

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA

EXPRESSÃO DE HSP70 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES  
DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM  
CARCINOMA DE MAMA COM E SEM METÁSTASES  
AXILARES

LETTÍCIA RODRIGUES DE ALMEIDA MAURIQUE

PORTO ALEGRE

2010

---

**LETTÍCIA RODRIGUES DE ALMEIDA MAURIQUE**

**EXPRESSÃO DE HSP70 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE  
EM CARCINOMA DE MAMA COM E SEM METÁSTASES AXILARES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

**Orientador**

**Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva**

**Co-orientadores**

**Prof. Dr. Bernardo Garicochea**

**Profa. Dra. Cristina Bonorino**

**PORTO ALEGRE**

**2010**

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

M455e Maurique, Lettícia Rodrigues de Almeida

Expressão de HSP70 e razão entre os índices de proliferação celular e apoptose em carcinoma de mama com e sem metástases axilares / Lettícia Rodrigues de Almeida Maurique. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

68 f.: fig. tab.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Coorientadores: Cristina Bonorino

Bernardo Garicochea

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Clínica Médica.

Rosaria Maria Lúcia Prena Geremia

Bibliotecária CRB 10/196

---

## Pesquisadores

Leticia Rodrigues de Almeida Maurique

Endereço: Rua Esteves Júnior, 574 apto 105

Centro - Florianópolis

Tel.: (48) 32074679 - 91250051

e-mail: [letticialmeida@yahoo.com.br](mailto:letticialmeida@yahoo.com.br)

João Guilherme Schütz Maurique

Endereço: Rua Esteves Júnior, 574 apto 105

Centro - Florianópolis

Tel.: (48) 32074679 - 84555548

e-mail: [joaomaurique@yahoo.com.br](mailto:joaomaurique@yahoo.com.br)

Cristina Bonorino

Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

Endereço: Av. Ipiranga, 6690

Jardim Botânico - Porto Alegre

Departamento de Imunologia

Tel.: (51) 33203000 – ramal: 2527

e-mail: [cbonorino@pucrs.br](mailto:cbonorino@pucrs.br)

Bernardo Garicochea

Endereço: Av. Ipiranga, 6690

Jardim Botânico - Porto Alegre

Departamento de Oncologia

Tel.: (51) 33203000 – ramal 3145

e-mail: [bgaricochea@terra.com.br](mailto:bgaricochea@terra.com.br)

---

Vinícius Duval da Silva

Laboratório de Patologia - Hospital São Lucas da PUCRS

Endereço: Av. Ipiranga, 6690

Jardim Botânico - Porto Alegre

Tel.: (51) 33203000 – ramal: 3220

e-mail: [vinids@pucrs.br](mailto:vinids@pucrs.br)

**Local de origem**

Departamento de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde da PUCRS

Endereço: Av. Ipiranga, 6690

Jardim Botânico / Porto Alegre

Tel.: 33203318

**Local onde foi realizado o projeto**

Hospital São Lucas da PUCRS

Endereço: Av. Ipiranga, 6690

Jardim Botânico - Porto Alegre

Departamento de Patologia

Tel.: 33203000 – ramal: 3220

Instituição que possui meios diagnósticos em histologia e imunohistoquímica.

---

*Aos meus pais Luiz Fernando e Santa Luzia, a quem eu devo toda a minha educação e minhas conquistas. Obrigada pelo amor incondicional e por ensinar-me a nunca desistir dos meus sonhos. Esta conquista, mais do que minha, também é de vocês.*

*Agradeço a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos que sempre batalharam pela realização dos meus sonhos.*

*Aos meus sogros Sebastião e Clarice pelo apoio nos momentos mais difíceis que passei ao longo destes dois anos. Os ensinamentos de luta e perseverança sempre ficarão em minha memória.*

*Ao meu marido, João Guilherme, pela paciência, pelo incansável apoio e dedicação neste trabalho, pelo amor que me proporciona dia após dia e pela presença em todos os momentos, tornando minha vida muito mais feliz. Agradeço a ele por muitas vezes abdicar dos próprios sonhos em prol dos meus...*

*És meu maior incentivador e compartilho contigo esta vitória.*

*Amor, com certeza tu és o melhor acontecimento de minha vida. Te amo!*

*Amo vocês.*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Vinicius Duval da Silva**, pela contribuição para a realização deste projeto e por proporcionar-me a oportunidade de conquistar este título.

Aos meus co-orientadores, **Professor Dr. Bernardo Garicochea e Professora Dra. Cristina Bonorino**, por apoiarem a elaboração e realização deste projeto.

Ao **Professor Hélio Radke Bittencourt**, pela colaboração imprescindível dos dados estatísticos.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura.

Ao **CNPq**, pela bolsa concedida e pelo incentivo à pesquisa.

À equipe do **Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS**, onde encontrei pessoas que me ajudaram e me apoiaram neste trabalho, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao **Tiago Giulianni**, técnico em histologia, por parte dos procedimentos histológicos.

À minha colega de pós-graduação e amiga **Alessandra Sebben**, que me ajudou nos momentos de dificuldade.

Ao professor **Eraldo Batista**, pela disposição em analisar meus dados estatísticos.

Às **pacientes** anônimas que contribuíram com seus dados. Sem elas este trabalho não se concretizaria.

---

*Não é o mais forte que sobrevive, nem o  
mais inteligente, mas o que melhor se  
adapta às mudanças.*

*Charles Darwin*



---

## RESUMO

**Objetivos:** Investigar a expressão de Hsp70 e a razão entre proliferação celular e apoptose através da expressão imunohistoquímica de Caspase-3 e Ki-67 nas amostras teciduais de mulheres com carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase linfonodal, tratadas em um hospital terciário de ensino, em comparação com amostras de pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística no tecido mamário.

**Materiais e Métodos:** Realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados para o presente trabalho 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase axilar, 25 pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase axilar e 10 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama, que neste trabalho serviram como grupo controle. Através de técnicas de imunohistoquímica, foram avaliadas as expressões de Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 e calculada a razão entre a taxa de proliferação celular e apoptose dos grupos estudados.

**Resultados:** A análise de Hsp70 mostrou diferença significativa no tecido linfonodal entre as pacientes com câncer de mama, estando sua expressão aumentada no tecido sem presença de metástase tumoral. Ao avaliarmos a proliferação celular através do marcador Ki-67, evidenciamos diferença significativa entre os três grupos estudados. No tecido mamário e linfonodal das pacientes sem metástase axilar evidenciamos um maior percentual de positividade para Caspase-3. A mensuração da razão entre proliferação celular e apoptose mostrou diferença significativa somente ao compararmos os grupos com carcinoma ductal invasor de mama ao grupo controle. Entretanto a razão não difere entre os grupos com diagnóstico de câncer de mama.

**Conclusão:** Os dados sobre a positividade de Hsp70 no tecido linfonodal sugerem que essa proteína pode estar associada a uma proteção local contra a proliferação tumoral nessas áreas. Por outro lado, a razão entre proliferação celular e apoptose não deve ser usada como indicador de prognóstico da doença até o momento.

**Palavras-chave:** Hsp70; caspase-3; Ki-67; câncer de mama; proliferação celular; apoptose.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** Investigate the expression of Hsp70 and the relation between cellular proliferation and apoptosis from immunohistochemical index of Caspase-3 and Ki-67 in tecidual samples of women with invasive ductal carcinoma with and without presence of linfonodal metastasis, treated on a school hospital, in comparison with breast tissue samples of patients with diagnosis of mammary fibrocystic variation treated at the same hospital.

**Material and Methods:** Performed a transversal study, being arranged 25 patients with diagnosis of invasive ductal carcinoma of the breast with presence of axilar linfonodal metastasis, 25 patients with invasive ductal carcinoma of the breast without presence of linfonodal metastasis and 10 patients with diagnosis of mammary fibrocystic variation, wich became our control group. Using immunohistochemical techniches, we observed the expression of Hsp70, Caspase-3 and Ki-67 and the relation between cellular proliferation rate and apoptosis in the studied groups.

**Results:** The annalysis of Hsp70 showed significant diference in the linfonodal tissue among patients with diagnosis of breast cancer, and its expression was higher at the group without presence of linfonodal involvement. As we evaluated cellular proliferation rate by using expression of Ki-67, we noticed significant difference between the three groups studied. At the breast and linfonodal tissues from patients without axilar involvement, we noticed a higher level of positivity for Caspase-3. The relation between cellular proliferation rate and apoptosis showed significant difference only as we compare groups with invasive ductal breast cancer from control patients. On the other hand, this relation does not show any difference among the groups with diagnosis of breast cancer.

**Conclusion:** The data about Hsp70 posititivity in the linfonodal tissue suggest that this protein may be associated with a local protection against breast cancer at those areas. The relation between cellular proliferation rate and apoptosis should not be used as an indicator of patient's prognosis at this time.

**Keywords:** Hsp70; Caspase-3; Ki-67; breast cancer; cell proliferation; apoptosis.

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem histológica de Ki-67 sob análise e contagem das células no programa Image Pro-Plus 6.0. .... 29
- Figura 2** - Gráfico representando a expressão de receptores hormonais em pacientes com carcinoma ductal invasor. .... 33
- Figura 3** - Gráfico representando a positividade para Her-2 em pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama. .... 33

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios de Nottingham. ....	25
<b>Tabela 2</b> - Escore de ALLRED.....	25
<b>Tabela 3</b> - Escore de Her-2.....	26
<b>Tabela 4</b> - Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica. ....	28
<b>Tabela 5</b> - Divisão dos grupos.....	31
<b>Tabela 6</b> - Lateralidade por grupo. ....	32
<b>Tabela 7</b> - Estatísticas descritivas para idade.....	32
<b>Tabela 8</b> - Resultados da ANOVA paramétrica e não-paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparação entre grupos. ....	34
<b>Tabela 9</b> - Teste t de student e Mann-Withney para comparação entre os grupos com carcinoma ductal invasor com e sem metástase em linfonodos axililares. ....	35
<b>Tabela 10</b> - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose entre os grupos .....	35
<b>Tabela 11</b> - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose no tecido mamário por pareamento. ....	36

---

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>13</b>
1.1 As proteínas de choque térmico em tumores .....	18
1.2 Hsp70 e a resposta imune antitumoral .....	18
1.3 Apoptose e expressão de Caspase-3 .....	19
1.4 Proliferação celular e a proteína Ki-67 .....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
2.1 Objetivo geral .....	22
2.2 Objetivos secundários .....	22
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>23</b>
3.1 Delineamento do estudo.....	23
3.2 Aspectos éticos .....	23
3.3 Seleção das pacientes .....	23
3.4 Gradação do tumor .....	24
3.5 Receptores hormonais (estrógeno e progesterona).....	25
3.6 Análise do Her-2.....	26
3.7 Confeção das lâminas histológicas.....	26
3.8 Teste de imunistoquímica .....	26
3.9 Análise das imagens .....	28
3.10 Análise estatística .....	29
<b>4. Resultados</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>41</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	<b>43</b>
<b>8. Apêndices</b> .....	<b>47</b>

---

## 1. Introdução

O conhecimento dos fatores que influenciam o diagnóstico, o tratamento e a evolução do câncer de mama tem atraído a atenção de vários estudos, já que se trata da neoplasia maligna mais comum entre as mulheres nos países desenvolvidos. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, também é a neoplasia maligna mais freqüente, seguido do câncer do colo uterino e de cólon/reto, sendo estes numa incidência de duas e quatro vezes menores, respectivamente.

Além da alta incidência no Brasil, o câncer de mama é também a primeira causa de óbito por câncer em mulheres, com um coeficiente de mortalidade padronizado por idade, mostrando tendência ascendente ao longo dos anos. O prognóstico do câncer de mama é relativamente bom, se diagnosticado nos estadios iniciais. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de aproximadamente 61%. Em nosso meio, infelizmente, a taxa de mortalidade é alta, principalmente pelo elevado número de casos avançados.

Antes dos 35 anos, o diagnóstico do câncer de mama é raro, mas acima desta faixa etária, sua incidência cresce rápida e progressivamente. Sabe-se que essa neoplasia apresenta uma incidência maior acima dos 65 anos, com aproximadamente 48% dos casos de câncer de mama ocorrendo nessas mulheres, e mais de 30% ocorrendo em mulheres com idade superior a 70 anos.

