UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel

Carcinoma Urotelial: correlação entre a imunoexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (Xiap e Survivina) e seu antagonista Smac/DIABLO com índice apoptótico, proliferação celular e prognóstico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

Botucatu
2017

Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel

Carcinoma Urotelial: correlação entre a imunoexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (Xiap e Survivina) e seu antagonista Smac/DIABLO com índice apoptótico, proliferação celular e prognóstico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Flavio de Oliveira Lima

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Berriel, Luiza Jacqueline Costa Nicolau.
Carcinoma urotelial : correlação entre a imunoexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (Xiap e Survivina) e seu antagonista Smac/DIABLO com índice apoptótico, proliferação celular e prognóstico / Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Flávio de Oliveira Lima
Capes: 40105008

1. Bexiga - Câncer. 2. Apoptose. 3. Proteínas Inibidoras de Apoptose. 4. Prognóstico. 5. Imunohistoquímica.

Palavras-chave: Antagonista dos inibidores da apoptose; Carcinoma de células transicionais; Inibidores da apoptose; Prognóstico; Índice apoptótico.

Dedicatória

Aos meus pais, José Henrique e Milaid, e aos meus irmãos, Jorge e Luiz Henrique, por todo amor e apoio incondicional.

Ao meu esposo, Antonio Augusto de Assis Berriel Junior. Sem o seu apoio e o seu amor nada teria sido possível.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Dr. Flávio de Oliveira Lima, pela amizade, paciência e encorajamento.

À coordenadora da Pós-Graduação, Professora Dra. Denise Fecchio, pelo apoio. À chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Professora Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayashi, à vice chefe, Professora Titular Mariângela Esther Alencar Marques, e à Professora Dra. Márcia Guimarães, pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente Carlos César Ramos, pela confecção dos blocos de TMA, Cícera A. da Silva Brito e Rita de Cássia, pelo auxílio na separação de laudos e blocos.

À Joaquim Soares de Almeida, técnico de histopatologia do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP. À Professora Dra. Celina Oshima, pesquisadora do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, pelo auxílio em parte das reações imuno-histoquímicas.

Ao Professor Titular Fernando Augusto Soares, chefe do Serviço de Patologia do A. C. Camargo Cancer Center, e Sueli Nonogaki, técnica de histopatologia do mesmo serviço, pelas reações imuno-histoquímicas.

À Gicliane de Oliveira Curto, técnica de histopatologia do Instituto de Patologia de Avaré, pela confecção dos cortes dos blocos doadores.

Ao Professor Titular Carlos Roberto Padovani e Farid Sallum Neto, pelo auxílio no estudo estatístico.

À Patrícia Perola Dantas, Guilherme Palhares Aversa Santos e Leonardo Ribeiro Nascimento, alunos de Iniciação Científica da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela seleção de pacientes e coleta de dados clínicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro através do Processo 2011/09720-0 (Projeto Apoptose em Tumores Urológicos).

À Helena Zorzeto e Júlia Thalita, pelo apoio logístico e emocional.

"*Tempore quo cognitio simul advenit, amor e medio supersurrexit*".

"Quando o conhecimento sobrevir, ao mesmo tempo o amor se elevará do seio das coisas".

(OUPNEK´HAT, Studio Anquetil Duperron, v.II, p.216)[2]

Resumo

INTRODUÇÃO: O câncer de bexiga é a neoplasia maligna mais comum do trato urinário, sendo o carcinoma urotelial o subtipo histológico mais comum. No momento do diagnóstico, cerca de 75% dos tumores não são invasivos. Entretanto esses tumores são caracterizados por alta frequência de recorrência e frequente progressão para tumor invasivo, com piora significativa no prognóstico. A incapacidade de prever com precisão sua evolução dificulta a escolha terapêutica adequada gerando um impacto na sobrevida dos pacientes. OBJETIVO: Avaliar a imunoexpressão de XIAP, Survivina e Smac/DIABLO em tecido tumoral. Correlacionar os resultados com o índice apoptótico, proliferação celular e imunoexpressão da proteína p53 nestes mesmos tecidos, e com o prognóstico dos pacientes. MÉTODOS: Estudo do tipo coorte retrospectiva, que avaliou pacientes diagnosticados com carcinoma urotelial de bexiga no período de 1980 a 2000, provenientes do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Cortes de 3 µm do bloco de TMA foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para XIAP, Survivina e Smac/DIABLO. As lâminas foram analisadas por dois patologistas, sendo obtidos escores de intensidade de imunoexpressão. Esses escores foram correlacionados entre si e com o índice apoptótico (obtido com o uso de anticorpo anti-caspase-3-clivada), índice de proliferação celular, imunoexpressão da proteína p53 e dados de sobrevida dos pacientes obtidos em prontuário médico. Foi usado o Teste de Associação de Goodman envolvendo contrastes entre e dentro de populações multinomiais considerando o nível de 5% de significância, na avaliação do grau histológico dos carcinomas uroteliais vesicais e seu status de invasão da camada muscular da bexiga, com os marcadores da apoptose estudados (XIAP, Smac/DIABLO, Survivina) e local de prevalência do Índice Apoptótico. O Teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi usado para avaliação da porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e sobrevida em meses com status de invasão da camada muscular da bexiga. Para avaliar as associações entre p53, Survivina nuclear e citoplasmática, Smac/DIABLO, e entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e o índice de proliferação celular (Ki-67), foi usado o Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementando o Teste de comparações múltiplas de Dunn. Na associação entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e a sobrevida em meses foi usada a Medida de Associação de Spearman. RESULTADOS: Dos 210 casos selecionados, 67 foram incluídos. Verificamos uma relação inversa entre a porcentagem do Índice Apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%) e entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística. A sobrevida é significativamente maior entre os pacientes sem

invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial (mediana de 76,5 meses, e valor máximo de 334 meses), comparados àqueles com camada muscular infiltrada pela neoplasia (mediana de sete meses, tempo máximo de 129 meses). A imunoexpressão nuclear da Survivina é mais significativamente negativa nos carcinomas invasivos que nos não invasivos. Quanto à imunoexpressão de Smac/DIABLO, os carcinomas não invasivos têm significativamente mais reações fortes que os invasivos. O mesmo acontece com a reação para XIAP, com mais carcinomas não invasivos positivos comparados aos invasivos. A localização dos "*hot-spots*" do índice apoptótico (reação positiva para caspase-3-clivada) nas superfícies das papilas neoplásicas é significativamente maior nos carcinomas de baixo grau que nos de alto grau. Carcinomas uroteliais com imunoexpressão forte para Smac/DIABLO têm significativamente menor proliferação celular. Em relação ao coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP, Survivina e Smac/DIABLO, em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados. **Conclusão:** Índice apoptótico obtido pela caspase-3-clivada é inversamente proporcional a sobrevida dos pacientes. A survivina é mais expressada nos carcinomas invasivos, podendo ser utilizada como marcador de mau prognóstico. O Smac/DIABLO e XIAP, por sua vez, são mais expressados nos tumores não invasivos. A localização dos "*hot spots*" do índice apoptótico pode ser útil para diferenciar carcinomas de alto e baixo grau.

