicas, assim promovendo o crescimento e disseminação das neoplasias malignas. Assim, essas proteínas clientes poderiam participar nos processos de evasão da morte celular, estímulo ao crescimento tumoral e agressividade da neoplasia. Elas têm sido associadas de forma consistente na literatura com diferentes receptores citoplasmáticos, tais como VEGF, FGF-2 e Her-2, intensificando a atividade da via da MAPK quinase / MEK/ ERK (Arrigo and Gibert 2014). O primeiro relato de interação entre uma Hsp com um receptor foi a descrição da Hsp27 atuando como proteína associada ao receptor de estrogênio Beta (ER beta) que poderia atuar como uma co-repressora na sinalização do estrogênio (Ciocca and Luque 1991). Mais recentemente foi demonstrado que em células humanas de carcinoma de mama a Hsp27 aumenta a estabilidade da proteína Her2/neu agindo como chaperonina desta proteína de membrana celular, resultando no aumento da resistência ao trastuzumab (Kang, Kang et al. 2008). Outro exemplo recente é o efeito promotor da Hsp27 em células de carcinoma de mama para que adquiram potencial metastático e instalem-se em tecido ósseo (Gibert, Eckel et al. 2012). A chamada transição epitelial para mesenquimal dos carcinomas continua sendo um processo pouco conhecido, mas o papel da Hsp27 na manutenção da viabilidade das células tronco tumorais do carcinoma de mama através da regulação da EMT e do fator de transcrição NK-kB já foi descrita na literatura (Wei, Liu et al. 2011).

Os achados relacionados à expressão de Ki-67, caspase 3 e a razão entre a expressão dessas proteínas foram condizentes com a literatura e também com a história natural do carcinoma de mama (Yerushalmi, Woods et al. 2010). No entanto, é possível que o método empregado para avaliação de apoptose neste estudo, através da avaliação da expressão da caspase 3 por método imunohistoquímico apresente baixa sensibilidade para detectar a apoptose e suas vias, já que não houve diferença na expressão de caspase 3 entre os três grupos. De fato, um método de custo adequado e boa sensibilidade e especificidade para determinação da taxa de apoptose em material fixado em formalina e preservado em parafina ainda não foi desenvolvido. Simultaneamente, outras formas de morte celular como a necroapoptose e piroapoptose, dentre outras, têm sido descritas nos últimos anos. De qualquer maneira, o crescente conhecimento sobre diferentes vias de sinalização celular pró-apoptóticas e de mecanismos de evasão da apoptose tornam esse tema cada vez mais complexo e trazem

também controvérsias sobre a adequação dos métodos existentes para estudo da apoptose, como mostram estudos com resultados por vezes conflitantes (Vinothini, Murugan et al. 2011) e as conclusões do interessante artigo de Blazquez e colaboradores (Blazquez, Sirvent et al. 2006), que corrobora os achados relacionados a apoptose neste estudo. O conceito de que os mecanismos de sinalização celular fazem parte de um sistema complexo na concepção da física, em que esta definição implica na capacidade de um fator influenciar o sistema em vários níveis diferentes e com muitos elementos desconhecidos se torna cada vez mais evidente (Service 1999). Consequentemente, novas abordagens, métodos e modelos para a avaliação crescente das vias de sinalização celular se fazem cada vez mais necessários.

6 CONCLUSÕES

1. A expressão da Hsp27 encontrou-se aumentada nas amostras teciduais e no tecido linfonodal de pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem metástase em linfonodo sentinela axilar comparado ao grupo controle, enquanto não houve diferença na expressão desta proteína entre o grupo com carcinoma ductal invasor com metástase em linfonodo sentinela axilar e o grupo controle.
2. O grupo de pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem metástases axilares apresentou maior expressão imunohistoquímica de Hsp27 quando comparado ao grupo de pacientes com metástase em linfonodo sentinela na axila no tecido tumoral da lesão primária ($p < 0,001$).
3. O tecido dos linfonodos sentinela axilares do grupo de pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem metástases axilares apresentou maior expressão imunohistoquímica de Hsp27 quando comparado ao grupo de pacientes com metástase em linfonodo sentinela na axila ($p = 0,003$).
4. A expressão de proteína Ki-67 foi maior nos dois grupos com carcinoma ductal invasor do que no grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa na expressão de Ki-67 entre os grupos de pacientes com metástase e o grupo sem metástase em linfonodo sentinela na axila.
5. Não houve diferença significativa na expressão de caspase 3 pelo método imunohistoquímico entre os três grupos.
6. Houve diferença significativa na razão entre ki-67 e caspase 3 comparando-se os grupos com carcinoma ductal com metástase ($p = 0,03$) e sem metástase ($p = 0,04$) com o grupo controle, porém não houve diferença na comparação entre os dois grupos com carcinoma, assim como também não foi encontrada diferença entre a expressão de Hsp27 e a razão entre Ki-67 e caspase 3 entre os grupos com carcinoma ductal invasivo com e sem metástase.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albain Ks, Allred Dc, et al; Breast Cancer Outcome And Predictors Of Outcome: Are There Age Differentials? J Natl Cancer Inst Monogr, V.16, P.35-42. 1994.

Anazetti Mc, Melo Ps. Morte Celular Por Apoptose: Uma Visão Bioquímica E Molecular. 2007 Metrocamp Pesquisa, V1, N1, P. 37-58

Anderson, Borgen Pi. Improved Survival In Young Womem With Brest Cancer. Ann Surg Oncol 2005; 2: 407-15.

Arrigo, A. P. And B. Gibert (2014). "Hspb1, Hspb5 And Hspb4 In Human Cancers: Potent Oncogenic Role Of Some Of Their Client Proteins." Cancers (Basel) 6(1): 333-365.