A evolução do câncer de mama, após o diagnóstico, atrai a atenção de vários pesquisadores na tentativa de encontrar os fatores relacionados ao prognóstico, que na prática clínica auxiliariam tanto na escolha do tratamento adequado para cada paciente, quanto na predição de possíveis recidivas. Um fator prognóstico poderia ser definido como um parâmetro possível de ser mensurado no momento do diagnóstico e que serviria como preditor da sobrevivência ou do tempo livre de doença. Os fatores prognósticos são importantes no tratamento do câncer de mama para a identificação de subgrupos de pacientes que se beneficiariam com as terapêuticas mais agressivas, evitando nas pacientes que têm um bom prognóstico, o

---

tratamento sistêmico complementar com quimioterapia e radioterapia (Eisenberg e Koifmann, 2000; Elston e Ellis, 1991; Cianfrocca e Goldstein, 2004).

Foram classificados os potenciais fatores prognósticos para o câncer de mama em quatro grupos, aos quais foram denominados gerações. Na primeira geração, estão agrupados os assim chamados fatores anatômicos (o tamanho do tumor, o comprometimento dos linfonodos, os subtipos histológicos) e a idade; na segunda geração, estão incluídos aqueles indicando características patológicas quantitativas (o grau histológico, a necrose tumoral, a ploidia, o índice mitótico) e a responsividade endócrina (receptores de estrogênio e de progesterona); na terceira geração, estão incluídos os fatores moleculares específicos reguladores de crescimento (amplificadores de oncogenes e supressores de genes); e, finalmente, na quarta geração, são incluídos os preditores de metástases específicos para os diferentes órgãos (micrometástases em medula óssea, polimorfismo de L-myc, vimentin, etc). Os fatores apresentados como de terceira e quarta gerações ainda se apresentam como grandes promessas, estando ainda hoje sua utilização restrita basicamente a estudos experimentais, que buscam vencer este desafio que é o desenvolvimento de marcadores prognósticos definitivos para o câncer de mama feminino (Dhingra e Hortobagyi, 1996).

A condição dos linfonodos axilares, no momento do diagnóstico, apresenta como característica ser tempo dependente, sendo, portanto, limitado e não suficiente para prognosticar a evolução do câncer de mama (Eisenberg, 2004). Entretanto, apesar de não suficiente para prognosticar de forma completa a evolução do câncer de mama, trata-se ainda hoje do mais forte fator prognóstico do câncer de mama inicial.

Com relação ao tipo histológico, os carcinomas infiltrativos ductais e lobulares, tanto em sua forma pura ou combinada a outros tipos de tumor, são as formas mais comuns de câncer de mama. A prevalência do carcinoma ductal invasivo varia de 50-75% e, a do lobular invasivo, de 5-15% de todos os carcinomas invasivos da mama, dependendo dos critérios diagnósticos utilizados pelos patologistas, bem como dos diagnósticos das formas puras e associadas. Pacientes com tumores ductais infiltrativos geralmente apresentam maior incidência de linfonodos axilares positivos e piores prognósticos clínicos que as pacientes com

---

tipos de tumores infiltrativos menos comuns (Albain, Allred *et al.*, 1994).

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. Um exemplo de fator preditivo é o estado do receptor de estrogênio (RE) no tumor, que prevê a resposta à terapia hormonal (Clark, 2002).

Desde que foi demonstrado que o crescimento do carcinoma de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos do mesmo, em tumores mamários, é comprovada quando se realiza a terapia ablativa desse hormônio, produzindo-se remissão clínica em pacientes com câncer de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto que os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis do mesmo (Fisher, Dignam *et al.*, 2001; Eisenberg, 2001).

Cerca de dois terços dos cânceres de mama expressam a proteína receptora para hormônios, sendo, então, considerados positivos para receptores hormonais (RH). O valor prognóstico dos receptores hormonais é maior nas mulheres pós-menopausadas. As pacientes com tumores positivos para receptor de progesterona 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 uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal (Eisenberg, 2001).

Aproximadamente 25% das pacientes com câncer de mama expressam c-erbB-2 (também conhecida como Her-2 ou Her-2/neu). O gene c-erbB-2 codifica uma proteína da membrana celular expressa em praticamente todas as células epiteliais, e pertence à mesma família do receptor do fator de crescimento epidérmico. Slamon e cols. foram os primeiros a ligar a superexpressão do Her-2 com o mau prognóstico no câncer de mama. Eles estudaram a associação entre a amplificação do gene Her-2 com a recorrência e morte em pacientes com axila positiva e demonstraram que a amplificação do Her-2 estava significativamente associada com a taxa de recorrência e com a diminuição da sobrevida. Convém frisar que essas



---

correlações são independentes de outros fatores prognósticos e tão significativas quanto o estado da axila, para recorrência e morte (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989).

É fundamental comentar aqui que esse receptor é amplificado e superexpresso (como medido pela análise imunistoquímica) em até 30% dos casos de câncer invasor e correlaciona-se com um pior prognóstico (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989; Gottardi *et al.*, 1992). Entretanto, é necessário lembrar que o papel biológico exato desta sinalização na rota oncogênica na mama não está bem definido e pode estar relacionado a um grande número de aspectos fenotípicos do câncer. Inclui-se, aqui, a progressão da hormônio-dependência e a sua perda, a sua habilidade metastática e a sua resistência a drogas (van de Vijver *et al.*, 1988). O Her-2 é superexpresso em aproximadamente 20% a 30% dos tumores de mama invasores de alto grau. Tem sido, portanto, um indicador prognóstico valioso (Al-Moundhri *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004).

O estado do Her-2 também prediz a resposta antiestrogênica e à quimioterapia citotóxica, sendo que os pacientes com forte expressão de Her-2 parecem ter uma pobre resposta aos agentes hormonais como o tamoxifeno e também aos quimioterápicos não-antracíclicos (Al-Moundhri *et al.*, 2003).

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 do mesmo. As diferentes mutações conferem diversas vantagens seletivas para as células tumorais, permitindo seu crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000).

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 o 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 objetivando uma resposta imune anti-tumoral eficiente a fim de eliminar o tumor. Diferentes tipos de vacinas vêm sendo testadas, incluindo a utilização de células tumorais inteiras (Eaton, Perry *et al.*, 2002), de antígenos tumorais na forma de peptídeos (Rosenberg, 1998), proteína ou inseridos em vetores (Rosenberg, 1999) e células dendríticas pulsadas com antígenos tumorais (Engleman, 2003). Outra estratégia de vacinação é o uso de proteínas de choque de calor (*heat shock proteins* (Hsp)) purificadas das células tumorais dos pacientes, objetivando a apresentação de antígenos tumorais e geração de resposta imune específica, vez que foi demonstrado que estas proteínas podem carregar antígenos tumorais (Srivastava, 2005). Além disso, imunoterapias como a transferência adotiva de células T ativadas em pacientes com câncer (Dudley, Wunderlich *et al.*, 2002) e uso de anticorpos humanizados específicos contra antígenos tumorais vem sendo utilizadas (Bargou, Leo *et al.*, 2008).

Estas diferentes estratégias têm demonstrado que é possível gerar resposta imune antitumoral nos pacientes, entretanto a eficácia destas novas terapias ainda não está atingindo os parâmetros esperados. Diversos fatores podem ser responsáveis pela baixa eficiência, mas principalmente o que ocorre é uma tolerização da resposta imune devido à presença do tumor (Rabinovich, Gabrilovich *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que a imunoterapia contra tumores pode ser muito promissora, entretanto 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.

No presente trabalho estudamos fatores importantes relacionados com a interação entre o sistema imune e o câncer que podem fornecer dados na terapia anti-tumoral. Assim, avaliamos a expressão de proteínas importantes do ciclo tumoral, mais particularmente a proteína de choque de calor Hsp70, a Caspase-3 e o Ki-67, em tecidos de pacientes com câncer de mama com e sem presença de metástase em linfonodos axilares em comparação com um grupo de pacientes com alteração fibrocística da mama, com posterior cálculo entre os índices de proliferação celular e apoptose na população estudada.

---

## 1.1 As proteínas de choque térmico em tumores

As proteínas de choque térmico ou estresse (Hsps) foram primeiramente descritas em 1962 (Ritossa, 1962) e são um grupo de proteínas altamente conservadas, induzidas por estresses celulares como o calor e radiação ionizante, sendo distribuídas de forma ubíqua entre organismos procarióticos e eucarióticos. As Hsps de mamíferos podem ser classificadas em 5 principais famílias de acordo com seu peso molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e sHsp (*small heat shock proteins*) e estão presentes no citosol, membrana, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria da célula (Jolly e Morimoto, 2000). Cada família é composta por membros expressos constitutivamente e outros induzidos. Funcionam principalmente como chaperonas moleculares, transportando proteínas entre compartimentos celulares, ajudando no dobramento de proteínas que estão sendo formadas ou no redobramento de proteínas que sofreram danos, protegendo a agregação de outras proteínas, além de direcionar proteínas a rotas de degradação e auxiliar na dissolução de complexos protéicos (Jaattela, 1999b).

## 1.2 Hsp70 e a resposta imune antitumoral

A família Hsp70 é a mais conservada e a melhor estudada entre as outras famílias (Garrido, Gurbuxani *et al.*, 2001; Daugaard, Jaattela *et al.*, 2005). A expressão da Hsp70 é regulada pelo fator de transcrição HSF1 (*heat shock factor 1*), e é induzida nas células expostas ao calor e a uma variedade de outros estímulos estressantes, como espécies reativas de oxigênio, infecção, inflamação, hipóxia e drogas anti-tumorais (Morimoto, 1998).

Níveis elevados de expressão de Hsp70 têm sido amplamente descritos em câncer de mama, cólon de útero, renal, endometrial, osteosarcoma, bem como em várias leucemias (Jaattela, 1999a; Helmbrecht, Zeise *et al.*, 2000; Jolly e Morimoto, 2000; Torronteguy, Frasson *et al.*, 2006). A vantagem seletiva de sobrevivência que esta proteína fornece, contribui para o processo de formação do tumor (Calderwood, Khaleque *et al.*, 2006).

A Hsp70 citoplasmática é uma proteína anti-apoptótica, atuando em diversos pontos, que pode bloquear os estágios pré-mitocondriais, mitocondriais e pós-mitocondriais da cascata apoptótica (Jaattela, Wissing *et al.*, 1992; Mosser, Caron *et al.*, 1997). Em modelos murinos,

---

altas concentrações da Hsp70 aumentam o potencial oncogênico de linhagem celulares cancerosas (Jaattela, 1995), do mesmo modo que a regulação negativa de Hsp70 diminui a oncogênese (Nylandsted, Rohde *et al.*, 2000; Gurbuxani, Bruey *et al.*, 2001). Entretanto, quando a Hsp70 encontra-se fora da célula tumoral ou na sua superfície, pode apresentar um efeito modulador da resposta imune antitumoral. A Hsp70 facilita a aquisição de antígenos tumorais pelas células dendríticas, facilitando a apresentação e processamento de antígenos pela via de MHC I, levando a indução de resposta de células T CD8 tumor específica (Arnold-Schild, Hanau *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que Hsp70 quando presente na membrana das células tumorais pode ativar células NK (Gastpar, Gehrmann *et al.*, 2005).

### 1.3 Apoptose e expressão de Caspase-3

A apoptose e a proliferação celular possuem uma participação importante na tumorigênese, determinando o crescimento tumoral e conseqüentemente sua agressividade. A apoptose é a via de morte celular que é induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. Sabe-se atualmente que existem múltiplos e variados mecanismos de morte celular, sendo que alguns requerem a presença de Caspase-3 (Strasser, O'Connor *et al.*, 2000), convergindo para eventos comuns que incluem achatamento, condensação da cromatina e fragmentação do DNA. Como se considera que a presença de muita ou pouca apoptose representa a base de várias doenças, tais como as doenças degenerativas e o câncer, existe um grande interesse em se elucidar os mecanismos desse tipo de morte celular.

O processo celular de apoptose envolve determinadas proteases, chamadas de caspases, que são ativadas pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem a apoptose. Essas proteases ativas clivam proteínas chaves nas células e as matam rápida e ordenadamente. A regulação deste processo é tão complexa quanto a regulação do crescimento celular e acompanham um grupo de alterações bioquímicas e morfológicas características, com alterações celulares (Vaux, 1999).

---

Assim, a família das caspases possui uma participação importante no processo de apoptose celular. Atualmente contando com mais de dez membros, pode ser dividida funcionalmente em dois grupos básicos, iniciadoras e efetoras, dependendo da ordem em que são ativadas durante a apoptose.

A Caspase-3 é uma caspase efetora que vem sendo foco de muito estudo, tornando-se peça chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos, e representa um bom marcador de apoptose celular. A marcação da Caspase-3 pode ainda ser usada no controle da resposta aos tratamentos quimioterápicos quanto à possível resistência da droga, onde a diminuição da expressão pode indicar um mecanismo importante de sobrevivência celular em pacientes com câncer de mama (De Jong, Van Diest *et al.*, 2000).