Abstract

BACKGROUD: Bladder cancer is the most common malignant neoplasm of the urinary tract, with urothelial carcinoma being the most common histological subtype. At the time of diagnosis, about 75% of the tumors are non-invasive. However, these tumors are characterized by high frequency of recurrence and frequent progression to invasive tumor, with significant worsening of the prognosis. The inability to accurately predict their progress makes it difficult to choose the appropriate therapy that has an impact on patient survival. OBJECTIVE: To evaluate the immunoexpression of XIAP, Survivin and Smac/DIABLO in tumor tissue. Correlate the results with the apoptotic index, cell proliferation and immunoexpression of the p53 protein in these same tissues, and with the prognosis of the patients. METHODS: A retrospective cohort study, which evaluated patients diagnosed with bladder urothelial carcinoma from 1980 to 2000, from the Department of Pathology of Botucatu Medical School (UNESP). Three μm sections of the TMA block were submitted to the immunohistochemical reaction for XIAP, Survivin and SMAC / Diablo. The slides were analyzed by two pathologists, and immunoexpression intensity scores were obtained. These scores were correlated with each other and with the apoptotic index (obtained with the use of cleaved anti-caspase-3 antibody), cell proliferation index, immunoexpression of p53 protein and survival data of patients obtained in medical records. RESULTS: Out of the 210 selected cases, 67 were included. We found an inverse relation between the percentage of apoptotic index obtained by the immunohistochemical reaction with caspase-3-cleaved (IA%) and between the survival in months of patients in the series. Survival was significantly higher among patients without invasion of the bladder muscle by urothelial carcinoma (median 76.5 months, and maximum value 334 months), compared to those with muscle layer infiltrated by neoplasia (median of seven months, maximum time of 129 months). Nuclear immunoexpression of Survivin is generally more significantly negative in invasive than noninvasive carcinomas. Regarding the immunoexpression of Smac/DIABLO, non-invasive carcinomas have significantly stronger reactions than invasive ones. The same happens with the reaction for XIAP, with more non-invasive positive carcinomas compared to invasive ones. The localization of the apoptotic index hot spots (caspase-3-cleaved positive reaction) on the surfaces of the neoplastic papillae is significantly higher in low-grade carcinomas (more than 85%, 6 cases versus 1). Urotelial carcinomas with strong immunoexpression for Smac/DIABLO have significantly lower cell proliferation. Regarding the coefficient and the minimum and maximum survival values in months of the patients according to the immunoexpression of the XIAP, Survivin and

Smac/DIABLO proteins, in none of the evaluations the p value was lower than 0.05, indicating a lack of significant results. CONCLUSION: The apoptotic index obtained by caspase-3-cleaved is inversely proportional to patient survival. Survivin is more expressed in invasive carcinomas and may be used as a marker of poor prognosis. Smac/DIABLO and XIAP, on the other hand, are more expressed in non-invasive tumors. The localization of apoptotic index 'hot spots' may be useful in differentiating between high and low grade carcinomas.

Lista de abreviaturas

BIR *Baculovirus IAP Repeat*

Caspase *Cysteine-aspartic acid protease*

c-IAP-1 *celular IAP 1*

c-IAP-2 *celular IAP 2*

DIABLO *Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein with low pl*

DNA *Desoxyribonucleic Acid*

FADD *Faz associated death domain*

FAS L *Fas ligand*

HE Hematocilina e Eosina

IA Índice Apoptótico

IAPs *Inhibitors of Apoptosis Proteins*

NAIP proteína inibidora da apoptose neuronal

NF-κB *Factor nuclear Kappa B*

P53 Proteína 53 (kDa)

SMAC *Second Mitocondrial Activation of Caspases*

TMA *Tissue Microarray*

TNF *Tumor NecrosisFactor*

XAF-1 *Xiap Associated Factor-1*

XIAP *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

Sumário

CAPÍTULO I REVISÃO DA LITERATURA **13**

1. **INTRODUÇÃO** 14
2. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 19
3. **OBJETIVOS** 23
4. **MATERIAIS E MÉTODOS** 24

4.1 **Descrição da amostra e tipo de estudo** 24

4.2 **Seleção dos sujeitos** 24

4.2.1 Critérios de Inclusão 24

4.2.2 Critérios de Exclusão 24

4.3 **Variáveis** **24**

4.3.1 Clínicas 24

4.3.2 Histopatológicas 24

4.4 **Coleta de Dados** 25

4.5 **Processamento de dados** 25

4.5.1 Avaliação de prontuário 25

4.5.2 Critérios histopatológicos 25

4.5.3 Técnica de TMA 25

4.5.4 Técnica de imuno-histoquímica 26

4.5.5 Análise imuno-histoquímica 27

4.6 **Análise estatística** 32

4.7 **Aspectos éticos** 32

CAPÍTULO II ARTIGO CIENTÍFICO **33**

CAPÍTULO III CONCLUSÃO **61**

5. Conclusão 62

ANEXOS **63**

Capítulo I Revisão da Literatura

1. Introdução

O câncer de bexiga é o tumor mais comum do trato urinário, com estimativa em 2012 de 74.000 novos casos e 16.000 mortes nos Estados Unidos da América, e 429.800 novos casos e 165.100 mortes em todo o mundo[1]. No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2016, são 9.670 casos novos de câncer de bexiga, sendo 7.200 em homens e 2.470 em mulheres. Houve 3.642 mortes pela doença em 2013, sendo 2.542 homens e 1.099 mulheres[2].

O carcinoma urotelial, antes chamado de carcinoma de células transicionais, é o tipo morfológico mais comum de câncer de bexiga. Mais de 90% dos casos de câncer de bexiga são diagnosticados com esse tipo morfológico[2]. Tumores de baixo grau apresentam atipia citológica discreta (aumento nuclear, contorno nuclear irregular e distribuição irregular da cromatina) e perda variável da polaridade. Esta categoria implica um risco de recorrência de cerca de 50% e risco de progressão de 5 a 10%. Tumores de alto grau apresentam urotélio com atipia citológica moderada ou severa (pleomorfismo nuclear, nucléolo proeminente e mitoses, incluindo mitoses atípicas), com frequente perda da polaridade e da coesão entre as células. Estes apresentam maior risco de recorrência que os de baixo grau, e risco de progressão de 15 a 40%[37, 38].

Os carcinomas uroteliais da bexiga, que têm como uma de suas características mais marcantes uma taxa relativamente elevada de recorrência e de progressão para invasão dos tecidos vizinhos, constituem um modelo natural rico para o estudo da carcinogênese. Embora 70% dos carcinomas de células transicionais não sejam inicialmente invasivos, tendem a progredir rapidamente quando não devidamente tratados. Destes, de 15% a 20% progridem para câncer invasivo[3]. Os fatores principais que definem a estratégia de tratamento para pacientes com câncer de bexiga são o estadiamento, o grau do tumor, e a presença de metástase[4]. Entretanto, esses indicadores convencionais estabelecidos não garantem uma predição precisa quanto ao prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga[1,6]. Por isso, a identificação de novas características do tumor, como detecção de proteínas com funções celulares específicas, pode contribuir para melhor avaliação quanto ao prognóstico, e assim possibilitar um tratamento mais adequado para cada paciente como, por exemplo, selecionar melhores candidatos para receberem quimioterapia pré-operatória ou, até mesmo, indicar uma cistectomia radical mesmo quando o tumor ainda não seja invasivo[1, 5]. Há necessidade de marcadores sensíveis, específicos e de baixa morbidade, que permitam tanto a detecção precoce do câncer vesical como a estimativa da probabilidade de sua progressão. A identificação dos

tumores que têm maior potencial para progressão pode sustentar decisões por tratamentos mais agressivos, que podem representar maior chance de cura da doença.

Como outras neoplasias malignas, o carcinoma de bexiga é resultado de alterações adquiridas; essas alterações podem se manifestar como indução de oncogenes, perda de genes supressores de tumor, danos aos mecanismos de reparo do DNA, ou interrupção da homeostase do ciclo celular[7]. Um aspecto da célula normal é a "morte celular programada", ou apoptose, que é uma via de morte celular induzida por um mecanismo de suicídio finamente regulado no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu próprio DNA e suas proteínas nucleares e citoplasmáticas[8]. Defeitos nos mecanismos de apoptose podem estender anomalamente a vida da célula, favorecendo o acúmulo de mutações genéticas e a tendência para transformação neoplásica[7, 8]. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa anti-neoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer [9, 10].