Belkacemi, L. And M. O. Hebb (2014). "Hsp27 Knockdown Produces Synergistic Induction Of Apoptosis By Hsp90 And Kinase Inhibitors In Glioblastoma Multiforme." Anticancer Res 34(9): 4915-4927.

Bennett Mr. Mechanisms Of P53-Induced Apoptosis. Biochem Pharmacol. 1999 Oct 1;58(7):1089-95

Blazquez, S., J. J. Sirvent, M. Olona, C. Aguilar, A. Pelegri, J. F. Garcia And J. Palacios (2006). "Caspase-3 And Caspase-6 In Ductal Breast Carcinoma: A Descriptive Study." Histol Histopathol 21(12): 1321-1329.

Boatright K M, Salvesen G S. Mechanisms Of Caspase Activation. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15: 725-31.

Bonassa, Edva Moreno Aguilar E Santana, Tatiana Rocha. Enfermagem Em Terapêutica Oncológica. 3º Edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Bui Jd, Schreiber Rd. Cancer Immunosurveillance, Immunoediting And Inflammation: Independent Or Interdependent Processes? Curr Opin Immunol, V.19, N.2, P.203-208. 2007.

Cheung, K. J. And A. J. Ewald (2014). "Illuminating Breast Cancer Invasion: Diverse Roles For Cell-Cell Interactions." Curr Opin Cell Biol 30c: 99-111.

Chinnaiyan, A. Et Al. Fadd, A Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts With The Death Domain Of Fas And Initiates Apoptosis. Cell, V. 81, N. 4, P. 505-12, May 1995. Issn 0092-8674.

Ciocca, D. R. And E. H. Luque (1991). "Immunological Evidence For The Identity Between The Hsp27 Estrogen-Regulated Heat Shock Protein And The P29 Estrogen Receptor-Associated Protein In Breast And Endometrial Cancer." Breast Cancer Res Treat 20(1): 33-42.

Clark G. Fatores Prognósticos E Preditivos. In: Harris, J., Editor. Doenças Da Mama, 2 Ed, Lippincott. P.587-620. 2002.

Cummins Ep, Taylor Ct. Hypoxia-Responsive Transcription Factors. Pflugers Arch. 2005 Sep;450(6):363-71. Epub 2005 Jul 9.

Deyarmin, B., J. L. Kane, A. L. Valente, R. Van Laar, C. Gallagher, C. D. Shriver And R. E. Ellsworth (2013). "Effect Of Asco/Cap Guidelines For Determining Er Status On Molecular Subtype." *Ann Surg Oncol* 20(1): 87-93.

Dunn Gp, Koebel Cm, Schreiber Rd. Interferons, Immunity And Cancer Immunoediting. *Nat Ver Immunol*, V.6, N.11, P.836-848. 2006.

Eisenberg A. Sobrevida De Cinco Anos Para Pacientes Com Carcinoma Ductal Infiltrante De Mama Sem Comprometimento De Linfonodos Axilares. Coorte Hospitalar, 1992-1996, Tese, Rio De Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 2004.

Ellis R J, Hartl F U. Protein Folding In The Cell: Competing Models For Chaperonin Function. *Faseb J* 1996; 10: 20-6.

Gabai Vl, Sherman My. Invited Review: Interplay Between Molecular Chaperones And Signaling Pathways In Survival Of Heat Shock. *J Appl Physiol* (1985) 2002 Apr;92(4):1743-8.

Gibert B, Eckel B, Gonin V, Goldschneider D, Fombonne J, Deux B, Mehlen P, Arrigo Ap, Clézardin P, Diaz-Latoud C. Targeting Heat Shock Protein 27 (Hspb1) Interferes With Bone Metastasis And Tumour Formation In Vivo. *Br J Cancer*. 2012 Jun 26; 107 (1): 63-70

Gorrini, C. (2014). "Discovery Of A P53 Variant That Controls Metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(32): 11576-11577.

Grivicich I, Regner A, Rocha A B Da. Morte Celular Por Apoptose. *Revista Brasileira De Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343.

Grzegorzolka, J., K. Kurnol, P. Piotrow, B. Pula, C. Kobierzycki, A. Piotrowska, K. Jablonska, et al; (2012). "Hsp-27 Expression In Invasive Ductal Breast Carcinoma." *Folia Histochem Cytobiol* 50(4): 527-533.

Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, et al; (2010). "American Society Of Clinical Oncology/College Of American Pathologists Guideline Recommendations For Immunohistochemical Testing Of Estrogen And Progesterone Receptors In Breast Cancer." *J Clin Oncol* 28(16): 2784-2795.

Hanahan D, Weinberg Ra. The Hallmarks Of Cancer. *Cell*, V.100, N.1, P.57-70. 2000.

Hartl, F. U. (1996). "Molecular Chaperones In Cellular Protein Folding." *Nature* 381(6583): 571-579.

Hartl, F. U., A. Bracher And M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular Chaperones In Protein Folding And Proteostasis." *Nature* 475(7356): 324-332.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - The P53 Network. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(Pt 20):4077-85.

Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden Kh, Oren M. Induction Of Apoptosis In Hela Cells By Trans-Activation-Deficient P53. *Genes Dev.* 1995 Sep 1;9(17):2170-83.

Horwich, A. L. (2014). "Molecular Chaperones In Cellular Protein Folding: The Birth Of A Field." *Cell* 157(2): 285-288.

Inca – Instituto Nacional Do Câncer. Disponível Em: [Http://Www.Inca.Gov.Br](http://www.inca.gov.br). Acesso Em Outubro 2013.

Jaattela M, Wissing D, Et Al. Major Heat Shock Protein Hsp70 Protects Tumor Cell From Tumor Necrosis Factor Cytotoxicity. *Embo J*, V.11, N.10, Oct, P.3507-12. 1992.