#### **1.4 Proliferação celular e a proteína Ki-67**

O Ki-67 é uma proteína não-histona encontrada principalmente no córtex do núcleo celular e nos componentes fibrilares densos do nucléolo durante a interfase. Durante a mitose ela se encontra principalmente na periferia dos cromossomos condensados. A expressão de Ki-67 varia através das diferentes fases do ciclo celular, sendo que essa proteína não é expressa nas células na fase G<sub>0</sub>, mas pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e mitose) (Beresford, Wilson *et al.*, 2006). Dessa forma, é um excelente marcador de replicação tumoral, sendo extremamente útil para determinar a fração em crescimento de uma dada população celular (Isolan, Filho *et al.*, 2005; Fitzgibbons *et al.*, 2000; Bouzubar *et al.*, 1989).

Inúmeros estudos tentam mostrar a relação entre o número de células de Ki-67 positivas e o bom ou mau prognóstico em relação ao câncer de mama, sendo descrito que sua expressão elevada representaria um fator de pior prognóstico. Um estudo mostrou que a relação entre a expressão de Ki-67 e o prognóstico é válida para o tumor primário, mas não para as metástases em linfonodos axilares, pois estas apresentam uma atividade mitótica diminuída em comparação com a lesão primária (Calascibetta, Cabidi *et al.*, 2006) e dados

---

recentes sugerem que um nível de Ki-67 acima de 10-14% define um grupo de alto risco em termos prognósticos (Yerushalmi, Woods *et al.*, 2010). Entretanto, os estudos até a presente data ainda não recomendam a adição do uso do Ki-67 aos testes prognósticos mais comumente utilizados (Yerushalmi, Woods *et al.*, 2010).

Sabe-se ainda que tecidos mamários sadios também podem expressar baixos níveis de Ki-67, geralmente abaixo de 3%. Uma correlação foi descrita entre a expressão de Ki-67 e a densidade mamária, bem como para lesões pré-cancerígenas (Zhou, Zhang *et al.*, 2008; Harvey, Santen *et al.*, 2008).

---

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a expressão de Hsp70 e a relação entre a taxa de proliferação celular e apoptose através da expressão imunohistoquímica de Caspase-3 e Ki-67 nas amostras teciduais de mulheres com carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase em linfonodos axilares, tratadas em um hospital terciário de ensino, em comparação com amostras de mama de pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística de mama tratadas no mesmo hospital.

Comparar os resultados aos da literatura internacional.

### **2.2 Objetivos secundários**

Revisar a literatura disponível sobre a relação entre Hsp70, Caspase-3, Ki-67 e câncer.

Avaliar os marcadores Her-2/neu, RE (receptor de estrógeno) e RP (receptor de progesterona) através de sua expressão imunohistoquímica nas biópsias de mulheres com carcinoma de mama com e sem metástase em linfonodos axilares tratadas em um hospital terciário de ensino, e comparar os resultados aos da literatura internacional.

---

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Delineamento do estudo**

Foi realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados para o presente trabalho casos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor com e sem presença de metástases em linfonodos axilares tratadas no Hospital São Lucas da Pucrs.

#### **3.2 Aspectos éticos**

O presente estudo está em conformidade com a resolução n°. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da Pucrs, pelo registro CEP 09/04948 conforme carta de aprovação em anexo. Não foi aplicado termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) à população deste estudo por tratar-se de um estudo retrospectivo de revisão de prontuário e lâminas, porém os preceitos de confidencialidade e confiabilidade foram observados.

#### **3.3 Seleção das pacientes**

As pacientes foram divididas da seguinte forma: 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 efeito de comparação, foi decidido pela seleção aleatória de 10 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama, que neste trabalho serviram como grupo controle.

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;



- 
- Alteração fibrocística como grupo controle.

Critérios de Exclusão:

- Pacientes que não possuem material disponível;
- Biópsia escassa;
- Pacientes com história conhecida de carcinoma de mama em familiar de primeiro grau e síndromes relacionadas a aumento de incidência de carcinoma de mama.

Foram analisados os dados dos prontuários das pacientes no que se refere a resultados da expressão de receptores de estrogênio e progesterona e presença de Her-2.

As expressões de Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 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.

### **3.4 Graduação do tumor**

Através da avaliação patológica das amostras de tumores de mama, foi possível fazer a graduação do tipo de células tumorais através dos critérios de Nottingham. Essa graduação é padronizada e utilizada em diversos países e é descrita na literatura internacional como potente indicador de prognóstico do câncer de mama. Os critérios de graduação de Nottingham baseiam-se na formação de túbulos, número de mitoses e pleomorfismos nucleares, onde a soma das três análises indicam o grau do tumor, conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de Nottingham

<b>Sistema de Graduação de Nottingham</b>	
<b>Formação Tubular</b>	
Maioria do Tumor (>75%)	1
Grau Moderado (10%-75%)	2
Pouca ou nenhuma (<10%)	3
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	
Núcleo pequeno, regular, uniforme	1
Moderado aumento no tamanho e variabilidade	2
Variação marcante, nucléolo presente	3
<b>Contagem Mitótica</b>	
Índice baixo 0-9 mitoses/10hpf	1
Índice moderado 10-19 mitoses/10hpf	2
Índice alto $\geq 20$ mitoses/10hpf	3
<b>Grau Histológico</b>	<b>Total</b>
Grau Baixo (I)	3-5
Grau Intermediário (II)	6-7
Grau Alto (III)	8-9

### 3.5 Receptores hormonais (estrogênio e progesterona)

Para a avaliação dos receptores hormonais, foi usado o sistema de escore proposto por ALLRED *et al.* que avalia a proporção de núcleos corados e intensidade da coloração, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Escore de ALLRED

<b>Escore ALLRED - Exame complementar para receptores hormonais</b>			
<b>Proporção do tecido neoplásico</b>		<b>Escore intensidade</b>	
Nenhum	0	Sem coloração	0
<1% núcleos marcados	1	Coloração fraca	1
1-10% núcleos marcados	2	Coloração moderada	2
22-33% núcleos marcados	3	Coloração forte	3
34-66% núcleos marcados	4		
67-100% núcleos marcados	5		
<b>Escore All Red<sup>2</sup>: 0 a 8 (proporção do tecido neoplásico + escore intensidade)</b>			

---

### 3.6 Análise do Her-2

A análise do Her-2 seguiu os critérios adotados pelo consenso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e Colégio Americano de Patologistas, onde são considerados a intensidade e o grau de coloração da membrana, conforme tabela 3.

Tabela 3 - Escore de Her-2

<b>Escore Her-2/neu - Exame complementar para Her-2/neu (c-erbB-2)</b>		
<b>Padrão de coloração</b>	<b>Escore</b>	<b>Interpretação</b>
Sem coloração de membrana celular ou coloração de 10% das células neoplásicas	0	Negativo
Coloração parcial e fraca de membrana celular em mais de 10% das células neoplásicas	1	Negativo
Coloração completa e fraca a moderada de membranas celulares em mais de 10% das células neoplásicas	2	Fracamente positivo
Coloração intensa e completa das membranas celulares em mais de 10% da população neoplásica	3	Fortemente positivo

### 3.7 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 retiradas do arquivo, e foram realizados cortes de 3µm de espessura obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Foi confeccionada uma lâmina histológica para cada marcador.

### 3.8 Teste de imunistoquímica

Após a execução das lâminas silanizadas contendo o corte do teste e um controle positivo (de acordo com o anticorpo em teste), as mesmas foram pré-tratadas com Histogrip (Zymed, USA) e levados à estufa com temperatura média entre 60°C por 24hs.

As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas por incubação em xileno por dez minutos por três vezes, sendo que a primeira imersão foi realizada com a cuba na estufa por cinco minutos e as seguintes em temperatura ambiente. As lâminas foram re-hidratadas em sequência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%,

---

80% e 70% durante três minutos cada, e após foram lavadas com água corrente até a eliminação completa do álcool, recebendo água destilada logo após.

Posteriormente, foram separadas em uma cuba frizada contendo tampão PBS, sendo feita a lavagem dessas lâminas com três trocas de tampão PBS e preparado os tampões para a recuperação antigênica através da indução por calor à alta temperatura sob pressão. As lâminas foram colocadas em cubas de Coplin, com tampão de recuperação Dako Target retrieval solution, pH 9,0 (Dako, USA), e foram colocadas em uma panela de pressão para microondas (NordicWare Microwave Tender Cooker/BioGenex, USA), com água destilada. Após a tampa estar completamente fechada e com a válvula colocada, foram realizados dois ciclos de quinze minutos em microondas, seguidos por vinte minutos no microondas (resfriando) e mais dez minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas com três trocas de tampão PBS pH 7,2, sendo realizado bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido a 3% em álcool metílico (metanol) por trinta minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas com três trocas de tampão PBS pH 7,2. Foi realizado bloqueio das ligações inespecíficas com a solução comercial Protein Block Serum-Free (Dako, USA), por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno-coloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) overnight em temperatura entre 2°C e 6°C e diluídos em solução de diluição (Antibody Diluent with background reducing components, Dako, USA) por trinta minutos em temperatura ambiente para os seguintes anticorpos presentes na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica

<b>Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação</b>				
<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante/País</b>	<b>Recuperação antigênica</b>
<b>RE</b>	1:250.	NCL-R-6F11	Novocastra, UK	Panela de pressão/citrato pH 6,0
<b>RP</b>	1:500.	NCL-PGR-312	Novocastra, UK	Panela de pressão/citrato pH 6,0
<b>Her2/neu</b>	1:200.	NCL-CB11	Novocastra, UK	Panela de pressão/citrato pH 6,0
<b>Ki-67</b>	1:250.	NCL-KI67-MM1	Novocastra, UK	Panela de pressão/citrato pH 6,0
<b>Caspase-3</b>	1:100.	3CSD01	NeoMarkers, EUA	Panela de pressão/citrato pH 6,0
<b>Hsp70</b>	1:200.	NCL-HSP70-8B11	Novocastra, UK	Panela de pressão/citrato pH 6,0

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por três passagens de tampão PBS, pH 7,2. Logo após foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado por trinta minutos. As lâminas foram então lavadas com duas trocas de tampão PBS e realizada incubação com o complexo avidina peroxidase por trinta minutos. Foi realizada mais uma lavagem com duas trocas de tampão PBS e prosseguido com incubação para revelação com diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) por cinco minutos. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e contra coradas com Hematoxilina de Harris por quinze segundos, lavadas em água corrente, mergulhadas em amônia 5% por quinze segundos e novamente lavadas em água corrente. Após, foram desidratadas em álcool etílico 99°, clareadas em xilol e montadas com meio sintético Entellan (Meck, Alemanha).

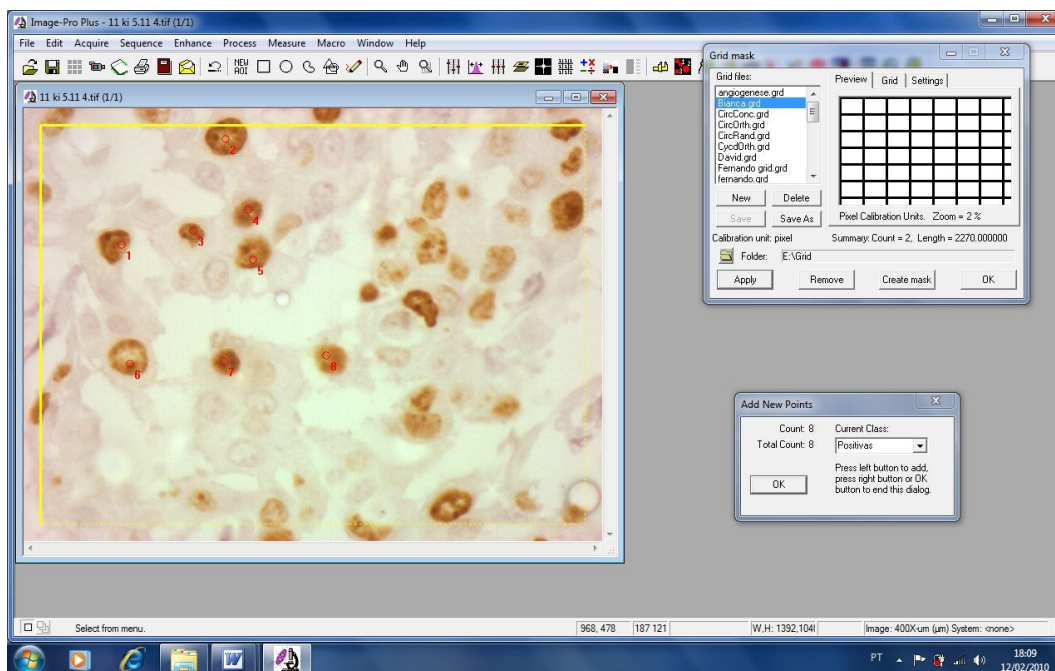
### 3.9 Análise das imagens

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com uma objetiva de 40X. Para captura das imagens utilizou-se a câmera CoolSNAP™- Pro cf (Media Cybernetics, Inc.) acoplada ao microscópio e a um computador, produzindo um aumento similar a uma objetiva de 10x. Com isso, as imagens resultantes passaram a ter um aumento de 400x. Cada imagem foi capturada sob luz normal, para posterior quantificação de células

com presença dos marcadores estudados.

