



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ivan Rodrigues de Carvalho Filho

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DA
APOPTOSE (XIAP; SURVIVINA) E DE SEU
ANTAGONISTA SMAC/DIABLO NO CARCINOMA
MAMÁRIO DUCTAL INVASIVO, SEM OUTRA
ESPECIFICAÇÃO (SOE): CORRELAÇÃO COM OS
MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS
PROGNÓSTICOS USUAIS, ÍNDICE APOPTÓTICO E
PROGNÓSTICO**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Cotrim Sator de Oliveira

Botucatu

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

IVAN RODRIGUES DE CARVALHO FILHO

Imunoexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (XIAP; Survivina) e seu antagonista SMAC/Diablo no carcinoma mamário ductal invasivo, sem outra especificação (SOE): correlação com os marcadores imunoistoquímicos prognósticos usuais, índice apoptótico e prognóstico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia Humana.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Cotrim Sator de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho Filho, Ivan Rodrigues de.
Imunexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (Xiap; Survivina) e de seu antagonista Smac/Diablo no carcinoma mamário ductal invasivo, sem outra especificação (SOE) : correlação com os marcadores imunistoquímicos prognósticos usuais, índice apoptótico e prognóstico / Ivan Rodrigues de Carvalho Filho. - Botucatu, 2016
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira
Coorientador: Flávio de Oliveira Lima
Capes: 40105008
1. Mamas - Câncer - Tratamento. 2. Imunohistoquímica. 3. Apoptose. 4. Prognóstico. 5. Inibidores químicos.
Palavras-chave: Apoptose; Carcinoma ductal invasivo (SOE); IAPs; Imunohistoquímica; Smac.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me ensinaram a nunca retroceder nas minhas escolhas;

Aos meus orientadores, Maria Luiza Cotrim Sator de Oliveira e Flávio de Oliveira Lima, pelo bom humor, otimismo e incentivo, durante a elaboração do trabalho;

Aos colegas de doutorado Tássia, Denise, Moisés e, em especial, a Luciana Gurgel, pelas importantes dicas na elaboração da tese;

A Vânia Soler, pela boa vontade de sempre querer ajudar;

A coordenadora da patologia geral Prof. Dra. Denise Fecchio;

À chefe do Dep., Prof.^a Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayashi;

Ao coordenador do programa Dinter de patologia pela UFPE, Prof. Dr. Mário Ribeiro Melo Junior;

A todos aqueles do Dep. de Patologia do Hospital de Medicina de Botucatu, que ajudaram na realização dessa tese.

Epígrafe

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina. ”

Cora Coralina

Resumo

RESUMO

Introdução: A maioria dos tumores malignos da mama apresenta aspecto morfológico de carcinoma ductal invasivo que pode apresentar diferentes prognósticos. Diante disso, conclui-se que a identificação do padrão morfológico não é suficiente para o estabelecimento do prognóstico, e que existe a necessidade da identificação de novos biomarcadores imunohistoquímicos que indiquem moléculas sinalizadoras importantes para proliferação e sobrevivência das células neoplásicas, e que possam ser alvos de modalidades terapêuticas oncológicas. A ocorrência de alterações dos mecanismos regulatórios genéticos da apoptose pode resultar em uma hiperativação das proteínas antiapoptóticas, com a perda da sensibilidade aos sinais de morte fisiológica, evitando-se a ocorrência da apoptose e resultando, desse modo, na preservação de células geneticamente alteradas com consequente aumento no seu número. Esse é um evento crítico para o início do crescimento tumoral, com repercussões no prognóstico e na resistência ao tratamento oncológico. Dessa forma, o entendimento da maquinaria das vias do processo apoptótico é de crucial importância na avaliação prognóstica do processo neoplásico, pois suas moléculas são importantes biomarcadores da proliferação e sobrevivência celular. **Objetivos:** Avaliar a relação entre as proteínas inibidoras do processo apoptótico (IAPs) e seu inibidor Smac/DIABLO no carcinoma mamário ductal invasivo, sem outra especificação (SOE). Analisar, também, sua correlação com os marcadores imunohistoquímicos usuais, aplicados para a avaliação prognóstica, índice apoptótico e taxa de sobrevivência dos pacientes. **Material e Métodos:** Foram confeccionados blocos de parafina de TMA com tecido de câncer mamário ductal invasivo sem outra especificação (SOE), extraído de pacientes operadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, entre 1980 e 2000. Estes foram submetidos à reação imunohistoquímica para Survivina, XIAP, Smac, Caspase 3 clivada (índice apoptótico) e Ki67 (índice de proliferação celular), RE, RP, HER2, P53. Dois patologistas realizaram a leitura das lâminas e obteve-se escores de intensidade de imunexpressão e/ou percentuais de positividade celular. Esses escores foram correlacionados entre as proteínas apoptóticas, com outros marcadores imunohistoquímicos

prognósticos usuais, com os dados de sobrevida dos pacientes, com o grau histológico e com o perfil molecular específico do carcinoma ductal invasivo. **Resultados:** Ocorreu uma correlação positiva entre Smac, Survivina e XIAP, houve maior intensidade de imunexpressão dos marcadores de apoptose nos tumores de maior grau e uma correlação de imunexpressão inversa entre Smac e um status hormonal positivo. Um estímulo pró-apoptótico pareceu ser dominante no carcinoma mamário de subtipo molecular HER2, quando comparado a outros subtipos. XIAP foi a única proteína apoptótica estudada que guardou correlação com a taxa de mortalidade. **Conclusão:** A detecção de uma correlação estatística significativa entre as proteínas apoptóticas, corrobora a integração múltipla que ocorre entre essas durante o processo apoptótico no carcinoma mamário invasivo, sem outra especificação (SOE). Estudos adicionais das proteínas apoptóticas com uma maior amostragem de pacientes serão necessários para o estabelecimento de valores prognósticos mais acurados de sobrevida.

Palavras-chave: carcinoma ductal invasivo SOE, imunistoquímica, IAPs, SMAC, apoptose, prognóstico.

Abstract

ABSTRACT

Background: Most of malignant breast tumors exhibit morphological aspect of invasive ductal carcinoma, not otherwise specified(NOS)carcinoma, that can present different prognosis. It concludes that the identification of the morphological type of the breast cancer is not enough to establish tumor prognosis. So there is the need to recognize new immunohistochemistry biomarkers that can identify important molecular signaling proteins of neoplastic cell proliferation and survival that can be used as target of oncological therapeutic. Changes in these regulatory mechanisms that favors the hiperactivation of antiapoptotic proteins can set the loss of the physiological signs of cell death avoiding the occurrence of apoptosis and preserving genetic modified cells. This is a critical event to the beginning of tumor growth which may further lead to repercussions in prognosis and cancer resistance to therapy. The knowledge about the different pathways to apoptosis is crucial to evaluate the prognosis of the neoplastic process. **Objectives:** To study the relation between the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonist, the protein SMAC/DIABLO, in invasive ductal breast carcinoma and also evaluate their correlation with the usual prognostic immunohistochemical markers, Apoptotic Index and clinical prognostics factors. **Design:** TMA paraffin blocks were made with invasive ductal breast carcinoma tissue samples of patients operated at the Botucatu School of Medicine Hospital from 1980 to 2000. Those samples were submitted to immunohistochemical reactions to Survivin, XIAP, cleaved Caspase 3 (apoptotic index) and Ki67 (cell proliferation index), RE, RP, HER2, P53. Two experienced pathologists analyzed the microscope slides and retrieved intensity scores and/or the percentage of positive cells of immune-expression. Those scores were interrelated and with IA, anti-cleaved caspase 3, the other usual immunohistochemical biomarkers and survival patients records, as well as the specific type and grade of the invasive ductal carcinoma. **Results:** There was a positive correlation between SMAC, Survivina and XIAP, as well as a higher immunoexpression intensity of apoptosi's markers with high grade tumor, and a inverse immunoexpression correlation between SMAC and positive progesterone hormonal status. The pro-apoptotic stimulus seemed be dominant in breast carcinoma HER2 molecular subtype when compared to other subtypes.A pro-

apoptotic stimulus seemed be dominant in breast carcinoma HER2 molecular subtype when compared to other subtypes. XIAP was the only one apoptotic protein studied that played correlation with mortality rate. **Conclusion:** The detection of a statistically significant correlation between the apoptotic proteins corroborates the multiple integration that occurs between these during the apoptotic process in invasive mammary carcinoma with no other specification. Further studies of apoptotic proteins in a large survey will be necessary to establish more accurate values of prognostic survival.

Key words: breast ductal carcinoma NOS, immunohistochemistry, IAPs, SMAC, apoptosis, prognosis.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do processo apoptótico pelas vias extrínseca e intrínseca

Figura 2 – Organograma da classificação dos pacientes segundo subtipo molecular

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medida dos marcadores de apoptose entre os controles

Tabela 2 – Correlações entre marcadores da apoptose SMAC, XIAP, Survivina (Nuclear e citoplasmática) e índice apoptótico

Tabela 3 – Associação do grau histológico com os marcadores de apoptose

Tabela 4 – Associação da expressão do HER 2 com os marcadores de apoptose

Tabela 5 – Correlações da imunoexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática), IA (índice apoptótico) e P53 com a imunoexpressão dos índices de proliferação celular Ki-67

Tabela 6 – Correlações do percentual de núcleos positivos pelo P53 forte e fraco com os marcadores de apoptose SMAC, XIAP, Survivina (Nuclear e citoplasmática), IA e Ki 67

Tabela 7 – Associação do subtipo molecular com os marcadores de apoptose

Tabela 8 – Associação da expressão dos marcadores hormonais RE e RP com os marcadores de apoptose

Tabela 9 – Comparação das taxas de mortalidade e Hazard Ratio, segundo os marcadores de apoptose

Tabela 10 – Correlação da condição de metástase com os marcadores de apoptose

Lísta de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF – Apoptosis-inducing factor
APAF-1 – Apoptosis Protease Activating Factor-1
Bad – Bcl-2-associated death promoter
Bak – Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax – Bcl-2-associated X protein
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2
Bcl-Xl – B cell lymphoma-extra large
BH – Bcl-2 homology
Bid – BH3 interacting domain death agonist
BIR – Baculovirus IAP Repeat
BIRP – BIR-containing Proteins
Caspase – cysteine-aspartic-acid-protease
CARD – Caspase Recruitment Domain
CEA – Carcino-embryonic antigen
CED – Caenorhabditis elegans cell-death protein
C. elegans – Caenorhabditis elegans
CK – Citoqueratina
DAB – Diaminobenzidine
DEDs – Death Efector Domains
DEDD – Death effector domain containing DNA-binding protein
DISC – Death Inducing Signalling Complex
DNA – Deoxyribonucleic acid
FISH – Fluorescence In Situ Hibridization
H&E – Hematoxilina & Eosina
IA – Índice Apoptótico
IAPs – Innibitors of Apoptosis Proteins
IBMs – IAP Binding Motifs

IPC – Índice de proliferação celular

K-ras – Kirsten rat sarcoma viral oncogene

MIB – Mindbomb homolog 1

MTTB – Multitumor Tissue Block

p53 – Proteína 53 (kDa)

RING – Real Interesting New Gene

RT-PCR – Real-time polymerase chain reaction

SMAC – Second Mitochondrial Activation of Caspases

TMA – Tissue microarray

TNF – Tumor necrosis factor

TRAIL – TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Histograma e boxplot da distribuição das medidas do índice de proliferação Ki-67

Gráfico 2 – Distribuição das medidas do número de núcleos positivos pelo P53

Gráfico 3– Distribuição dos pacientes segundo subtipos moleculares do câncer de mama

Gráfico 4 – Probabilidade de sobrevida dos pacientes

Sumário

SUMÁRIO

➤ Capítulo I	39
○ 1. Revisão da Literatura	27
○ Referências.....	43
○ 2. Objetivos.....	54
➤ Capítulo II	55
○ Artigo Científico.....	255
○ Resumo	57
○ Abstract.....	59
○ 1. Introdução.....	62
○ 2. Material e Métodos.....	69
○ 3. Resultados.....	73
○ 4. Discussão	88
○ 5. Conclusões	96
○ Referências.....	98
○ Anexos.....	102

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. REVISÃO DA LITERATURA

Dentre as causas de morte pelo câncer nas mulheres com idade entre os 20 e os 59 anos, o câncer de mama é a causa líder mundial¹. No Brasil, é a segunda forma de câncer mais frequente nas mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, sendo o responsável por cerca de 25% dos casos novos a cada ano, com uma estimativa de 57.960 casos para 2016. Apesar do crescente escrutínio clínico e mamográfico e do aumento da detecção precoce do câncer mamário, 80% das pacientes com nódulos positivos morrem após o tratamento adjuvante, devido à progressão da doença, no intervalo de trinta anos – a partir do diagnóstico^{2,3}. Mais de 80% dos tumores malignos da mama apresentam aspecto morfológico de carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE)⁴. A introdução da gradação histológica de Bloom e Richardson, modificada por Elston e Ellis⁵, foi de grande importância para mostrar a forte associação entre os graus histológicos e o prognóstico (ANEXO A). A introdução às novas técnicas de subtipagem gênica demonstrou que o câncer de mama é um grupo de desordens neoplásicas molecularmente distintas⁶, não podendo ser mais visto como uma entidade clinico-patológica única, mas devendo ser dissecada em um número maior de entidades. Não apenas o padrão morfológico, o grau histopatológico e o *status* linfonodal são importantes para o estabelecimento do prognóstico e para a escolha da terapia mais acurada, mas também as

¹ Cancer. In: World Health Organization [Internet]. [acesso em 2016 out 19]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

² Kozłowska E, Szewczyk MT, Banaszkiwicz Z, Jawień A, Cierzniakowska K, Jarmocik P. Knowledge of symptoms and diagnostic possibilities of cancer diseases. Arch Med Sci. 2011 abr;7(2):304-9. PubMed; PMID 22291771.

³ Mcardle CS, McMillan DC, Greenlaw N, Morrison DS. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in breast cancer: 30year follow-up of survival. BMC Cancer. 2010 jul 30;30:398. DOI: 10.1186/1471-2407-10-398.

⁴ Kimberly H, Allison MD. Molecular Pathology of Breast Cancer: what a Pathologist Needs to Know. Am J Clin Pathol. 2012;138:770-80. doi: 10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO.

⁵ Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer, experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19(5):403-10. PubMed; PMID 1757079.

⁶ Viale G. The current state of breast cancer classification. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. ESMO. 2012;23(suppl 10):x207-x10. doi:10.1093/annonc/mds326.

diferentes associações de anormalidades genéticas e epigenéticas⁷. Dessa forma, subtipos morfologicamente similares de câncer mamário podem apresentar grande variabilidade de comportamento clínico⁸.

Perou et al. determinaram a classificação molecular do câncer de mama em, pelo menos, cinco subtipos moleculares⁹: padrão de células basais ou triplo negativo (RE-,RP-,HER2- e CK5/6+ e ou EGRF+); luminal A (RE+ e/ou RP+,HER2- e Ki 67<14%); luminal B (RE + e/ou RP+,HER2- e Ki 67>igual a 14%); luminal híbrido (RE+ e/ou RP+,HER2+) e grupo HER2 (RE-,RP- e HER2+). Posteriormente, outros trabalhos englobaram o subtipo luminal híbrido ao subtipo luminal B^{10,11}. Essa classificação prova que tais variantes moleculares do câncer de mama surgem de diferentes células-tronco ou progenitoras transformadas, cada uma com suas propriedades biológicas distintas, conseqüente prognóstico e resposta terapêutica variada^{12,13}. As diferentes formas moleculares estão associadas a uma expressão variada, quanto a genes relacionados com a proliferação e a diferenciação celular e, desse modo, influenciam na progressão e disseminação do tumor^{14,15}.

Em face dessa grande heterogeneidade molecular, conclui-se que a identificação do padrão morfológico é insuficiente para o estabelecimento do prognóstico tumoral. Existe a necessidade da descoberta de novas moléculas

⁷ Nature. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. 2012 out 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.

⁸ Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010 maio;23 Suppl2:S60-4. PubMed; PMID 20436504.

⁹ Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006 jun 7;295(21):2492-502. PubMed; PMID 16757721.

¹⁰ Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 mar 1;14(5):1368-76. PubMed; PMID 18316557.

¹¹ Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 maio 20;101(10):736-50. PubMed; PMID: 19436038.

¹² Glinsky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev*. 2007 jan;3(1):79-93. PubMed; PMID:17873385.

¹³ Kararala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol*. 2008 jun 10;26(17):2813-20. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.3931.

¹⁴ Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 maio 13;100(10):5974-9. PubMed; PMID: 12714683.

¹⁵ Weinberg RA. Mechanisms of Malignant progression. *Carcinogenesis*, 2008 jun; 29(6):1092-5. PubMed; PMID: 18453542.

sinalizadoras importantes para a proliferação e a sobrevivência das células neoplásicas. A identificação dessas moléculas tem modificado o tratamento do câncer de uma forma generalizada para uma forma mais específica, baseada nas características exclusivas de cada tumor.

Atualmente, o desafio para os patologistas frente ao câncer de mama não inclui apenas a sua identificação histopatológica. Inclui, também, a necessidade de pesquisar novos e diferentes biomarcadores e vias biológicas moleculares que possam estar envolvidas em determinar o prognóstico, a resposta e a resistência à terapia nos diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama podendo, assim, ser usados para uma melhoria na sobrevida e, igualmente, ser alvos para uma manipulação terapêutica mais efetiva^{16,17,18}.

A apoptose (ou morte celular programada) é um importante mecanismo de morte celular envolvida na homeostase tecidual^{19,20}, na organogênese e na patogênese dos tumores^{21,22,23}. Nos processos fisiológicos, encontra-se relacionada com o crescimento e a diferenciação celular, participando no desenvolvimento embriológico, controlando o número de células e o tamanho dos órgãos, bem como na atividade imunológica do tecido linfóide²⁴.

Muitas das terapias antineoplásicas citotóxicas atuais estão baseadas na capacidade de ativação do processo apoptótico nas células

¹⁶ Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289.

¹⁷ Pluta P, Jeziorski A, Pluta A, Cebula-Obrzut A, Wierzbowska A, Piekarski J, Smolewski P. Expression of IAP family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma*. 2015;62(4):666-73. PubMed; PMID: 25997966.

¹⁸ Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015 fev;16(2):2942-55. doi:10.3390/ijms16022942.

¹⁹ Julian L, Olson MF. Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2015;7;133-142. doi: <https://dx.doi.org/10.2147/CHC.S57893>.

²⁰ Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 ago;26(4):239-57. PubMed; PMID: 4561027.

²¹ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 jan 7;100:57-70. PubMed; PMID: 10647931.

²² Lockshin R, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J. Cell Mol Med*. 2007;11:1214-24.

²³ Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. *Mol Cell Bio*. 2008 mar; 9(3):231-40.

²⁴ Tomei LD, Cope, FO, editores. *Apoptosis: The molecular Basis of Cell Death*; Stought, WI, USA: Books on demand; 1991.

cancerosas^{25,26}. O conhecimento de que a evasão da apoptose é um dos principais fatores primários ou adquiridos na resistência terapêutica que frequentemente ocorre nos vários tipos de câncer, faz com que procuremos um melhor entendimento dos eventos moleculares disfuncionais da apoptose.

A apoptose ocorre quando a carga de fatores pró-apoptóticos excede a capacidade de tamponamento antiapoptótica celular²⁷. Em condições fisiológicas, a presença de proteínas antiapoptóticas previne uma morte celular desnecessária ativada por estresses mínimos variáveis²⁸.

Contudo, uma alteração dos mecanismos regulatórios que favoreça a hiperativação das proteínas antiapoptóticas pode determinar a perda da sensibilidade aos sinais de morte fisiológica, prevenindo a ocorrência da apoptose. Pode, assim, preservar células geneticamente alteradas, sendo um evento crítico para o início do crescimento tumoral²⁹, com repercussões no prognóstico e na resistência ao tratamento oncológico^{30,31,32}.

As células mamárias normais podem realizar o processo apoptótico em resposta às alterações hormonais durante o ciclo menstrual, mas também podem responder a sinais não hormonais. A desregulação do processo apoptótico que induz no aumento do número de células e a preservação de células geneticamente alteradas é considerada essencial para o processo

²⁵ Fulda S. Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins as therapeutic targets for radiosensitization of humans cancers. *Cancer Treatment Reviews*. 2012 out;38(6):760-66. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.005>.

²⁶ Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*. 2009 fev 1;124(3):511-5. PubMed; PMID: 19003982.

²⁷ Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 nov 18;432(7015):307-15. doi:10.1038/nature03098.

²⁸ Ludwig-Galezowska AH, Flanagan L, Rehm M. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain: a multifunctional modulator of cell death. *J Cell Mol Med*. 2011 nov 19; 15(5):1044-53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01221.x.