Kang, S. H., K. W. Kang, K. H. Kim, B. Kwon, S. K. Kim, H. Y. Lee, S. Y. Kong, E. S. Lee, S. G. Jang And B. C. Yoo (2008). "Upregulated Hsp27 In Human Breast Cancer Cells Reduces Herceptin Susceptibility By Increasing Her2 Protein Stability." *Bmc Cancer* 8: 286.

Kromann N, Andersen Pk E Melbie M. Factors Influencing The Effect Of Age On Prognosis In Breast Cancer: Population Based Study. *Brit Med J* 2005; 320: 474-9.

Lane, D. P. And L. V. Crawford (1979). "T Antigen Is Bound To A Host Protein In Sv40-Transformed Cells." *Nature* 278(5701): 261-263.

Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P. Caspases: Pharmacological Manipulation Of Cell Death. *J Clin Invest*, V. 115, N. 10, P. 2665-72, Oct 2005. Issn 0021-9738.

Lee, C. H., H. M. Hong, Y. Y. Chang And W. W. Chang (2012). "Inhibition Of Heat Shock Protein (Hsp) 27 Potentiates The Suppressive Effect Of Hsp90 Inhibitors In Targeting Breast Cancer Stem-Like Cells." *Biochimie* 94(6): 1382-1389.

Linzer, D. I. And A. J. Levine (1979). "Characterization Of A 54k Dalton Cellular Sv40 Tumor Antigen Present In Sv40-Transformed Cells And Uninfected Embryonal Carcinoma Cells." *Cell* 17(1): 43-52.

Locksley, R.; Killeen, N.; Lenardo, M. The Tnf And Tnf Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell*, V. 104, N. 4, P. 487-501, Feb 2001. Issn 0092-8674.

Meyer T N, Silva A L Da. Resposta Celular Ao Estresse. *Ver Ass Brasil* 1999; 45(2): 181-8.

Mohit, E., A. Hashemi And M. Allahyari (2014). "Breast Cancer Immunotherapy: Monoclonal Antibodies And Peptide-Based Vaccines." *Expert Rev Clin Immunol* 10(7): 927-961.

Morales L, Reigosa A, Caleiras E, Mora R, Marrero N, Payares E, Molina K, Sucre L. Her2/Neu Expression In Venezuelan Patients With Locally Advanced Breast Cancer. *Invest Clin.* 2008 Mar;49(1):69-78

Mounier, Nicole And Arrigo, André Patrick. Actin Cytoskeleton And Small Heat Shock Proteins: How Do They Interact? *Cell Stress Chaperones.* Apr 2002; 7(2): 167–176.

Nicholson D W, Thornberry Na. Caspases: Killer Proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 229-306.

Nicholson D W. From Bench To Clinic With Apoptosis-Based Therapeutic Agents. *Nature* 2000; 407: 810-16.

Parrish, A. B., C. D. Freel And S. Kornbluth (2013). "Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation And Function." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(6).

Rabinovich Ga, Gabrilovich D, Et Al. Immunosuppressive Strategies That Are Mediated By Tumor Cells. *Annu Rev Immunol*, V.25, P.267-96. 2007.

Rakha, E. A., J. Starczynski, A. H. Lee And I. O. Ellis (2014). "The Updated Asco/Cap Guideline Recommendations For Her2 Testing In The Management Of Invasive Breast Cancer: A Critical Review Of Their Implications For Routine Practice." *Histopathology* 64(5): 609-615.

Rappa, F., F. Farina, G. Zummo, S. David, C. Campanella, F. Carini, G. Tomasello, P. Damiani, F. Cappello, D. E. M. Ec And A. J. Macario (2012). "Hsp-Molecular Chaperones In Cancer Biogenesis And Tumor Therapy: An Overview." *Anticancer Res* 32(12): 5139-5150.

Ritossa F. A New Puffing Pattern Induced By Temperature And Dnp In *Drosophila*. *Experientia*, V.18, P.571-73. 1962.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon Cancer: Genetics And Apoptotic Events. *Biol Chem.* 2004; 385: 449-64.

Seemampillai, B., R. Germack, L. E. Felkin, A. McCormack And M. L. Rose (2014). "Heat Shock Protein-27 Delays Acute Rejection After Cardiac Transplantation: An Experimental Model." *Transplantation* 98(1): 29-38.

Service, R. F. (1999). "Complex Systems. Exploring The Systems Of Life." *Science* 284(5411): 80-81, 83.

Straume, O., T. Shimamura, M. J. Lampa, J. Carretero, A. M. Oyan, D. Jia, C. L. Borgman, et al; (2012). "Suppression Of Heat Shock Protein 27 Induces Long-Term Dormancy In Human Breast Cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(22): 8699-8704.

Vermeulen K, Berneman Zn, Van Bockstaele Dr. Cell Cycleand Apoptosis. *Cell Prolif.*, 2003, N36, P 165-175.

Vinothini, G., R. S. Murugan And S. Nagini (2011). "Mitochondria-Mediated Apoptosis In Patients With Adenocarcinoma Of The Breast: Correlation With Histological Grade And Menopausal Status." *Breast* 20(1): 86-92.

Wang, X., M. Chen, J. Zhou And X. Zhang (2014). "Hsp27, 70 And 90, Anti-Apoptotic Proteins, In Clinical Cancer Therapy (Review)." *Int J Oncol* 45(1): 18-30.

Wei, L., T. T. Liu, H. H. Wang, H. M. Hong, A. L. Yu, H. P. Feng And W. W. Chang (2011). "Hsp27 Participates In The Maintenance Of Breast Cancer Stem Cells Through Regulation Of Epithelial-Mesenchymal Transition And Nuclear Factor-Kappab." *Breast Cancer Res* 13(5): R101.