Foram selecionados quatro campos por lâmina, representando toda área da amostra, sendo realizadas fotografias dos mesmos. Após o registro das imagens, essas foram analisadas através do software Image ProPlus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Inc.), o qual permitiu quantificar o percentual de positividade para cada marcador em determinada fotografia, conforme a figura 1 abaixo. Através de uma contagem do número de células positivas e negativas de cada campo, mensuramos o percentual de positividade na amostra, e posteriormente foi realizada a média de positividade dos quatro campos escolhidos em cada lâmina.

Figura 1 - Imagem histológica de Ki-67 sob análise e contagem das células no programa Image Pro-Plus 6.0



### 3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão para variáveis de distribuição normal. Para a comparação dos valores percentuais de cada marcador utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos três grupos e

---

teste t de Student seguido pelo teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos com diagnóstico de carcinoma de mama com e sem presença de metástase linfonodal. O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$  e  $\alpha=0,01$ , descrito ao lado de cada tabela.

---

#### 4. Resultados

Foram estudados 60 casos no total de pacientes tratadas no Hospital São Lucas da Pucrs, assim divididos: 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase em linfonodos axilares; 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase em linfonodos axilares; e 10 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama como grupo controle. A tabela 5 mostra a divisão das pacientes entre os grupos.

Tabela 5 - Divisão dos grupos

	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>	<b>Percentual Válido</b>	<b>Percentual Cumulativo</b>
<b>Mama + Linfonodo +</b>	25	41,7	41,7	41,7
<b>Mama + Linfonodo -</b>	25	41,7	41,7	83,3
<b>Controle</b>	10	16,7	16,7	100,0
<b>Total</b>	60	100,0	100,0	100,0

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 metástase linfonodal foi de 54,2 anos de idade, sendo que a paciente mais jovem apresentava 22 anos e a mais velha 76 anos de idade. 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 50,9 anos, variando entre 34 e 64 anos de idade. Esses dados mostram que não existiu discrepância nesses quesitos nos grupos estudados, mostrando equivalência entre os mesmos, e estão representados nas tabelas 6 e 7 a seguir.



Tabela 6 - Lateralidade por grupo

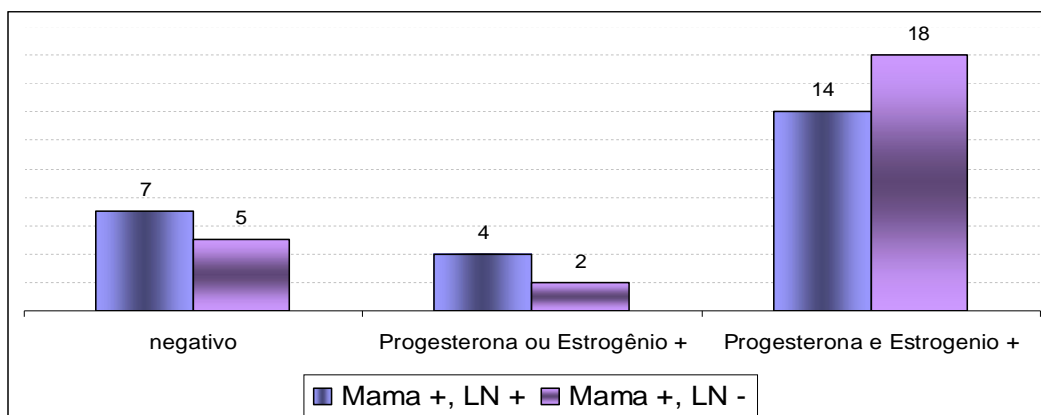
		Uni/Bilateral			Total
		Bilateral	Direita	Esquerda	
<b>Mama +</b>	<b>Contagem</b>	0	12	13	25
<b>Linfonodo +</b>	<b>% dentro do Grupo</b>	0%	48,0%	52,0%	100,0%
<b>Mama +</b>	<b>Contagem</b>	0	11	14	25
<b>Linfonodo -</b>	<b>% dentro do Grupo</b>	0%	44,0%	56,0%	100,0%
	<b>Contagem</b>	0	23	27	50
<b>Total</b>	<b>% dentro do Grupo</b>	0,0	46,0%	54,00%	100,0%

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para idade

		Intervalo Médio de Confiança							
		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Limite Inferior	Limite Superior	Mínimo	Máximo
<b>Mama +</b>	<b>Linfonodo +</b>	25	54,20	13,466	2,693	48,64	59,76	22	76
<b>Mama +</b>	<b>Linfonodo -</b>	25	55,88	13,890	2,778	50,15	61,61	30	81
	<b>Controle</b>	10	50,90	10,257	3,244	43,56	58,24	34	64
	<b>Total</b>	60	54,35	13,089	1,690	50,97	57,73	22	81

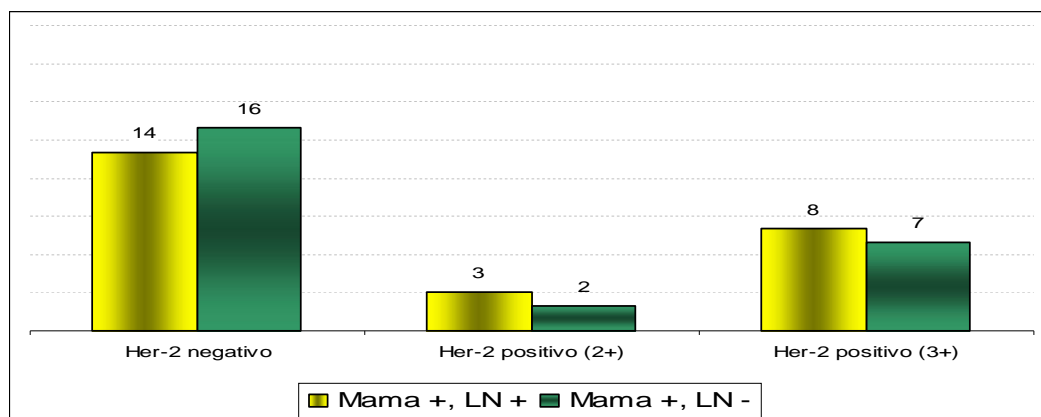
Prosseguimos com a avaliação da expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e de Her-2 nas amostras de tecido mamário dos grupos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama. Encontramos um maior número de positividade de receptores hormonais no grupo sem presença de metástase em linfonodos axilares, conforme a figura 2 abaixo.

Figura 2 - Expressão de receptores hormonais em pacientes com carcinoma ductal invasor



Na avaliação da presença da proteína de membrana Her-2, não visualizamos uma diferença significativa entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor no que se refere à expressão dessa proteína, conforme podemos observar na figura 3 abaixo.

Figura 3 - Positividade para Her-2 em pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama



Foi realizada a comparação entre os três grupos estudados para os marcadores Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 nas amostras de tecido mamário, tanto exemplificados como carcinoma ductal invasor de mama quanto por alteração fibrocística da mesma. A avaliação da proteína de choque térmico Hsp70 mostrou diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com um valor de p-value igual a 0,010. Na

avaliação da Caspase-3, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Ao avaliarmos a proliferação celular através da dosagem do marcador Ki-67, evidenciamos diferença significativa entre os grupos ao nível de 1%, com um valor de p-value igual a 0,000, tanto nos testes de ANOVA quanto de Kruskal-Wallis, conforme mostra a tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da ANOVA paramétrica e não-paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparação entre grupos

					<b>ANOVA</b>	<b>K-W</b>
	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor p</b>
<b>Hsp70</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,7140	0,3361	0,081	0,010*
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,7795	0,3056		
	<b>Controle</b>	10	0,9679	0,0793		
<b>Caspase-3</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,6599	0,4176	0,069	0,128
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,8835	0,2800		
	<b>Controle</b>	10	0,8378	0,2724		
<b>Ki-67</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,2262	0,1539	0,000**	0,000**
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,2588	0,1513		
	<b>Controle</b>	10	0,0408	0,0281		

\* Diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05)

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% (p<0,01)

Na avaliação entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase axilar, a análise do Hsp70 na mama não mostrou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, ao avaliarmos o mesmo marcador no linfonodo, encontramos uma diferença significativa ao nível de 1% nos testes t de Student e Mann-Whitney, com p-value de 0,003 e 0,002 respectivamente.

A mensuração da expressão de Caspase-3 apresentou um p-value igual a 0,031 no teste t de Student ao comparar o tecido mamário das pacientes com câncer de mama. Entretanto, nas amostras de linfonodos para o mesmo marcador, ambos os testes apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

Ao analisarmos o marcador de proliferação celular Ki-67 entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama, não encontramos diferença significativa em sua expressão tanto no tecido mamário quanto no tecido linfonodal. Estes dados estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Teste t de student e Mann-Withney para comparação entre os grupos com carcinoma ductal invasor com e sem metástase em linfonodos axilares

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	t de Student	Mann-Whitney
					Valor p	Valor p
Hsp70	Mama +, LN +	25	0,71	0,34	0,474	0,340
Mama	Mama +, LN -	25	0,78	0,31		
Hsp70	Mama +, LN +	25	0,48	0,41	0,003**	0,002**
Linfonodo	Mama +, LN -	25	0,80	0,29		
Caspase-3	Mama +, LN +	25	0,66	0,42	0,031*	0,053
Mama	Mama +, LN -	25	0,88	0,28		
Caspase-3	Mama +, LN +	25	0,67	0,40	0,000**	0,000**
Linfonodo	Mama +, LN -	25	1,00	0,01		
Ki-67	Mama +, LN +	25	0,23	0,15	0,454	0,497
Mama	Mama +, LN -	25	0,26	0,15		
Ki-67	Mama +, LN +	25	0,20	0,22	0,183	0,516
Linfonodo	Mama +, LN -	25	0,14	0,12		

\* Diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05)

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% (p<0,01)

Ao avaliarmos a razão entre proliferação celular e apoptose, não encontramos diferenças significativas nas amostras de tecido linfonodal. Contudo, encontramos diferenças significativas nas amostras de tecido mamário ao compararmos os três grupos estudados, com p-value de 0,0024, conforme ilustrado na tabela 10. Ao realizarmos o pareamento dos dados, não encontramos diferença significativa ao compararmos o tecido mamário do grupo com carcinoma ductal invasor de mama e metástase linfonodal (Mama+, LN+) ao grupo sem metástase linfonodal (Mama+, LN-), sendo a significância presente apenas ao compararmos os grupos de tumor ao grupo controle, como mostra a tabela 11.

Tabela 10 - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose entre os grupos

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	ANOVA
					Valor p
Ki-67/Caspase-3	Mama+, LN+	25	0,2712	0,2146	0,0024*
Mama	Mama+, LN-	25	0,2656	0,1668	
	Controle	10	0,0482	0,0261	
Ki-67/Caspase-3	Mama+, LN+	25	0,2642	0,3176	0,2083
Linfonodo	Mama+, LN-	25	0,1348	0,1147	

Tabela 11 - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose no tecido mamário por pareamento

	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>ANOVA Valor p</b>
<b>Ki-67/Caspase-3 Mama</b>	<b>Mama+, LN+</b>	25	0,2712	0,2146	0,0201*
	<b>Controle</b>	10	0,0482	0,0261	
<b>Ki-67/Caspase-3 Mama</b>	<b>Mama+, LN-</b>	25	0,2656	0,1668	0,0484*
	<b>Controle</b>	10	0,0482	0,0261	
<b>Ki-67/Caspase-3 Mama</b>	<b>Mama+, LN+</b>	25	0,2712	0,2146	0,9245
	<b>Mama+, LN-</b>	25	0,2656	0,1668	

---

## 5. Discussão

O câncer de mama representa, nos países ocidentais, umas das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento da freqüência desta neoplasia, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento. De acordo com dados da literatura, a probabilidade de se desenvolver câncer de mama aumenta com a idade, e embora apresente prevalência na pós-menopausa, a doença ocorre em praticamente todas as faixas etárias a partir da idade reprodutiva.