²⁹ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 jan 7;100;57-70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

³⁰ Rodel F, Reichert S, Sprenger T, Gaigl US, Mirsch J, Liersch T, et al. The role of surviving for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition. *Current Medical Chemistry*. 2011;18(2):191-9. doi: 10.2174/092986711794088362.

³¹ Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005 mar;5(3):231-7. PubMed; PMID: 15738985.

³² Eccles AS, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007 maio 19;369(9574):1742-57. PubMed; PMID: 17512859.

carcinogênico³³, o crescimento tumoral e a agressividade do câncer de mama³⁴.

O entendimento do funcionamento das proteínas envolvidas na regulação da apoptose no carcinoma mamário é de grande importância, pois elas atuam como biomarcadores associados à progressão e ao prognóstico do carcinoma mamário. A investigação da expressão imunohistoquímica destas proteínas pode ajudar em traçar um perfil molecular mais acurado do carcinoma mamário. Além disso, a terapia sistêmica e a radioterapia dependem da apoptose para determinar a morte das células mamárias cancerosas e o sucesso do tratamento^{35,36}.

O processo apoptótico pode ser ativado por duas vias: a via dos receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca)³⁷. Ambas vias promovem a ativação da cascata das caspases, uma família de proteases aspartato-cisteínicas específicas, que são as enzimas efetoras do processo apoptótico que atuam na clivagem de proteínas celulares importantes, determinando o desmonte celular³⁸. A atividade das caspases está sujeita a um rigoroso controle molecular pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs, do inglês *inhibitors of apoptosis proteins*) que, por sua vez, são controladas por outras moléculas inibidoras. As alterações morfológicas observadas na apoptose³⁹ são induzidas pela ativação das caspases, especialmente a caspase 3, que é a principal efetora do processo apoptótico.

³³ Simstein R, Burrow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003 out;228(9):995-1003. PubMed; PMID: 14530507.

³⁴ de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2000 jan;82(2):368-73. PubMed; PMID: 10646890.

³⁵ Fulda S. Targeting IAP proteins in combination with radiotherapy. *Rad Oncol*. 2015 abr 26;10:105. PubMed; PMID: 25927408.

³⁶ Shao ZM, Li J, Wu J, Han QX, Shen ZZ, Fontana JA, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer induces apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 fev;53(3):263-9. doi: 10.1023/A:1006194921139.

³⁷ Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006 ago 7;25(34):4798-811. PubMed; PMID: 16892092.

³⁸ Parish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 jun 1;5(6). pii: a008672. doi;10.1101/cshperspect.a008672.

³⁹ Kromer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ*. 2008 out 10;16(1):3-11. PubMed; PMID: 18846107.

A ativação da via extrínseca ocorre pela ligação dos ligantes FAS (CD95L) ou do fator de necrose tumoral alfa com seus receptores induzindo, assim, o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD ou RAIDD) para a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC). O complexo DISC ativa a caspase-8 que, por sua vez, ativará as caspases efetoras por clivagem catalítica^{40,41,42}. A ativação da via intrínseca ocorre por uma variada rede de estímulos internos citotóxicos, tais como drogas antineoplásicas, hipóxia, radiação, ausência de fatores de crescimento, danos ao DNA e presença do tBID derivado da ativação do BID pelo complexo DISC. Esses estímulos provocam alterações estruturais nas proteínas BAX e BAK, determinam sua ativação e migração para as mitocôndrias e irão promover alterações estruturais em sua membrana externa com formação de poros, com um aumento da permeabilidade⁴³ e consequente liberação para o citossol de proteínas do espaço intermembranoso, tais como o citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 e AIF^{44,45}. Essa liberação permite a formação de um complexo multiproteico, o apoptossomo, que inclui o citocromo c, a pró-caspase 9 e fator-1 indutor da apoptose citosólica (APAF-1)⁴⁶. O apoptossomo ativa a caspase-9 que, por sua vez, ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 que irão clivar os seus substratos celulares específicos e gerar a morfologia típica da apoptose.

⁴⁰ Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 jun-ago;19(3-4):325-31. PubMed; PMID: 18495520.

⁴¹ Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol.* 2000 abr;2(4):241-3. PubMed; PMID: 10783243.

⁴² Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 set;2(9):647-56. PubMed; PMID: 12209154.

⁴³ Dewson G, Kratina T, Czabotar L, Adams M, Kluck M. Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha helices. *Mol Cell.* 2009 nov 25;36(4):696-703. PubMed; PMID: 19941828.

⁴⁴ Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 jun;9(6):447-64. PubMed; PMID: 20467424.

⁴⁵ Goldstein C, Waterhouse J, Juin P, Evan I, Green R. The Coordinate release of cytochrome C during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000 mar;2(3):156-62. PubMed; PMID: 10707086.

⁴⁶ Ghavami S, Kerkoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by s100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of the metal ions. *J Leukoc Biol.* 2004 jul;76(1):169-75. PubMed; PMID: 15075348.

A atividade das caspases maduras é negativamente regulada por sua interação com proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)^{47,48}.

As IAPs são uma família de proteínas inibidoras da apoptose, presentes na maioria dos tecidos normais e codificadas por genes presentes nos mamíferos e filogeneticamente conservados. Elas também são encontradas na *Drosophila* e em certos vírus⁴⁹. O processo apoptótico envolve uma série de mecanismos amplificadores que, uma vez disparados, rapidamente alcançam a irreversibilidade. Dessa forma, a existência de moléculas inibidoras é explicada pela necessidade de as células se protegerem dos possíveis ativadores ambientais, que podem funcionar como sinais indevidos, levando à morte não fisiológica por apoptose. As IAPs apresentam um papel antiapoptótico inibindo a atividade das caspases efetoras 3 e 7 e a caspase iniciadora 9. O primeiro membro de genes da família das proteínas IAPs foi uma proteína baculoviral, que contribuía para manter a replicação viral através da sustentação da sobrevivência da célula hospedeira infectada⁵⁰. Todas as proteínas IAPs contêm um domínio baculoviral repetido (BIR), além dos domínios Really Interesting New Gene (RING) e o Caspase-Activating And Recruitment Domain (CARD). O domínio RING é uma E3 ubiquitina ligase, responsável pela ubiquitinação e degradação proteossômica de múltiplos substratos, incluindo Smac e proteínas IAP⁵¹. Essas são as únicas proteínas endógenas conhecidas que apresentam tal atividade. Ao longo dos anos, vários diferentes membros da família IAPs têm sido descritos por serem codificados pelo genoma humano:

⁴⁷ Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008 abr 15;15;7(8):1036-46. PubMed; PMID: 18414036.

⁴⁸ Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *CurrMol Med*. 2011 nov;11(8):633-649. PubMed; PMID: 21902653.

⁴⁹ Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*. 2007 jan;14(1):73-78. PubMed; PMID: 16946729.

⁵⁰ Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus genes with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993 abr;67(4):2168-74. PubMed; PMID: 8445726.

⁵¹ Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 jul;12:439-52. doi: 10.1038/nrm3143.

BIRC1/NAIP, BIRC2/c-IAP-1, BIRC3/c-IAP-2, BIRC4/XIAP, BIRC5/Survivina, BIRC6/BRUCE, BIRC7/ML-IAPe BIRC8/ILP2^{52,53}.

Acredita-se que as IAPs são uma causa da resistência à apoptose nas células cancerosas^{54,55}. Uma superexpressão de membros da família IAP tem sido observada em vários tumores sólidos, incluindo os cânceres de próstata, mama, pancreático, gástrico e melanoma^{56,57}.

Dentre as proteínas inibidoras da apoptose humana, a XIAP é a mais estudada e a mais potente inibidora das caspases⁵⁸, por ser a única IAP que inibe a caspase ativada madura em concentrações fisiológicas. É também a mais potente inibidora *in vitro* das caspases⁵⁹, a única da família capaz de inibir as caspases de forma direta⁶⁰. É formada por três domínios BIR (Baculoviral IAP Repeat), localizados na terminação NH₂, um domínio associado com a ubiquitina (UBA) e um domínio RING na terminação CO₂H, que tem atividade ubiquitina ligase⁶¹. A XIAP bloqueia, de maneira direta, as formas ativadas das caspases efetoras 3, 7 e iniciadora 9, via domínios BIR2 e 3 em contraste com c-IAP1 e c-IAP2, que não inibem diretamente as

⁵² Uren AJ, Coulson EJ, Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis (BIRPs) in viroses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci.* 1998;23:159-62.

⁵³ Salvensen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2002 jun;3(6):401-10. PubMed; PMID: 12042762.

⁵⁴ Pluta P, Jeziorski A, Pluta A, Cebula-Obrzut B, Wierzbowska A, Piekarski J, Smolewski P. Expression of IAP Family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma.* 2015;62(4):666-73. doi:10.4149/neo_2015_080.

⁵⁵ Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Disc.* 2012 fev 1;11(2):109-24. PubMed; PMID: 22293567.

⁵⁶ Watson RWG, Fitzpatrick JM. Targeting apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.* 2005 dez 16;96 Suppl s2:30-4. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05944.

⁵⁷ Chen N, Gong J, Chen X, Meng W, Huang Y, Zhao F, et al. Caspases and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance. *Hum Pathol.* 2009;40(7):950-6. doi: 10.1016/j.humpath.2008.12.001.

⁵⁸ Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosome Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1996;37(3):404-6.

⁵⁹ Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the Family. *EMBO Rep* 2006 out;7(10):988-94. PubMed; PMID: 17016456.

⁶⁰ Eckelman BP, Salvesen GS. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but not inhibit caspases. *J Biol Chem.* 2006 fev 10;281(6):3254-60. PubMed; PMID: 16339151.

⁶¹ Latour S, Aguilar C. XIAP deficiency syndrome in humans. *Seminars in cell and developmental biology.* 2015;39:115-23. PubMed; PMID: 25666262.

caspases⁶². Ela inibe as pró-caspases 3, 7 e 9 em concentrações fisiológicas por inserir um resíduo de ácido aspártico no sítio catalítico da caspase, correspondendo à orientação espacial inversa adotada pelos substratos ativadores quando estes se unem aos mesmos sítios catalíticos. Ela inibe tanto as vias de morte intrínseca (mitocondrial) quanto a extrínseca (via receptor de morte celular) da apoptose. Esse fenômeno não é visto com outra importante proteína antiapoptótica, a Bcl-2, que inibe o citocromo C a ser liberado da mitocôndria, mas não inibe a caspase diretamente. Outras proteínas IAPs, como c-IAP1 e c-IAP2, se unem às caspases efetoras 3 e 7, mas não conseguem interferir diretamente com suas atividades proteolíticas. Ao invés disso, neutralizam as caspases por ubiquitinação e induzem a sua degradação proteolítica^{63,64}. A XIAP é expressa em quase todos os tecidos e tipos celulares, sendo mais frequentemente superexpressa no tecido tumoral que em tecidos normais, incluindo o carcinoma mamário, e está fortemente associada a uma alta resistência terapêutica nos carcinomas da cérvix, ovário e próstata⁶⁵. Pode ser um alvo terapêutico através da criação de drogas como oligonucleotídeos antagonistas, que mimetizam a porção N-terminal da SMAC⁶⁶.

Eventualmente, a correlação entre os níveis elevados de XIAP e o comportamento clínico das neoplasias não é direta pois – apesar de sua expressão estar elevada em uma grande variedade de tumores que

⁶² Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*. 2001 jul 20;276(29):27058-63. doi: 10.1074/jbc.M102415200.

⁶³ Estornes Y, Bertrand MJ. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Seminars in Cell And Dev Biol*. 2015 mar;39:106-7. PubMed; PMID: 24718315.

⁶⁴ Choi YE, Butterworth M, Malladi S, Duckett CS, Cohen GM, Bratton SB. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem*. 2009 maio 8;284(19):12772-82. PubMed; PMID: 19258326.

⁶⁵ Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther*. 2013 set 16;6(9):1285-1304. doi: 10.2147/OTT.S33375.

⁶⁶ Tamm I. AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 jun;9(6):638-46. PubMed; PMID: 18516763.

apresentam quimiorresistência e prognóstico ruim^{67,68,69,70,71} – foi observado que sua expressão está relacionada ao bom prognóstico no câncer pulmonar de não pequenas células^{72,73}.

A survivina é implicada na regulação de processos celulares de sobrevivência, está relacionada com a evasão da apoptose, com a promoção da proliferação celular e com a regulação do processo mitótico^{74,75}. Acreditava-se que, se amplamente expressa em células fetais e embrionárias, não era expressa em células adultas normais não neoplásicas. Ela ocupa uma função no ciclo celular de a única IAP associada com estruturas cromatínicas⁷⁶, estando associada ao monitoramento do sucesso da segregação e replicação cromossômica, e supressão das caspases nucleares. Apesar de a survivina ser fracamente expressa em células adultas

⁶⁷ Zhang Y, Zhu J, Tang Y, Li F, Zhou H, Peng B, et al. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol*. 2011 Jun 7;6:49. doi: 10.1186/1746-1596-6-49.

⁶⁸ Lima FO, Costa H, Barrezueta LF, Oshima CTF, Silva Júnior JA, Gomes TS, et al. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. *Oncol Rep*. 2009 ago;22(2):295-303. PubMed; PMID: 19578769.

⁶⁹ Costa H, Lima FO, Barrezueta LFM, Oshima CTF, Silva Jr JA, Thiago TS, et al. Correlation between immunoexpression of BCL-2 protein family with apoptosis index, cellular proliferation and survival in colorectal carcinomas. *Applied Cancer Research*. 2011;31(3):74-80.

⁷⁰ Barrezueta LFM, Oshima CTF, Lima FO, Costa HO, Gomes TS, De Franco MF, et al. The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: Immunoexpression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis. *Mol Med Rep*. 2010 Mar-Apr;3(2):261-7. doi: 10.3892/mmr_00000249.

⁷¹ Gomes TS, Celina Oshima CTF, Segreto HRC, Barrezueta LM, Costa HO, Lima FO, et al. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. *Phatol Res Pract*. 2011 out 15;207(10):613-17.

⁷² Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Jonker JM, Postmus PE, Kruijt FA, et al. Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2001 Jun;12(6):799-805. PubMed; PMID: 11484955.

⁷³ Ferreira G, van der Valk P, Span W, Ludwig I, Smit F, Kruijt A, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 ago;7(8):2468-74. PubMed; PMID: 11489828.

⁷⁴ Oikawa T, Unno Y, Matsuno K, Sawada, Ogo N, Tanaka K, Asai A. Identification of a small-molecule inhibitor of the interaction between Survivin and Smac/Diablo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;393(2):253-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.113.

⁷⁵ Seligson DB, Hongo F, Huerta-Yepez S, Mizutani Y, Miki T, Yu H, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein is a Strong predictor of human prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 out 15;13(20):6053-63. PubMed; PMID: 17947468.

⁷⁶ Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002 nov; 89(2):213-28. PubMed; PMID: 12445661.

diferenciadas de qualquer órgão⁷⁷, é superexpressa em uma série de linhagens celulares transformadas e representa um dos poucos antígenos tumorais universais⁷⁸. No pulmão, intestino, pâncreas, próstata, carcinoma mamário, linfoma não-Hodgkin e no câncer de cabeça e pescoço, está associada ao aumento do índice proliferativo, aos padrões clínico patológicos mais agressivos, à maior probabilidade de recorrência e ao prognóstico pobre⁷⁹.

Nos processos malignos, a survivina evita que as células cancerígenas entrem em apoptose, facilitando a proliferação celular das células mutantes e consequente progressão tumoral⁸⁰. O exato mecanismo antiapoptótico da survivina é controverso⁸¹. Acredita-se que seus mecanismos de bloqueio da apoptose sejam mais que uma interação direta com as caspases efetoras, além de sua interação e bloqueio da função da Smac/DIABLO, o que permite a liberação das IAPs para se ligarem e inibirem os sítios específicos das caspases^{82,83}. Dessa forma, a sua superexpressão se encontra associada a uma maior resistência aos estímulos apoptóticos, incluindo a quimioterapia. Está significativamente relacionada com a mutação da proteína p53 em carcinomas mamários e ainda parece guardar correlação com a geração da linfangiogênese neste tipo de neoplasia, favorecendo a ocorrência de metástases linfáticas⁸⁴. A survivina está distribuída em concentrações

⁷⁷ Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, et al. Generation of survivin-specific CD8 CT effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 2000 set 1;60(17):4845-9. PubMed; PMID: 10987296.

⁷⁸ Stenner M, Weinell A, Ponert T, Hardt A, Hahn M, Preuss SF, et al. *Histopathology.* 2010;57:699-706.

⁷⁹ Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Stenner M, Semrau R, Drebber U, et al. Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Br J Cancer.* 2008 fev 12;98(3):627-32. doi: 10.1038/sj.bjc.6604192.

⁸⁰ Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews.* 2009 nov;35(7):553-62. PubMed; PMID: 19559538.

⁸¹ Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood.* 2000 Dec 1;96(12):4002-3. PubMed; PMID: 11186274.

⁸² Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000 jul 7;102(1):43-53. PubMed; PMID: 10929712.

⁸³ Du C, Fang M, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 jul 7;102(1):33-42. PubMed; PMID: 10929711.

⁸⁴ Li X, Dang X, Sun X. Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012; 33(2):178-82. PubMed; PMID:

celulares distintas e abrange o núcleo, o citoplasma e as mitocôndrias⁸⁵: a concentração nuclear, provavelmente, está envolvida com a da proliferação/divisão celular, fazendo parte da subunidade do complexo de passagem cromossômica, que toma parte no seu processo de segregação e citocinese, enquanto as concentrações citoplasmática e mitocondrial são consideradas citoprotetoras e envolvidas no controle da sobrevivência/viabilidade celular^{86,87,88}.

No nível nuclear, a survivina forma um complexo com outras proteinoquinasas e coordena a segregação cromossômica e a citocinese^{89,90,91}, sendo reconhecida como um fator indispensável na regulação da divisão celular⁹². O local da marcação imunoistoquímica da survivina é de crucial importância no prognóstico do carcinoma mamário, uma vez que a survivina nuclear indica um bom prognóstico, ao mesmo tempo que sua marcação citoplasmática revela um prognóstico mais pobre, com relação à recorrência da doença. Estudos recentes apontam que a ação da survivina é mais ampla do que a simples inibição da apoptose. É uma proteína multifuncional, que toma parte na regulação de uma variedade de vias moleculares e tem papel importante na proliferação celular tumoral, pois favorece o aumento na motilidade, na invasão e na migração celular, bem

22611959.

⁸⁵ Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell*. 2007 jul 6;27(1):17-28. PubMed; PMID: 17612487.

⁸⁶ Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci*. 2002 fev 1;115(Pt3):575-85. PubMed; PMID: 11861764.

⁸⁷ Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res*. 2007 jul 1;67(13):5999-6002. PubMed; PMID: 17616652.

⁸⁸ Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Inves*. 2004 out;114(8):1117-27. PubMed; PMID: 15489959.

⁸⁹ Lens SM, Vader G, Medema R.H. The case for survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:616-22.

⁹⁰ Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*. 2007 out 19;131(2):230-1. PubMed; PMID: 17956723.

⁹¹ Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2004 set 9;101(42):15100-5. doi: 10.1073/pnas.0406665101.

⁹² Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. 2010 set 1;430(2):199-205. PubMed; PMID: 20704571.

como na disseminação metastática além de sua adaptação a um microambiente desfavorável.

A proteína SMAC (Secondary Mitochondrial Activation of Caspases), também conhecida como DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pl), é uma proteína mitocondrial liberada no citossol, similar ao citocromo C depois de um estresse apoptótico. Exercerá um efeito pró-apoptótico mediado por sua interação com as IAPs, liberando a ligação das caspases com estas proteínas. Ela se liga a todas as IAPs que foram submetidas a estudos inibitórios. Uma particular terminação NH₂, que consiste em quatro aminoácidos (Ala-Val-Pro-Ile), é responsável pela sua interação com as IAPs⁹³. Apresenta ligação específica para os domínios BIR-2 e BIR-3 da XIAP e permite a liberação das caspases 3 e 9⁹⁴.

Vários estudos⁹⁵ têm mostrado que a superexpressão da Smac/DIABLO sensibiliza as células neoplásicas para a apoptose^{96,97}. Também foi observada uma correlação positiva entre a expressão de Smac/DIABLO com angiogênese no câncer cervical, de modo que venha a ser uma possível causa de recorrência⁹⁸.

A ação antiapoptótica de certas IAPS – a exemplo da survivina e da livina – ocorre por sequestração da Smac/DIABLO, e liberação das moléculas XIAP para inibir as caspases⁹⁹.

⁹³ Bai LC, Smith DC, Wang S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014;144:82-95.