Xu, F., T. Yang, D. Fang, Q. Xu And Y. Chen (2014). "An Investigation Of Heat Shock Protein 27 And P-Glycoprotein Mediated Multi-Drug Resistance In Breast Cancer Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics." *J Proteomics* 108: 188-197.

Yerushalmi, R., R. Woods, P. M. Ravdin, M. M. Hayes And K. A. Gelmon (2010). "Ki67 In Breast Cancer: Prognostic And Predictive Potential." *Lancet Oncol* 11(2): 174-183.

Zimmermann, M., Mueller, T., Dieplinger, B., Bekos, C., Beer, L., Hofbauer, H., Dome, B. & Ankersmit, H. J. 2014. Circulating Heat Shock Protein 27 As A Biomarker For The Differentiation Of Patients With Lung Cancer And Healthy Controls--A Clinical Comparison Of Different Enzyme Linked Immunosorbent Assays. *Clin Lab*, 60, 999-1006.

Artigo Original

Código de Fluxo: 2299

EXPRESSÃO DE HSP27 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM CARCINOMA DE MAMA COM E SEM METÁSTASES AXILARES

HSP27 EXPRESSION AND REASON BETWEEN CELL PROLIFERATION INDICES AND APOPTOSIS IN BREAST CARCINOMA WITH AND WITHOUT AXILLARY METASTASES

Autores (Authors)

Clarice Martins Feyh Birnfeld: Mestre - Enfermeira Liderança do serviço de oncologia do Hospital Moinhos de Vento

Vinicius Duval da Silva: Hospital do câncer de Barretos -

Descritores (Palavras-chave)

Carcinoma Ductal de Mama; Proliferação de Células; Apoptose

Keywords

Carcinoma, Ductal, Breast; Cell Proliferation; Apoptosis

Resumo

Introdução: O envolvimento do sistema imunológico no processo de neoplasias vem cada vez mais sendo estudado visto seu potencial em terapia antitumorais. **Objetivos:** Avaliar a expressão de Hsp27 em amostras teciduais de carcinomas ductais invasores com e sem presença de metástase em linfonodo sentinela axilar e estudar a relação da taxa de proliferação celular (Ki-76) e apoptose (caspase 3) em comparação com amostras de alteração fibrocística no tecido mamário. **Métodos:** Estudo transversal com amostras de tecidos coletados no Hospital São Lucas entre setembro de 2001 e outubro de 2009, divididas em três grupos: alteração fibrocística da mama (grupo controle); carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase linfonodal; sem presença de metástase linfonodal. **Resultados:** Foi observada expressão aumentada da Hsp27 no grupo de carcinomas sem metástase, quando comparados aos demais grupos. Houve diferença na expressão da proteína Ki-67 e razão entre proliferação celular e apoptose entre os grupos com carcinoma comparados ao grupo controle. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos com carcinoma ou entre a expressão de caspase 3 nos três grupos quando comparados entre si. **Conclusão:** A análise quantitativa da Hsp27 demonstrou maior expressão da proteína nos tecidos da neoplasia primária e nos linfonodos em carcinomas sem metástase em linfonodo sentinela axilar. Embora a metodologia e o número de casos não permitam concluir que esse comportamento na doença metastática seja um achado constante, justifica-se a necessidade de avaliar esse achado em estudos futuros.

Abstract

Introduction: The involvement of the immune system in the process of neoplasms is increasingly being studied considering its potential in antitumor therapy. **Objectives:** To evaluate the expression of Hsp27 in tissue samples from invasive ductal carcinomas with and without presence of axillary sentinel lymph node metastasis and to study the relationship of cell proliferation rate (Ki-76) and apoptosis (caspase 3) in comparison with samples of alteration fibrocystic breast tissue. **Methods:** Cross-sectional study with tissue samples collected at Hospital São Lucas between September 2001 and October 2009, divided into three groups: fibrocystic breast alteration (control group); invasive ductal carcinoma of the breast with presence of lymph node metastasis; without presence of lymph node metastasis. **Results:** Increased expression of Hsp27 was observed in the group of non-metastasis carcinomas when compared to the other groups. There was a significant difference between the Ki-67 protein and the ratio between cell proliferation and apoptosis among the carcinoma groups compared to the control group. However, there was no significant difference between the groups with carcinoma or between the expression of caspase 3 in the three groups when compared to each other. **Conclusion:** Quantitative analysis of Hsp27 demonstrated increased protein expression in primary neoplasia tissues and in lymph nodes in carcinomas without axillary sentinel lymph node metastasis. Although the methodology and the number of cases do not allow to conclude that this behavior in metastatic disease is a constant finding, it is justified the need to evaluate this finding in future studies.

Trabalho submetido em (Article's submission in): 11/04/2018 15:44:07

Instituição (Affiliation): Hospital São Lucas da PUCRS

Correspondência (Correspondence): Rua dos Burgueses, número 295/402, Bairro Partenon, CEP:91530020, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Suporte Financeiro (Financial support):

Submetido para (Submitted for): **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 2299

INTRODUÇÃO

De acordo com Instituto Nacional do Câncer o carcinoma de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo representa cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres no Brasil a cada ano¹. Esse tipo de câncer acomete principalmente mulheres a partir dos 40 anos, com maior incidência na sexta década de vida^{2,3}. Atualmente, mais de 60% dos casos são identificados em estágios avançados, o que claramente se reflete nas curvas de mortalidade¹.

O conhecimento dos fatores de relevância sobre o comportamento biológico do câncer de mama, das classificações diagnósticas e do seu tratamento tem sido objeto crescente de vários estudos. No momento do diagnóstico a realização do estadiamento preciso é fundamental para determinar prognóstico e possibilidades de resposta terapêutica¹. Inicialmente realiza-se a biópsia para a definição do tipodetumor por exame anatomopatológico e imunoistoquímicos^{4,5,6}. Adicionalmente, outros exames são realizados para estabelecer o estadiamento da doença, sendo o status dos linfonodos axilares ainda um forte fator prognóstico no câncer de mama⁷.