A história natural do câncer de mama ainda não é bem compreendida, já que seu comportamento evolutivo não se reproduz de maneira uniforme em todas as mulheres. Busca-se explicar esta divergência comportamental de alguns tumores que possuem as mesmas características clínicas, com os conhecimentos adquiridos através dos fatores prognósticos que envolvem o contexto geral do câncer de mama. Assim, têm-se além do diagnóstico da doença em si, aspectos de achados clínicos e biológicos que se associam às diferenças de tempo livre de doença e a sobrevida global.

O valor do estudo dos receptores de estrogênio e progesterona na previsão da resposta ao tratamento hormonal do câncer de mama avançado tem forte embasamento, sendo a expressão de receptores hormonais um fator mais preditivo de resposta ao tratamento hormonal do que propriamente fator prognóstico. Os receptores de estrogênio e progesterona estão altamente associados com a idade da paciente ao diagnóstico, sendo significativamente mais positivos nos tumores de mulheres na pós-menopausa. Os receptores hormonais não estão relacionados com a história familiar, paridade ou idade da menarca e a maioria dos tumores positivos para receptor de progesterona são também positivos para receptor de estrogênio.

Em nosso estudo, das 50 pacientes estudadas para a positividade de receptores hormonais, evidenciamos que 32 pacientes apresentavam positividade para ambos receptores hormonais. Somente 12 pacientes apresentavam negatividade para ambos receptores. Esses achados conferem aos da literatura estudada, onde dois terços dos cânceres de mama

---

apresentam positividade para receptores hormonais.

Consideramos a presença de Her-2 positivo como a expressão de escore 3, sendo que a presença de escore 2 necessita da realização de hibridização "in situ" com fluorescência (FISH) para determinação final da super-expressão de Her-2/neu. Em nosso estudo, encontramos uma positividade para Her-2 em 30% das pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama, condizendo com os achados da literatura que relatam uma expressão de Her-2 entre 25-30% nesses casos.

No câncer de mama a expressão de Hsp70 se correlaciona com o aumento da proliferação celular, pouca diferenciação, metástases linfonodais e piores prognósticos e resposta terapêutica. A alta expressão de Hsp70 em um tumor recém desenvolvido parece oferecer um melhor prognóstico ao paciente, enquanto um tumor em estágio avançado com baixo nível de Hsp70 deve ser correlacionado com um pior prognóstico. Isso sugere que a expressão de Hsp70 deve ser importante como um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Ao avaliarmos a proteína de choque térmico 70 no tecido mamário, encontramos uma super-expressão significativa nas células tumorais ao compararmos ao tecido sem presença de neoplasia, achados semelhantes aos da literatura. Ao compararmos a expressão de Hsp70 no tecido linfonodal, obtivemos uma diferença significativa quando comparamos o tecido com e sem presença de metástase, com maior expressão em pacientes sem envolvimento linfonodal. Isso sugere que a presença de Hsp70 no tecido linfonodal pode estar associada a uma proteção local contra a proliferação tumoral nessas áreas.

A apoptose pode ser considerada um marcador prognóstico favorável para indivíduos com neoplasia mamária, uma vez que a homeostase que controla a morte celular programada estabiliza o crescimento e impede a evolução tumoral. Por outro lado, durante o crescimento tumoral há um equilíbrio entre proliferação celular e apoptose. Dessa maneira, se a presença de um grande número de marcadores apoptóticos possuir grande correlação com a proliferação celular, o indivíduo apresentará um prognóstico menos favorável. Por isso, pode-

---

se deduzir que indivíduos com grande número de células marcadas pela apoptose possuem uma sobrevida menor.

Em alguns estudos a correlação entre índice apoptótico e proliferação celular se mostrou bastante positiva, principalmente em carcinomas mamários, indicando que a apoptose está diretamente relacionada à taxa de proliferação tumoral na tentativa de controlar seu crescimento. Quanto à Caspase-3, o alto número de células apoptóticas está relacionado a um prognóstico não favorável (Mommers *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002).

Neste estudo, o grupo com diagnóstico de carcinoma ductal invasor sem presença de envolvimento linfonodal apresentou maior positividade de Caspase-3 em ambos tecidos (mama e linfonodo) em comparação com o grupo com metástase axilar. Isso sugere que tumores com maior potencial teórico de agressividade estão associados a um nível mais reduzido de células apoptóticas. Isso é explicado devido ao fato que durante o crescimento tumoral há um balanço entre proliferação e a morte celular, onde o processo de apoptose está envolvido. Sendo assim, o alto número de células apoptóticas juntamente com um alto índice de proliferação celular representa um prognóstico não favorável.

Encontramos uma alta taxa de Ki-67 quando comparamos os tecidos tumorais com espécimes de alteração fibrocística de mama. Considerando-se que a alta expressão de Ki-67 está relacionada à proliferação celular, que é uma característica de malignidade, nossos resultados estão de acordo com a literatura investigada.

Existe correlação estatística entre alto número de células marcadas pela apoptose com a proliferação celular (González-Cámpora *et al.*, 2000; De Jong *et al.*, 2000). Quando comparamos o tecido mamário cancerígeno ao grupo controle, evidenciamos que o índice de proliferação celular sobre apoptose tem sua razão aumentada, indicando que as células tumorais estão sofrendo proliferação celular e bloqueando o processo de morte celular.

Entretanto, ao comparamos a razão de proliferação celular e apoptose entre os grupos com malignidade, não encontramos diferença significativa entre os mesmos.

Assim, ao analisarmos nossa amostra, concluímos que a razão entre proliferação



---

celular e apoptose não deve ser usada como indicador de prognóstico da doença até o momento, pois não evidenciamos diferença entre os grupos com e sem presença de metástase linfonodal.

---

## 6. Conclusão

Durante os últimos anos, houve uma mudança gradual na atitude que está, provavelmente, destinada a afetar profundamente a investigação do câncer. As informações que emergiram sobre a pesquisa do genoma e alta tecnologia são utilizadas para desenvolver avanços em termos de diagnóstico, prevenção e tratamento. Conseqüentemente, a abordagem tradicional clínico-patológica do estadiamento tumoral poderá ser combinada com resultados de expressão genética e protéica. Juntos, eles auxiliarão na identificação de assinaturas moleculares associadas ao prognóstico e resposta ao tratamento.

A identificação de fatores prognósticos preditivos é de fundamental importância na evolução dos protocolos terapêuticos. Uma terapia baseada em uma avaliação preditiva e prognóstica possibilita a aplicação de diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequada para aquele paciente específico.

Através da avaliação de marcadores tumorais por imunistoquímica podemos saber quais os pacientes serão prováveis beneficiários de uma determinada terapia além de eventualmente oferecer um prognóstico do comportamento tumoral.

Com base nos dados apresentados, é possível concluir que:

- Os resultados da análise dos receptores hormonais foram satisfatórios e obtiveram uma verossimilhança aos dados da literatura internacional vigente, onde dois terços dos carcinomas de mama apresentaram positividade para ambos receptores.
- Foi observado neste estudo 30% de positividade da proteína Her-2/neu nos casos de câncer de mama, condizendo com os dados da literatura.
- A proteína de choque térmico Hsp70 mostrou-se superexpressa nas células tumorais ao se comparar com o tecido controle neste estudo. Entretanto, encontramos uma positividade maior desta proteína nos linfonodos negativos em comparação com os linfonodos com presença de metástases tumorais, ambos de pacientes com carcinoma de mama. Esta

---

superexpressão em linfonodos negativos pode estar relacionada a uma forma de proteção local à disseminação tumoral.

- Na avaliação de Caspase-3, evidenciamos um aumento de expressão no grupo de carcinoma ductal invasor sem presença de envolvimento linfonodal ao compararmos com o grupo com metástase axilar. Isso sugere que tumores mais agressivos estão associados à diminuição do índice apoptótico.

- A proliferação celular, representada pela expressão de Ki-67, apresentou altas taxas de positividade ao compararmos o tecido tumoral com os espécimes de alteração fibrocística de mama, evidenciando uma proliferação celular elevada no tecido tumoral em crescimento.

- O índice de proliferação celular sobre apoptose foi relativamente maior no tecido tumoral ao compararmos com o grupo controle, mostrando que as células tumorais estão afetando o balanço entre proliferação celular e apoptose. Podemos concluir que estas células estão em rápido crescimento, inibindo o processo de morte celular. Por outro lado, ao compararmos o índice de proliferação celular sobre apoptose entre os grupos com malignidade, não observamos uma diferença significativa, excluindo a possibilidade de se utilizar este índice como fator prognóstico do câncer de mama até o momento.

- Estudos subsequentes são necessários, no âmbito da imunologia dos tumores, para um melhor entendimento do comportamento tumoral e de suas diferentes vias de sinalização.

---

## 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.
- Al-Moundhri M, Nirmala V, *et al.* Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. Pathol Oncol Res, v.9, n.4, p. 226-31. 2003.
- Arnold-Schild D, Hanau D, *et al.* Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. J Immunol, v.162, n.7, Apr 1, p.3757-60. 1999.
- Bargou R, Leo E, *et al.* Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science, v.321, n.5891, Aug 15, p.974-77. 2008.
- Bouzubar N, *et al.* Immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. British Journal of Cancer, v.59, n.6, p.943-47. 1989.
- Bull SB, Ozcelik H, *et al.* The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. J Clin Oncol, v.22, n.1, p.86-96. 2004.
- Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr Opin Immunol, v.19, n.2, p.203-208. 2007.
- Calderwood SK, Khaleque MA, *et al.* Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem Sci, v.31, n.3, Mar, p.164-72. 2006.
- Cianfrocca M, Goldstein L. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. The Oncologist, v.9, n.6, p.606-16. 2004.
- Clark G. Fatores prognósticos e preditivos. In: Harris, J., editor. Doenças da Mama, 2 ed, Lippincott. p.587-620. 2002.
- Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. Hsp70-2 is Required for Tumor Cell Growth and Survival. Cell Cycle, v.4, p.877-80. 2005.
- De Jong, JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Number of apoptosis cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. British Journal of Cancer, v.82, n.2, p.368-73. 2000.
- Dhingra K, Hortobagyi G. Critical Evaluation of Prognostic Factors. Semin Oncol, v.23, n.4, p.436-45. 1996.
- Dudley ME, Wunderlich JR, *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science, v.298, n.5594, Oct 25, p.850-4. 2002.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol, v.6, n.11, p.836-848. 2006.

- 
- Eaton JD, Perry MJ, *et al.* Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. BJU Int, v.89, n.1, Jan, p.19-26. 2002.
- Eisenberg A, Koifmann S. Fatores prognósticos do câncer de mama. Rev Bras Mastol, v.10, n.2, p.75-87. 2000.
- Eisenberg A. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão da literatura). Rev Bras Cancerologia, v.47, n.4, p.377-88. 2001.
- 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.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology, v.19, n.5, p.403-10. 1991.
- Engleman EG. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. Semin Oncol, v.30, n.3 Suppl 8, Jun, p.23-9. 2003.
- Fisher B, J Dignam, *et al.* Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. Journal of the National Cancer Institute, v.93, n.2, p.112-20. 2001.
- Fitzgibbons PL, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, p.966-78. 2000.
- Garrido C, Gurbuxani S, *et al.* Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun, v.286, n.3, Aug 24, p.433-42. 2001.
- Gastpar R, Gehrman M, *et al.* Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. Cancer Res, v.65, n.12, Jun 15, p.5238-47. 2005.
- González-Cámpora R, *et al.* Apoptosis in breast carcinoma. Pathology Research Practice, v.196, n.3, p.167-74. 2000.
- Gottardi O, Tabiaddon D, *et al.* Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma. Pathologica, v.84, n.1094, Nov-Dec, p.15-22. 1992.
- Gurbuxani S, Bruey JM, *et al.* Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. Oncogene, v.20, n.51, Nov 8, p.7478-85. 2001.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, p.57-70. 2000.
- Helmbrecht K, Zeise E, *et al.* Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. Cell Prolif, v.33, n.6, Dec, p.341-65. 2000.

- 
- Isolan GR, Filho JMR, Isolan PM, *et al.* Neoplasias astrocíticas e correlação com as proteínas P53 mutada e Ki-67. Arquivos de Neuropsiquiatria, v.63, n.4, p.997-1004. 2005.
- Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med, v.31, p. 261-271. 1999.
- Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. Int J Cancer, v.60, n.5, Mar 3, p.689-93. 1995.
- Jaattela M, Wissing D, *et al.* Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. Embo J, v.11, n.10, Oct, p.3507-12. 1992.
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl Cancer Inst, v.92, p.1564-72. 2000.
- Mommers ECM, *et al.* Balance of cell proliferation and apoptosis in breast cancer carcinogenesis. Breast Cancer Research and Treatment, v.58, p.163-69. 1999.
- Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev, v.12, n.24, Dec 15, p.3788-96. 1998.
- Mosser DD, Caron AW, *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol, v.17, n.9, Sep, p.5317-27. 1997.
- Nylandsted J, Rohde M, *et al.* Selective Depletion of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Activates a Tumor-Specific Death Program That is Dependent of Caspases and Bypasses Bcl-2. Proc Natl Acad Sci USA, v.97, p.7871-76. 2000.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, *et al.* Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annu Rev Immunol, v.25, p.267-96. 2007.
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature and DNP in *Drosophila*. Experimentia, v.18, p.571-73. 1962.
- Rosenberg SA, Yang JC, *et al.* Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. Nat Med, v.4, n.3, Mar, p.321-7. 1998.
- Rosenberg SA, Zhai Y, *et al.* Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. J Natl Cancer Inst, v.90, n.24, Dec 16, p.1894-900. 1998.
- Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity, v.10, n.3, Mar, p.281-7. 1999.
- Slamon DJ, Clark GM, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, v. 235, n.4785, Jan, p.177-82. 1987.