A apoptose resulta da ativação de enzimas chamadas caspases, que depende de um equilíbrio entre a produção de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Duas vias distintas convergem para a ativação das caspases: a via mitocondrial (intrínseca) e a via dos receptores de morte (extrínseca)[8, 9].

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da família dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases[9]. Os receptores de morte mais conhecidos são o TNF tipo 1 e a proteína FAS, cujo ligante é chamado de FAS ligante (FASL). Quando o FAS se liga ao FASL, as moléculas Fas se reúnem e formam um sítio de ligação para a proteína adaptadora FADD (*FAZ associated death domain*). A FADD ligada aos receptores de morte recruta a pró-caspase-8 que, por sua vez, ativa a pró-caspase-3, executando a morte por apoptose[8,9,11].

A via intrínseca ocorre pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com a consequente liberação de moléculas indutoras de morte para o citoplasma, em particular o citocromo c, iniciando assim o suicídio celular. No citosol, o citocromo c liga-se a uma proteína chamada APAF-1 (fator ativador da apoptose-1), formando o apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 que, por sua vez, ativa a caspase-3, que vai ocasionar a apoptose.[8, 9 ,11 ,12]

Como a caspase 3 é ativada tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca, ela tem um papel central na execução da apoptose. As caspases ficam latentes em sua forma inativa – o zimogênio, e são ativadas por proteólise[34]. Estudos demonstram que a baixa expressão de caspase 3 está associada com pior prognóstico em pacientes com carcinoma de bexiga não invasivo [35,36].

Os inibidores de apoptose (IAPs) são inibidores fisiológicos da apoptose cuja função é bloquear a ativação das caspases, tornando as células insensíveis ao estímulo apoptótico[11, 13, 14]. As IAPs foram isoladas do genoma do baculovírus (um grupo de vírus de inseto) em 1993. Sabe-se que IAPs possuem um ou mais domínios BIR (repetição IAP de baculovírus), que permitem a elas se ligarem e inibirem as caspases ativadas [9, 16.]

Atualmente, oito IAPs foram identificadas em mamíferos: inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP), celular-IAP (cIAP1), celular-IAP-2 (cIAP2), Livina, ILP2, proteína inibidora da apoptose neuronal (NAIP), Survivina e BRUCE. [11, 13]. A XIAP é capaz de inibir diretamente a atividade enzimática das caspases através da sua ligação com as caspases-3 e 7, evitando assim a apoptose[14, 15, 16]. Foi demonstrado que a expressão aumentada de XIAP pode estar relacionada com a recorrência precoce de câncer de bexiga não invasivo[18], assim como pior prognóstico em outros tipos de tumores, como câncer de mama, colorretal e hepático[16, 18, 20, 21, 22].

A survivina é uma proteína multifuncional que regula o ciclo celular na fase G2 e inibe a apoptose através da inibição das caspases. Expressão elevada de survivina em tumores está associada com estadiamento avançado, mau prognóstico e resposta negativa à quimioterapia[23]. Embora os mecanismos moleculares da survivina não estejam completamente elucidados, considera-se que a regulação da survivina está ligada a proteína p53. A survivina também é regulada pela β-catenina em relação à via de sinalização WNT. A via WNT/β-catenina tem sido descrita como regulador da homeostase urotelial e carcinogênese. [3,7]. Acredita-se que a ação antiapoptótica mediada por survivina se deve mais à perda do p53 do que devido à expressão aumentada de β-catenina[46]. Outro mecanismo de ação da survivina diz respeito ao fator nuclear kappa-β (NF-kβ), que regula a inflamação, imunidade e sobrevida celular, sendo um marcador de carcinogênese. Foi proposto que o complexo survivina-XIAP também funciona como um ativador do NF-kβ[23]. Vários estudos relacionam alta expressão de survivina em cânceres, incluindo pulmão, cólon, pâncreas, próstata e mama. Em carcinoma colorretal, carcinoma de

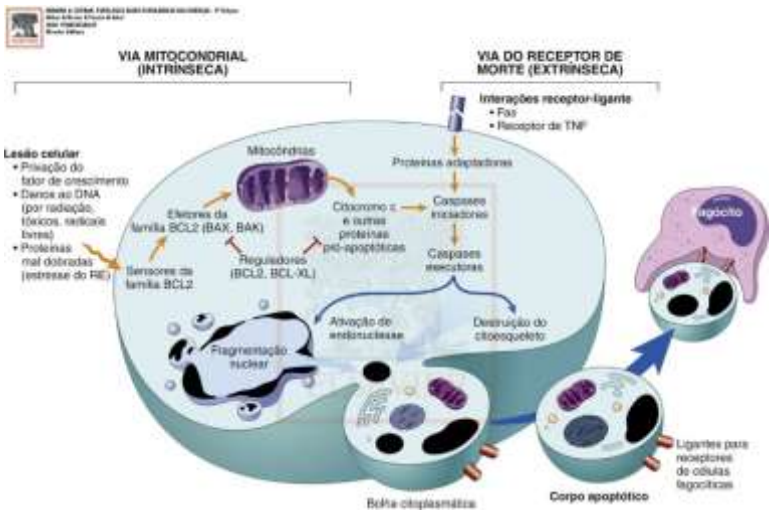
mama, linfoma de grandes células B, câncer esofágico e neuroblastoma, a expressão de survivina está relacionada a prognóstico desfavorável e baixa sobrevida [24, 25, 26, 27, 28, 29].

Os principais antagonistas dos inibidores da apoptose são Smac/DIABLO e XAF1, envolvidos no equilíbrio e regulação do estímulo apoptótico. XAF-1 (*XIAP Associated Factor*-1) se liga à XIAP e impede a inibição da caspase-3, e está presente em todos os tecidos. Smac/DIABLO foi identificado como uma proteína que estimula a ativação da caspase-3 e DIABLO foi identificado independentemente, mas foi demonstrado ser a mesma molécula posteriormente. Smac/DIABLO é expressa na maioria dos tecidos humanos em níveis diferentes. Smac/DIABLO pode se ligar a membros das IAPs, incluindo XIAP, cIAP-1, cIAP-2 e survivina. Uma das formas que o Smac/DIABLO promove a ativação das caspases é deslocando a caspase 9 da ligação com a XIAP, por isso Smac/DIABLO é considerado um fator apoptogênico[16,17,30]. Estudos mostraram que a expressão aumentada deste antagonista das IAPs sensibiliza células neoplásicas resistentes a apoptose induzida por agentes citotóxicos, o que sugere que a Smac/DIABLO tem um papel importante nas respostas apoptóticas em células neoplásicas para tratamento mediados tanto por drogas como mediados pelo sistema imune[31]. Em estudo de 2012, foi demonstrado que os níveis séricos de Smac/DIABLO em pacientes com câncer de bexiga são inversamente proporcionais ao grau histológico e ao estadiamento da doença, e baixo nível sérico foi associado com recorrência precoce da doença, indicando que o Smac/DIABLO pode ser usado como marcador prognóstico que pode ajudar a selecionar pacientes para abordagens cirúrgicas e quimioterápicas mais drásticas[17].

O Ki-67 é considerado um biomarcador primordial para proliferação celular, e o uso de imuno-histoquímica para sua estimativa é amplamente aplicado em patologia[1]. Ki-67 é uma proteína que pode ser detectada durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Comparado com outros biomarcadores moleculares conhecidos, como p53 e survivina, Ki-67 é o marcador geralmente escolhido para marcar proliferação de células tumorais. Recentemente, vários estudos utilizaram o Ki-67 como marcador independente para predizer prognóstico desfavorável em pacientes com tumores de bexiga, correlacionando-o com baixa taxa de sobrevida e chances maiores de recorrência, tanto em tumores invasivos como não invasivos[1, 32, 33]. Entretanto, há controvérsia na literatura, uma vez que outros estudos não correlacionaram alto Ki-67 com prognóstico desfavorável[45]. Os valores de ponto de corte ("*cut off*") para definir Ki-67 alto ou baixo não são totalmente definidos e podem gerar discrepância quanto aos resultados. Um estudo de meta-análise concluiu que um ponto de corte de 20% pode ser o mais próximo do ideal[1], mas observam-se na literatura estudos que usam valores diferentes[43].