⁹⁴ Gao Z, Tian Y, Wang J, Ying Q, Wu H, Li YM, et al. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. *J Biol Chem*. 2007 Oct 19;282(42):30718-27. PubMed; PMID: 17724022.

⁹⁵ Ibd. [ver nota 94]

⁹⁶ Kashkar H, Seeger JM, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermohlen O, Heimlich G, et al. XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood*. 2006;108(10):3434-40. doi: 10.1182/blood-2006-05-021675.

⁹⁷ Kashar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med*. 2003; 198(2):341-7.

⁹⁸ Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, DelaGarza JG, et al. High Smac/DIABLO expression. Is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer*. 2006 Oct 26;6:256. doi: 10.1186/1471-2407-6-256.

⁹⁹ Verhagen AM, Katrina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ*. 2007 Feb;14(2):348-57. PubMed; PMID: 16794601.

O número de células apoptóticas como um percentual das células presentes em um tecido neoplásico, ou o número de células apoptóticas por milímetro quadrado nesse tecido, é usualmente descrito como o índice apoptótico (AI, do inglês *Apoptotic Index*)^{100,101}.

Considerando-se o carcinoma mamário, o AI é maior no tipo carcinoma ductal invasivo, em comparação a outros subtipos, e também está relacionado a um maior grau histológico, ao alto grau nuclear, à necrose tipo comedônica, à ausência de formação de túbulos e à densa infiltração tumoral linfocítica e, além disso, guarda uma correlação inversa com a expressão do gene antiapoptótico Bcl-2 e do receptor estrogênico no carcinoma mamário. Em contrapartida, demonstra uma correlação positiva com o marcador de proliferação celular Ki-67 e com a superexpressão do gene p53. Um mecanismo regulatório comum pode justificar a correlação entre os níveis de apoptose e proliferação. Fatores de crescimento podem estar envolvidos na ativação de oncogenes que podem atuar na dupla via de apoptose e proliferação¹⁰².

Uma correlação direta entre o índice apoptótico (AI) e a imunoexpressão de SMAC é esperada, uma vez que essa proteína é a principal inibidora da XIAP, que libera a caspase 3 para o processo de apoptose.

As atuais estratégias de pesquisas que envolvem agentes terapêuticos relacionados com a promoção do aumento na sensibilidade para a apoptose nas células tumorais visa inibir as IAPs, seja pela criação de inibidores moleculares ou de proteínas Smac-símile, resultando, desse modo, em aumento da eficácia do processo apoptótico induzido pela química e radioterapia¹⁰³.

¹⁰⁰ Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol.* 1998 out;153(4):1041-53. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65649-0.

¹⁰¹ Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by surviving. *Oncogene.* 2007, 26:7569-7575.

¹⁰² Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with others pathological parameters. *Endocrine-Related Cancer.* 1999;6:13-6.

¹⁰³ ver *notas 58 a 62.*

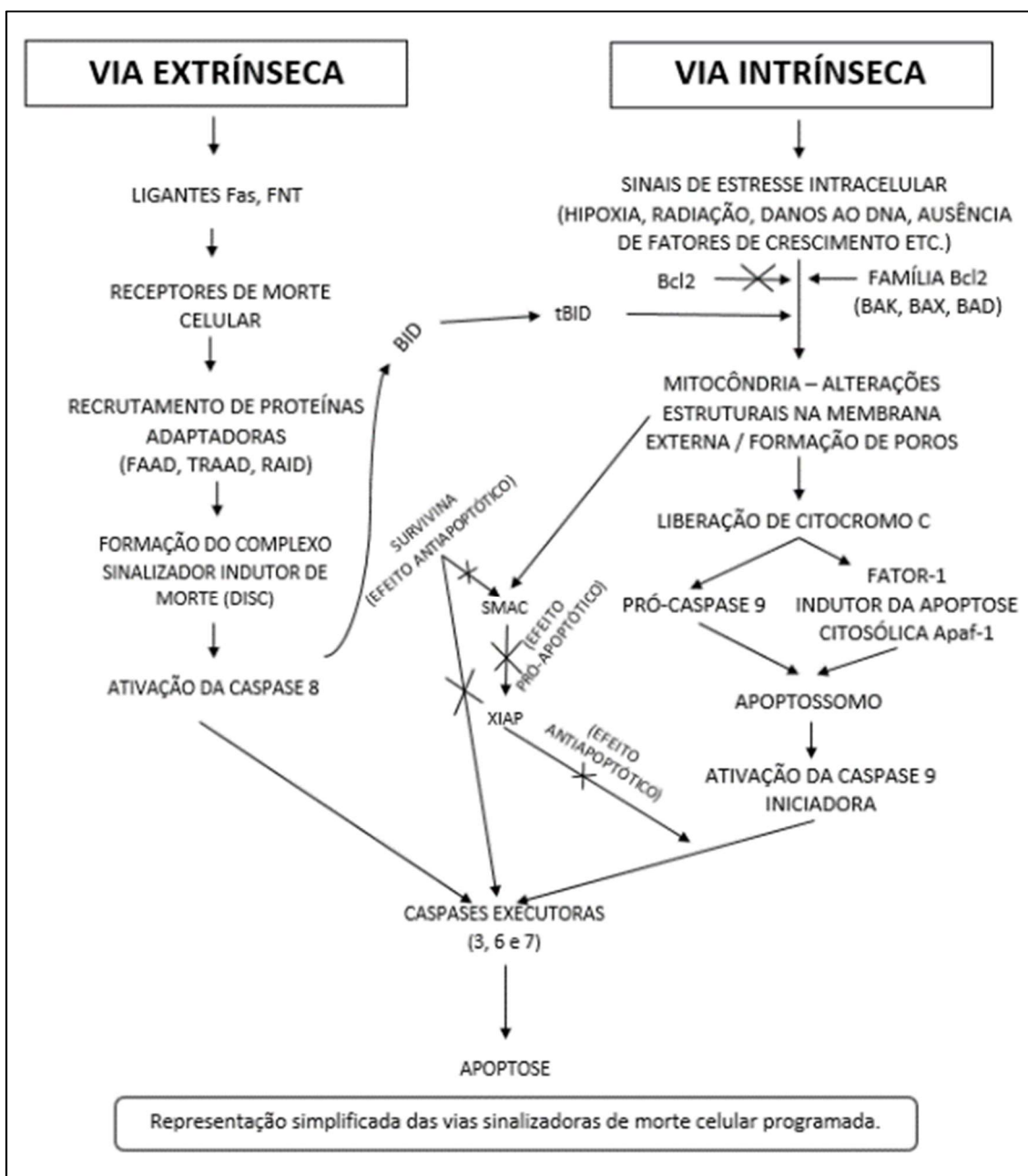


Figura 1 – Esquema do processo apoptótico pelas vias extrínseca e intrínseca

FONTE: Adaptada pelo autor, baseada nas informações que constam no artigo Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol.* 2001 abr-jun; 38(2):138-44. (grifo do autor)

Referências

REFERÊNCIAS

- 1) Cancer. In: World Health Organization [Internet]. [acesso em 2016 out 19]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- 2) Kozłowska E, Szewczyk MT, Banaszkiwicz Z, Jawień A, Cierzniakowska K, Jarmocik P. Knowledge of symptoms and diagnostic possibilities of cancer diseases. Arch Med Sci. 2011 abr;7(2):304-9. PubMed; PMID 22291771.
- 3) Mcardle CS, McMillan DC, Greenlaw N, Morrison DS. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in breast cancer: 30year follow-up of survival. BMC Cancer. 2010 jul 30;30:398. DOI: 10.1186/1471-2407-10-398.
- 4) Kimberly H, Allison MD. Molecular Pathology of Breast Cancer: what a Pathologist Needs to Know. Am J Clin Pathol. 2012;138:770-80. doi: 10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO.
- 5) Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer, experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19(5):403-10. PubMed; PMID 1757079.
- 6) Viale G. The current state of breast cancer classification. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. ESMO. 2012;23(suppl 10):x207-x10. doi:10.1093/annonc/mds326.
- 7) Nature. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. 2012 out 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.
- 8) Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. Mod Pathol. 2010 maio;23 Suppl2:S60-4. PubMed; PMID 20436504.
- 9) Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. JAMA, 2006 jun 7;295(21):2492-502. PubMed; PMID 16757721.
- 10) Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res. 2008 mar 1;14(5):1368-76. PubMed; PMID 18316557.

- 11) Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 maio 20;101(10):736-50. PubMed; PMID: 19436038.
- 12) Glinsky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev.* 2007 jan;3(1):79-93. PubMed; PMID:17873385.
- 13) Kararala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J. Clin Oncol.* 2008 jun 10;26(17):2813-20. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.3931.
- 14) Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 maio 13;100(10):5974-9. PubMed; PMID: 12714683.
- 15) Weinberg RA. Mechanisms of Malignant progression. *Carcinogenesis*, 2008 jun; 29(6):1092-5. PubMed; PMID: 18453542.
- 16) Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289.
- 17) Pluta P, Jeziorski A, Pluta A, Cebula-Obrzut A, Wierzbowska A, Piekarski J, Smolewski P. Expression of IAP family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma.* 2015;62(4):666-73. PubMed; PMID: 25997966.
- 18) Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int. J.Mol Sci.* 2015 fev;16(2):2942-55. doi:10.3390/ijms16022942.
- 19) Julian L, Olson MF. Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton.* 2015;7;133-142. doi: <https://dx.doi.org/10.2147/CHC.S57893>.
- 20) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 ago;26(4):239-57. PubMed; PMID: 4561027.
- 21) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 jan 7;100:57-70. PubMed; PMID: 10647931.
- 22) Locckshin R, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J. Cell Mol Med.* 2007;11:1214-24.
- 23) Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. *Mol Cell Bio.* 2008 mar; 9(3):231-40.

- 24) Tomei LD, Cope, FO, editores. Apoptosis: The molecular Basis of Cell Death; Stought, WI, USA: Books on demand; 1991.
- 25) Fulda S. Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins as therapeutic targets for radiosensitization of humans cancers. *Cancer Treatment Reviews*. 2012 out;38(6):760-66. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.005>.
- 26) Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*.2009 fev 1;124(3):511-5. PubMed; PMID: 19003982.
- 27) Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinic tumour supression. *Nature*. 2004 nov 18;432(7015):307-15. doi:10.1038/nature03098.
- 28) Ludwig-Galezowska AH, Flanagan L, Rehm M. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain: a multifunctional modulator of cell death. *J Cell Mol Med*. 2011 nov 19; 15(5);1044-53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01221.x.
- 29) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 jan 7;100;57-70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- 30) Rodel F, Reichert S, Sprenger T, Gaipf US, Mirsch J, LierschT, et al. The role of surviving for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition. *Current Medical Chemistry*. 2011;18(2):191-9. doi: 10.2174/092986711794088362.
- 31) Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer.*, 2005 mar;5(3):231-7. PubMed; PMID: 15738985.
- 32) Eccles AS, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007 maio 19;369(9574):1742-57. PubMed; PMID: 17512859.
- 33) Simstein R, Burrow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 out;228(9):995-1003. PubMed; PMID: 14530507.
- 34) de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2000 jan;82(2):368-73. PubMed; PMID: 10646890.
- 35) Fulda S. Targeting IAP proteins in combination with radiotherapy. *Rad Oncol*. 2015 abr 26;10:105. PubMed; PMID: 25927408.

- 36) Shao ZM, Li J, Wu J, Han QX, Shen ZZ, Fontana JA, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer induces apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 fev;53(3):263-9. doi: 10.1023/A:1006194921139.
- 37) Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006 ago 7;25(34):4798-811. PubMed; PMID: 16892092.
- 38) Parish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 jun 1;5(6). pii: a008672. doi;10.1101/cshperspect.a008672.
- 39) Kromer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.* 2008 out 10;16(1):3-11. PubMed; PMID: 18846107.
- 40) Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 jun-ago;19(3-4):325-31. PubMed; PMID: 18495520.
- 41) Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FAAD and caspase-8. *Nat Cell Biol.* 2000 abr;2(4):241-3. PubMed; PMID: 10783243.
- 42) Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 set;2(9):647-56. PubMed; PMID: 12209154.
- 43) Dewson G, Kratina T, Czabotar L, Adams M, Kluck M. Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha helices. *Mol Cell.* 2009 nov 25;36(4):696-703. PubMed; PMID: 19941828.
- 44) Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 jun;9(6):447-64. PubMed; PMID: 20467424.
- 45) Goldstein C, Waterhouse J, Juin P, Evan I, Green R. The Coordinate release of cytochrome C during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000 mar;2(3):156-62. PubMed; PMID: 10707086.
- 46) Ghavami S, Kerkoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. Mechanism of apoptosis induced by s100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of the metal ions. *J Leukoc Biol.* 2004 jul;76(1):169-75. PubMed; PMID: 15075348.

- 47) Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008 abr 15;15(7):1036-46. PubMed; PMID: 18414036.
- 48) Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *CurrMol Med*. 2011 nov;11(8):633-649. PubMed; PMID: 21902653.
- 49) Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*. 2007 jan;14(1):73-78. PubMed; PMID: 16946729.
- 50) Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus genes with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993 abr;67(4):2168-74. PubMed; PMID: 8445726.
- 51) Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 jul;12:439-52. doi: 10.1038/nrm3143.
- 52) Uren AJ, Coulson EJ, Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis (BIRPs) in viroses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci*.1998;23:159-62.
- 53) Salvensen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2002 jun;3(6):401-10. PubMed; PMID: 12042762.
- 54) Pluta P, Jeziorski A, Pluta A, Cebula-Obrzut B, Wierzbowska A, Piekarski J, Smolewski P. Expression of IAP Family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma*. 2015;62(4):666-73. doi:10.4149/neo_2015_080.
- 55) Fulda S, VucicD. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Disc*.2012 fev 1;11(2):109-24. PubMed; PMID: 22293567.
- 56) Watson RWG, Fitzpatrick JM. Targeting apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int*. 2005 dez 16;96 Suppl s2:30-4. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05944.
- 57) Chen N, Gong J, Chen X, Meng W, Huang Y, Zhao F, et al. Caspases and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance. *Hum Pathol*. 2009;40(7):950-6. doi: 10.1016/j.humpath.2008.12.001.

- 58) Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosome Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996;37(3):404-6.
- 59) Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the Family. *EMBO Rep* 2006 out;7(10):988-94. PubMed; PMID: 17016456.
- 60) Eckelman BP, Salvesen GS. The human anti-apoptotic proteins clAP1 and clAP2 bind but not inhibit caspases. *J Biol Chem*. 2006 fev 10;281(6):3254-60. PubMed; PMID: 16339151.
- 61) Latour S, Aguilar C. XIAP deficiency syndrome in humans. *Seminars in cell and developmental biology*. 2015;39:115-23. PubMed; PMID: 25666262.
- 62) Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*. 2001 jul 20;276(29):27058-63. doi: 10.1074/jbc.M102415200.
- 63) Estornes Y, Bertrand MJ. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Seminars in Cell And Dev Biol*. 2015 mar;39:106-7. PubMed; PMID: 24718315.
- 64) Choi YE, Butterworth M, Malladi S, Duckett CS, Cohen GM, Bratton SB. The E3 ubiquitin ligase clAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem*. 2009 maio 8;284(19):12772-82. PubMed; PMID: 19258326.
- 65) Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther*. 2013 set 16;6(9):1285-1304. doi: 10.2147/OTT.S33375.
- 66) Tamm I. AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 jun;9(6):638-46. PubMed; PMID: 18516763.
- 67) Zhang Y, Zhu J, Tang Y, Li F, Zhou H, Peng B, et al. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. *DiagnPathol*. 2011 jun7;6:49. doi: 10.1186/1746-1596-6-49.

- 68) Lima FO, Costa H, Barrezueta LF, Oshima CTF, Silva Júnior JA, Gomes TS, et al. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. *Oncol Rep.* 2009 ago;22(2):295-303. PubMed; PMID: 19578769.
- 69) Costa H, Lima FO, Barrezueta LFM, Oshima CTF, Silva Jr JA, Thiago TS, et al. Correlation between immunoexpression of BCL-2 protein family with apoptosis index, cellular proliferation and survival in colorectal carcinomas. *Applied Cancer Research.* 2011;31(3):74-80.
- 70) Barrezueta LFM, Oshima CTF, Lima FO, Costa HO, Gomes TS, De Franco MF, et al. The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: Immunoexpression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis. *Mol Med Rep.* 2010 Mar-Apr;3(2):261-7. doi: 10.3892/mmr_00000249.
- 71) Gomes TS, Celina Oshima CTF, Segreto HRC, Barrezueta LM, Costa HO, Lima FO, et al. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. *Phatol Res Pract.* 2011 out 15;207(10):613-17.
- 72) Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Jonker JM, Postmus PE, Kruijt FA, et al. Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2001 jun;12(6):799-805. PubMed; PMID: 11484955.
- 73) Ferreira G, van der Valk P, Span W, Ludwig I, Smit F, Kruijt A, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001 ago;7(8):2468-74. PubMed; PMID: 11489828.
- 74) Oikawa T, Unno Y, Matsuno K, Sawada, Ogo N, Tanaka K, Asai A. Identification of a small-molecule inhibitor of the interaction between Survivin and Smac/Diablo. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010;393(2):253-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.113.
- 75) Seligson DB, Hongo F, Huerta-Yepez S, Mizutani Y, Miki T, Yu H, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein is a Strong predictor of human prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007 out 15;13(20):6053-63. PubMed; PMID: 17947468.

- 76) Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002 nov; 89(2);213-28. PubMed; PMID: 12445661.
- 77) Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, et al. Generation of survivin-specific CD8 CT effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 2000 set 1;60(17);4845-9. PubMed; PMID: 10987296.
- 78) Stenner M, Weinell A, Ponert T, Hardt A, Hahn M, Preuss SF, et al. *Histopathology.* 2010;57:699-706.
- 79) Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Stenner M, Semrau R, Drebber U, et al. Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Br J Cancer.* 2008 fev 12;98(3):627-32. doi: 10.1038/sj.bjc.6604192.
- 80) Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews.* 2009 nov;35(7);553-62. PubMed; PMID: 19559538.
- 81) Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood.* 2000 Dec 1;96(12):4002-3. PubMed; PMID: 11186274.
- 82) Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000 jul 7;102(1):43-53. PubMed; PMID: 10929712.
- 83) Du C, Fang M, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 jul 7;102(1):33-42. PubMed; PMID: 10929711.
- 84) Li X, Dang X, Sun X. Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2012; 33(2):178-82. PubMed; PMID: 22611959.
- 85) Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell.* 2007 jul 6;27(1):17-28. PubMed; PMID: 17612487.
- 86) Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved

- in spindle microtubule function. *J Cell Sci.* 2002 fev 1;115(Pt3):575-85. PubMed; PMID: 11861764.
- 87) Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res.* 2007 jul 1;67(13):5999-6002. PubMed; PMID: 17616652.
- 88) Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Inves.* 2004 out;114(8):1117-27. PubMed; PMID: 15489959.
- 89) Lens SM, Vader G, Medema R.H. The case for survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:616-22.
- 90) Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell.* 2007 out 19;131(2):230-1. PubMed; PMID: 17956723.
- 91) Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004 set 9;101(42):15100-5. doi: 10.1073/pnas.0406665101.
- 92) Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J.* 2010 set 1;430(2):199-205. PubMed; PMID: 20704571.
- 93) Bai LC, Smith DC, Wang S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics.* 2014;144:82-95.
- 94) Gao Z, Tian Y, Wang J, Ying Q, Wu H, Li YM, et al. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):30718-27. PubMed; PMID: 17724022.
- 95) Kashkar H, Seeger JM, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermohlen O, Heimlich G, et al. XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood.* 2006;108(10):3434-40. doi: 10.1182/blood-2006-05-021675.
- 96) Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med.* 2003; 198(2):341-7.
- 97) Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, DelaGarza JG, et al. High Smac/DIABLO expression. Is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer.* 2006 out 26;6:256. doi: 10.1186/1471-2407-6-256.

- 98) Verhagen AM, Katrina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL.
Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via
N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ.* 2007 fev;14(2):348-57.
PubMed; PMID: 16794601.
- 99) Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in
cancer. *Am J Pathol.* 1998 out;153(4):1041-53. doi: 10.1016/S0002-
9440(10)65649-0.
- 100) Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J.
Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by surviving.
Oncogene. 2007, 26:7569-7575.
- 101) Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with others pathological
parameters. *Endocrine-Related Cancer.* 1999;6:13-6.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar a imunexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (Survivina, XIAP) e da proteína antagonista destas, a Smac/DIABLO, correlacionando os resultados com a imunexpressão do índice de proliferação celular (Ki67), índice apoptótico, receptor de Estrógeno (RE), receptor de Progesterona (RP), HER-2, p53 e sobrevida no carcinoma mamário ductal invasivo, sem outra especificação (SOE).