---

Slamon DJ, Godolphin W, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science, v.244, n.4905, May, p.707-12. 1989.

Srivastava PK. Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. Curr Oncol Rep, v.7, n.2, Mar, p.104-8. 2005.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annual Review of Biochemistry, v.69, p.207. 2000.

Torrenteguy C, Frasson A, *et al.* Inducible heat shock protein 70 expression as a potential predictive marker of metastasis in breast tumors. Cell Stress Chaperones, v.11, n.1, Spring, p.34-43. 2006.

van de Vijver MJ, Mooi WJ, *et al.* Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. Oncogene, v.2, n.2, Feb, p.175-78. 1988.

Vaux DL. Caspases and apoptosis: biology and terminology. Cell Death Differentiation, v.6, p.493-94. 1999.

Zhao H, *et al.* Immunohistochemical expression of uPA, PAI-1, cathepsin D and apoptotic cells in ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer, v.9, p.118-26. 2002.

Yerushalmi R, Woods R, *et al.* Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. The Lancet Oncology, v. 11, Feb, p.174-83. 2010.

---

## 8. Apêndices

Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	48
Resumo da dissertação.....	49





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-138/10

Porto Alegre, 08 de fevereiro de 2010.

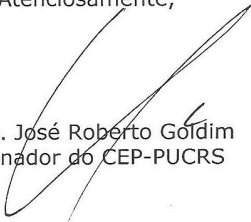
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04948 intitulado **“Expressão de Hsp70 e razão entre os índices de proliferação celular e apoptose em Carcinoma de Mama com e sem metástases axilares”**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. José Roberto Gódim  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.  
Dr. Vinicius Duval da Silva  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@puhrs.br](mailto:cep@puhrs.br)  
[www.puhrs.br/prppg/cep](http://www.puhrs.br/prppg/cep)

---

# EXPRESSÃO DE HSP70 E RAZÃO ENTRE OS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM CARCINOMA DE MAMA COM E SEM METÁSTASES AXILARES

Maurique, LRA<sup>1</sup>; Maurique, JGS<sup>2</sup>; Garicochea, B<sup>3</sup>; Bonorino, C<sup>4</sup>; Silva, VD<sup>5</sup>

1 Farmacêutica formada pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, possui Pós Graduação em Farmácia com ênfase em Oncologia realizado no Hospital Moinhos de Vento e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina da PUCRS.

2 Médico residente do serviço de Clínica Médica do Hospital Governador Celso Ramos.

3 Professor adjunto da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, médico chefe do serviço de oncologia clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

4 Professora adjunta da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, chefe do laboratório de imunologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

5 Professor adjunto da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, editor executivo Acta Medica, membro do corpo editorial do periódico Analytical and Quantitative Cytology and Histology, membro do corpo editorial internacional do periódico Cytojournal e médico patologista do Hospital São Lucas da PUCRS.

Endereço para correspondência:

Leticia Rodrigues de Almeida Maurique

Laboratório de Patologia

Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Av. Ipiranga, 6690, térreo. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000

Tel.: (51) 3320-3000

E-mail: [lepucrs@hotmail.com](mailto:lepucrs@hotmail.com)

---

## RESUMO

**Objetivos:** Investigar a expressão de Hsp70 e a razão entre proliferação celular e apoptose através da expressão imunohistoquímica de Caspase-3 e Ki-67 nas amostras teciduais de mulheres com carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase linfonodal, tratadas em um hospital terciário de ensino, em comparação com amostras de pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística no tecido mamário.

**Materiais e Métodos:** Realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados para o presente trabalho 25 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com presença de metástase axilar, 25 pacientes com carcinoma ductal invasor de mama sem presença de metástase axilar e 10 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama, que neste trabalho serviram como grupo controle. Através de técnicas de imunohistoquímica, foram avaliadas as expressões de Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 e calculada a razão entre a taxa de proliferação celular e apoptose dos grupos estudados.

**Resultados:** A análise de Hsp70 mostrou diferença significativa no tecido linfonodal entre as pacientes com câncer de mama, estando sua expressão aumentada no tecido sem presença de metástase tumoral. Ao avaliarmos a proliferação celular através do marcador Ki-67, evidenciamos diferença significativa entre os três grupos estudados. No tecido mamário e linfonodal das pacientes sem metástase axilar evidenciamos um maior percentual de positividade para Caspase-3. A mensuração da razão entre proliferação celular e apoptose mostrou diferença significativa somente ao compararmos os grupos com carcinoma ductal invasor de mama ao grupo controle. Entretanto a razão não difere entre os grupos com diagnóstico de câncer de mama.

**Conclusão:** Os dados sobre a positividade de Hsp70 no tecido linfonodal sugerem que essa proteína pode estar associada a uma proteção local contra a proliferação tumoral nessas áreas. Por outro lado, a razão entre proliferação celular e apoptose não deve ser usada como indicador de prognóstico da doença até o momento.

**Palavras-chave:** Hsp70; caspase-3; Ki-67; câncer de mama; proliferação celular; apoptose.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** Investigate the expression of Hsp70 and the relation between cellular proliferation and apoptosis from immunohistochemical index of Caspase-3 and Ki-67 in tecidual samples of women with invasive ductal carcinoma with and without presence of linfonodal metastasis, treated on a school hospital, in comparison with breast tissue samples of patients with diagnosis of mammary fibrocystic variation treated at the same hospital.

**Material and Methods:** Performed a transversal study, being arranged 25 patients with diagnosis of invasive ductal carcinoma of the breast with presence of axilar linfonodal metastasis, 25 patients with invasive ductal carcinoma of the breast without presence of linfonodal metastasis and 10 patients with diagnosis of mammary fibrocystic variation, wich became our control group. Using immunohistochemical techniches, we observed the expression of Hsp70, Caspase-3 and Ki-67 and the relation between cellular proliferation rate and apoptosis in the studied groups.

**Results:** The annalysis of Hsp70 showed significant diference in the linfonodal tissue among patients with diagnosis of breast cancer, and its expression was higher at the group without presence of linfonodal involvement. As we evaluated cellular proliferation rate by using expression of Ki-67, we noticed significant difference between the three groups studied. At the breast and linfonodal tissues from patients without axilar involvement, we noticed a higher level of positivity for Caspase-3. The relation between cellular proliferation rate and apoptosis showed significant difference only as we compare groups with invasive ductal breast cancer from control patients. On the other hand, this relation does not show any difference among the groups with diagnosis of breast cancer.

**Conclusion:** The data about Hsp70 posititivity in the linfonodal tissue suggest that this protein may be associated with a local protection against breast cancer at those areas. The relation between cellular proliferation rate and apoptosis should not be used as an indicator of patient's prognosis at this time.

**Keywords:** Hsp70; Caspase-3; Ki-67; breast cancer; cell proliferation; apoptosis.

---

## Introdução

O conhecimento dos fatores que influenciam o diagnóstico, o tratamento e a evolução do câncer de mama tem atraído a atenção de vários estudos, já que se trata da neoplasia maligna mais comum entre as mulheres nos países desenvolvidos. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, também é a neoplasia maligna mais freqüente, seguido do câncer do colo uterino e de cólon/reto, sendo estes numa incidência de duas e quatro vezes menores, respectivamente.

Além da alta incidência no Brasil, o câncer de mama é também a primeira causa de óbito por câncer em mulheres, com um coeficiente de mortalidade padronizado por idade, mostrando tendência ascendente ao longo dos anos. O prognóstico do câncer de mama é relativamente bom, se diagnosticado nos estádios iniciais. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de aproximadamente 61%. Em nosso meio, infelizmente, a taxa de mortalidade é alta, principalmente pelo elevado número de casos avançados.

A evolução do câncer de mama, após o diagnóstico, atrai a atenção de vários pesquisadores na tentativa de encontrar os fatores relacionados ao prognóstico, que na prática clínica auxiliariam tanto na escolha do tratamento adequado para cada paciente, quanto na predição de possíveis recidivas. Um fator prognóstico poderia ser definido como um parâmetro possível de ser mensurado no momento do diagnóstico e que serviria como preditor da sobrevivência ou do tempo livre de doença. Os fatores prognósticos são importantes no tratamento do câncer de mama para a identificação de subgrupos de pacientes que se beneficiariam com as terapêuticas mais agressivas, evitando nas pacientes que têm um bom prognóstico, o tratamento sistêmico complementar com quimioterapia e radioterapia (Eisenberg e Koifmann, 2000; Elston e Ellis, 1991; Cianfrocca e Goldstein, 2004).

Embora seja um importante fator prognóstico, a condição dos linfonodos axilares, no momento do diagnóstico, apresenta como característica ser tempo dependente, sendo, portanto, limitado e não suficiente para prognosticar a evolução do câncer de mama (Eisenberg, 2004).

---

Com relação ao tipo histológico, os carcinomas infiltrativos ductais e lobulares, tanto em sua forma pura ou combinada a outros tipos de tumor, são as formas mais comuns de câncer de mama. A prevalência do carcinoma ductal invasivo varia de 50-75% e, a do lobular invasivo, de 5-15% de todos os carcinomas invasivos da mama, dependendo dos critérios diagnósticos utilizados pelos patologistas, bem como dos diagnósticos das formas puras e associadas. Pacientes com tumores ductais infiltrativos geralmente apresentam maior incidência de linfonodos axilares positivos e piores prognósticos clínicos que as pacientes com tipos de tumores infiltrativos menos comuns (Albain, Allred *et al.*, 1994).

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. Um exemplo de fator preditivo é o estado do receptor de estrogênio (RE) no tumor, que prevê a resposta à terapia hormonal (Clark, 2002).

Desde que foi demonstrado que o crescimento do carcinoma de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos do mesmo, em tumores mamários, é comprovada quando se realiza a terapia ablativa desse hormônio, produzindo-se remissão clínica em pacientes com câncer de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto que os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis do mesmo (Fisher, Dignam *et al.*, 2001; Eisenberg, 2001).

Cerca de dois terços dos cânceres de mama expressam a proteína receptora para hormônios, sendo, então, considerados positivos para receptores hormonais (RH). O valor prognóstico dos receptores hormonais é maior nas mulheres pós-menopausadas. As pacientes com tumores positivos para receptor de progesterona 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 uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal (Eisenberg, 2001).

Aproximadamente 25% das pacientes com câncer de mama expressam c-erbB-2

---

(também conhecida como Her-2 ou Her-2/neu). O gene c-erbB-2 codifica uma proteína da membrana celular expressa em praticamente todas as células epiteliais, e pertence à mesma família do receptor do fator de crescimento epidérmico. Slamon e cols. foram os primeiros a ligar a superexpressão do Her-2 com o mau prognóstico no câncer de mama. Eles estudaram a associação entre a amplificação do gene Her-2 com a recorrência e morte em pacientes com axila positiva e demonstraram que a amplificação do Her-2 estava significativamente associada com a taxa de recorrência e com a diminuição da sobrevida. Convém frisar que essas correlações são independentes de outros fatores prognósticos e tão significativas quanto o estado da axila, para recorrência e morte (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989).

É fundamental comentar aqui que esse receptor é amplificado e superexpresso (como medido pela análise imunistoquímica) em até 30% dos casos de câncer invasor e correlaciona-se com um pior prognóstico (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989; Gottardi *et al.*, 1992). É necessário referir que o papel biológico exato desta sinalização na rota oncogênica na mama não está bem definido e pode estar relacionado a um grande número de aspectos fenotípicos do câncer. Inclui-se, aqui, a progressão da hormônio-dependência e a sua perda, a sua habilidade metastática e a sua resistência a drogas (van de Vijver *et al.*, 1988). O Her-2 é superexpresso em aproximadamente 20% a 30% dos tumores de mama invasores de alto grau. Tem sido, portanto, um indicador prognóstico valioso (Al-Moundhri *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004).