Quando a célula sofre um estresse com dano ao DNA, a proteína p53 é ativada e funciona como fator de transcrição e controla genes envolvidos no ciclo celular, como p21 e p16, assim como proteínas pró-apoptóticas[39]. O p53 é um supressor tumoral, e observa-se mutação no gene que o codifica em 53% dos cânceres, inclusive no câncer vesical invasivo, e foi correlacionado com mau prognóstico, progressão para carcinoma invasor e resistência à radioterapia[40, 41]. Entretanto, uma meta-análise que revisou 168 publicações que avaliavam o p53 como marcador prognóstico do câncer de bexiga, não encontrou evidências de que o p53 é um marcador de recorrência, progressão e mortalidade neste tipo de tumor[42].

Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos inibidores da apoptose XIAP e survivina, assim como seu antagonista SMAC/Diablo no carcinoma urotelial de bexiga, correlacionando estes achados com proliferação celular, índice apoptótico e o prognóstico dos pacientes, possibilitaria um melhor entendimento quanto à evolução dos pacientes, visando escolha de terapêutica mais adequada e seguimento mais assíduo, mesmo quando o tumor, no momento diagnóstico, se apresente como uma lesão não invasiva.



Fonte: Kumar, Vinay. Robbins & Cotran. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

2. Referências Bibliográficas

1) Luo Y, Zhang X, Mo M, Tan Z, Huang L. High Ki-67 immunohistochemical reactivity correlates with poor prognostic in bladder carcinoma. Medicine. 2016; 95: 1-18.
2) Instituto Nacional do Câncer (Internet). Brasil: Portal do Instituto Nacional do Câncer (updated in 2016; cited in 2017 Jan 30). Avaliable from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf
3) Senol S, Yildirim A, Ceyran B, Uruc F, Zemheri E. Prognostic significance of survivin, β-catenin and p53 expression in urothelial carcinoma. Bosnian Journal of Basis Medical Science. 2015:15 (4):7-14.
4) Clark P, Agarval N, Biagioli M. Bladder cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2013;11:446-475.
5) Mathieu R,Lucca I, Rouprêt M, Briganti, A, Shariat S. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder. Nature Reviews. Volume 13, August 2016. 471-479.
6) WHO (2014) Tumors of the urinary system and male genital organs. Edited by JN Eble, G Sauter, JI Epstein & IA Sesterhenn. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon pgs 89-120.
7) Sharp J, Hausladen D, Maher M, Wheeler M, Altieri. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. Frontiers of Bioscience. 2002; 7:36-41.
8) Kumar, Vinay. Robbins & Cotran. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
9) Grivicich I, Regner A, Rocha A. Morte Celular por Apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). Revista Brasileira de Cancerologia. 2007; 53(3): 335-343
10) Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature. 2000;407:810-16.
11) Dean E, Ranson M, Blackhall F, Volt S, Dive C. Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptosis proteins from laboratory to clinic. Cancer Treatment Reviews. 2007; 33: 203-212.
12) Costa H, Lima F, Barrezueta L, Oshima C, Siva Jr 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.

13) Chen X, Wang T, Yang D, Wang J, Li X. Expression of the IAP protein Family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patientes. Oncology Letters. 2013; 5: 1278-1284.
14) Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. Onco Targets and Therapy. 2013; 6: 1285-1304.
15) Srivastava A, Singh P, Singh D, Dalela D, Rath S. Evaluation of urinary XIAP as a diagnostic biomarker of carcinoma of urinary bladder. Tumor Biology. 2014; 35: 8243-8248.
16) Augello C, Caruso L, Maggioni M, Donadon M, Montorsi M. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2009; 9: 125-135.
17) Mizutani Y, Katsuoka Y, Bonavida B. Low circulating serum levels of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) in patients with bladder cancer. International Journal of Oncology. 2012. 40: 1246-1250.
18) Li M, Yin Z, Na Y. XIAP as a prognostic marker of early recurrence of nonmuscular invasive bladder cancer. Chin Med J (Engl). 2007; 120 (6): 467-473.
19) Zhang Y, Zhu J, Tang Y. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. Diagn Pathol. 2011; 6-49.
20) Xiang G, Wen X, Wang H, Chen K, Liu H. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in humans in colorectal cancer and its correlation with prognosis. J Surg Oncol. 2009; 100 (8): 708-712.
21) Moussata D, Amara S, Siddeek B. XIAP as a radioresistance factor and prognostic marker for radiotherapy in human rectal adenocarcinoma. Am J Pathol. 2012; 181 (4): 1271-1278.
22) Shi Y, Ding W, Zhou J. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. Hepatology. 2008; 48 (2): 497-507.
23) Cui X, Shen D, Kong C, Zhang Z, Zeng Y. NF-κB supresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression. *in vitro* and *in vivo*. Scientific Reports. 2017; 1-13.
24) Kawasaki H, Altieri D, Lu C. Inhibition of apoptosis by surviving predicts shorter survival rates in colorectal cancer. Cancer Res. 1998; 58: 5071-5074.

25) Tanaka K, Iwamoto S, Gon G. Expression of suvivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin Cancer Res. 2000; 6: 127-134.
26) Monzo M, Rosell R, Felip E. A novel antiapoptosis gene: Re-expression of survivin Messenger RNA on prognosis marker in non-small-cell lung cancers. J Clin Onc. 1999; 17: 2100-2104.
27) Adida C, Haioun C, Gaulard P. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. Blood. 2000; 96: 1921-1925.
28) Kato J, Kuwabara Y, Mitani M. Expression of surviving on esophageal cancer: Correlation with the prognosis and response to chemotherapy. Int J Cancer. 2001; 95: 92-95.
29) Islam A, Kageyama H, Takada N. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. Oncogene. 2000; 19: 617-623.
30) Verhagen A, Ekert P, Pakusch M, Silke J, Connolly L. Iddentification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell. 2000; 102: 43-53.
31) Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin K. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL – or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. Nat Med. 2002. 8: 808-815.
32) Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz P. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. J NatlCancer Inst. 2009; 32: 114-119.
33) Wang L, Xylinas E, Kent M. Combining smoking information and molecular markers improves prognostic in patients with urothelial carcinoma in bladder. Urol Oncol. 2014; 32: 433-440.
34) Salvesen, G. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. Cell Death and Differentiation. 2002; 9: 3-5.
35) Wang J, Zhang X, Wei P, Zhang J, Niu Y. Livin, Survivin and Caspase 3 as early recurrence markers. World J Urol. 2014; 32:1477–1484.
36) Ather M, Nazim S. New and contemporary markers of prognosis in nonmuscle invasive urothelial cancer. Korean J Urol. 2015; 56: 553-564.