Capítulo II
Artículo Científico

Resumo

RESUMO

Introdução: A maioria dos tumores malignos da mama apresenta aspecto morfológico de carcinoma ductal invasivo que pode apresentar diferentes prognósticos. Diante disso, conclui-se que a identificação do padrão morfológico não é suficiente para o estabelecimento do prognóstico, e que existe a necessidade da identificação de novos biomarcadores imunoistoquímicos que indiquem moléculas sinalizadoras importantes para proliferação e sobrevivência das células neoplásicas, e que possam ser alvos de modalidades terapêuticas oncológicas. A ocorrência de alterações dos mecanismos regulatórios genéticos da apoptose pode resultar em uma hiperativação das proteínas antiapoptóticas, com a perda da sensibilidade aos sinais de morte fisiológica, evitando-se a ocorrência da apoptose e resultando, desse modo, na preservação de células geneticamente alteradas com conseqüente aumento no seu número. Esse é um evento crítico para o início do crescimento tumoral, com repercussões no prognóstico e na resistência ao tratamento oncológico. Dessa forma, o entendimento da maquinaria das vias do processo apoptótico é de crucial importância na avaliação prognóstica do processo neoplásico, pois suas moléculas são importantes biomarcadores da proliferação e sobrevivência celular. **Objetivos:** Avaliar a relação entre as proteínas inibidoras do processo apoptótico (IAPs) e seu inibidor Smac/DIABLO no carcinoma mamário ductal invasivo, sem outra especificação (SOE). Analisar, também, sua correlação com os marcadores imunoistoquímicos usuais, aplicados para a avaliação prognóstica, índice apoptótico e taxa de sobrevivência dos pacientes. **Material e Métodos:** Foram confeccionados blocos de parafina de TMA com tecido de câncer mamário ductal invasivo sem outra especificação (SOE), extraído de pacientes operadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, entre 1980 e 2000. Estes foram submetidos à reação imunoistoquímica para Survivina, XIAP, Smac, Caspase 3 clivada (índice apoptótico) e Ki67 (índice de proliferação celular), RE, RP, HER2, P53. Dois patologistas realizaram a leitura das lâminas e obteve-se escores de intensidade de imunexpressão e/ou percentuais de positividade celular. Esses escores foram correlacionados entre as proteínas apoptóticas, com outros marcadores imunoistoquímicos

prognósticos usuais, com os dados de sobrevida dos pacientes, com o grau histológico e com o perfil molecular específico do carcinoma ductal invasivo. **Resultados:** Ocorreu uma correlação positiva entre Smac, Survivina e XIAP, houve maior intensidade de imunexpressão dos marcadores de apoptose nos tumores de maior grau e uma correlação de imunexpressão inversa entre Smac e um status hormonal positivo. Um estímulo pró-apoptótico pareceu ser dominante no carcinoma mamário de subtipo molecular HER2, quando comparado a outros subtipos. XIAP foi a única proteína apoptótica estudada que guardou correlação com a taxa de mortalidade. **Conclusão:** A detecção de uma correlação estatística significativa entre as proteínas apoptóticas, corrobora a integração múltipla que ocorre entre essas durante o processo apoptótico no carcinoma mamário invasivo, sem outra especificação (SOE). Estudos adicionais das proteínas apoptóticas com uma maior amostragem de pacientes serão necessários para o estabelecimento de valores prognósticos mais acurados de sobrevida.

Palavras-chave: carcinoma ductal invasivo SOE, imunistoquímica, IAPs, SMAC, apoptose, prognóstico.

Abstract

ABSTRACT

Background: Most of malignant breast tumors exhibit morphological aspect of invasive ductal carcinoma, not otherwise specified(NOS)carcinoma, that can present different prognosis. It concludes that the identification of the morphological type of the breast cancer is not enough to establish tumor prognosis. So there is the need to recognize new immunohistochemistry biomarkers that can identify important molecular signaling proteins of neoplastic cell proliferation and survival that can be used as target of oncological therapeutic. Changes in these regulatory mechanisms that favors the hiperactivation of antiapoptotic proteins can set the loss of the physiological signs of cell death avoiding the occurrence of apoptosis and preserving genetic modified cells. This is a critical event to the beginning of tumor growth which may further lead to repercussions in prognosis and cancer resistance to therapy. The knowledge about the different pathways to apoptosis is crucial to evaluate the prognosis of the neoplastic process. **Objectives:** To study the relation between the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonist, the protein SMAC/DIABLO, in invasive ductal breast carcinoma and also evaluate their correlation with the usual prognostic immunohistochemical markers, Apoptotic Index and clinical prognostics factors. **Design:** TMA paraffin blocks were made with invasive ductal breast carcinoma tissue samples of patients operated at the Botucatu School of Medicine Hospital from 1980 to 2000. Those samples were submitted to immunohistochemical reactions to Survivin, XIAP, cleaved Caspase 3 (apoptotic index) and Ki67 (cell proliferation index), RE, RP, HER2, P53. Two experienced pathologists analyzed the microscope slides and retrieved intensity scores and/or the percentage of positive cells of immune-expression. Those scores were interrelated and with IA, anti-cleaved caspase 3, the other usual immunohistochemical biomarkers and survival patients records, as well as the specific type and grade of the invasive ductal carcinoma. **Results:** There was a positive correlation between SMAC, Survivina and XIAP, as well as a higher immunoexpression intensity of apoptosi's markers with high grade tumor, and a inverse immunoexpression correlation between SMAC and positive progesterone hormonal status. The pro-apoptotic stimulus seemed be

dominant in breast carcinoma HER2 molecular subtype when compared to other subtypes. A pro-apoptotic stimulus seemed to be dominant in breast carcinoma HER2 molecular subtype when compared to other subtypes. XIAP was the only one apoptotic protein studied that played correlation with mortality rate. **Conclusion:** The detection of a statistically significant correlation between the apoptotic proteins corroborates the multiple integration that occurs between these during the apoptotic process in invasive mammary carcinoma with no other specification. Further studies of apoptotic proteins in a large survey will be necessary to establish more accurate values of prognostic survival.

Key words: breast ductal carcinoma NOS, immunohistochemistry, IAPs, SMAC, apoptosis, prognosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Dentre as causas de morte pelo câncer de mama nas mulheres com idade entre os 20 e os 59 anos, o câncer de mama é a causa líder mundial¹. A introdução da graduação histológica de Bloom e Richardson, modificada por Elston e Ellis, foi de grande importância para mostrar a forte associação entre os graus histológicos e prognóstico². Mais de 80% dos tumores malignos da mama apresentam aspecto morfológico de carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE). A introdução às novas técnicas de subtipagem gênica demonstrou que o câncer de mama é um grupo de desordens neoplásicas molecularmente distintas³. Dessa forma, subtipos morfológicamente similares de câncer mamário podem apresentar grande variabilidade de comportamento clínico.

Perou et al. determinaram a classificação molecular do câncer de mama em, pelo menos, cinco subtipos moleculares: padrão triplo negativo (RE-,RP-,HER2- e CK5/6+ e ou EGRF+); luminal A (RE+ e/ou RP+,HER2- e Ki 67<14%); luminal B (RE + e/ou RP+,HER2- e Ki 67>ou igual a 14%); luminal híbrido (RE+ e/ou RP+,HER2+) e grupo HER2 (RE-,RP- e HER2+). Posteriormente, outros trabalhos englobaram o subtipo luminal híbrido ao subtipo luminal B^{4,5}. Essa classificação prova que tais variantes moleculares do câncer de mama surgem de diferentes células-tronco ou progenitoras

¹ Cancer. In: World Health Organization [Internet]. [acesso em 2016 out 19]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

² Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer, experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991;19(5):403-10. PubMed; PMID 1757079.

³ Viale G. The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. ESMO*. 2012;23(suppl 10):x207-x10. doi:10.1093/annonc/mds326.

⁴ Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 mar 1;14(5):1368-76. PubMed; PMID 18316557.

⁵ Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 maio 20;101(10):736-50. PubMed; PMID: 19436038.

transformadas, cada uma com suas propriedades biológicas distintas, consequente prognóstico e resposta terapêutica variada^{6,7}.

Atualmente, o desafio para os patologistas frente ao câncer de mama não inclui apenas a sua identificação histopatológica. Inclui, também, a necessidade de pesquisar novos e diferentes biomarcadores e vias biológicas moleculares que possam estar envolvidas em determinar o prognóstico, a resposta e a resistência à terapia nos diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama podendo, assim, ser usados para uma melhoria na sobrevida e, igualmente, ser alvos para uma manipulação terapêutica mais efetiva^{8,9,10}.

A apoptose é um importante mecanismo de morte celular envolvida na homeostase tecidual, defesa imunológica e supressão da oncogênese^{11,12,13,14,15}. A disfunção da maquinaria do processo apoptótico é considerado um evento crucial da oncogênese além de conferir as células cancerosas resistência as terapias oncológicas atuais¹⁶.

⁶ Glinsky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev.* 2007 jan;3(1):79-93. PubMed; PMID:17873385.

⁷ Kararala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J. Clin Oncol.* 2008 jun 10;26(17):2813-20. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.3931.

⁸ Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289.

⁹ Pluta P, Jeziorski A, Pluta A, Cebula-Obrzut A, Wierzbowska A, Piekarski J, Smolewski P. Expression of IAP family proteins and its clinical importance in breast cancer patients. *Neoplasma.* 2015;62(4):666-73. PubMed; PMID: 25997966.

¹⁰ Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015 fev;16(2):2942-55. doi:10.3390/ijms16022942.

¹¹ Julian L, Olson MF. Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton.* 2015;7;133-142. doi: <https://dx.doi.org/10.2147/CHC.S57893>.

¹² Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 ago;26(4):239-57. PubMed; PMID: 4561027.

¹³ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 jan 7;100:57-70. PubMed; PMID: 10647931.

¹⁴ Locckshin R, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J. Cell Mol Med.* 2007;11:1214-24.

¹⁵ Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. *Mol Cell Bio.* 2008 mar; 9(3):231-40.

¹⁶ Sun H, Liu L, Lu J, Bai L, Li X, Nikolovska-Coleska Z, et al. Potent bivalent Smac mimetics: effect of the linker on binding to inhibitor of apoptosis protein (IAPs) and anticancer activity. *J. Med. Chem.* 2011 maio 12;54:3306-18. PubMed; PMID: 21462933.

O processo apoptótico pode ser ativado por duas vias: a via dos receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca)¹⁷. Ambas vias promovem a ativação da cascata das caspases, uma família de proteases aspartato-cisteínicas específicas, que são as enzimas efetoras do processo apoptótico que atuam na clivagem de proteínas celulares importantes, determinando o desmonte celular¹⁸.

A atividade das caspases maduras é negativamente regulada por sua interação com proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)^{19,20}.

As IAPs são uma família de proteínas inibidoras da apoptose, presentes na maioria dos tecidos normais e codificadas por genes presentes nos mamíferos e filogeneticamente conservados. Elas também são encontradas na *Drosophila* e em certos vírus²¹. O processo apoptótico envolve uma série de mecanismos amplificadores que, uma vez disparados, rapidamente alcançam a irreversibilidade. Dessa forma, a existência de moléculas inibidoras é explicada pela necessidade de as células se protegerem dos possíveis ativadores ambientais, que podem funcionar como sinais indevidos, levando à morte não fisiológica por apoptose. Dentre as proteínas inibidoras da apoptose humana, a XIAP é a mais estudada e a mais potente inibidora das caspases²², por ser a única IAP que inibe a caspase ativada madura em concentrações fisiológicas. É também a mais potente inibidora *in vitro* das caspases²³, a única da família capaz de inibir as caspases

¹⁷ Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006 ago 7;25(34):4798-811. PubMed; PMID: 16892092.

¹⁸ Parish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 jun 1;5(6). pii: a008672. doi;10.1101/cshperspect.a008672.

¹⁹ Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008 abr 15;15;7(8):1036-46. PubMed; PMID: 18414036.

²⁰ Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *Curr Mol Med*. 2011 nov;11(8):633-649. PubMed; PMID: 21902653.

²¹ Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*. 2007 jan;14(1):73-78. PubMed; PMID: 16946729.

²² Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosome Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996;37(3):404-6.

²³ Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the Family. *EMBO Rep* 2006 out;7(10):988-94. PubMed; PMID: 17016456.

de forma direta²⁴. É formada por três domínios BIR (Baculoviral IAP Repeat), localizados na terminação NH₂, um domínio associado com a ubiquitina (UBA) e um domínio RING na terminação CO₂H, que tem atividade ubiquitina ligase²⁵. A XIAP bloqueia, de maneira direta, as formas ativadas das caspases efetoras 3, 7 e iniciadora 9, via domínios BIR2 e 3 em contraste com c-IAP1 e c-IAP2, que não inibem diretamente as caspases²⁶. Apesar de a survivina ser fracamente expressa em células adultas diferenciadas de qualquer órgão²⁷, é superexpressa em uma série de linhagens celulares transformadas e representa um dos poucos antígenos tumorais universais²⁸. Acredita-se que seus mecanismos de bloqueio da apoptose sejam mais que uma interação direta com as caspases efetoras, além de sua interação e bloqueio da função da Smac/DIABLO, o que permite a liberação das IAPs para se ligarem e inibirem os sítios específicos das caspases^{29,30}. Dessa forma, a sua superexpressão se encontra associada a uma maior resistência aos estímulos apoptóticos, incluindo a quimioterapia.

A proteína SMAC (Secondary Mitochondrial Activation of Caspases), também conhecida como DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOW pI), é uma proteína mitocondrial liberada no citossol, similar ao citocromo C depois de um estresse apoptótico. Exercerá um efeito pró-apoptótico mediado por sua interação com as IAPs, liberando a ligação das caspases com estas proteínas.

²⁴ Eckelman BP, Salvesen GS. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but not inhibit caspases. *J Biol Chem*. 2006 fev 10;281(6):3254-60. PubMed; PMID: 16339151.

²⁵ Latour S, Aguilar C. XIAP deficiency syndrome in humans. *Seminars in cell and developmental biology*. 2015;39:115-23. PubMed; PMID: 25666262.

²⁶ Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*. 2001 jul 20;276(29):27058-63. doi: 10.1074/jbc.M102415200.

²⁷ Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, et al. Generation of survivin-specific CD8 CT effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res*. 2000 set 1;60(17):4845-9. PubMed; PMID: 10987296.

²⁸ Stenner M, Weinell A, Ponert T, Hardt A, Hahn M, Preuss SF, et al. *Histopathology*. 2010;57:699-706.

²⁹ Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000 jul 7;102(1):43-53. PubMed; PMID: 10929712.

³⁰ Du C, Fang M, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 jul 7;102(1):33-42. PubMed; PMID: 10929711.

O número de células apoptóticas como um percentual das células presentes em um tecido neoplásico, ou o número de células apoptóticas por milímetro quadrado nesse tecido, é usualmente descrito como o índice apoptótico (AI, do inglês *Apoptotic Index*)^{31,32}.

Uma correlação direta entre o índice apoptótico (AI) e a imunexpressão de SMAC é esperada, uma vez que essa proteína é a principal inibidora da XIAP, que libera a caspase 3 para o processo de apoptose.

As atuais estratégias de pesquisas que envolvem agentes terapêuticos relacionados com a promoção do aumento na sensibilidade para a apoptose nas células tumorais visa inibir as IAPs, seja pela criação de inibidores moleculares ou de proteínas Smac-símile, resultando, desse modo, em aumento da eficácia do processo apoptótico induzido pela químico e radioterapia.

³¹ Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol.* 1998 out;153(4):1041-53. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65649-0.

³² Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by surviving. *Oncogene.* 2007, 26:7569-7575.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado o levantamento retrospectivo de informações clínicas e de sobrevida de pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário. Entretanto, para esse estudo, foram separados os casos apenas de carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE), operados por nodulectomia, segmentectomia ou mastectomia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), no período de 1980 até 2000. As amostras teciduais embocadas em parafina, pertencentes a pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE), foram separadas e novas lâminas coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina foram confeccionadas a partir destes. Estas foram revisadas por dois patologistas experientes, sendo feita uma reanálise dos diagnósticos e da graduação tumoral de acordo com o sistema proposto por Scarff, Bloom e Richardson e modificada por Elston e Ellis (ANEXO A), excluindo-se os casos em que o tecido tumoral não era viável ou disponível. Com isso, foram selecionados 311 casos nos quais o material se encontrava em quantidade suficiente e em bom estado de conservação para análise. Para o estudo dos casos-controle, foram selecionados os blocos de parafina e nova análise das lâminas histológicas resultantes de dezesseis pacientes operadas por mamoplastia redutora devido à hiperplasia adiposa, sem neoplasia mamária, de período semelhante ao das pacientes de nossa casuística. Posteriormente, foi feita a marcação e seleção de sítios tumorais nas respectivas lâminas histológicas e, em seguida, nos blocos de parafina das pacientes selecionadas, para remoção de dois fragmentos cilíndricos teciduais de cada neoplasia, utilizados na construção de três blocos receptores de Tissue Microarray (TMA). Essa técnica descrita por Kononen, permite que numerosas amostras teciduais sejam tecnicamente processadas e avaliadas de uma única vez, sendo utilizada mais comumente na pesquisa de novos marcadores prognósticos. Também permite uma melhor padronização das reações imunoistoquímicas, visto que todas são feitas no mesmo procedimento, sem variações naturalmente inerentes a

procedimentos feitos em tempos diferentes, mesmo quando são previamente padronizados.

Os critérios para avaliar a imunexpressão de XIAP, Survivina, Smac/DIABLO foram adotados, de acordo com a intensidade da imunocoloração, categorizadas em escala de 4, onde: 0 (zero) foi considerado como negativo; 1 como positividade fraca; 2 como positividade média; e 3 como positividade forte. Os resultados para Survivina foram considerados, de acordo com a localização celular da reação, se marcação nuclear e/ou citoplasmática.

A avaliação de imunexpressão dos índices de proliferação celular (Ki67) e índice apoptótico (IA – Caspase 3 clivada) foi realizada, de acordo com a porcentagem de imunexpressão celular. A avaliação imunexpressão da proteína p53, de imunexpressão nuclear, foi feita, de acordo com a intensidade de positividade, sendo negativa (igual a zero), reação fraca (igual a 1) e reação forte (igual a 2).

Para a avaliação dos marcadores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), a intensidade da imunexpressão foi dividida em duas escalas, positiva ou negativa, nas quais a positividade correspondia a 1% (ou acima) de núcleos corados, enquanto a negatividade, foi considerada quando não ocorreu qualquer imunomarcação nuclear.

A imunexpressão do HER2 foi confirmada, com a coloração em padrão de membrana. Os resultados, categorizados em quatro escalas, utilizando-se os seguintes escores: 0 (negativo) – ausência de imunocoloração nas células neoplásicas ou imunocoloração de membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível $\leq 10\%$ das células tumorais; 1+ (negativo) imunocoloração de membrana incompleta e fraca/difícilmente perceptível em mais de 10% das células tumorais; 2+ (duvidoso) imunocoloração de membrana contínua, incompleta, fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais ou imunocoloração de membrana completa e intensa $\leq 10\%$ das células tumorais; 3+ (positivo) imunocoloração de membrana completa e intensa em mais de 10% das células tumorais.

2.1 Análise estatística

Na análise do índice de proliferação pela medida do Ki-67, assim como a análise do percentual de núcleos positivos pelo P53 forte e fraco em relação aos marcadores de apoptose, foram calculados os coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman, pelo fato de não ter havido normalidade em nenhuma das variáveis estudadas. O teste de Normalidade aplicado foi o teste de Shapiro-Wilks. Na análise da associação do grau histológico, na associação da expressão do HER 2, na expressão dos marcadores hormonais e subtipos moleculares com os marcadores de apoptose foi aplicado o teste Qui-Quadrado de Fischer. Quanto à comparação do índice apoptótico com os marcadores de apoptose, a comparação foi entre medianas utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

No estudo de sobrevida a curva de sobrevida dos pacientes foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e na análise da associação da sobrevida e marcadores de apoptose foi estimado o Hazard Ratio como medida de risco, com seus respectivos intervalos de confiança ao nível de 95%. Para isso, aplicou-se a regressão de Cox. A suposição de proporcionalidade do risco foi testada pelo resíduo de Schoenfeld, sendo proporcional em todas as comparações feitas.

Todos os testes foram analisados considerando 5% de significância e o software utilizado foi o Stata versão 12.0.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1 Análise de dados

No banco de dados constam 322 pacientes com carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE), dos quais 11 não tinham informação de nenhuma das variáveis estudadas, sendo excluídas da casuística. Os outros 16 casos são “pacientes-controle” não portadoras de carcinoma mamário. O estudo dessas pacientes-controle foi realizado visando obter uma indicação do comportamento dos marcadores imunoistoquímicos desse estudo em tecido mamário não tumoral e, assim, confrontar os resultados obtidos nos tecidos tumorais.