O estado do Her-2 também prediz a resposta antiestrogênica e a quimioterapia citotóxica, sendo que os pacientes com forte expressão de Her-2 parecem ter uma pobre resposta aos agentes hormonais como o tamoxifeno e também aos quimioterápicos não-antracíclicos (Al-Moundhri *et al.*, 2003).

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 do mesmo. As diferentes mutações conferem diversas vantagens seletivas para as células tumorais, permitindo seu crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000).

---

No presente trabalho estudamos fatores importantes relacionados com a interação entre o sistema imune e o câncer que podem fornecer dados na terapia anti-tumoral. Assim, avaliamos a expressão de proteínas importantes do ciclo tumoral, mais particularmente a proteína de choque de calor Hsp70, a Caspase-3 e o Ki-67, em tecidos de pacientes com câncer de mama com e sem presença de metástase linfonodal em comparação com um grupo de pacientes com alteração fibrocística da mama, com posterior cálculo entre os índices de proliferação celular e apoptose na população estudada.

### **As proteínas de choque térmico em tumores**

As proteínas de choque térmico ou estresse (Hsps) foram primeiramente descritas em 1962 (Ritossa, 1962) e são um grupo de proteínas altamente conservadas, induzidas por estresses celulares como o calor e radiação ionizante, sendo distribuídas de forma ubíqua entre organismos procarióticos e eucarióticos. As Hsps de mamíferos podem ser classificadas em 5 principais famílias de acordo com seu peso molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e sHsp (*small heat shock proteins*) e estão presentes no citosol, membrana, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria da célula (Jolly e Morimoto, 2000). Cada família é composta por membros expressos constitutivamente e outros induzidos. Funcionam principalmente como chaperonas moleculares, transportando proteínas entre compartimentos celulares, ajudando no dobramento de proteínas que estão sendo formadas ou no redobramento de proteínas que sofreram danos, protegendo a agregação de outras proteínas, além de direcionar proteínas a rotas de degradação e auxiliar na dissolução de complexos protéicos (Jaattela, 1999b).

### **Hsp70 e a resposta imune antitumoral**

A família Hsp70 é a mais conservada e a melhor estudada entre as outras famílias (Garrido, Gurbuxani *et al.*, 2001; Daugaard, Jaattela *et al.*, 2005). A expressão da Hsp70 é regulada pelo fator de transcrição HSF1 (*heat shock factor 1*), e é induzida nas células expostas ao calor e a uma variedade de outros estímulos estressantes, como espécies reativas de oxigênio, infecção, inflamação, hipóxia e drogas anti-tumorais (Morimoto, 1998). Níveis elevados de expressão de Hsp70 têm sido amplamente descritos em câncer de mama, cólon



---

de útero, renal, endometrial, osteosarcoma, bem como em várias leucemias (Jaattela, 1999a; Helmbrecht, Zeise *et al.*, 2000; Jolly e Morimoto, 2000; Torronteguy, Frasson *et al.*, 2006). A Hsp70 citoplasmática é uma proteína anti-apoptótica, atuando em diversos pontos, que pode bloquear os estágios pré-mitocondriais, mitocondriais e pós-mitocondriais da cascata apoptótica (Jaattela, Wissing *et al.*, 1992; Mosser, Caron *et al.*, 1997). Em modelos murinos, altas concentrações da Hsp70 aumentam o potencial oncogênico de linhagem celulares cancerosas (Jaattela, 1995), do mesmo modo que, regulação negativa de Hsp70 diminui a oncogênese (Nylandsted, Rohde *et al.*, 2000; Gurbuxani, Bruey *et al.*, 2001).

### **Apoptose e a expressão de Caspase-3**

Sabe-se atualmente que existem múltiplos e variados mecanismos de morte celular, sendo que alguns requerem a presença de Caspase-3 (Strasser, O'Connor *et al.*, 2000), convergindo para eventos comuns que incluem achatamento, condensação da cromatina e fragmentação do DNA. Como se considera que a presença de muita ou pouca apoptose representa a base de várias doenças, tais como as doenças degenerativas e o câncer, existe um grande interesse em se elucidar os mecanismos desse tipo de morte celular.

O processo celular de apoptose envolve determinadas proteases, chamadas de caspases, que são ativadas pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem a apoptose. Essas proteases ativas clivam proteínas chaves nas células e as matam rápida e ordenadamente. A regulação deste processo é tão complexa quanto a regulação do crescimento celular e acompanham um grupo de alterações bioquímicas e morfológicas características, com alterações celulares (Vaux, 1999). Assim, a família das caspases possui uma participação importante no processo de apoptose celular.

### **Proliferação celular e a proteína Ki-67**

O Ki-67 é um excelente marcador de replicação tumoral, sendo extremamente útil para determinar a fração em crescimento de uma dada população celular (Isolan, Filho *et al.*, 2005; Fitzgibbons *et al.*, 2000; Bouzubar *et al.*, 1989).

---

## **Objetivos**

### **Objetivo geral**

Investigar a expressão de Hsp70 e a relação da taxa de proliferação celular e apoptose através da expressão imunohistoquímica de Caspase-3 e Ki-67 nas amostras teciduais de mulheres com carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase em linfonodos axilares, tratadas em um hospital terciário de ensino, em comparação com amostras de mama de pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística de mama tratadas no mesmo hospital.

### **Objetivos secundários**

Avaliar os marcadores Her-2/neu, RE (receptor de estrógeno) e RP (receptor de progesterona) através de sua expressão imunohistoquímica nas biópsias de mulheres com carcinoma de mama com e sem metástase em linfonodos axilares tratadas em um hospital terciário de ensino, e comparar os resultados aos da literatura internacional.

## **Materiais e Métodos**

Foi realizado um estudo do tipo transversal, sendo selecionados para o presente trabalho casos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor com e sem presença de metástases em linfonodos axilares tratadas no Hospital São Lucas da Pucrs.

As pacientes foram divididas da seguinte forma: 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 efeito de comparação, foi decidido pela seleção aleatória de 10 pacientes com diagnóstico de alteração fibrocística da mama, que neste trabalho serviram como grupo controle.

As expressões de Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 foram avaliadas após a confecção de lâminas histológicas das peças de tecido mamário das pacientes selecionadas e avaliadas através de análise imunohistoquímica.

---

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com uma objetiva de 40X. Para captura das imagens utilizou-se a câmera CoolSNAP™- Pro cf (Media Cybernetics, Inc.) acoplada ao microscópio e a um computador.

Foram selecionados quatro campos por lâmina, representando toda área da amostra, sendo realizadas fotografias dos mesmos. Após o registro das imagens, essas foram analisadas através do software Image ProPlus® versão 6.0 (Media Cybernetics, Inc.).

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão para variáveis de distribuição normal. Para a comparação dos valores percentuais de cada marcador utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos três grupos e teste t de Student seguido pelo teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos com diagnóstico de carcinoma de mama com e sem presença de metástase linfonodal. O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$  e  $\alpha=0,01$ , descrito ao lado de cada tabela.

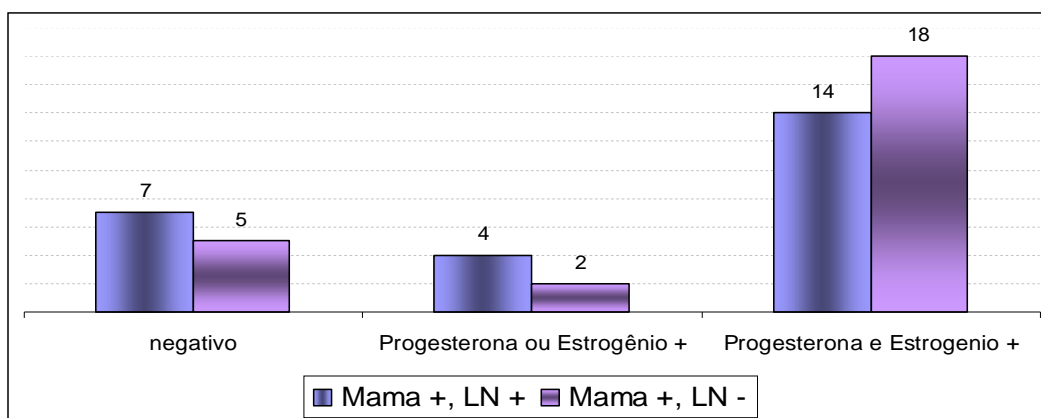
## **Resultados**

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 metástase linfonodal foi de 54,2 anos de idade, sendo que a paciente mais jovem apresentava 22 anos e a mais velha 76 anos de idade. 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 50,9 anos, variando entre 34 e 64 anos de idade. Esses dados mostram que não existiu discrepância nesses quesitos nos grupos estudados, mostrando equivalência entre os mesmos.

Prosseguimos com a avaliação da expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e de Her-2 nas amostras de tecido mamário dos grupos de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama. Encontramos um maior número de

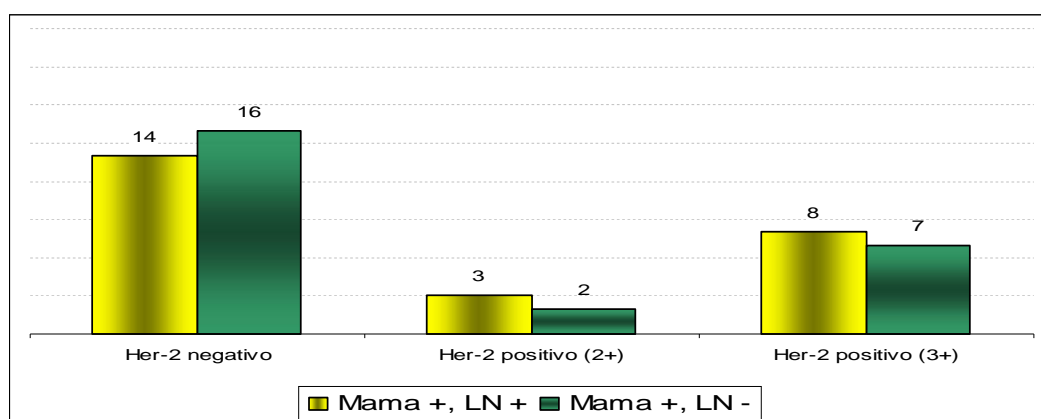
positividade de receptores hormonais no grupo sem presença de metástase em linfonodos axilares, conforme a figura 1 abaixo.

Figura 1 - Expressão de receptores hormonais em pacientes com carcinoma ductal invasor



Na avaliação da presença da proteína de membrana Her-2, não visualizamos uma diferença significativa entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor no que se refere à expressão dessa proteína, conforme podemos observar na figura 2 abaixo.

Figura 2 - Positividade para Her-2 em pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama



Foi realizada a comparação entre os três grupos estudados para os marcadores Hsp70, Caspase-3 e Ki-67 nas amostras de tecido mamário, tanto exemplificados como carcinoma ductal invasor de mama quanto por alteração fibrocística da mesma. A avaliação da

proteína de choque térmico Hsp70 mostrou diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com um valor de p-value igual a 0,010. Na avaliação da Caspase-3, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Ao avaliarmos a proliferação celular através da dosagem do marcador Ki-67, evidenciamos diferença significativa entre os grupos ao nível de 1%, com um valor de p-value igual a 0,000, tanto nos testes de ANOVA quanto de Kruskal-Wallis, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da ANOVA paramétrica e não-paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparação entre grupos

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	ANOVA	K-W
					Valor p	Valor p
<b>Hsp70</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,7140	0,3361	0,081	0,010*
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,7795	0,3056		
	<b>Controle</b>	10	0,9679	0,0793		
<b>Caspase-3</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,6599	0,4176	0,069	0,128
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,8835	0,2800		
	<b>Controle</b>	10	0,8378	0,2724		
<b>Ki-67</b>	<b>Mama +, LN +</b>	25	0,2262	0,1539	0,000**	0,000**
	<b>Mama +, LN -</b>	25	0,2588	0,1513		
	<b>Controle</b>	10	0,0408	0,0281		

\* Diferença significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% ( $p < 0,01$ )

Na avaliação entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com e sem presença de metástase axilar, a análise do Hsp70 na mama não mostrou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, ao avaliarmos o mesmo marcador no linfonodo, encontramos uma diferença significativa ao nível de 1% nos testes t de Student e Mann-Whitney, com p-value de 0,003 e 0,002 respectivamente.

A mensuração da expressão de Caspase-3 apresentou um p-value igual a 0,031 no teste t de Student ao comparar o tecido mamário das pacientes com câncer de mama. Entretanto, nas amostras de linfonodos para o mesmo marcador, ambos os testes apresentaram diferença significativa ao nível de 1%.