A maioria das terapias antitumorais não-cirúrgicas possuem efeitos colaterais limitantes. Deste modo, novas terapia estão sendo estudadas para proporcionar um melhor tratamento, como a mediação de respostas imunes antitumorais^{8,9}. Ainda assim, diversos fatores podem ser responsáveis por uma resposta ineficaz, como a tolerância à resposta imune¹⁰.

Embora esses resultados sugerem que a imunoterapia contra neoplasias malignas, possa ser muito promissora, um melhor entendimento de todo o processo envolvido na resposta imune tumoral é necessário a fim de aprimorar as estratégias propostas e fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas terapias¹¹.

Genes e proteínas envolvidas na carcinogênese

Sabe-se que o surgimento de neoplasias tem relações com mutações que ocorrem nos genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose¹². Apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma fisiológica se patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual¹³. Este é um mecanismo inato de defesa, e por esse motivo, diversos agentes medicamentosos agem induzindo esse processo como forma de tratamento¹⁴.

O processo de apoptose envolve diversos agentes, em especial determinadas proteases, chamadas de caspases, que possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que levam à condensação e fragmentação nuclear e exposição de fosfolípidios de membrana celular que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos^{15,16}.

Outros agentes também estão envolvidos no desenvolvimento do câncer. As *Heat Shock Proteins* (Hsp) são uma classe de proteínas que conferem proteção no processo de biogênese proteica, evitando interações incorretas, sem fazer parte da estrutura final das mesmas^{17,18,19}. Elas são chamadas de proteínas de choque térmico, visto que sua expressão é estimulada após estresse celular, em especial a Hsp27, Hsp70 e Hsp90^{20,21}.

Contudo, estudos mostram uma expressão aumentada em alguns tipos de neoplasias, fato que pode estar correlacionados

com o aumento do potencial da carcinogênese, do potencial metastático e da resistência à agentes quimioterápicos²². Em vários estudos a Hsp27 foi associada ao aumento da agressividade de determinados tumores primários e diminuição da sobrevida em pacientes com câncer de mama e melanoma^{23,24,25}. Entretanto, os seus papéis na fase posterior da progressão do tumor, em especial na etapa de disseminação metastática, ainda são desconhecidos²⁶.

Há também outros genes envolvidos com a carcinogênese, como por exemplo o TP53 (supressor tumoral), responsável pela síntese da proteína p53, que se encontra frequentemente mutado na maioria dos tipos de câncer²⁷. Células mutantes que não codificam este gene, não sofrem apoptose, acabam sobrevivendo por mais tempo e acumulando mais mutações, multiplicando-se fora de controle e gerando neoplasias¹². Situações de estresse celular (como luz ultravioleta, raios-X, dano ao DNA, baixo pH extracelular, hipóxia e choque térmico) também podem influenciar a interação direta entre o p53 e o reparo do DNA, já que esta proteína é indutora de parada do ciclo celular e de apoptose, impedindo assim a proliferação de células com mutação^{12,28,29}.

OBJETIVOS

Investigar a expressão da Hsp27 em amostras de tecidos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductais invasores de mama com e sem metástases axilares pelo método imunistoquímico, relacionando essa expressão com a atividade proliferativa da neoplasia, por meio da expressão da proteína Ki-67, e do apoptose, pela caspase 3.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados casos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástases em linfonodos axilares no período entre setembro de 2001 e outubro de 2009.

Na amostra foram incluídas mulheres adultas com carcinoma de mama ductal invasor de qualquer grau histológico, que apresentavam estadiamento clínico II e III, com ou sem metástase axilar. Foram excluídas pacientes que não dispunham de material para estudo imunistoquímico ou tecido tumoral escasso; e com história conhecida de carcinoma de mama em familiar de primeiro grau e síndromes relacionadas a aumento de incidência de carcinoma de mama.

O cálculo amostral estimou um N mínimo de vinte e cinco casos por grupo para detecção de diferença significativa ($p < 0,005$). Ao todo foram selecionadas 75 amostras, divididas igualmente em três grupos com os seguintes diagnósticos: carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase em linfonodo sentinela axilar (TUMOR+LFN+); carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase em linfonodo sentinela axilar (TUMOR+LFN-); alteração fibrocística da mama (grupo controle), que é um processo benigno de elevada prevalência.

Confecção das lâminas histológicas

As lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Os blocos de parafina foram retirados do arquivo de material do serviço e realizados cortes de 3µm de espessura com micrótomo rotativo (Leica, RM2165, Nussloch, Alemanha). Foi confeccionada uma lâmina para cada marcador. As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com objetiva neofluar de 40X. Para captura das imagens foi utilizada câmera Retiga 2000R (Qimaging, Surrey, BD, Canadá) acoplada ao microscópio e a um microcomputador padrão IBM-PC. Cada imagem foi capturada sob luz normal de lâmpada halógena com controle de voltagem, para posterior quantificação das células com expressão dos marcadores estudados pelo método imunistoquímico.

Os cortes para análise imunistoquímica foram colocados em lâminas com carga positiva (Dako, Glostrup, Dinamarca) e levadas à estufa a 60°C por 1h. A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida à altas temperaturas, foi realizada no pTLink (Dako, Glostrup, Dinamarca) programado com o tempo de 40 minutos de incubação

à 98°C com tampão pH alto. Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H₂O₂ em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH7.2.