37) Amin M, Smith S, Reuter V, Epstein J, Grignon D. Update for Practicing Pathologist: the International Consultation on Urologic Disease – European association of urology consultation on bladder cancer. Modern Pathology. 2015; 28: 612-630.
38) Grignon, D. The current classification of urothelial neoplasms. Modern Pathology. 2009; 22: 60-69.
39) Smolensky D, Rathore K, Cekanova M. Molecular targets in urothelial cancer: detection, treatment, and animal models of bladder cancer. Drug Design, Development and Therapy. 2016; 10: 3305-3322.
40) Esrig D, Elmajian D, Groshen S. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. N Engl J Med. 1994; 331(19):1259–1264.
41) Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. Oncol Res. 1994; 6(12):569–579.
42) Malats N, Bustos A, Nascimento C, Fernandez F, Rivas M. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta analysis and review. Lancet Oncol 2005; 6: 678–86.
43) Surbhi S, Singh U, Sharma S, Kaur N. Correlation of Mitotic Index, Ag Nor Count, Ki-67 and Bcl-2 with Grade and Stage in Papillary Urothelial Bladder Cancer. Urology Journal. 2014; 11 (01): 1238-1247.
44) Andrade V, Cunha I, Silva E, Ayala F, Sato Y. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43 (1): 55-60.
45) Tanabe K, Yoshida S, Koga F. High Ki-67 expression predicts favorable survival in muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiation-based bladder-sparing protocol. Clin Genitourin Cancer. 2015; 13: 243-251.
46) Chang E, Dohanue J, Smith A, Hornick J, Rao J, Wang J et al. Loss of p53, rather than β-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistence to apoptosis in an esophageal cancer cell line. J Thorac Cardiovasc Surg 2010: 140 (1): 225-232.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos histopatológicos do carcinoma urotelial de bexiga da nossa casuística, graduando os tumores em alto e baixo grau de acordo com os atuais critérios citológicos e arquiteturais; realizar análise imuno-histoquímica nos tecidos em parafina utilizando os seguintes marcadores: Caspase-3 clivada, XIAP, Survivina, Smac/Diablo, Ki-67 e p53, e avaliar sua correlação com o prognóstico dos pacientes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a imunoexpressão dos inibidores da apoptose (IAPs) e do seu inibidor SMAC/DIABLO nos carcinomas uroteliais vesicais.

- Avaliar o índice apoptótico nos carcinomas uroteliais vesicais de alto e baixo graus com o uso de anticorpo anti-caspase-3-clivada.

- Relacionar esses achados com a proliferação celular (imunoexpressão de Ki-67), a expressão de p53 e prognóstico dos pacientes.

4. Materiais e métodos

4.1 Descrição da amostra e tipo de estudo.

A amostra foi obtida a partir do total de lesões com diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga feito por biópsia, ressecção transuretral de bexiga ou cistectomia, provenientes do serviço de Patologia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 1980 a 2000 (vinte anos). A partir da amostra, foi realizado estudo de Coorte retrospectiva.

4.2 Seleção dos sujeitos

Foram selecionados 210 laudos de biópsias presentes nos arquivos do Departamento de Patologia da FMB, de pacientes diagnosticados com carcinoma de bexiga no período de 1980 a 2000– UNESP, que tiveram seu diagnóstico anatomopatológico através de biópsia ou peça cirúrgica entre os anos de 1980 e 2000. Foram selecionadas também 17 biópsias vesicais sem alterações no exame anatomopatológico para serem usados como casos-controle.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos:

1. Pacientes cujos prontuários médicos não foram encontrados.
2. Blocos de parafina que não apresentavam condições técnicas para realização de análise imuno-histoquímica.
3. Pacientes que não possuíam blocos de parafina.

   Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra resultou em 67 casos.

4.3.1Variáveis clínicas

Foram extraídas a partir do prontuário médico sexo, idade, diagnóstico e evolução.

4.3.2 Variáveis histopatológicas

Foram extraídos a partir de revisão dos laudos e das lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) os dados de estadiamento, natureza do material, o tipo histológico e grau do tumor.

4.4 Coleta de dados

Uma vez identificados e separados os laudos anatomopatológicos emitidos no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), foram avaliados os prontuários médicos dos pacientes acompanhados pelo serviço de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Foram retirados do arquivo as lâminas e os respectivos blocos para a realização deste estudo.

4.5 Processamento de dados

4.5.1 Avaliação do prontuário

Foram analisados dados epidemiológicos como sexo e idade. As informações sobre os tumores foram obtidas a partir dos laudos anatomopatológicos. Os aspectos evolutivos, como seguimento dos pacientes, tempo de sobrevida, óbito por carcinoma vesical ou por outras doenças, foram observados nos prontuários médicos e são referentes aos atendimentos realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

4.5.2 Critérios histopatológicos

As lâminas dos espécimes anatomopatológicos estavam previamente fixadas e coradas pelo método de HE, seguindo o protocolo do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Este material foi reavaliado por dois patologistas (F. O. L. e L. J. C. N. B.) para identificar o tipo histológico do tumor, o grau da lesão e presença ou não de invasão.

4.5.3 Técnica de *TissueMicroarray* (TMA)

A partir das lâminas obtidas, foram selecionadas duas áreas morfologicamente significativas do carcinoma. Tais lâminas, com as áreas já selecionadas, foram sobrepostas aos respectivos blocos e em cada um destes foram delimitados os locais de extração do material. De cada bloco foram extraídos dois cilindros de 1 mm de diâmetro que foram depositados nos blocos receptores. Em cada bloco receptor foi feito o corte sequencial de 3 micrômetros de espessura, sendo que o primeiro corte foi utilizado para confecção de lâmina corada por Hematoxilina-Eosina (HE) para controle morfológico da presença do carcinoma. Os demais cortes foram envolvidos em uma camada de parafina até a sua utilização no processo de imuno-histoquímica (IHQ).

4.5.4 Técnica de Imuno-histoquímica

As lâminas foram desparafinizadas em xilol a 60ºC por 20 minutos, seguida por 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. Após, foram lavadas em água corrente e destilada.

Para a reação imuno-histoquímica, a solução tampão citrato10 mM 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, sendo após 3 minutos girada novamente para 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 destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H_2O_2 a 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada. Findadas as trocas, as lâminas passaram por água corrente e destilada. A solução salina tamponada foi lavada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

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

Foi feita lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos cada. Em seguida, sucedeu-se à incubação das laminas com NovoLink Post PrimaryBlock (NovoLink Max Polymer, LeicaBiosystems 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, sendo realizadas 3 trocas de 3 minutos cada.

A etapa seguinte foi a incubação em solução substrato: 100 mg 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 100 mL de PBS por 5 minutos a 37ºC, ao abrigo da luz.

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

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, sendo que foram lavadas em água corrente e em água destilada antes e após este procedimento. Seguiu-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 Entellann (Merck, 1.07961, Damstadt, Alemanha).

Os clones, fabricantes, diluições e métodos de recuperação empregados foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos utilizados no estudo imuno-histoquímico.

Anticorpos	**Clones**	**Títulos**	**Fabricantes**
Ki-67	MiB-1	1:200	Dako #M7240, 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

4.5.5 Análise da Imuno-histoquímica

O padrão de positividade para os anticorpos primários anti-proteínas da XIAP, Survivina, SMAC/Diablo, Caspase-3 clivada, Ki-67 e p53 foi o aparecimento de coloração marrom-acastanhada na área nuclear ou no citoplasma da célula. Foram usados como controle positivo lâminas contendo cortes histológicos comprovados anteriormente como positivos para os marcadores a serem utilizados. As mesmas lâminas foram usadas como controle negativo, subtraindo-se o anticorpo primário da reação.

Os critérios para avaliação das proteínas p53, survivina e Smac/DIABLO foram: intensidade da marcação nuclear (p53 e survivina) e citoplasmática (survivina e SMAC/Diablo)

em escala de 0 a 2, sendo 0 considerado negativo, 1 considerado fraco e 2 considerado forte. O critério para avaliação do inibidor da apoptose XIAP foi: intensidade da marcação nuclear em escala de 0 a 1, sendo 0 considerado negativo e 1 considerado positivo.