Tabela 1. Medida dos marcadores de apoptose entre os controles

Marcadores de apoptose	Número (%)
SMAC	
0	0 (-)
1	0 (-)
2	0 (-)
3	16 (100%)
XIAP	
0	15 (100%)
1	0 (-)
2	0 (-)
3	0 (-)
Survivina nuclear	
0	10 (90,9%)
1	0 (-)
2	0 (-)
3	1 (9,1%)
Survivina citoplasmática	
0	0 (-)
1	1 (9,1%)
2	6 (54,5%)
3	4 (36,4%)

* As correlações não foram possíveis serem calculadas por não ter havido variação no SMAC e XIAP.

Tabela 2 – Correlações entre marcadores da apoptose SMAC, XIAP, Survivina (Nuclear e citoplasmática) e índice apoptótico

Marcadores de apoptose	SMAC	XIAP	Survivina nuclear	Survivina citoplasmática	IA
SMAC	-	-	-	-	-
XIAP	0,1612^b (p = 0,021)	-	-	-	-
Survivina nuclear	0,1288 (p = 0,061)	0,0918 (p = 0,205)	-	-	-
Survivina citoplasmática	0,2074^b (p = 0,002)	0,2375^b (p < 0,001)	-0,0506 (p = 0,452)	-	-
Índice apoptótico (IA)	0,0883 (p = 0,143)	-0,0192 (p = 0,780)	-0,0079 (p = 0,908)	0,1355^b (p = 0,045)	-

^aCoefficiente de correlação de Spearman (p-valor)

^bCorrelação estatisticamente significante (p < 0,05)

Correlacionando os marcadores de apoptose, observa-se que houve correlação estatisticamente significante na relação entre os marcadores SMAC e XIAP, assim como correlação significativa com survivina citoplasmática, ambas correlações positivas. O XIAP apresentou correlação significativa com a survivina citoplasmática, assim como o índice apoptótico se mostrou correlacionado com a survivina citoplasmática (Tabela 2).

3.2 Correlações entre a imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática) e o grau histológico tumoral.

Quanto ao grau histológico, 7,3% dos pesquisados foram classificados como grau I, enquanto a grande maioria (76,1%) foi grau II, sendo 16,6% dos tumores classificados como grau histopatológico III. Associando o grau histológico com os marcadores de apoptose, a associação, em nenhum deles, foi estatisticamente significante. Porém, observou-se uma maior frequência de níveis de intensidade 2 e 3 com o aumento do grau histológico,

comportamento também observado quando associado com os marcadores XIAP e survivina nuclear e citoplasmática (Tabela 3).

Tabela 3 – Associação do grau histológico com os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	Grau histológico			p-valor ^a
	I (Bem diferenciado)	II (moderadamente diferenciado)	III (pouco diferenciado)	
SMAC				
0	2 (10,0%)	11 (5,3%)	0 (-)	0,083
1	8 (40,0%)	65 (31,2%)	9 (20,0%)	
2	7 (35,0%)	99 (47,6%)	22 (48,9%)	
3	3 (15,0%)	33 (15,9%)	14 (31,1%)	
XIAP				
0	5 (62,5%)	72 (44,2%)	10 (24,4%)	0,151
1	3 (37,5%)	39 (23,9%)	13 (31,7%)	
2	0 (-)	37 (22,7%)	13 (31,7%)	
3	0 (-)	15 (9,2%)	5 (12,2%)	
Survivina nuclear				
0	9 (81,8%)	117 (71,3%)	35 (81,4%)	0,632
1	1 (9,1%)	12 (7,3%)	1 (2,3%)	
2	1 (9,1%)	27 (16,5%)	4 (9,3%)	
3	0 (-)	8 (4,9%)	3 (7,0%)	
Survivina citoplasmática				
0	1 (9,1%)	5 (3,0%)	1 (2,3%)	0,264
1	7 (63,6%)	80 (48,8%)	14 (32,6%)	
2	2 (18,2%)	61 (37,2%)	23 (53,5%)	
3	1 (9,1%)	18 (11,0%)	5 (11,6%)	

^a Teste Qui-quadrado de Fischer

3.3 Correlações entre a imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática) e a imunexpressão de HER 2

Dentre os pacientes estudados, 69,7% apresentavam resultado do HER 2 negativo (205 pacientes); 5,8%, duvidoso (17 pacientes); e 24,5%, resultado positivo (72 pacientes). Na associação com o HER 2, observa-se

que houve significância estatística quando relacionada com a survivina citoplasmática, na qual entre os tumores positivos para HER-2 houve uma maior frequência de survivina com intensidade 2 e 3 (65,3%). Quando comparadas aos tumores HER 2 negativos, 42,6% deles tinham positividade citoplasmática moderada ou intensa para Survivina, ou seja, carcinomas mamários HER2+ se correlacionam com survivina citoplasmática moderada e alta. Associação limítrofe foi observada na relação com o marcador SMAC, sobre a qual também se observou uma maior frequência de survivina com intensidade 2 e 3 entre os positivos (76,1%), quando comparados aos pesquisados com HER 2 negativo (60,8%). Comparando as medianas do índice apoptótico e a classificação do HER, houve diferença estatisticamente significativa, com um maior índice apoptótico entre os pacientes com HER 2 positivo (tabela 4).

Tabela 4 – Associação da expressão do HER 2 com os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	HER 2			p-valor	p-valor ^a
	Negativo (0 e 1)	Duvidoso (2)	Positivo (3)		
SMAC					
0	10 (5,2%)	1 (6,3%)	1 (1,5%)	0,022^c	0,063
1	65 (34,0%)	2 (12,5%)	15 (22,4%)		
2	88 (46,1%)	6 (37,5%)	34 (50,7%)		
3	28 (14,7%)	7 (43,7%)	17 (25,4%)		
XIAP					
0	61 (41,8%)	8 (57,1%)	15 (30,0%)	0,387	0,357
1	38 (26,0%)	4 (28,6%)	13 (26,0%)		
2	33 (22,6%)	1 (7,1%)	17 (34,0%)		
3	14 (9,6%)	1 (7,1%)	5 (10,0%)		
Survivina nuclear					
0	117 (75,5%)	8 (57,1%)	37 (71,2%)	0,320	0,196
1	11 (7,1%)	2 (14,3%)	1 (1,9%)		
2	21 (13,5%)	3 (21,4%)	9 (17,3%)		
3	6 (3,4%)	1 (7,1%)	5 (9,6%)		
Survivina citoplasmática					
0	5 (3,2%)	0 (-)	2 (3,8%)	0,009^c	0,025^c
1	84 (54,2%)	2 (14,3%)	16 (30,7%)		
2	50 (32,3%)	10 (71,4%)	28 (53,8%)		

3	16 (10,3%)	2 (14,3%)	6 (11,5%)		
Índice apoptótico (%)					
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	5 (2; 13)	14 (8; 30)	9 (3; 16)	< 0,001 ^c	0,011 ^c

^a Comparação considerar os duvidosos)

^b Comparação entre positivos e negativos (sem considerar os duvidosos)

^c Associação estatisticamente significante (p<0,05)

3.4 Análise do índice de proliferação - Ki-67

Na análise do índice de proliferação pela medida do Ki-67, o número de observações foi de 246 pacientes, a mediana do Ki-67 na população estudada foi de 10% e o intervalo interquartílico foi entre 1% e 30% (P₂₅; P₇₅). Avaliando a distribuição do Ki-67, não se observou uma distribuição normal (histograma) e, pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilks, não foi confirmada a hipótese de normalidade (p < 0,001). Assim, na análise das associações as medidas e testes adotados serão as não paramétricas (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Histograma e boxplot da distribuição das medidas do índice de proliferação Ki-67

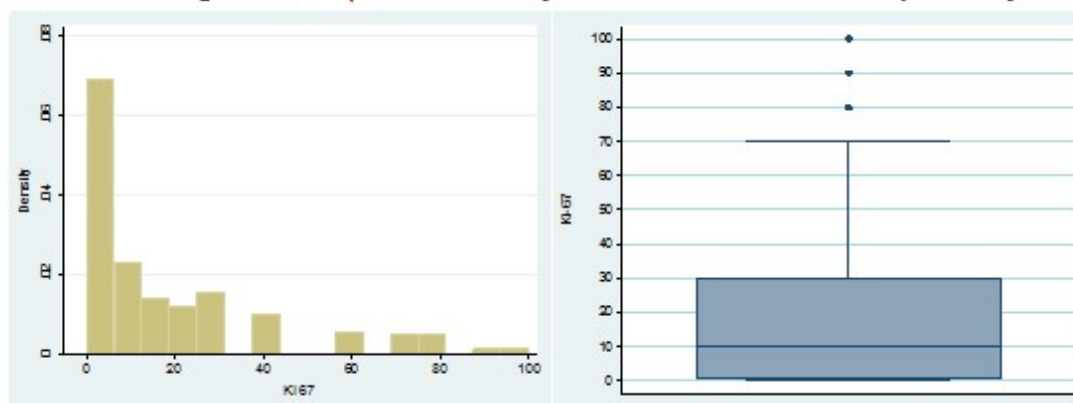


Tabela 5 – Correlações da imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática), IA (índice apoptótico) e P53 com a imunexpressão dos índices de proliferação celular Ki-67

Marcadores de apoptose	Coefficiente de correlação de Spearman	p-valor
SMAC	0,0603	0,356
XIAP	0,1272	0,076
Survivina nuclear	0,2743	<0,001 ^a
Survivina citoplasmática	0,1264	0,072
IA (% de células positivas)	0,2461	<0,001 ^a
P53 (% de núcleos positivos)	0,2675	<0,001 ^a
P53 (fraco)	0,0888	0,254

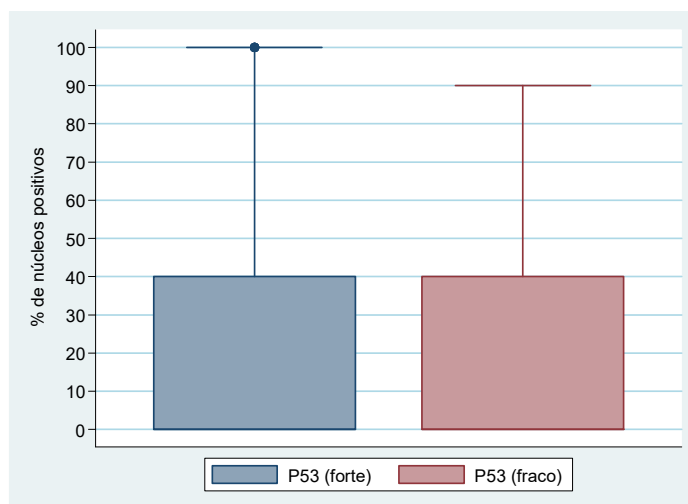
^a Correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Pelos valores de $p (< 0,05)$, concluímos que carcinomas mamários com alto Ki67 têm níveis aumentados de XIAP, IA, p53 nuclear forte e Survivina nuclear.

3.5 Correlações entre a imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática), IA (índice apoptótico), índice proliferativo (Ki67) e a imunexpressão do P53.

3.5.1 Análise da medida do P53, forte e a fraca

Analisando a medida dos P53, considerando o marcador forte, observa-se que a mediana do percentual de núcleos positivos foi de 0% e o intervalo interquartilico de 0% e 40% (P_{25} ; P_{75}), onde 67% dos pesquisados tinham 0% de núcleo positivo. Considerando o marcador fraco, a distribuição foi semelhante ao marcador forte, com mediana de 0% e intervalo interquartilico de 0% e 40%. O percentual de pesquisados com 0% de núcleos positivos foi de 51,5%.

Gráfico 2 – Distribuição das medidas do número de núcleos positivos pelo P53**Tabela 6 – Correlações do percentual de núcleos positivos pelo P53 forte e fraco com os marcadores de apoptose SMAC, XIAP, Survivina (Nuclear e citoplasmática), IA e Ki 67**

Marcadores de apoptose	P53 forte		P53 fraco	
	Coefficiente de correlação de Spearman	p-valor	Coefficiente de correlação de Spearman	p-valor
SMAC	-0,0229	0,703	0,0249	0,733
XIAP	0,0494	0,473	-0,0260	0,761
Survivina nuclear	0,0144	0,831	-0,0102	0,902
Survivina citoplasmática	0,1104	0,101	0,1849	0,025 ^a
IA (% de células positivas)	0,2482	<0,001 ^a	0,081	0,255
Ki 67	0,2675	<0,001 ^a	0,0888	0,254

^a Correlação estatisticamente significante (p<0,05)

Na análise da correlação com a medida do percentual de núcleos positivos e os marcadores de apoptose, considerando o P53 forte, houve correlação estatisticamente significante em relação ao percentual de células positivas ($r = 0,2482$) e a medida do Ki 67, como já apresentada anteriormente. A correlação com o IA foi positiva, indicando que um aumento do percentual de núcleos fortemente positivos para p53 está correlacionado com um aumento do percentual de células positivas para caspase 3 clivada. No que se refere ao P53 fraco, houve correlação estatisticamente significante apenas com a positividade da survivina citoplasmática ($r = 0,1849$) (Tabela 3).

3.6 Correlações entre a imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática), IA (índice apoptótico) e os subtipos moleculares do carcinoma ductal invasivo

Classificando os pacientes segundo subtipo molecular, dos 311 pacientes recrutados 242 tinham informação dos marcadores hormonais RE, RP, HER2 e Ki-67. Desses, 191 foram classificados segundo o subtipo e 51 pacientes (21,1%) tinham outras combinações relacionadas ao RE, RP e HER2.

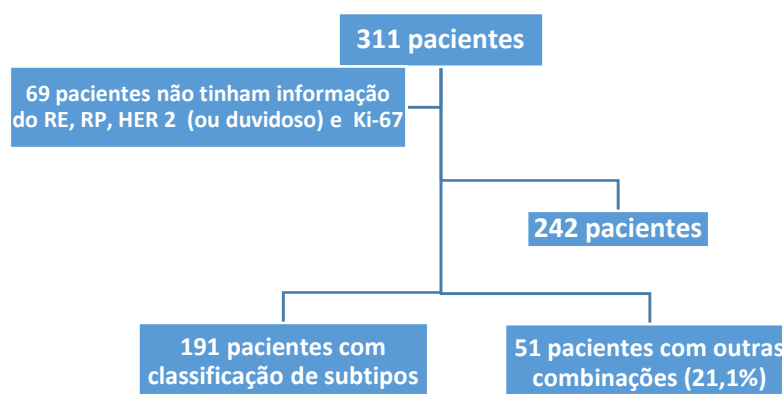
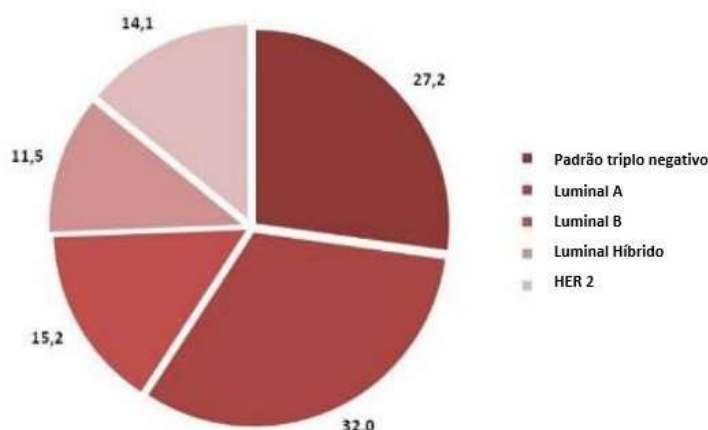


Figura 2 – Organograma da classificação dos pacientes segundo subtipo molecular

Dentre os 191 pacientes que foram classificados segundo o subtipo, 32% eram do subtipo molecular luminal A; 27,2% são triplo negativos; 15,2%, luminal B; 11,5%, luminal híbrido; e 14,1% do grupo HER 2 (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Distribuição dos pacientes segundo subtipos moleculares do câncer de mama



* 191 pacientes se enquadraram em uma dessas categorias do subtipo

****Padrão triplo negativo:** RE negativo, RP negativo e HER2 negativo

Luminal A: RE positivo, RP positivo, HER2 negativo e Ki-67 < 14%

Luminal B: RE positivo, RP positivo, HER2 negativo e Ki-67 ≥ 14%

Luminal híbrido: RE positivo, RP positivo, HER2 positivo

Grupo HER2: RE negativo, RP negativo, HER2 positivo

Tabela 7 – Associação do subtipo molecular com os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	Subtipos moleculares					p-valor
	Subtipo triplo negativo	Luminal A	Luminal B	Luminal híbrido	Grupo HER 2	
SMAC						
0	5 (9,8%)	1 (1,7%)	2 (6,9%)	0 (-)	1 (3,8%)	0,030^a
1	14 (27,4%)	25 (43,1%)	8 (27,6%)	6 (27,3%)	3 (11,5%)	
2	22 (43,1%)	27 (46,5%)	16 (55,2%)	12 (54,5%)	12 (46,2%)	
3	10 (19,6%)	5 (8,6%)	3 (10,3%)	4 (18,2%)	10 (38,5%)	
XIAP						
0	16 (37,2%)	21 (45,6%)	9 (36,0%)	3 (25,0%)	4 (17,4%)	0,541
1	14 (32,6%)	11 (23,9%)	8 (32,0%)	2 (16,7%)	8 (34,8%)	
2	9 (20,9%)	11 (23,9%)	5 (20,0%)	6 (50,0%)	9 (39,1%)	
3	4 (9,3%)	3 (6,5%)	3 (12,0%)	1 (8,3%)	2 (8,7%)	
Survivina nuclear						
0	34 (73,9%)	41 (82,0%)	18 (75,0%)	13 (86,7%)	14 (63,6%)	0,249
1	3 (6,5%)	5 (10,0%)	0 (-)	0 (-)	1 (4,5%)	

2	8 (17,4%)	3 (6,0%)	5 (20,8%)	1 (6,7%)	4 (18,2%)	
3	1 (2,2%)	1 (2,0%)	1 (4,2%)	1 (6,7%)	3 (13,6%)	
Survivina citoplasmática						
0	3 (6,5%)	2 (4,0%)	0 (-)	1 (6,7%)	0 (-)	0,061
1	25 (54,3%)	27 (54,0%)	11 (45,8%)	4 (26,7%)	6 (27,3%)	
2	15 (32,6%)	11 (22,0%)	12 (50,0%)	7 (46,7%)	13 (59,1%)	
3	3 (6,5%)	10 (20,0%)	1 (4,2%)	3 (20,0%)	3 (13,6%)	
Índice apoptótico (%)						
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	7,5 (4; 17)	3 (1; 8)	6 (3; 13)	5 (3; 15)	13 (4; 19)	< 0,001 ^a

^a Associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A associação dos marcadores apoptóticos e os subtipos moleculares foram significativas, quando comparado o marcador Smac, no qual se observa que no grupo HER 2 85% dos pacientes tinham SMAC 2 ou 3, enquanto o luminal A e B as maiores frequências estavam nas intensidades 1 e 2. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação do índice apoptótico entre os subtipos moleculares, com um maior índice no grupo HER 2 (Tabela 7).

3.7 Correlações entre a imunexpressão dos marcadores da apoptose Smac, XIAP, Survivina (nuclear e citoplasmática), IA (índice apoptótico) e a imunexpressão de estrógeno e progesterona

Na associação dos marcadores hormonais e os marcadores de apoptose, o SMAC se mostrou associado ao RP, onde o que parece diferenciar é a frequência de Smac 1 entre os positivos e a maior frequência de Smac 3 entre os negativos para a RP. O índice apoptótico se mostrou associado tanto ao marcador hormonal RE quanto RP, no qual se observou um menor percentual de células positivas para caspase 3 clivada entre os casos positivos para RE e RP (Tabela 8).