Os cortes foram incubados com os anticorpos anti-HspBp1(clone ab3858, ABCAM, Cambridge, MA, EUA) diluído a 1:100 em solução de diluição (*Antibody Diluent with background reducing components*), Dako), Ki-67 (clone NCL-KI67-MM1, Novocastra, UK) diluído a 1:250 e caspase3 (clone3CSD01,Neomarkers,EUA),diluído a 1:100. O processo de incubação foi realizado pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno- coloração Dako Autostainer, (Dako, Glostrup, Dinamarca). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3 passagens de tampão PBS, pH7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se o sistema validado Envision Flex HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca).

A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (*Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System*, Dako, Glostrup, Dinamarca) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante, e incubadas em solução de amônia a 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). As expressões de Hsp27, Ki-67 e caspase 3 foram avaliadas após a confecção de lâminas.

Análise das Imagens

Foram obtidas 10 imagens aleatórias e não sobrepostas em 400 aumentos de cada lâmina, como mostra a figura 1. O sistema de captura foi previamente calibrado antes de cada sessão e teve a voltagem da iluminação controlada e a óptica do microscópio ajustada pelo método de Koehler. As mensurações foram realizadas com paleta de cores padronizada e armazenada pelo programa Image Pro Plus, garantindo a uniformidade de seleção de cores.

Análise estatística

A análise descritiva foi realizada pelas medidas de dispersão (desvio padrão e amplitude), de tendência central (média e mediana) e por distribuição de frequências, n(%). Para o estudo da distribuição de dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (n>50). Na comparação da expressão de positividade foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn e Mann Whitney.

Para as análises que envolveram as comparações sobre as variáveis categóricas entre os grupos foi utilizado o teste Qui-quadro de Pearson. Para critérios de decisão estatística foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os dados foram analisados por meio do programa *Statistical Package for the Social Science*[®] (SPSS), versão 17.0.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, sob número (CAAE) 34425514.6.0000.533.

RESULTADOS

O grupo TUMOR+LFN+ apresentou 52% de prevalência de acometimento da mama esquerda, enquanto que o grupo TUMOR+LFN- apresentou 56% da mama esquerda. A média de idade para o grupo TUMOR+LFN+ foi de 54,2 anos, variando entre 22 e 76 anos. No grupo TUMOR+LFN-, a média de idade foi de 55,8 anos de idade, com idades entre 30 e 81 anos. No grupo controle, a média de idade foi de 25,9 anos, oscilando entre 18 e 30 anos.

Os resultados apresentados na tabela 1 descrevem a avaliação da expressão da proteína Hsp27 nos três grupos.

Verificou-se que m a m b o s o s g r u p o s a maior parte das lesões apresentaram expressão positiva de Hsp27, porém mais constante no grupo TUMOR+LNF+, como se pode observar nas tabelas 1 e 2.

Os resultados da avaliação quantitativa estão apresentados na tabela 2. Comparando-se os três grupos, foi detectada diferença estatística significativa ($p < 0,001$), onde o grupo TUMOR+LNF- apresentou média significativamente mais elevada em comparação aos grupos TUMOR+LNF+ e controle. Sendo que, entre estes dois últimos grupos citados não foram detectadas diferenças significativas. Comparando-se as expressões de positividade detectadas nos linfonodos entre os grupos TUMOR+LNF+ e TUMOR+LNF-, os resultados mostraram expressão significativamente mais elevada no grupo TUMOR+LNF+ ($p=0,003$), quando comparada ao grupo TUMOR+ LNF-.

A tabela 3 apresenta o resultado da análise quantitativa da proteína Ki-67 no tecido mamário dos três grupos, onde não houve diferença significativa entre o tecido mamário de pacientes com ou sem metástases em axila, enquanto a expressão da proteína foi significativamente maior no tecido neoplásico comparado ao tecido do grupo controle. Os resultados foram coerentes com o comportamento biológico esperado nos diferentes grupos.

A tabela 4 mostra os resultados da avaliação da expressão de caspase 3 por método quantitativo no tecido mamário, que não apresentou diferença significativa entre os três grupos.

A tabela 5 apresenta a razão entre a expressão de ki-67 e caspase3, estimando a relação entre a taxa de proliferação e apoptose entre os três grupos. Os resultados mostram que houve diferença entre o grupo TUMOR+LNF- e TUMOR+LNF+ quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença na comparação entre os dois grupos de tecido tumoral (TUMOR+LNF- e TUMOR+LNF+).

5 DISCUSSÃO

A Hsp27 tem diferentes papéis na sinalização celular em carcinomas, junto com a Hsp5³². Essa característica é possivelmente derivada da capacidade dessas proteínas ligarem-se, exercerem o papel de chaperoninas moleculares e modularem a atividade ou a meia-vida de vários alvos proteicos que envolvem a regulação celular, como: apoptose, etapas de processos oncogênicos e formação de metástases. Essas proteínas possuem complexas estruturas oligoméricas, que permitem formar estruturas homo e hetero-oligoméricas de tamanhos dinâmicos. Além disso, a Hsp27, HspB4 e HspB5 contém vários sítios de serina que podem ser fosforilados por quinases específicas, incluindo as quinases de estresse e as MAP-quinases. Tanto a fosforilação como as possibilidades de organização oligomérica dessas proteínas são dinâmicas e modificadas por alterações no ambiente celular. Um exemplo é a reorganização do estado de fosforilação e oligomerização da Hsp27 dependendo do indutor de apoptose, o que sugere que esta proteína pode se modificar de várias formas para inibir o processo de apoptose³⁰.

Essa plasticidade estrutural poderiam facilitar o reconhecimento de proteínas “clientes” que favoreceriam novas características agressivas de células neoplásicas, assim promovendo o crescimento e disseminação de neoplasias. Elas têm sido associadas de forma consistente na literatura com diferentes receptores citoplasmáticos, tais como VEGF, FGF-2 e Her-2, intensificando a atividade da via da MAPK quinase/MEK/ERK³⁰.