Para a avaliação do índice apoptótico, foi utilizado o marcadorcaspase-3-clivada, observando-se a positividade citoplasmática em células isoladas a cada 100 células no campo com marcação mais intensa e numerosa ("*hot spot"*). Observamos também se o campo com maior marcação se localizava no meio do tumor ou em células neoplásicas na superfície das papilas. O critério utilizado foi: 0 para positividade no meio do tumor e 1 para positividade na superfície da papila.

Para a avaliação da proliferação celular foi utilizado o marcadorKi-67 contando-se os núcleos positivos e calculada sua porcentagem em relação ao total. Foram feitas três análises diferentes com os resultados obtidos, utilizando na primeira análise: até 15% dos núcleos positivos foi atribuído 0, acima de 15% de positividade foi atribuído 1. Na segunda análise, foi atribuído 0 quando até 25% dos núcleos estavam positivos, e 1 quando havia mais de 25% de positividade nuclear. Na terceira análise, houve três estratificações, com até 10% de positividade (atribuído 0), de 11% a 25% de positividade (atribuído 1) e mais de 25% de positividade (atribuído 2). A seguir, figuras de 1 a 6 evidenciando negatividade e positividade dos imunomarcadores.

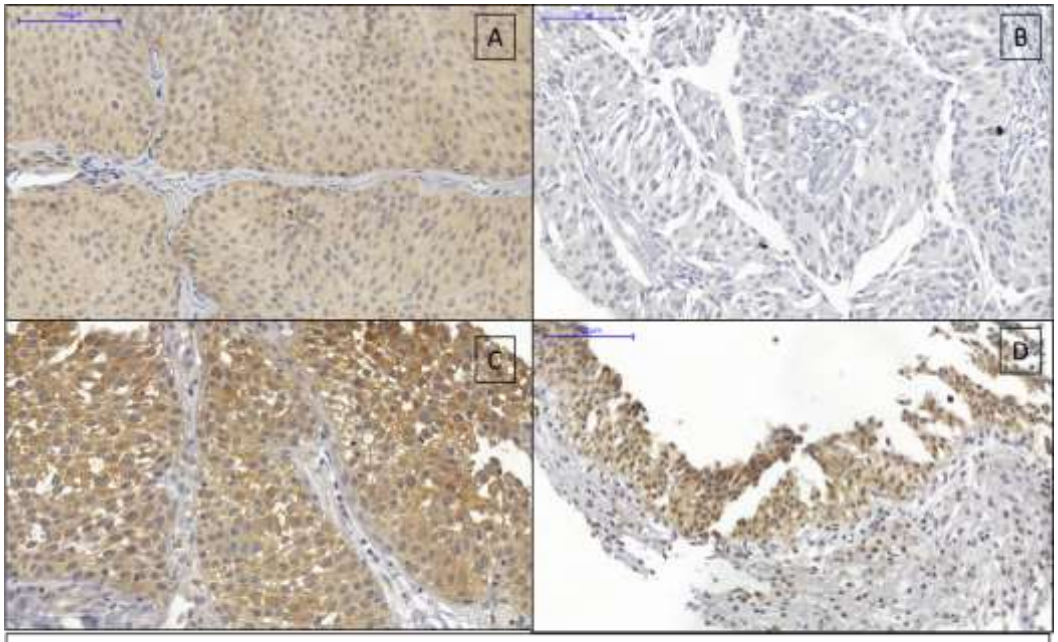


Figura 1: Reação imunoistoquímica para XIAP. A: reação positiva fraca no tumor; B: reação negativa no tumor; C: reação positiva no tumor, pouco mais intensa que em A, porém não considerada de intensidade forte; D: reação positiva fraca na mucosa urotelial de paciente-controle.

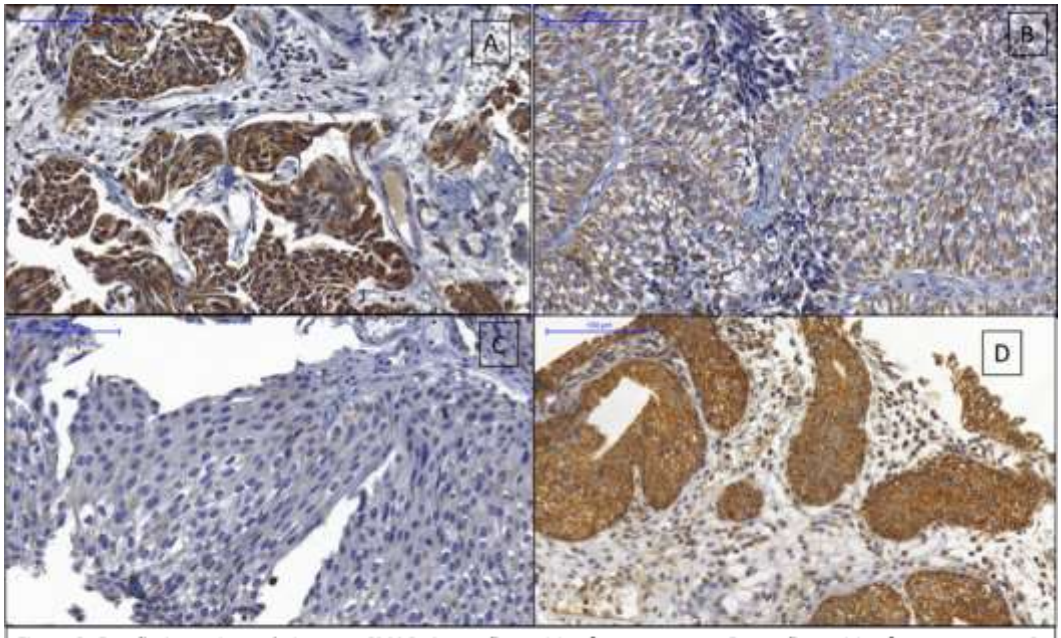


Figura 2: Reação imunoistoquímica para SMAC. A: reação positiva forte no tumor; B: reação positiva fraca no tumor; C: reação negativa no tumor; D: reação forte na mucosa urotelial de paciente-controle.

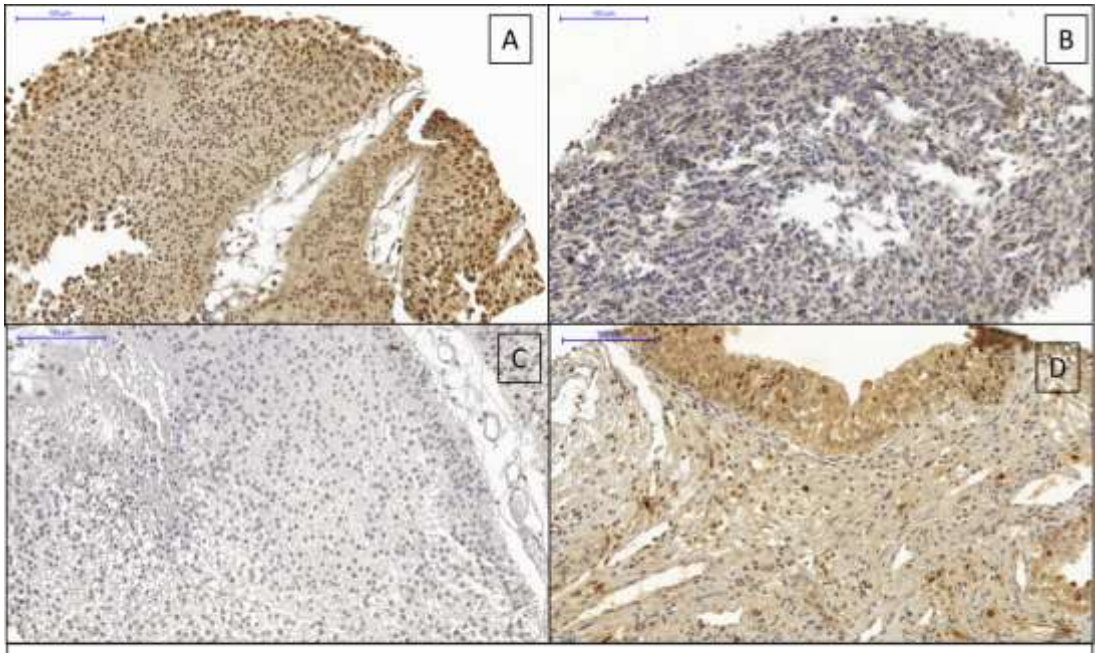


Figura 3: Reação imunoistoquímica para Survivina. A: reação positiva forte no tumor, nuclear e citoplasmática; B: reação positiva fraca no tumor; C: reação negativa no tumor; D: reação positiva na mucosa urotelial de paciente-controle.