Tabela 8 – Associação da expressão dos marcadores hormonais RE e RP com os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	RE			RP		
	Negativo	Positivo	p-valor	Negativo	Positivo	p-valor
SMAC						
0	6 (6,1%)	5 (2,8%)	0,202	9 (7,2%)	3 (2,2%)	0,005^a
1	25 (25,5%)	58 (32,8%)		28 (22,4%)	50 (36,2%)	
2	44 (44,9%)	85 (48,0%)		56 (44,8%)	66 (47,8%)	
3	33 (23,5%)	29 (16,4%)		32 (25,6%)	19 (13,8%)	
XIAP						
0	31 (36,9%)	56 (43,4%)	0,755	37 (35,6%)	43 (43,4%)	0,713
1	24 (28,6%)	31 (24,0%)		30 (28,8%)	24 (24,3%)	
2	20 (23,8%)	31 (24,0%)		27 (26,0%)	23 (23,2%)	
3	9 (10,7%)	11 (8,5%)		10 (9,6%)	9 (9,1%)	
Survivina nuclear						
0	58 (69,9%)	104 (75,4%)	0,754	71 (68,3%)	85 (78,0%)	0,321
1	5 (6,0%)	9 (6,5%)		9 (8,6%)	5 (4,6%)	
2	15 (18,1%)	18 (13,0%)		19 (18,3%)	13 (11,9%)	
3	5 (6,0%)	7 (5,1%)		5 (4,8%)	6 (5,5%)	
Survivina citoplasmática						
0	3 (3,6%)	4 (2,9%)	0,619	4 (3,9%)	3 (2,7%)	0,433
1	36 (43,4%)	66 (47,8%)		49 (47,1%)	49 (45,0%)	
2	37 (44,6%)	51 (37,0%)		43 (41,3%)	41 (37,6%)	
3	7 (8,4%)	17 (12,3%)		8 (7,7%)	16 (14,7%)	
Índice apoptótico (%)						
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	9 (4; 18)	4,5 (2; 12)	<0,001^a	8 (4; 17)	5 (2; 12)	<0,001^a

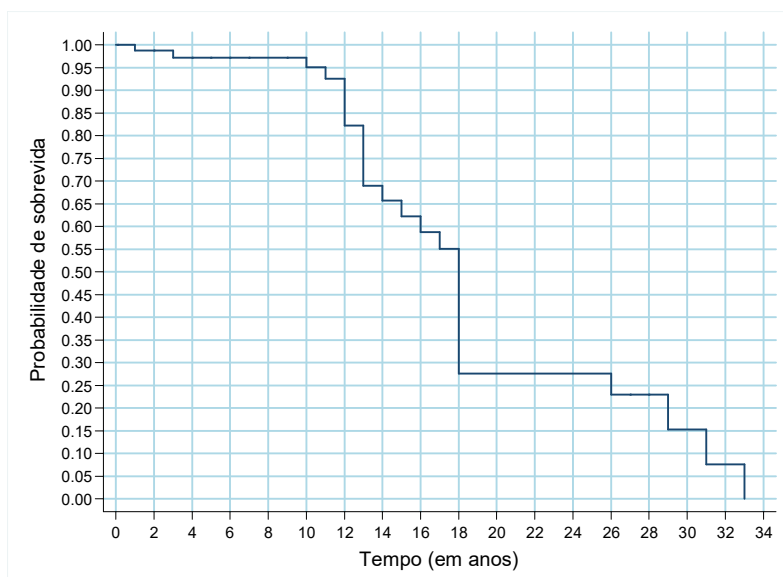
^a Associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

3.8 Análise de sobrevida

Para o estudo de sobrevida, 90 pacientes tinham informação do tempo do diagnóstico, até a última consulta ou óbito. Desses, 28 pacientes foram à óbito, o que corresponde a uma taxa de mortalidade de 3,4 óbitos em cada 100 pacientes por ano (IC 95%: 2,31 - 4,86). O tempo mínimo livre de

sobrevida foi de 1 mês e máximo de 33 anos, com tempo de sobrevida mediano de 18 anos e intervalo interquartil de 13 e 26 anos (P_{25} e P_{75} , respectivamente). De acordo com a curva de sobrevida, observa-se que a probabilidade estimada de óbito no primeiro ano de acompanhamento foi de 1,3%; em 5 anos de 2,9%; e, em 10 anos, a probabilidade estimada de ir à óbito foi de 5%. Nota-se que, a partir dos 10 anos de acompanhamento, há um aumento na ocorrência de óbito, ao longo dos anos, ou seja, há um aumento na força de incidência de óbito entre os pacientes. Na comparação das taxas de mortalidade, segundo os marcadores de apoptose, houve diferença estatisticamente significativa com relação ao XIAP, com uma maior taxa de mortalidade entre os pacientes com XIAP 0 ou 1. Observa-se, também, que a sobrevivência nuclear 2 ou 3 apresentou uma maior taxa de mortalidade, quando comparada aos pacientes com sobrevivência 0 ou 1, apesar da significância estatística se apresentar limítrofe ($p = 0,053$).

Gráfico 4 – Probabilidade de sobrevida dos pacientes



* Mediana do tempo de sobrevida (P_{25} ; P_{75}): 18 anos (13; 26 anos)

Tabela 9 – Comparação das taxas de mortalidade e Hazard Ratio, segundo os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	Taxa de mortalidade (IC 95%)	HazardRatio (IC 95%)	p-valor
SMAC			
0 ou 1	3,78 (2,19 - 6,50)	Referência	-
2 ou 3	2,81 (1,55 - 5,06)	0,92 (0,40 - 2,09)	0,839
XIAP			
0 ou 1	4,82 (2,74 - 8,50)	Referência	-
2 ou 3	1,91 (0,79 - 4,58)	0,29 (0,10 - 0,86)	0,026^a
Survivina nuclear			
0 ou 1	2,54 (1,47 - 4,37)	Referência	-
2 ou 3	4,69 (1,76 - 12,5)	3,20 (0,99 - 10,4)	0,053
Survivina citoplasmática			
0 ou 1	3,54 (2,01 - 6,25)	Referência	-
2 ou 3	1,93 (0,8 - 4,64)	0,58 (0,18 - 1,83)	0,353
Índice apoptótico^b			
≤ 6	3,51 (2,18 - 5,65)	Referência	-
> 6	2,82 (1,41 - 5,65)	0,92 (0,39 - 2,18)	0,853
Ki-67			
≥ 15%	3,70 (1,92 - 7,11)	Referência	-
< 15%	3,02 (1,67 - 5,46)	0,83 (0,34 - 2,05)	0,686
P53 (forte)			
Zero	3,26 (1,96 - 5,40)	Referência	-
> zero	3,45 (1,96 - 6,08)	0,84 (0,37 - 1,88)	0,666
P53 (fraco)			
Zero	2,83 (1,35 - 5,94)	Referência	-
> zero	3,75 (1,87 - 7,50)	1,48 (0,51 - 4,29)	0,473

^a Associação estatisticamente significante ($p < 0,05$)

^b Classificado pela mediana

Tabela 10 – Correlação da condição de metástase com os marcadores de apoptose

Marcadores de apoptose	Metástase		p-valor
	Sim	Não	
SMAC			
0	4 (10,5%)	2 (9,5%)	0,161
1	16 (42,1%)	5 (23,8%)	

2	9 (23,7%)	11 (52,4%)	
3	9 (23,7%)	3 (14,3%)	
XIAP			
0	9 (30,0%)	3 (20,0%)	0,518
1	10 (33,3%)	3 (20,0%)	
2	9 (30,0%)	7 (46,7%)	
3	2 (6,7%)	2 (13,3%)	
Survivina nuclear			
0	26 (72,2%)	9 (60,0%)	0,254
1	2 (5,6%)	3 (20,0%)	
2	6 (16,7%)	1 (6,7%)	
3	2 (5,6%)	2 (13,3%)	
Survivina histopatológico			
0	17 (47,2%)	9 (60,0%)	0,406
1	19 (52,8%)	6 (40,0%)	
2	0 (-)	0 (-)	
3	0 (-)	0 (-)	
Índice apoptótico (%)			
Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	7 (2; 13)	5 (2; 14)	0,895

^c Associação estatisticamente significativa (p<0,05)

Não ocorreu associação significativa entre os marcadores da apoptose e a ocorrência de metástase.

Discussão

4. DISCUSSÃO

A biologia molecular do câncer de mama, no que concerne as proteínas da apoptose, ainda é um assunto pouco conhecido. Um maior entendimento dos biomarcadores envolvidos na desregulação do processo apoptótico permitirá a descoberta de novos alvos terapêuticos oncológicos e, assim, melhora na sobrevida.

A observação de um estímulo pró-apoptótico, presente em todos os casos de pacientes-controle em tecido não tumoral, representado pela positividade de maior intensidade do Smac, nos expõe à necessidade de um estudo de maior grupo de amostras para um melhor entendimento desse comportamento ambíguo dessa proteína. Já a negatividade para XIAP, nos casos não tumorais, era o esperado, pois o aumento de sua expressão se encontra relacionada à progressão tumoral e uma correlação inversa com o Smac.

Os presentes achados de nosso estudo demonstraram uma correlação direta entre a imunoexpressão das proteínas IAPs (XIAP, Survivina citoplasmática) e a sua proteína antagonista SMAC. Apesar de ser esperada uma relação inversa entre essas proteínas antagonistas, como foi observado em alguns estudos¹, isso não ocorreu em nossa série. Contudo, essa correlação direta foi vista em diferentes tumores em outros estudos² e pode representar uma forma de equilíbrio homeostático entre as quantidades dessas proteínas dentro da célula. Essa correlação direta reflete uma “disputa molecular” em torno do processo apoptótico, com proteínas de efeito contrário elevando-se em conjunto, numa tentativa de sobrepujar a sua inibidora ou o seu alvo. Enquanto uma correlação inversa é esperada pela ação contrária dessas proteínas, na qual o inibidor atuaria diminuindo a presença da

¹ Pluta P, Cebula-Obrzut B, Ehemann V, Pluta A, Wierzbowska A. Correlation of Smac/DIABLO protein expression. With the clinico-pathological features of breast cancer patients. *Neoplasma*. 2011;58:430-5.

² De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, Barrezueta LF, Fujiyama Oshima CT, Silva JA Jr, Gomes TS, et al. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. *Oncol Rep*. 2009 ago;22(2):295-303. PubMed; PMID: 19578769.

proteína-alvo, ou vice-versa. Nossos resultados indicam uma dinâmica de competição de proteínas e foram obtidos com a averiguação da presença dessas proteínas no citoplasma das células, através de reações imunohistoquímicas.

A correlação direta entre o I.A. e a imunexpressão da SMAC era esperada e corrobora a função dessa proteína como a principal inibidora da XIAP, liberando a caspase 3 para efetuar o processo apoptótico. A mesma correlação direta da survivina com o I.A. pode ser explicada pela função antiapoptótica dessas proteínas ocorrer pela inibição da SMAC, liberando a ação bloqueadora da caspase-3-clivada da XIAP. Outros autores também verificaram correlação direta entre I.A. e imunexpressão da survivina, tendo sido encontrados ambos os marcadores aumentados em tecido tumoral³. Correlação inversa, porém, também tem sido relatada⁴.

A evasão do processo apoptótico, devido à inativação mutacional de proteínas pró-apoptóticas ou uma superexpressão de proteínas antiapoptóticas, além de ser considerado um evento essencial da fisiologia celular para o crescimento e progressão tumoral, pode conferir às células tumorais resistência a agentes antineoplásicos que agem primariamente por induzir a apoptose⁵. Dessa forma, já era esperado que ocorresse uma maior frequência de intensidade dos níveis 2 e 3 da imunexpressão da XIAP e da Survivina, nos casos de maior grau histológico dos carcinomas mamários invasivos. Zhang e colaboradores observaram imunexpressão de XIAP em 83% dos casos de carcinoma ductal invasivo com imunomarcção de alto grau⁶, resultado esse que também observamos. Sing e Adamkovet et al. relatam uma correlação significativamente positiva entre a expressão de

³ Pinho SL, Ghislandi LR, Fronza Jr. H, Wengerkiewicz A, Pereira Filho A, Ferreira LC, et al. Valor prognóstico da expressão da proteína survivina em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no câncer colo-retal. *Rev Bras Coloproct.* 2005 maio 16;25(2):121-7.

⁴ Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, et al. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol.* 2002 ago;178(8):426-35.

⁵ Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2005 nov;5(11):876-85. PubMed; PMID: 16239906.

⁶ Zhang Y, Zhu J, Tang Y, Li F, Zhou H, Peng B, et al. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol.* 2011 jun7;6:49. PubMed; PMID: 21645409.

survivina e o alto grau histológico e prognóstico ruim do carcinoma ductal infiltrativo mamário^{7,8}. Foi observada maior correlação direta da frequência da imunexpressão da survivina citoplasmática de maior intensidade (65,3%) com HER 2 positivo, sendo esses dois marcadores considerados já classicamente fatores independentes de mau prognóstico⁹. Poucos estudos avaliaram como as IAPs podem servir de alvo na terapia oncológica mamária direcionada contra receptores de fatores de crescimento. Muitos cânceres mamários apresentam superexpressão do HER2 (20% de todos os casos)¹⁰. Dessa forma, uma estratégia para aumentar a sensibilidade das células tumorais para a apoptose seria a criação de mimetizadores inibidores de IAPs ou SMAC-símiles com antagonistas do ErbB, como o trastuzumab (Herceptin). Essa associação poderia aumentar a eficácia dessa terapia, na qual somente cerca de 35% das pacientes HER2-positivas respondem inicialmente ao tratamento¹¹.

A correlação direta observada entre a imunomarcção alta para Ki67 e os marcadores HER-2, IA, p53, Survivina e alto grau histológico indicam que a taxa de crescimento tumoral é resultado não apenas dos níveis de proliferação celular, mas também da taxa de morte celular. Essa relação entre os níveis de apoptose e proliferação celular pode ser resultante de mecanismos regulatórios que funcionam através de fatores de crescimento, agindo de forma conjunta na ativação de oncogenes, entre eles o Myc e o HER2(neu/ErbB-2), que poderiam atuar na dupla via da apoptose e da proliferação celular. O Myc é um clássico fator de transcrição oncogênico que

⁷ Singh M, Bleile MJ, Shroyer AL, Heinz D, Jarboe EA, Shroyer KR. Analysis of surviving expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004 dez;12(4):296-304. PubMed; PMID: 15536328.

⁸ Adamkov M, Kajo K, Vybohova D, Krajcovic J, Stuller F et al. Correlations of survivin expression. With clinicomorphological parameters and hormonal receptor status in breast ductal carcinoma. *Neoplasma*. 2012;59:30-7.

⁹ Ryan BM1, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome an disassociated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann Oncol*. 2006 abr;17(4):597-604. PubMed; PMID: 16403812.

¹⁰ Nitta H, Kelly BD, Allred C, Jewell S, Banks P, Dennis E, et al. The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol Int*. 2016 jun;66(6):313-24. PubMed; PMID: 27061008.

¹¹ Foster FM, Owens TW, Taniaris-Hughes J, Clarke RB, Brennan K, Bundred NJ, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R41. PubMed; PMID: 19563669.

é superexpresso em um grande número de neoplasias humanas¹². Suas funções antagonistas promovem a sobrevivência e a morte celular. Quando ele é superexpresso, o seu fenótipo apoptótico ocorre como uma medida de proteção contra a proliferação celular exacerbada. Essa apoptose induzida pelo Myc é dependente de um aumento da regulação do P53, que determina um aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas dos membros da família BCL-2, BAX, PUMA e Noxa¹³.

Um estímulo pró-apoptótico parece ser dominante no carcinoma mamário de subtipo molecular HER2 [mediana do IA 13(4;19)], quando comparado aos demais subtipos.

Ao comparar a XIAP com os marcadores hormonais RE e RP, observamos que a sua maior frequência de negatividade da imunomarcação correlacionou-se a uma maior quantidade de pacientes com receptores hormonais positivos enquanto, ao compararmos a SMAC, observamos que a menor frequência de negatividade da imunomarcação está associada a uma menor quantidade de pacientes com receptores hormonais positivos. Esses resultados podem indicar que a imunomarcação positiva para os receptores hormonais, considerado um fator de bom prognóstico no câncer mamário, guardou uma correla o esperada com os marcadores XIAP e SMAC. A imunoexpressão de XIAP aumenta com a progressão tumoral, enquanto a expressão de receptores hormonais diminui. A imunoexpressão de SMAC diminui com a progressão tumoral. Dessa forma, sua marcação tende a diminuir junto a uma menor positividade para os receptores hormonais.

A survivina   superexpressa em uma série de linhagens celulares transformadas e em células de câncer de pulmão, intestino, pâncreas, próstata e mama. Survivina foi também encontrada em casos de linfomas não-Hodgkin assim como associada a fatores de risco e de mau prognóstico em neuroblastomas humanos (15); está ainda superexpressa em carcinomas

¹² Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*. 2003 dez 8;22(56):9007-21. PubMed; PMID: 14663479.

¹³ Elkholi R, Renault TT, Serasinghe MN, Chipuk JE. Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer Metab*. 2014 out 6;2:16. PubMed; PMID: 25621172.

mamários¹⁴, associando-se a recidivas e mau prognóstico. A imunexpressão aumentada da survivina e de suas variantes (survivina 2B e survivina Δ Ex3) está correlacionada significativamente com a mutação da proteína p53 em carcinomas mamários¹⁵.

A função da survivina na apoptose foi motivo de falsa controvérsia na literatura, pois nenhum estudo refutou sua ação antiapoptótica. Apesar de se imunolocalizar em gel com as caspases 3 e 9, não se liga fisicamente às caspases e não as inativa diretamente. Sua provável ação antiapoptótica é devida a sua capacidade de se ligar aos inibidores das IAPs (Smac-Diablo e Omi/HtrA2), ubiquitinizando-os e marcando-os para degradação, e liberando a XIAP para se ligar e inibir as caspases^{16,17}.

A survivina foi considerada inicialmente ausente e não expressa em tecidos normais, com muitos autores mostrando resultados condizentes com esse achado^{18,19,20}. Trabalhos posteriores com RT-PCR e imunistoquímica, usando anticorpos e reagentes mais novos, encontraram a presença da survivina em tecidos não-tumorais, em especial em mucosa colônica adjacente a carcinomas^{21,22}. Ressalta-se que, em um desses experimentos, o

¹⁴ Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer*. 2006 jan 30;94(2):253-8.

¹⁵ Vegran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebutti M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene*. 2007 jan 11;26(2):290-7.

¹⁶ Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ*. 2007 fev;14(2):348-57.

¹⁷ Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003 nov 24;22(53):8581-9.

¹⁸ Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999 fev 1;13(3):239-52.

¹⁹ Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*. 2001 jun 1;91(11):2026-32.

²⁰ Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut*. 2000 maio;46(5):645-50.

²¹ Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, et al. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 set;53(9):770-6.

²² Pinho MdSL, Ghislandi LR, Fronza Jr. H, Wengerkiewicz A, Pereira Filho A, Ferreira LC, et al. Valor prognóstico da expressão da proteína survivina em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no cancer colo-retal. *Rev bras Coloproct*. 2005 maio 16;25(2):121-7.

reagente usado foi o mesmo empregado em nosso estudo. A positividade para survivina tem sido descrita tanto no núcleo como no citoplasma²³.

Alguns estudos indicam que a imunexpressão da fração citoplasmática da survivina correlaciona-se com maior tamanho do tumor, metástase linfonodal, alto grau histológico, estadiamento tumoral avançado, alto índice mitótico, positividade para p53, superexpressão de HER2 e status de receptores hormonais para progesterona e estrogênio negativos^{24,25,26}. Adamkovet al. confirmaram por reação imunoistoquímica que a survivina é um fator de prognóstico pobre para o carcinoma ductal mamário fazendo correlações que indicam associação entre a expressão nuclear de survivina e o grau tumoral. Observamos associação entre uma maior frequência da negatividade da imunomarcagem da survivina nuclear e um maior número de pacientes positivos para receptores hormonais, ao mesmo tempo que para a survivina citoplasmática, chamou à atenção uma menor frequência da negatividade da imunomarcagem relacionada a uma menor quantidade de pacientes positivos para receptores hormonais. Essas correlações, observadas das diferentes frações da survivina com os receptores hormonais, sugerem que, em nossa casuística, a negatividade da imunomarcagem da fração nuclear apresenta tendência para uma melhor diferenciação celular e manutenção dos receptores hormonais e conseqüente possível melhor prognóstico. Não ocorreu correlação significativa entre a negatividade da imunexpressão da survivina citoplasmática e a positividade para receptores hormonais.

Nossos achados mostram correlação direta entre a imunexpressão das duas estudadas tanto no tumor quanto no tecido e dessas proteínas com seu inibidor SMAC. Os modelos matemáticos propostos preveem relação

²³ Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, Faivre J, et al. Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 ago;131(8):504-10.

²⁴ Youssef NS1, Hewedi IH, AbdRaboh NM. Immunohistochemical expression of survivin in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2008 dez;20(4):348-57. PubMed; PMID: 20571593.

²⁵ Chu JS, Shew JY, Huang CS. Immunohistochemical analysis of survivin in primary breast cancers. *J Formos Med Assoc.* 2004 dez;103(12):925-31. PubMed; PMID: 15624042.