O primeiro relato de interação entre uma Hsp com um receptor foi com a Hsp27, que age como uma proteína associada ao receptor de estrogênio Beta (ER beta), sendo uma possível co-repressora na sinalização do estrogênio³¹. Mais recentemente foi demonstrado que a Hsp27 em carcinoma de mama aumenta a estabilidade da proteína Her2/neu, o que resulta em um aumento da resistência a trastuzumab³². Outro exemplo é o efeito promotor da Hsp27 em células de carcinoma de mama para que adquiram potencial metastático e instalem-se em tecido ósseo²⁶. A chamada transição epitelial para mesenquimal dos carcinomas continua sendo um processo pouco conhecido, mas o papel da Hsp27 na manutenção da viabilidade das células-tronco tumorais do carcinoma de mama através da regulação da EMT e do fator de transcrição NK-kB já foi descrita³³.

Os achados relacionados à expressão de Ki-67, caspase 3 e a razão entre a expressão dessas proteínas foram

condizentes com a literatura e também com a história natural do carcinoma de mama³⁴. No entanto, é possível que o método empregado para avaliação de apoptose nesse estudo apresente baixa sensibilidade para detectar apoptose e suas vias, já que não houve diferença na expressão de caspase 3 entre os três grupos. De fato, um método de custo adequado e boa sensibilidade e especificidade para determinação da taxa de apoptose em material fixado em formalina e preservado em parafina ainda não foi desenvolvido. Simultaneamente, outras formas de morte celular como a necroapoptose e piroapoptose, dentre outras, têm sido descritas nos últimos anos, o que torna necessário novas abordagens, métodos e modelos para análise^{35,36}.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a expressão aumentada da Hsp27 em carcinomas ductais invasores. A análise quantitativa da Hsp27 demonstrou maior expressão da proteína em TUMOR+LFN-, enquanto não houve diferença na expressão dessa proteína entre o grupo de carcinomas com metástases em linfonodo sentinela axilar e o grupo controle. Embora a metodologia empregada e o número de casos estudados nesse trabalho não permitam concluir que esse comportamento na doença metastática seja um achado constante, torna-se evidente a necessidade de explorar melhor esse achado em estudos futuros.

Da mesma maneira, estudar a relação entre a expressão de Hsp27 com receptores hormonais, HER2/neu e p53 em um número bem maior de pacientes, dentre várias outras possibilidades é uma interessante perspectiva futura a partir dos achados deste trabalho. Essa mudança no imunofenótipo da neoplasia talvez resulte da emergência de novos subclones com capacidades de imunomodulação diferentes durante a história natural da doença, e há evidências de que a supressão da Hsp27 diminua a taxa de proliferação celular dos carcinomas de mama²³, o que torna os achados desse trabalho, particularmente a redução da expressão da Hsp27 no tecido da neoplasia primária no grupo com metástases axilares, particularmente interessante para investigação futura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA–Instituto Nacional Do Câncer. Disponível Em: [Http://Www.Inca.Gov.Br](http://www.inca.gov.br).
2. Anderson BO, Senie RT, Vetto JT, Wong GY, McCormick B, Borgen PI. Improved Survival In Young Women With Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2005; 2: 407-15. PubMed PMID: 7496835.
3. Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. Factors Influencing The Effect Of Age On Prognosis In Breast Cancer: Population Based Study. *BMJ*. 2000 Feb; 320 (7233):474-8. PubMed PMID: 10678859.
4. Bonassa EMA, Santana, TR. *Enfermagem Em Terapêutica Oncológica*. 3rd ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.
5. Rakha EA, Starczynski J, Lee AH, Ellis IO. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for Her2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice. *Histopathology*. 2014 Apr; 64 (5):609-1. PubMed PMID: 24382093.
6. Hammond MEI, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jul; 134(7):e48-72. PubMed PMID: 20586616.
7. Eisenberg A. *Sobrevida de cinco anos para pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama sem comprometimento de linfonodos axilares: coorte hospitalar, 1992-1996*. 2004 [tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
8. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, Immunity And Cancer Immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov; 6(11):836-48. PubMed PMID: 17063185.

9. Bui JD, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance, Immunoediting And Inflammation: Independent Or Interdependent Processes? *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):203-8. PubMed PMID: 17292599.
10. Rabinovich GA, Gabrilovich D, et al. Immunosuppressive Strategies That Are Mediated By Tumor Cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267-96. PubMed PMID: 17134371.
11. Mohit E, Hashemi A, Allahyari M. Breast Cancer Immunotherapy: Monoclonal Antibodies And Peptide-Based Vaccines. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Jul;10(7):927-6. PubMed PMID: 24867051.
12. Bennett MR. Mechanisms Of P53-Induced Apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1999 Oct 58(7):1089-95. PubMed PMID: 10484066.
13. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol* 2007; 53(3): 335-343.
14. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature.* 2000 Oct;407(6805):810-6. PubMed PMID: 11048733.
15. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997 Aug;22(8):299-306. PubMed PMID: 9270303.
16. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec;15(6):725-31. PubMed PMID: 14644197.
17. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996 Jun;381(6583):571-9. PubMed PMID: 8637592.
18. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 2011 Jul;475(7356):324-32. PubMed PMID: 21776078.
19. Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *Int J Oncol.* 2014 Jul;45(1):18-30. PubMed PMID: 24789222.
20. Belkacemi L, Hebb MO. HSP27 knockdown produces synergistic induction of apoptosis by HSP90 and kinase inhibitors in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* 2014 Sep;34(9):4915-27. PubMed PMID: 25202074.
21. Seemampillai B, Germack R, Felkin LE, McCormack A, Rose ML. Heat shock protein-27 delays acute rejection after cardiac transplantation: an experimental model. *Transplantation.* 2014 Jul 15;98(1):29-38. PubMed PMID: 24879379.
22. Rappa F, Farina F, Zummo G, et al. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res.* 2012 Dec;32(12):5139-50. PubMed PMID: 23225410.
23. Straume O, Shimamura T, Lampa MJ, et al. Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May;109(22):8699-704. PubMed PMID: 22589302.
24. Xu F, Yang T, Fang D, Xu Q, Chen Y. An investigation of heat shock protein 27 and P-glycoprotein mediated multi-drug resistance in breast cancer using liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted proteomics. *J Proteomics.* 2014 Aug;108:188-97. PubMed PMID: 24882106.
25. Zimmermann M, Mueller T, Dieplinger B, et al. Circulating heat shock protein 27 as a biomarker for the differentiation of patients with lung cancer and healthy controls--a clinical comparison of different enzyme linked immunosorbent assays. *Clin Lab.* 2014;60(6):999-1006. PubMed PMID: 25016706.
26. Gibert B, Eckel B, Gonin V, et al. Targeting heat shock protein 27 (HspB1) interferes with bone metastasis and tumour formation *in vivo*. *Br J Cancer.* 2012 Jun; 107(1): 63-70. PubMed PMID: 22627320;
27. Anazetti MC, Melo PS. Morte Celular Por Apoptose: Uma Visão Bioquímica E Molecular. *Metrocamp Pesquisa* 2007 Jan; 1(1):