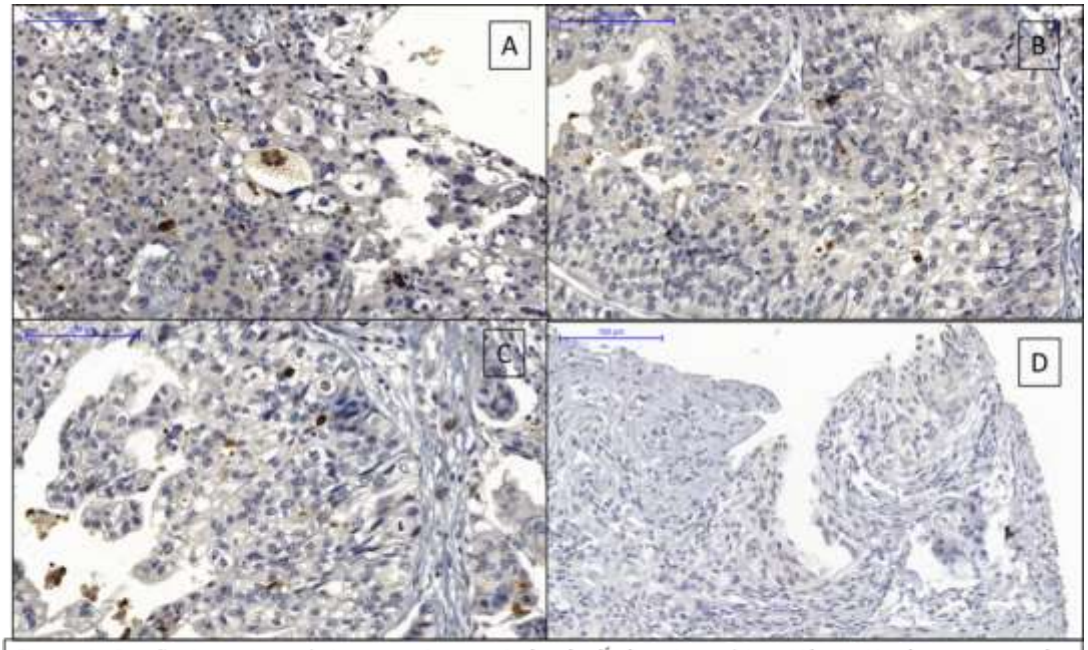


Figura 4: Reação imunoistoquímica para Caspase-3-clivada (Índice Apoptótico, IA). A: IA alto no meio dos agrupamentos de células tumorais; B: IA alto na superfície das papilas neoplásicas; C: IA moderado no tumor; D: Ausência de imunoexpressão de caspase-3-clivada na mucosa urotelial de paciente-controle, com IA zero.

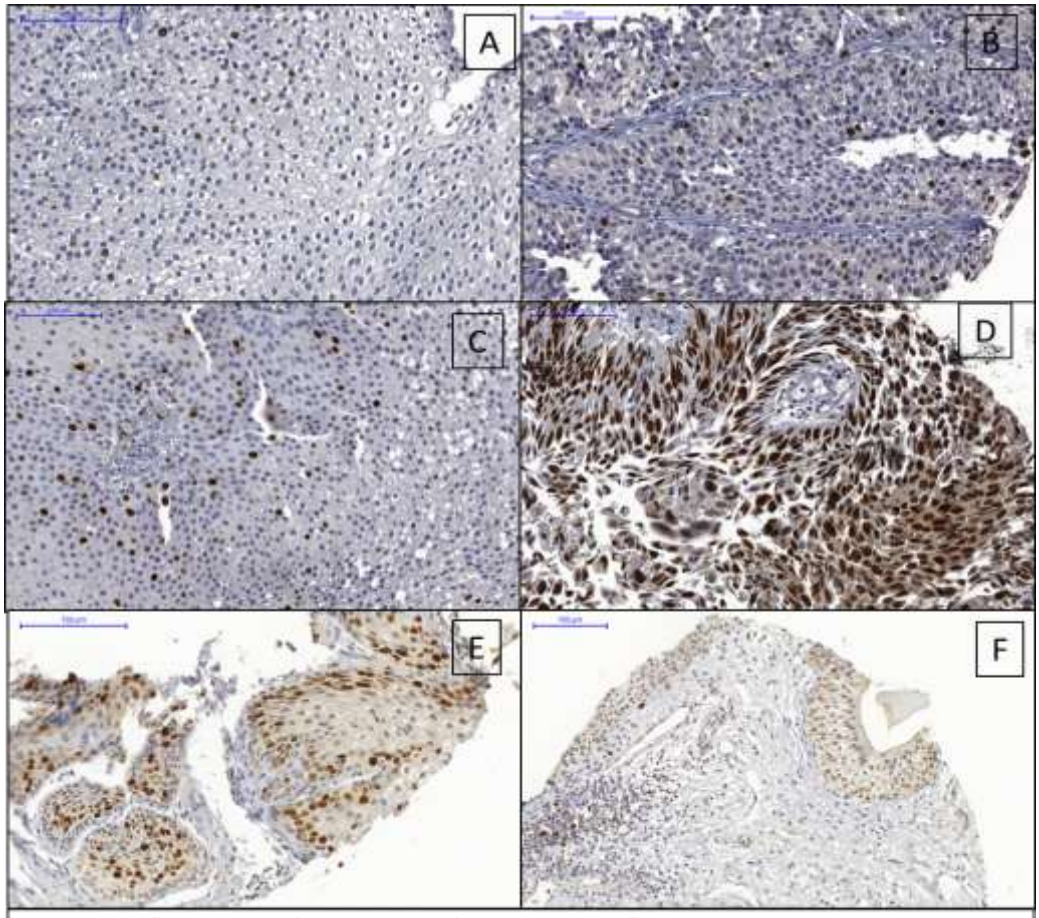


Figura 5: Reação imunoistoquímica para Ki-67 (índice de proliferação celular). A: Abaixo de 10% no tumor; B: até 15% no tumor; C: entre 11 e 25% no tumor; D: mais de 25% no tumor (em quase 100% das células nesse caso; E: proliferação celular alta na mucosa urotelial de paciente-controle; F: proliferação celular baixa na mucosa urotelial de paciente-controle.