²⁶ Sohn DM1, Kim SY, Baek MJ, Lim CW, Lee MH, Cho MS, et al. Expression of surviving and clinical correlation in patients with breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2006 jul;60(6):289-92. PubMed; PMID: 16876381.

dinâmica entre o número de moléculas de IAPs e SMAC presentes nas células^{27,28,29}, sendo esperada, e por vezes encontrada, relação inversa entre essas proteínas em experimentos dinâmicos com culturas celulares. Este dado explica também uma eventual correlação direta. Nossos achados indicam que tumores e tecidos com grande expressão de IAPs têm maior expressão de SMAC e mostram quadro de busca homeostática de equilíbrio dinâmico entre a quantidade dessas proteínas nas células.

A mediana do índice apoptótico foi menor nos casos de onde os receptores hormonais foram positivos, o que era esperado pois os carcinomas com status de receptores positivos apresentam classicamente um menor índice proliferativo e apoptótico. Contudo, não foi observada correlação estatística significativa entre a ocorrência de metástases e a imunexpressão das proteínas apoptóticas.

A única proteína apoptótica que guardou correlação com a taxa de mortalidade foi a XIAP, confirmando nesse estudo seu importante papel na carcinogênese e na progressão tumoral do carcinoma mamário.

²⁷ Stucki JW, Simon HU. Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation. *J Theor Biol.* 2005 maio 7;234(1):123-31.

²⁸ McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, et al. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* 2005 jan 1;302(1):69-82.

²⁹ Rehm M, Huber HJ, Dussmann H, Prehn JH. Systems analysis of effector caspase activation and its control by X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Embo J.* 2006 set 20;25(18):4338-49.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Entre as proteínas do processo apoptótico que foram avaliadas nesse estudo (XIAP, Survivina citoplasmática, SMAC, IA - caspase 3 clivada), foi encontrada uma correlação estatística significativa entre elas, indicando desse modo a integração múltipla que ocorre entre essas proteínas durante o processo apoptótico no carcinoma mamário invasivo, sem outra especificação.

A evasão do processo apoptótico, com uma conseqüente progressão do grau histológico, correlacionou-se com um aumento da quantidade dessas proteínas nas células transformadas e, desse modo, podem ser potenciais biomarcadores do carcinoma mamário, bem como novos alvos para tratamento oncológico.

A correlação estatística significativa entre o IA e XIAP, P53 forte, Survivina nuclear e o HER2 indica a tentativa de interação proteica de compensar a perda de sinais antiapoptóticos ou excessivamente proliferativos com um aumento compensatório da taxa de apoptose.

A imunoexpressão de SMAC demonstrou uma correlação inversa com o status hormonal de progesterona das pacientes.

Um estímulo pró-apoptótico dominante pode ocorrer nos casos de carcinoma mamário com fenótipo molecular HER2, quando comparado com os demais subtipos.

XIAP foi a única proteína apoptótica estudada que guardou correlação com a taxa de mortalidade.

Estudos adicionais das proteínas apoptóticas com uma maior amostragem de pacientes serão necessários para o estabelecimento de valores prognósticos mais acurados de sobrevida.

Referências

REFERÊNCIAS¹

- 1) Wen YY, Yang ZQ, Song M, Li BL, Yao XH, Chen XL, et al. The expression of SIAHA1 is downregulated and associated with BIM and apoptosis in human breast cancer tissues and cells. *Mol Carcinog*. 2010 maio;49(5):440-9. PubMed; PMID: 20082325.
- 2) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776, 2000. *Nature*. 2000 out 12;407(6805):770-6. PubMed; PMID: 11048727.
- 3) Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, et al. Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis. *Journal of Surgical Oncology*. 1999;71:226–234. doi: 10.1002/(SICI)1096-9098(199908)71:4<226::AID-JSO4>3.0.CO;2-0.
- 4) Gandhi A, Holland PA, Knox F, Potten CS, Bundred NJ. Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer*. 1998 set;78(6):788-94. PubMed; PMID: 9743302.
- 5) Debatin K. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol Lett*. 2000 mar 15;112-113:41-8. PubMed; PMID: 10720711.
- 6) Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*. 2009; 46:497-510. doi:10.1136/jmg.2009.066944.
- 7) Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JPR, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008 set 26;27:48. PubMed; PMID: 18822137.
- 8) Saelens XG, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *van Loo*. *Cell Death Differ*. 2002 out;9(10):1031-42. doi:10.1038/sj.cdd.4401088.
- 9) Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 jan;14(1):32-43. PubMed; PMID: 17082813.
- 10) Stanculescu A, Bembinster LA, Borgen K, Bergamaschi A, Wiley E, Frasor J. Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
 Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suelly C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

dependent manner. *Horm Cancer*. 2010 jun 1;1(3):127-35.doi: 10.1007/s12672-010-0018-6.

- 11) Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waśko R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, et al. Survivin-prognostic tumor biomarker in human neoplasms-review. *Gineko Pol*. 2012 jul;83(7):537-40. PubMed; PMID: 22880480.
- 12) Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res*. 2008 ago 15;14(16):5000-5.doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0746.
- 13) Alteri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008 jan;8(1):61-70. PubMed; PMID: 18075512.
- 14) Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*. 2003 out;197(1):8-29. PubMed; PMID: 12942537.
- 15) Mehrotra S, Languimo LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*. 2010 jan 19;17(1):53-64. PubMed; PMID: 20129247.
- 16) Kempkensteffen C, Jager T, Bub J, Weikert S, Hinz S, Christoph F, et al. The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours. *Int J Androl*. 2007 out;30(5):476-83. PubMed; PMID: 17298543.
- 17) Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikaus S, Gabbert HE, Ramp U. Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2007 mar;16(1):1-8. PubMed; PMID: 17471152.
- 18) Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, et al. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2004 out 4;91(7):1349-57. PubMed; PMID: 15328523.
- 19) Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, et al. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2005 jan 20;23(3):448-54. PubMed; PMID: 15572731.
- 20) Sierra A, Castellsague X, Tortola S, Escobedo A, Lloertas B, Peinado MA, et al. Apoptosis loss and bcl-2 expression: key determinants of lymph node metastases in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 nov 1;2(11):1887-94.
- 21) Fandy TE, Shankar S, Srivastava RK. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2008 jun 30;7:60. PubMed; PMID: 18590557.

- 22) Aird KM, Ding X, Baras A, Wei J, Morse MA, Clay T, et al. Trastuzumab signaling in ErbB2-overexpressing inflammatory breast cancer correlates with X-linked inhibitor of apoptosis protein expression. *Mol Cancer Ther.* 2008 jan;7(1):38-47. PubMed; PMID: 18202008.
- 23) Foster FM, Owens TW, Tanianis-Hughes J, Clarke RB, Brennan K, Bundred NJ, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009 jun 29; 11(3): R41. doi: 10.1186/bcr2328.
- 24) Chen DJ, Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anticancer Drugs.* 2009 set; 20(8):646-58. PubMed; PMID: 19550293.
- 25) Yang D, Zhao Y, Li AY, Wang S, Wang G, Sun Y. Smac-mimetic compound SM-164 induces radio sensitization in breast cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 maio;133(1):189-99. PubMed; PMID: 21901386.
- 26) Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, and Kaufmann SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J Biol Chem.* 2002 nov 15;277(46):44236-43. PubMed; PMID: 12218061.
- 27) Mizukawa K, Kawamura A, Sasayama T, Tanaka K, Kamei M, Sasaki M, et al. Synthetic Smac peptide enhances the effect of etoposide-induced apoptosis in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 2006;77(3):247-55. PubMed; PMID: 16575541.
- 28) Bockbrader KM, Tan M, Sun Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide- induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene.* 2005 nov 10;24(49):7381-8. PubMed; PMID: 16044155.
- 29) Peng XH, Karna P, O'Regan RM, Liu X, Naithani R, Moriarty RM, et al. Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin selectively induces apoptosis in breast cancer cells. *MolPharmacol.* 2007 jan;71(1):101-11. PubMed; PMID: 17035597.
- 30) Zhang Y, Wang Y, Gao W, Zhang R, Han X, Jia M, et al. Transfer of siRNA against XIAP induces apoptosis and reduces tumor cells growth potential in human breast cancer in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 abr;96(3):267-77. PubMed; PMID: 16341821.
- 31) Nikitakis NG, Scheper MA, Papanikolaou VS, Sklavounou A, Sauk JJ. Immunohistochemical expression of the oncogenic molecules active Stat3 and survivin in benign and malignant salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 jun;107(6):837-43. PubMed; PMID: 19272817.
- 32) Garcia-Barros MF, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell

apoptosis. *Science*. 2003 maio 16;300(5622):1155-9. PubMed; PMID: 12750523.

- 33) Brieger J, Schroeder P, Gosepath J, Mann WJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are released by squamous cell carcinoma cells after irradiation and increase resistance to subsequent irradiation. *Int J Mol Med*. 2005 jul;16(1):159-64. PubMed; PMID: 15942693.
- 34) Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for surviving in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 abr 2;99(7):4349-54. PubMed; PMID: 11917134.
- 35) Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 2004;23:7494-506. PubMed; PMID: 15326475.
- 36) Rodel F, Reichert S, Sprenger T, Gaipf US, Mirsch J, Liersch T, et al. The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition. *Curr Med Chem*. 2011;18(2):191-9. PubMed; PMID: 21110807.
- 37) Gosh JC, Dohi T, Raskett CM, Kowalik TF, Altieri DC. Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res*. 2006 dez 15;66(24):11576-9. PubMed; PMID: 17178848.

Anexos

Anexo A – Tabela da graduação histológica do carcinoma ductal invasor

Tabela 1. Escores dos graus tubular, nuclear e índice mitótico

Critérios	Escore
Grau tubular	
Formação tubular presente em:	
Mais de 75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
Menos de 10% do tumor	3
Grau nuclear	
Leve atipia nuclear; núcleos pequenos regulares e uniformes	1
Moderada atipia nuclear; tamanho moderado e variabilidade	2
Intensa atipia nuclear; variabilidade marcante e presença de nucléolos	3
Índice mitótico*	
0 a 5 mitoses por campo de grande aumento	1
6 a 10 mitoses por campo de grande aumento	2
Mais de 11 mitoses por campo de grande aumento	3

*Para microscópio Nikon (diâmetro de campo de 0,44 mm e objetiva de 40x)

FONTE: Rev Bras Mastologia, 2016 jan 6;26(2):47.

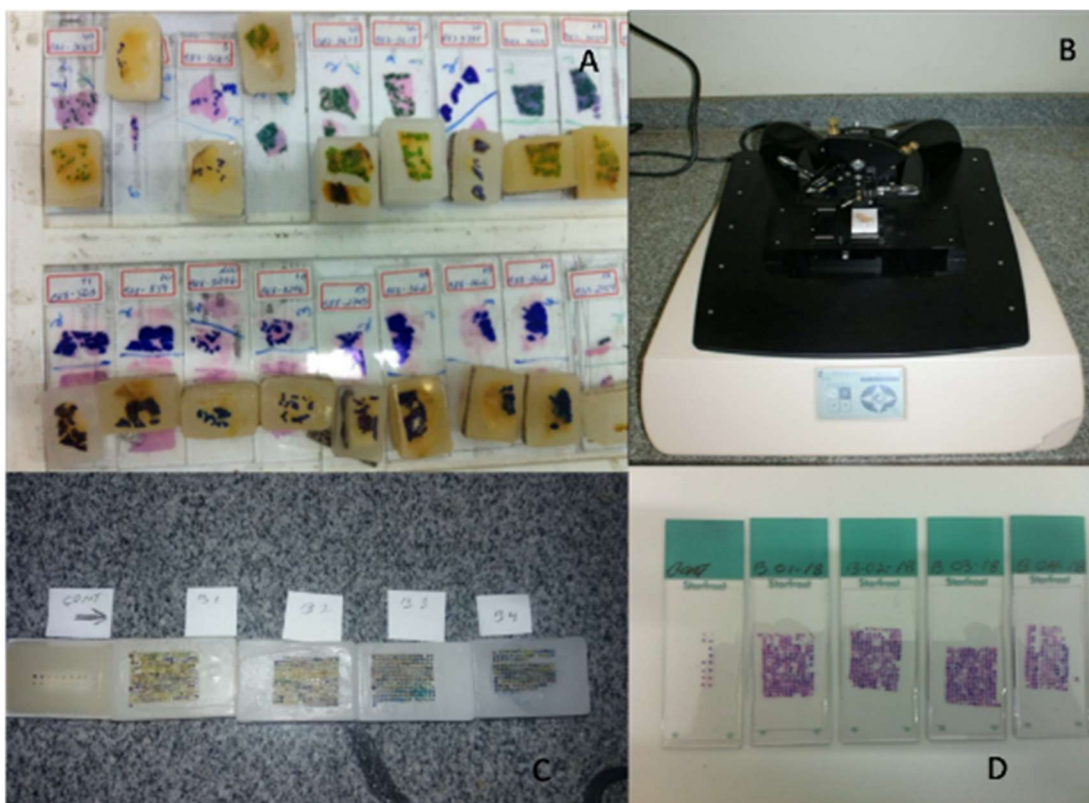
Anexo B – Fotomicrografias

Figura 1: Confeção dos blocos de TMA. A) Laminas histológicas dos carcinomas mamários coradas pela H-E e seus respectivos blocos doadores, com as áreas tumorais marcadas; B) Dispositivo em base fixa para confecção de blocos de TMA (PATHOLOGY DEVICES- USA); C) Blocos de TMA de carcinomas mamários (B1 a B4), e bloco com tecidos-controle das reações imunohistoquímicas; D) Lâminas cortadas a partir dos Blocos de TMA e coradas pela H-E.

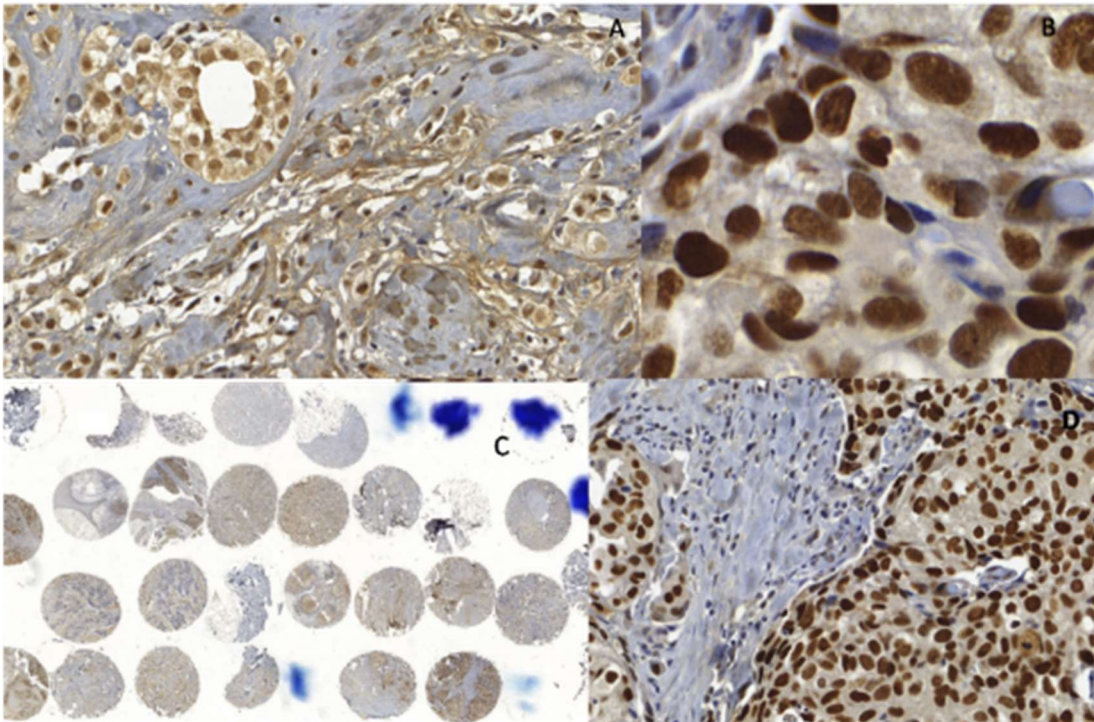


Figura 2: Reação imunoistoquímica para p53. A) reação nuclear fraca; B) reação nuclear forte, detalhe; C) visão panorâmica de parte do bloco com reação para p53; D) p53, reação nuclear forte.

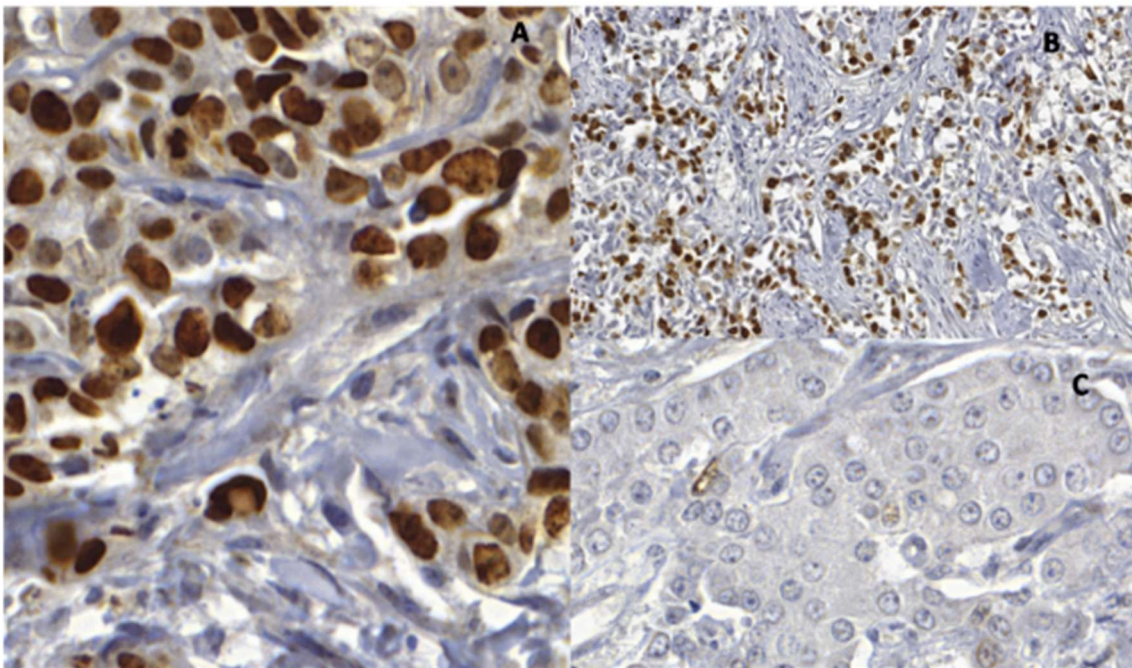


Figura 3: Reação imunoistoquímica para índice de proliferação celular com Ki67. A) alto índice de proliferação celular em detalhe; B) proliferação celular alta, campo aberto; C) índice de proliferação celular baixo.

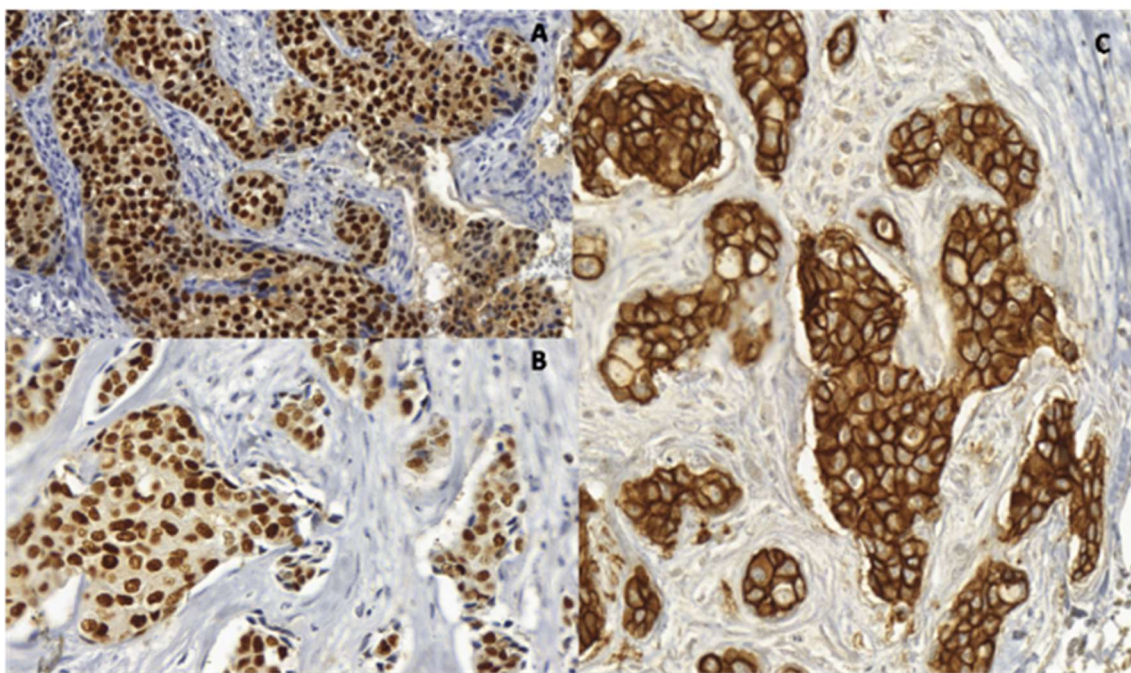


Figura 4: Reação imunoistoquímica para marcadores prognósticos/terapêuticos. A) Receptor de Estrógeno, índice alto; B) Receptor de Progesterona, alto; C) cerb2, reação forte, intensidade 3.