37-58.

28. Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M. Induction of Apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient P53. *Genes Dev.* 1995 Sep 1;9(17):2170-83. PubMed PMID: 7657168.

29. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 2005 Sep;450(6):363-71. PubMed PMID: 16007431.

30. Arrigo AP, Gibert B. HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers (Basel).* 2014 Feb 7;6(1):333-65. PubMed PMID: 24514166.

31. Ciocca DR, Luque EH. Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1991 Dec;20(1):33-42. PubMed PMID: 1667487.

32. Kang SH, Kang KW, Kim KH, et al. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer.* 2008 Oct;8:286. PubMed PMID: 18834540.

33. Wei L, Liu TT, Wang HH, et al. Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor- κ B. *Breast Cancer Res.* 2011 Oct;13(5):R101. PubMed PMID: 22023707.

34. Yerushalmi R1, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174-83. PubMed PMID: 20152769.

35. Vinothini G, Murugan RS, Nagini S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: Correlation with histological grade and menopausal status. *Breast.* 2011 Feb;20(1):86-92. PubMed PMID: 20829044.

36. Blázquez S1, Sirvent JJ, Olona M. Caspase-3 and caspase-6 in ductal breast carcinoma: a descriptive study. *Histol Histopathol.* 2006 Dec;21(12):1321-9. PubMed

Imagens enviadas pelo autor. (Images sent by the author)

Distribuição absoluta e relativa da positividade para anticorpo anti-Hsp27

Expressão de Hsp27 para tecido mamário e linfonodo sentinela para os três grupos por análise quantitativa*

*valores em mm²

§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

¥: Teste de Mann Whitney

Resultados da análise quantitativa da expressão de Ki-67 no tecido mamário entre os diferentes grupos estudados*

*valores em um²

§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

Análise quantitativa da expressão de caspase 3 nos tecidos mamários*

Expressão de positividade					
Tecido	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
Tecido Mamário	TUMOR+LFN+	25	2389,5 _{2a}	1094,0	0,134§
	TUMOR+LFN-	25	1945,3 _b	1579,2	
	Controle	25	2299,7 _a	1354,6	

 * valores em um2

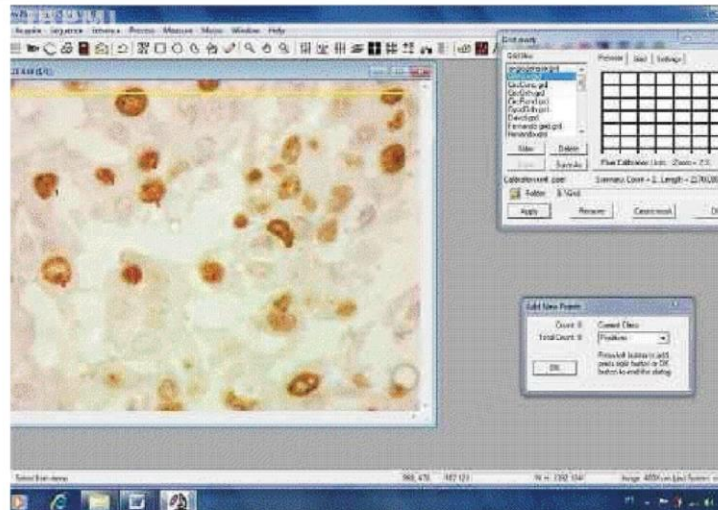
§: Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

Avaliação da razão entre proliferação celular por Ki-67 (proliferação celular) e caspase 3 (apoptose) nos tecidos mamários.

Expressão de positividade					
Tecido	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
Tecido Mamário	TUMOR+LFN+	25	0,3051 _a	0,1914	0,0301§
	Controle	25	0,0463 _b	0,0304	
	TUMOR+LFN-	25	0,2858 _a	0,1896	0,0441§
	Controle	25	0,0455 _b	0,0297	
	TUMOR+LFN+	25	0,2799	0,2030	0,9950§
	TUMOR+LFN-	25		0,1865	

§Teste de Kruskal-Wallis – post Hoc Dunn, onde os valores seguidos de letras iguais não diferem a 5% de significância.

Imagem da tela do programa Image Pro Plus 6.0 com arquivo com células marcadas em marrom com o anticorpo Ki-67



Cada campo teve o número de células e a área corada contados. Corante DAB, 400X.