Ao analisarmos o marcador de proliferação celular Ki-67, entre os grupos com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama, não encontramos diferença significativa em

sua expressão tanto no tecido mamário quanto no tecido linfonodal. Estes dados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Teste t de student e Mann-Whitney para comparação entre os grupos com carcinoma ductal invasor com e sem metástase linfonodal

Grupo		N	Média	Desvio Padrão	t de Student Valor p	Mann-Whitney Valor p
Hsp70	Mama +, LN +	25	0,71	0,34	0,474	0,340
Mama	Mama +, LN -	25	0,78	0,31		
Hsp70	Mama +, LN +	25	0,48	0,41	0,003**	0,002**
Linfonodo	Mama +, LN -	25	0,80	0,29		
Caspase-3	Mama +, LN +	25	0,66	0,42	0,031*	0,053
Mama	Mama +, LN -	25	0,88	0,28		
Caspase-3	Mama +, LN +	25	0,67	0,40	0,000**	0,000**
Linfonodo	Mama +, LN -	25	1,00	0,01		
Ki-67	Mama +, LN +	25	0,23	0,15	0,454	0,497
Mama	Mama +, LN -	25	0,26	0,15		
Ki-67	Mama +, LN +	25	0,20	0,22	0,183	0,516
Linfonodo	Mama +, LN -	25	0,14	0,12		

\* Diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05)

\*\* Diferença significativa ao nível de 1% (p<0,01)

Ao avaliarmos a razão entre proliferação celular e apoptose, não encontramos diferenças significativas nas amostras de tecido linfonodal. Contudo, encontramos diferenças significativas nas amostras de tecido mamário ao compararmos os três grupos estudados, com p-value de 0,0024, conforme ilustrado na tabela 3. Ao realizarmos o pareamento dos dados, não encontramos diferença significativa ao compararmos o tecido mamário do grupo com carcinoma ductal invasor de mama e metástase linfonodal (Mama+, LN+) ao grupo sem metástase linfonodal (Mama+, LN-), sendo a significância presente apenas ao compararmos os grupos com tumor ao grupo controle, como mostra a tabela 4.

Tabela 3 - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose entre os grupos

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	ANOVA Valor p
Ki-67/Caspase-3 Mama	Mama+, LN+	25	0,2712	0,2146	0,0024*
	Mama+, LN-	25	0,2656	0,1668	
	Controle	10	0,0482	0,0261	
Ki-67/Caspase-3 Linfonodo	Mama+, LN+	25	0,2642	0,3176	0,2083
	Mama+, LN-	25	0,1348	0,1147	

Tabela 4 - Avaliação da razão entre proliferação celular e apoptose no tecido mamário por pareamento

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	ANOVA Valor p
Ki-67/Caspase-3 Mama	Mama+, LN+	25	0,2712	0,2146	0,0201*
	Controle	10	0,0482	0,0261	
Ki-67/Caspase-3 Mama	Mama+, LN-	25	0,2656	0,1668	0,0484*
	Controle	10	0,0482	0,0261	
Ki-67/Caspase-3 Mama	Mama+, LN+	25	0,2712	0,2146	0,9245
	Mama+, LN-	25	0,2656	0,1668	

### Conclusão e discussão

O câncer de mama representa, nos países ocidentais, umas das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento da freqüência desta neoplasia, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento. De acordo com dados da literatura, a probabilidade de se desenvolver câncer de mama aumenta com a idade, e embora prevaleça na pós-menopausa, a doença ocorre em praticamente todas as faixas etárias a partir da idade reprodutiva.

Em nosso estudo, das 50 pacientes estudadas para a positividade de receptores hormonais, evidenciamos que 32 pacientes apresentavam positividade para ambos receptores hormonais. Somente 12 pacientes apresentavam negatividade para ambos receptores. Esses achados conferem aos da literatura estudada, onde dois terços dos cânceres de mama apresentam positividade para receptores hormonais.

Consideramos a presença de Her-2 positivo como a expressão de escore 3, sendo que a presença de escore 2 necessita da realização de hibridização "in situ" com fluorescência

---

(FISH) para determinação final da super-expressão de Her-2/neu. Assim, encontramos uma positividade para Her-2 em 30% das pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama, condizendo com os achados da literatura que relatam uma expressão de Her-2 entre 25-30% nesses casos.

No câncer de mama, a expressão de Hsp70 se correlaciona com o aumento da proliferação celular, pouca diferenciação, metástases linfonodais e piores prognósticos e resposta terapêutica. A alta expressão de Hsp70 em um tumor recém desenvolvido parece oferecer um melhor prognóstico ao paciente, enquanto um tumor em estágio avançado com baixo nível de Hsp70 deve ser correlacionado com um pior prognóstico. Isso sugere que, a expressão de Hsp70 deve ser importante como um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Ao avaliarmos a proteína de choque térmico 70 no tecido mamário, encontramos uma super-expressão significativa nas células tumorais ao compararmos ao tecido sem presença de neoplasia, achados semelhantes aos da literatura. Ao compararmos a expressão de Hsp70 no tecido linfonodal, obtivemos uma diferença significativa quando comparamos o tecido com e sem presença de metástase, com maior expressão em pacientes sem envolvimento linfonodal. Isso sugere que a presença de Hsp70 no tecido linfonodal pode estar associada a uma proteção local contra a proliferação tumoral nessas áreas.

A apoptose pode ser considerada um marcador prognóstico favorável para indivíduos com neoplasia mamária, uma vez que a homeostase que controla a morte celular programada estabiliza o crescimento e impede a evolução tumoral. Por outro lado, durante o crescimento tumoral há um equilíbrio entre proliferação celular e apoptose. Dessa maneira, se a presença de um grande número de marcadores apoptóticos possuir grande correlação com a proliferação celular, o indivíduo apresentará um prognóstico menos favorável. Por isso, pode-se deduzir que indivíduos com grande número de células marcadas pela apoptose possuem uma sobrevida menor.

Em alguns estudos a correlação entre índice apoptótico e proliferação celular se



---

mostrou bastante positiva, principalmente em carcinomas mamários, indicando que a apoptose está diretamente relacionada à taxa de proliferação tumoral na tentativa de controlar seu crescimento. Quanto à Caspase-3, o alto número de células apoptóticas está relacionado a um prognóstico não favorável (Mommers *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002).

Neste estudo, o grupo com diagnóstico de carcinoma ductal invasor sem presença de envolvimento linfonodal apresentou maior positividade de Caspase-3 em ambos tecidos (mama e linfonodo) em comparação com o grupo com metástase linfonodal. Isso sugere que tumores com maior potencial teórico de agressividade estão associados a um nível mais elevado de células apoptóticas. Isso se explica devido ao fato que durante o crescimento tumoral há um balanço entre proliferação e a morte celular, onde o processo de apoptose está envolvido. Sendo assim, o alto número de células apoptóticas juntamente com um alto índice de proliferação celular representa um prognóstico não favorável.

Encontramos uma alta taxa de Ki-67 quando comparamos os tecidos tumorais com espécimes de alteração fibrocística de mama. Considerando-se que a alta expressão de Ki-67 está relacionada à proliferação celular, que é uma característica de malignidade, nossos resultados estão de acordo com a literatura investigada.

De acordo com alguns estudos, existe correlação estatística de um alto número de células marcadas pela apoptose com a alta proliferação celular (González-Cámpora *et al.*, 2000; De Jong *et al.*, 2000). Quando comparamos o tecido mamário cancerígeno ao grupo controle, evidenciamos que o índice de proliferação celular sobre apoptose tem sua razão aumentada, indicando que as células tumorais estão sofrendo proliferação celular e bloqueando o processo de morte celular.

Entretanto, ao comparamos a razão de proliferação celular e apoptose entre os grupos com malignidade, não encontramos diferença significativa entre os mesmos.

Assim, ao analisarmos nossa amostra, concluímos que a razão entre proliferação celular e apoptose não deve ser usada como indicador de prognóstico da doença até o momento.

---

A identificação de fatores prognósticos preditivos é de fundamental importância na evolução dos protocolos terapêuticos. Uma terapia baseada em uma avaliação preditiva e prognóstica possibilita a aplicação de diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequada para aquele paciente específico.

Através da avaliação de marcadores tumorais por imunistoquímica podemos saber quais os pacientes serão prováveis beneficiários de uma determinada terapia além de eventualmente oferecer um prognóstico do comportamento tumoral. Assim, mais estudos são necessários, no âmbito da imunologia dos tumores, para um melhor entendimento do comportamento tumoral e de suas diferentes vias de sinalização.

#### **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.

Al-Moundhri M, Nirmala V, *et al.* Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. Pathol Oncol Res, v.9, n.4, p. 226-31. 2003.

Bouzubar N, *et al.* Immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. British Journal of Cancer, v.59, n.6, p.943-47. 1989.

Bull SB, Ozcelik H, *et al.* The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. J Clin Oncol, v.22, n.1, p.86-96. 2004.

Cianfrocca M, Goldstein L. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. The Oncologist, v.9, n.6, p.606-16. 2004.

Clark G. Fatores prognósticos e preditivos. In: Harris, J., editor. Doenças da Mama, 2 ed, Lippincott. p.587-620. 2002.

Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. Hsp70-2 is Required for Tumor Cell Growth and Survival. Cell Cycle, v.4, p.877-80. 2005.

De Jong, JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Number of apoptosis cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. British Journal of Cancer, v.82, n.2, p.368-73. 2000.

Eisenberg A, Koifmann S. Fatores prognósticos do câncer de mama. Rev Bras Mastol, v.10, n.2, p.75-87. 2000.

- 
- Eisenberg A. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão da literatura). Rev Bras Cancerologia, v.47, n.4, p.377-88. 2001.
- 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.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology, v.19, n.5, p.403-10. 1991.
- Fisher B, J Dignam, *et al.* Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. Journal of the National Cancer Institute, v.93, n.2, p.112-20. 2001.
- Fitzgibbons PL, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, p.966-78. 2000.
- Garrido C, Gurbuxani S, *et al.* Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun, v.286, n.3, Aug 24, p.433-42. 2001.
- González-Cámpora R, *et al.* Apoptosis in breast carcinoma. Pathology Research Practice, v.196, n.3, p.167-74. 2000.
- Gottardi O, Tabiaddon D, *et al.* Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma. Pathologica, v.84, n.1094, Nov-Dec, p.15-22. 1992.
- Gurbuxani S, Bruey JM, *et al.* Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. Oncogene, v.20, n.51, Nov 8, p.7478-85. 2001.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, p.57-70. 2000.
- Helmbrecht K, Zeise E, *et al.* Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. Cell Prolif, v.33, n.6, Dec, p.341-65. 2000.
- Isolan GR, Filho JMR, Isolan PM, *et al.* Neoplasias astrocíticas e correlação com as proteínas P53 mutada e Ki-67. Arquivos de Neuropsiquiatria, v.63, n.4, p.997-1004. 2005.
- Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med, v.31, p. 261-271. 1999.
- Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. Int J Cancer, v.60, n.5, Mar 3, p.689-93. 1995.
- Jaattela M, Wissing D, *et al.* Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. Embo J, v.11, n.10, Oct, p.3507-12. 1992.
- Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl Cancer Inst, v.92, p.1564-72. 2000.

- 
- Mommers ECM, *et al.* Balance of cell proliferation and apoptosis in breast cancer carcinogenesis. Breast Cancer Research and Treatment, v.58, p.163-69. 1999.
- Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev, v.12, n.24, Dec 15, p.3788-96. 1998.
- Mosser DD, Caron AW, *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol, v.17, n.9, Sep, p.5317-27. 1997.
- Nylandsted J, Rohde M, *et al.* Selective Depletion of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Activates a Tumor-Specific Death Program That is Dependent of Caspases and Bypasses Bcl-2. Proc Natl Acad Sci USA, v.97, p.7871-76. 2000.
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature and DNP in *Drosophila*. Experimentia, v.18, p.571-73. 1962.
- Slamon DJ, Clark GM, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, v. 235, n.4785, Jan, p.177-82. 1987.
- Slamon DJ, Godolphin W, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science, v.244, n.4905, May, p.707-12. 1989.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annual Review of Biochemistry, v.69, p.207. 2000.
- Torrenteguy C, Frasson A, *et al.* Inducible heat shock protein 70 expression as a potential predictive marker of metastasis in breast tumors. Cell Stress Chaperones, v.11, n.1, Spring, p.34-43. 2006.
- van de Vijver MJ, Mooi WJ, *et al.* Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. Oncogene, v.2, n.2, Feb, p.175-78. 1988.
- Vaux DL. Caspases and apoptosis: biology and terminology. Cell Death Differentiation, v.6, p.493-94. 1999.
- Zhao H, *et al.* Immunohistochemical expression of uPA, PAI-1, cathepsin D and apoptotic cells in ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer, v.9, p.118-26. 2002.