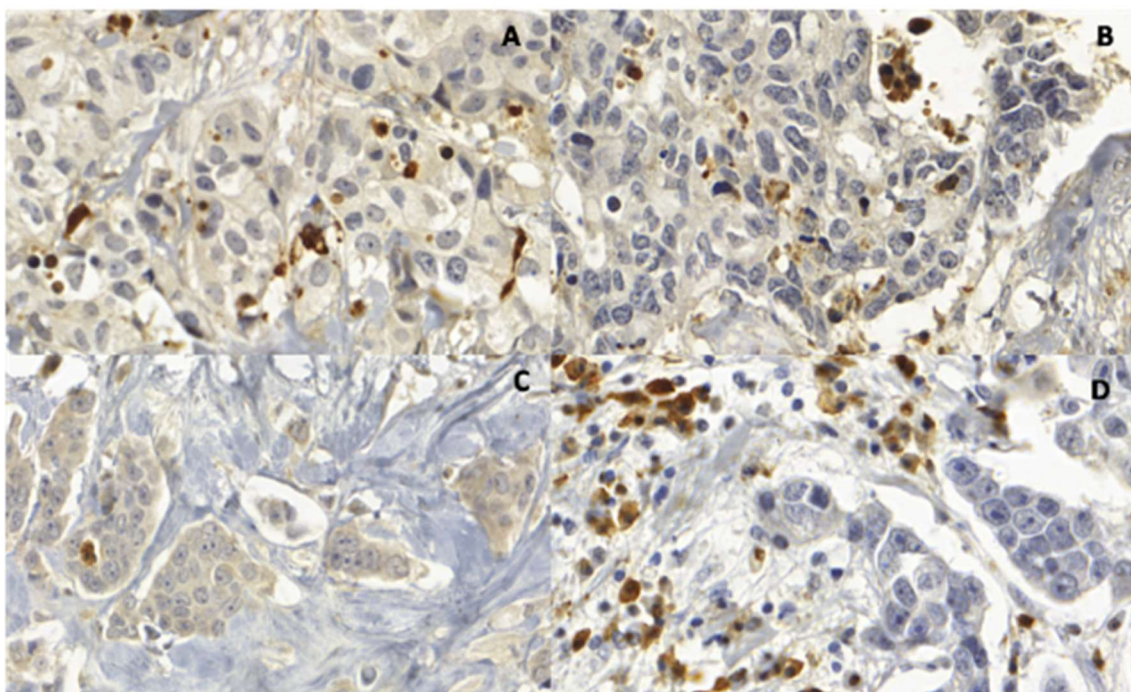


Figura 5: Reação imunoistoquímica para Índice Apoptótico (IA) com uso de anticorpo anti-caspase-3-clivada. A e B) Índice Apoptótico alto nas células tumorais; C) IA baixo nas células tumorais; D) IA alto nos linfócitos peritumorais, baixo nas células tumorais.

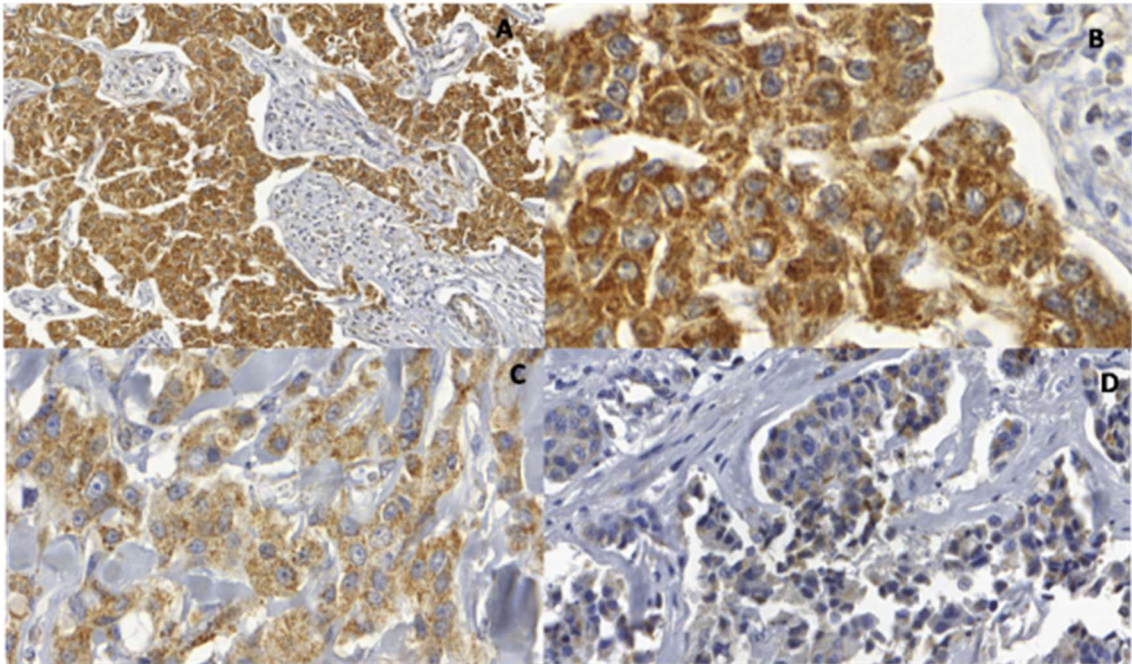


Figura 6: Reação imunoistoquímica para SMAC-Diablo. A e B) Reação forte; C) Reação moderada; D) Reação fraca/negativa.

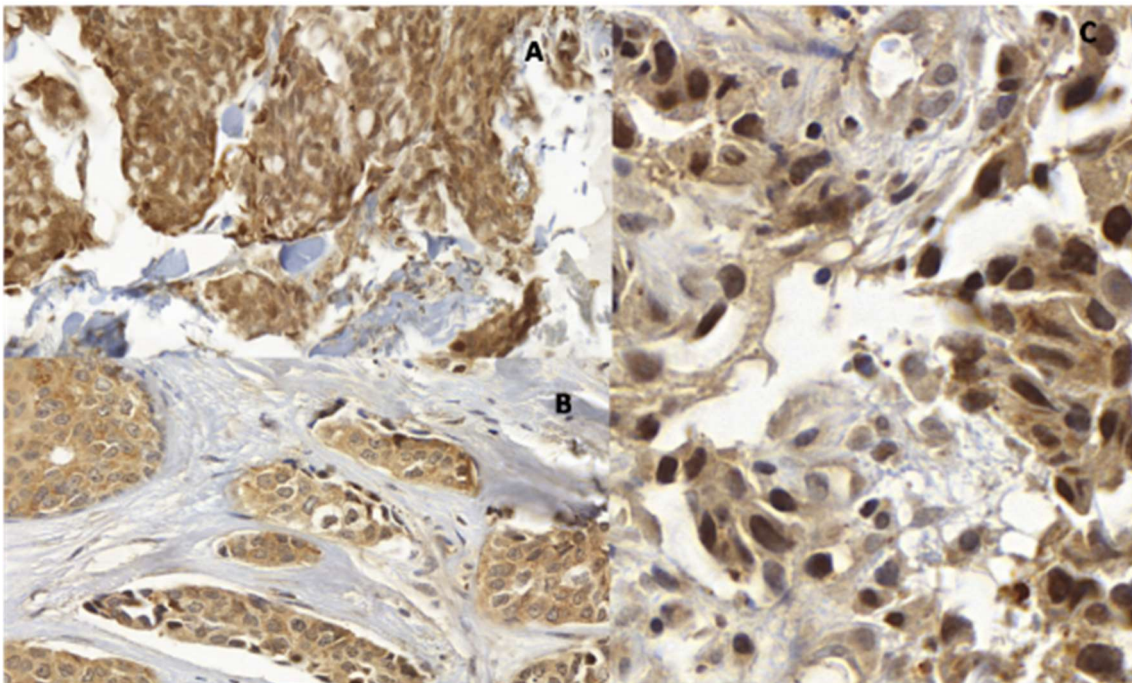


Figura 7: Reação imunoistoquímica para Survivina. A) Reação citoplasmática forte; B) Reação citoplasmática moderada; C) Reação nuclear forte.

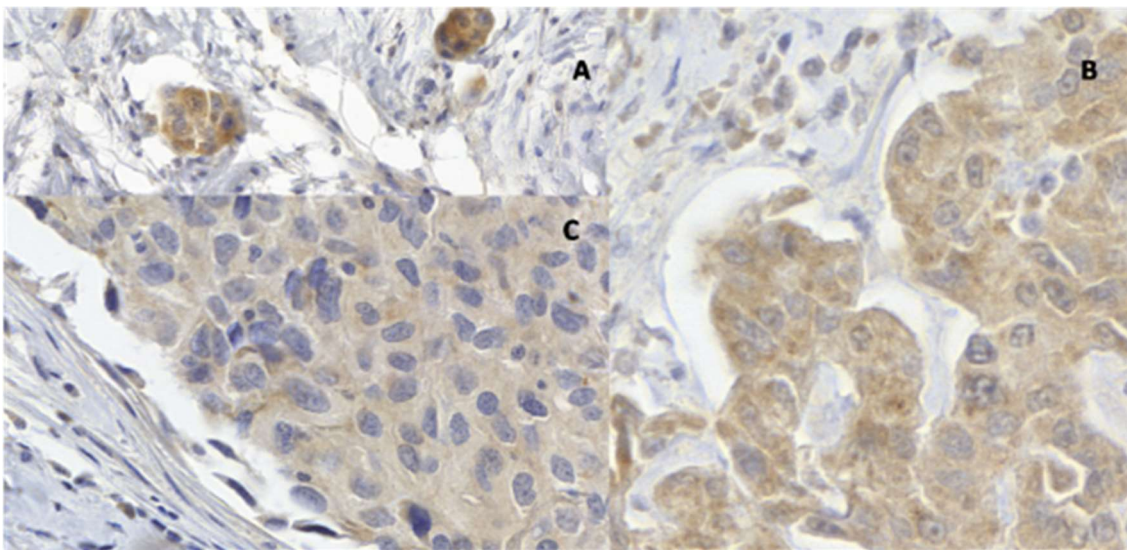


Figura 8: Reação imunoistoquímica para XIAP. A) Reação forte; B) Reação moderada; C) Reação fraca/negativa.

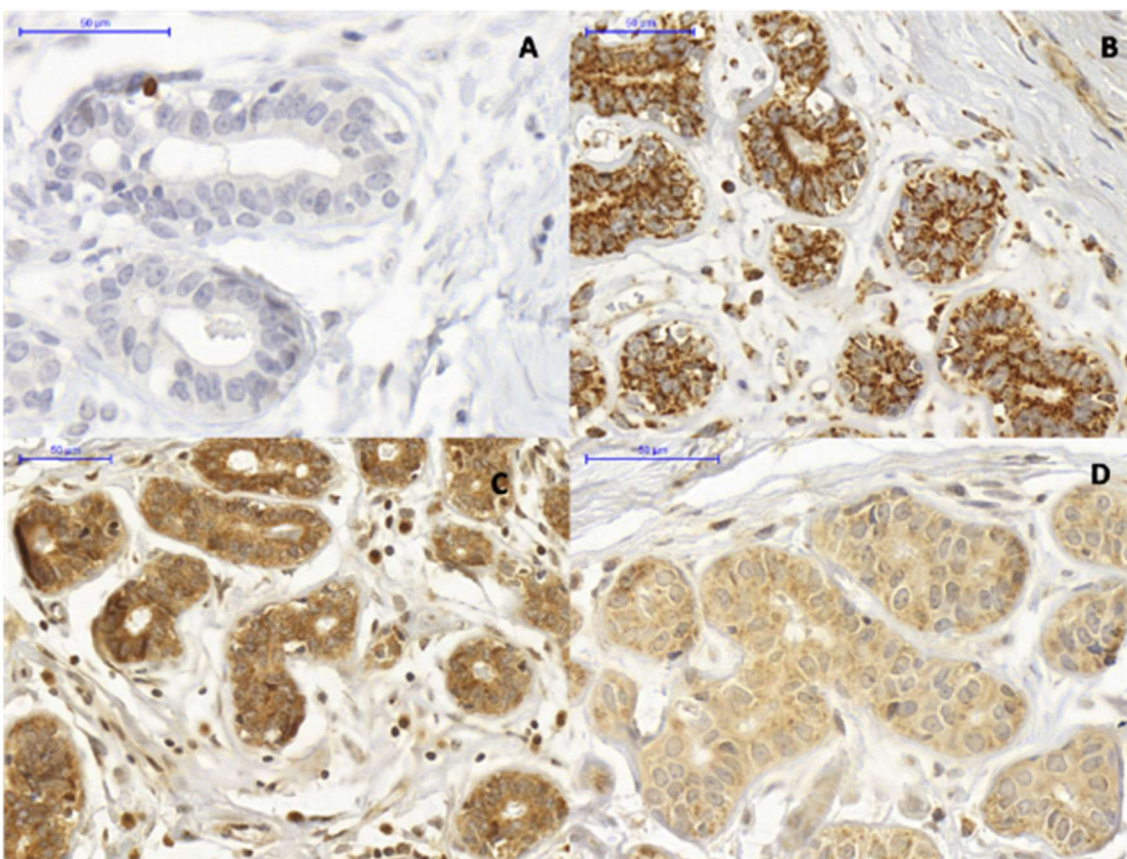


Figura 9: Reações imunoistoquímicas dos marcadores da apoptose nos tecidos mamários das pacientes controle: A) Índice Apoptótico (caspase-3-clivada); B) SMAC/Diablo; C) Survivina; D) XIAP.

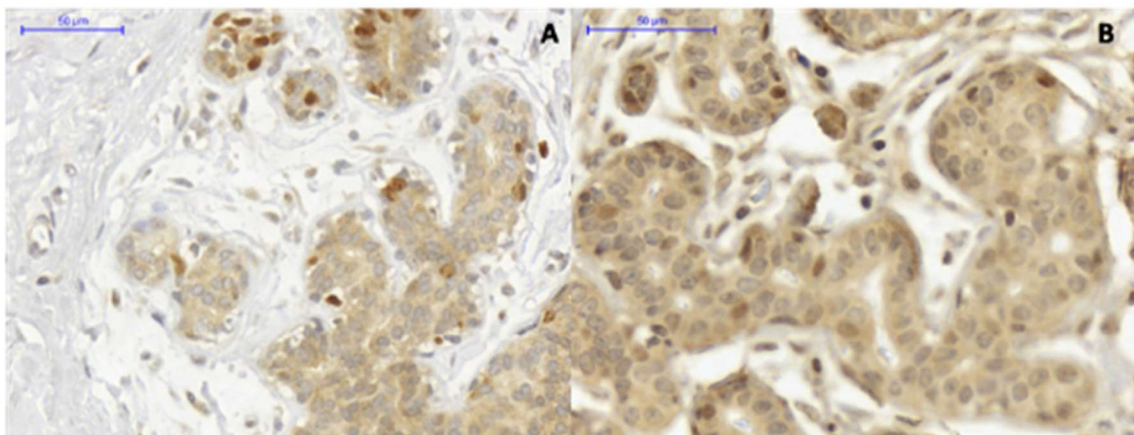


Figura 10: Reações imunoistoquímicas nos tecidos mamários das pacientes controle: A) Índice de proliferação celular com Ki-67; B) p53.

Anexo C – Técnica da realização dos blocos de TMA

Os blocos de TMA foram confeccionados e submetidos a cortes histológicos no departamento de Patologia da EPM-UNIFESP, segundo o protocolo a seguir:

Com o uso de um aparelho Tissue Arrayer Pathology Devices™ foram confeccionados três blocos de TMA conforme especificações do fabricante, seguindo-se as seguintes etapas: 1. Marcação da área selecionada no respectivo bloco de parafina; 2. Utilização do aparelho para criar espaço vasado (“casela”) no bloco receptor; 3. Extração de um cilindro tecidual do bloco doador com 1 mm de diâmetro da respectiva área de interesse previamente selecionada; 4. Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor; 5. Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial; 6. Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento.

Para adesão dos cortes dos blocos de TMA nas lâminas foi utilizado sistema convencional de “pesca” dos cortes em laminas sinalizadas. As amostras foram cortadas com espessura de 4 µm, sendo então utilizadas na técnica imunohistoquímica.

Anexo D – Técnica de imunohistoquímica

As lâminas foram submetidas à técnica de imunohistoquímica no departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center segundo a técnica a seguir:

As lâminas foram desparafinadas em xilol a 60°C por 20 minutos, seguidas imersão em xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram colocadas, sucessivamente, em etanol 100%, etanol 85% e etanol 70%, permanecendo 30 segundos em cada solução. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e em água destilada.

Para a reação imunohistoquímica, a solução tampão citrato 10mM, pH 6,0, foi fervida em panela de pressão (Solar, Rapid Express, 4 ½ litros, Tramontina) destampada e, ao atingir ebulição, foram mergulhadas as lâminas. A panela foi, então, lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2, e após 3 minutos, girada novamente para a liberação do vapor. Ao final da despressurização total, com a panela fechada sob água corrente, foi retirada a tampa desta e as lâminas foram, então, lavadas novamente em água corrente e em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H₂O₂ a 3%, com trocas de 5 minutos, cada. Findadas as trocas, as lâminas passaram por águas corrente e destilada. A solução salina tamponada foi lavada com fosfatos (PBS) 10mM, pH7,4, por 5 minutos.

As lâminas foram, então, encubadas com anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, conforme a Tabela 1 (abaixo), em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, St. Louis, MO, EUA) e azida sódica 0,1% (Merck, 6688), por 30min a 37°C e por 18 horas a 4°C, em câmara úmida.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na reação imunohistoquímica, tal como seu respectivo clone, titulação e fabricante

ANTICORPOS	CLONES	TÍTULOS	FABRICANTES
Ki-67	MiB-1	1:200	Dako #M7240, Glostrup, Dinamarca

ER	SP1 monoclonal em coelho	Readyto use	Dako North America #IR151, Carpinteria, CA, EUA
PR	PgR636	1:300	Dako #M3569, Glostrup, Dinamarca
C-erbB-2	policlonal	1:1500	Dako #A485, Glostrup, Dinamarca
Caspase 3 clivada (D175)	policlonal	1:200	Cell Signaling #9661, Danvers, MA EUA
p53	DO-7	1:200	Dako #M7240
Smac/DIABLO	Y12 monoclonal em coelho	1:100	Epitomics # 1012-1, Burlingame, CA, EUA
Survivin (ab-6)	policlonal	1:50	Thermos/Neomarkers # Rb1629, Fremont, CA EUA
XIAP (H202)	policlonal	1:200	Santa Cruz #sc11426, Santa Cruz, CA, EUA

FONTE: Sueli Nonogaki, A.C. Camargo Câncer Center.

Foi realizada a lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos, cada. Em seguida, procedeu-se à incubação das lâminas com Novo Link Post Primary Block (Novo Link Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7260-k, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido), por 30 min a 37°C. Antes e após esta etapa, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e foram efetuadas 3 trocas de 3 minutos, cada.

A etapa seguinte foi a incubação em solução substrato: 100mg de 3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1 mL de H₂O₂ 6% e 100mL de PBS, por 5 min a 37°C, ao abrigo da luz.

Ao microscópio, observou-se nas lâminas controle, como produto final da reação, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado.

As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris, por 1 minuto, lavadas em águas corrente e destilada, antes e após este procedimento. Procedeu-se a imersão, por duas vezes, em água amoniacal (solução de

hidróxido de amônio 0,5%) lavando, em seguida, em água corrente e em água destilada.

A desidratação das lâminas foi realizada banhando-as, por 30 segundos, em soluções de etanol 80%, etanol 95%, etanol 100% (duas vezes) e xilol (quatro vezes).

Por fim, seguiu-se à montagem das lâminas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Damstadt, Alemanha).

As lâminas foram lidas e os resultados graduados, de acordo com cada marcador imunoistoquímico. O padrão de positividade para os anticorpos utilizados foi a presença de coloração marrom-dourada na região do núcleo, membrana ou citoplasma, de acordo com marcador utilizado.