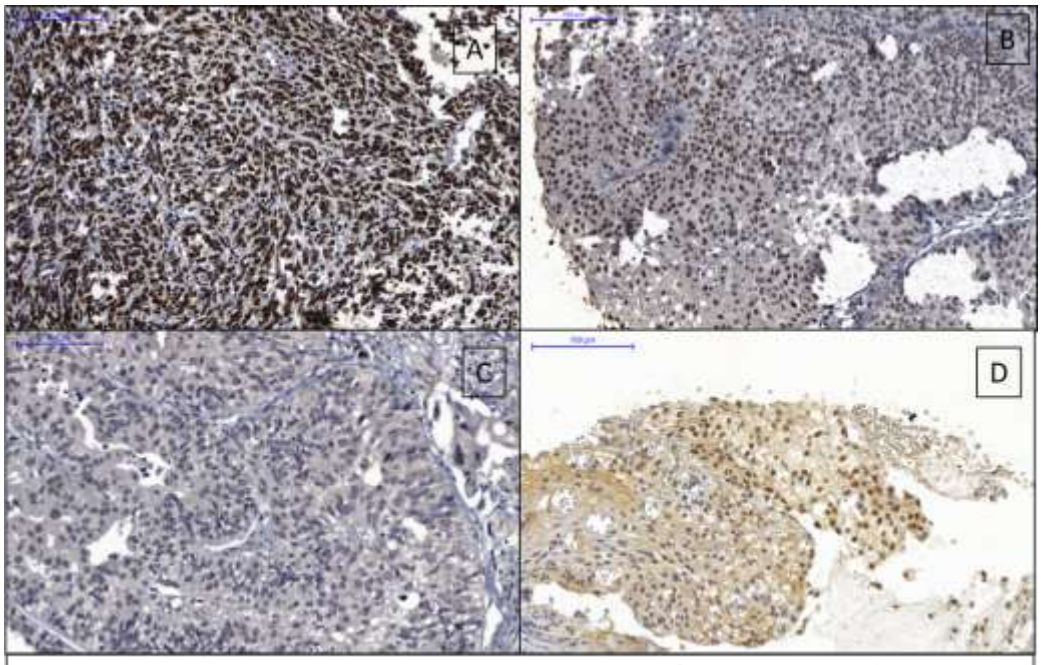


Figura 6: Reação imunoistoquímica para p53. A: reação positiva forte no tumor, nuclear; B: reação positiva fraca no tumor; C: reação negativa no tumor; D: reação positiva fraca na mucosa urotelial de paciente-controle.

4.6 Análise estatística

Foi usado o teste de associação de Goodman envolvendo contrastes entre e dentro de populações multinominais (Goodman, 1964; Goodman, 1965), considerando o nível de 5% de significância, na avaliação do grau histológico dos carcinomas uroteliais vesicais e seu status de invasão da camada muscular da bexiga, com os marcadores da apoptose estudados (XIAP, Smac/DIABLO e Survivina) e local de prevalência do Índice Apoptótico (IA). Também usado para as mesmas associações entre índice de proliferação celular (Ki-67) com os marcadores apoptóticos estudados, e entre os mesmos marcadores, uns com outros, além da comparação entre os pacientes-controle e pacientes da casuística quanto a imunoexpressão de XIAP, Smac/DIABLO, Survivina nuclear e citoplasmática, p53, Ki-67 em escalas e localização preferencial do IA.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 2009) foi usado para avaliação da porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e sobrevida em meses com status de invasão da camada muscular da bexiga, com o grau histológico dos carcinomas uroteliais, com a localização preferencial do IA e também com imunorreação para XIAP, além da avaliação da sobrevida em meses com o grau histológico e status de invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial. A comparação entre os Índices Apoptótico (caspase-3-clivada) e de proliferação celular (Ki-67) dos pacientes-controle e dos pacientes da casuística também usou esse teste.

Para avaliar as associações entre p53, Survivina nuclear e citoplasmática, Smac/DIABLO, e entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e o índice de proliferação celular (Ki-67), foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementando o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 2009).

Na associação entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e a sobrevida em meses foi usada a medida de associação de Spearman (Zar, 2009).

4.7 Aspectos éticos

Para a utilização dos dados dos pacientes para este estudo, foram obedecidos os preceitos do Código de Ética Médica. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) protocolo 3903/2011; Of. 79/2015 (vide Anexos).

Capítulo II Artigo Científico

Os resultados deste estudo são apresentados na forma de artigo científico.

Título: Carcinoma Urotelial: correlação entre a imunoexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (XIAP e Survivina) e seu antagonista Smac/DIABLO com índice apoptótico, proliferação celular e prognóstico.

Autores: Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel[a], Leonardo Ribeiro Nascimento[a], Celina Oshima [c], Carlos Roberto Padovani [b], Farid Sallum Neto [b], Sueli Nonogaki[d], Fernando A. Soares[d], Flávio de Oliveira Lima [a]

a- Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
b- Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
c- Escola Paulista de Medicina - UNIFESP
d- A. C. Camargo Cancer Center

Autor correspondente:

Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel, MD.

Departamento de Patologia.

Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP),

Distrito de Rubião Júnior, s/n.

CEP: 18618-970.

Telefone: + 55 (61) 981547611.

E-mail: luizapatologia@gmail.com

Palavras-chave: carcinoma de células transicionais, apoptose, proteínas inibidores da apoptose, antagonista da apoptose, proteína inibidora da apoptose ligado ao cromossomo X, Survivina, Smac/DIABLO, índice apoptótico, proliferação celular, prognóstico.

Conflito de interesse: nada a declarar.

Resumo

Introdução: O câncer de bexiga é a neoplasia maligna mais comum do trato urinário, sendo o carcinoma urotelial o subtipo histológico mais comum. No momento do diagnóstico, cerca de 75% dos tumores não são invasivos, entretanto esses tumores são caracterizados por alta frequência de recorrência e progressão para tumor invasivo, com piora significativa no prognóstico. A incapacidade de prever com precisão sua evolução dificulta a escolha terapêutica adequada gerando um impacto na sobrevida dos pacientes. **Objetivo:** Avaliar a imunoexpressão de XIAP, Survivina e Smac/DIABLO em tecido tumoral. Correlacionar os resultados com o índice apoptótico, proliferação celular e imunoexpressão da proteína p53 nestes mesmos tecidos, e com o prognóstico dos pacientes. **Métodos:** Estudo do tipo coorte retrospectiva, que avaliou pacientes diagnosticados com Carcinoma Urotelial de bexiga no período de 1980 a 2000, provenientes do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Cortes de 3 µm do bloco de TMA foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para XIAP, Survivina e Smac/DIABLO. As lâminas foram analisadas por dois patologistas, sendo obtidos escores de intensidade de imunoexpressão. Esses escores foram correlacionados entre si e com o índice apoptótico (obtido com o uso de anticorpo anti-caspase 3 clivada), índice de proliferação celular, imunoexpressão da proteína p53 e dados de sobrevida dos pacientes obtidos em prontuário médico. **Resultados:** Verificamos uma relação inversa entre a porcentagem do índice apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%) e entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística. A sobrevida é significativamente maior entre os pacientes sem invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial (mediana de 76,5 meses, e valor máximo de 334 meses), comparados àqueles com camada muscular infiltrada pela neoplasia (mediana de sete meses, tempo máximo de 129 meses). A localização dos "*hot-spots*" do índice apoptótico (reação positiva para caspase-3-clivada) nas superfícies das papilas neoplásicas é significativamente maior nos carcinomas de baixo grau (mais de 85%, 6 casos contra 1) que nos de alto grau. Em relação ao coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP, Survivina e Smac/DIABLO, em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados. Conclusão: O índice apoptótico (caspase-3-clivada) apresenta relação inversa com sobrevida dos pacientes. Pacientes com tumores invasivos apresentam pior prognóstico. Os carcinomas de baixo grau apresentam maior concentração de células apoptóticas na superfície das papilas

neoplásicas. Não foi observada correlação entre a imunoexpressão o das proteínas XIAP, Survivina e SMAC/Diablo com a sobrevida dos pacientes da casuística.

Introdução

O câncer de bexiga é o tumor mais comum do trato urinário, com estimativa em 2012 de 74.000 novos casos e 16.000 mortes nos Estados Unidos da América, e 429.800 novos casos e 165.100 mortes em todo o mundo[1]. No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2016, são 9.670 casos novos de câncer de bexiga, sendo 7.200 em homens e 2.470 em mulheres. Houve 3.642 mortes pela doença em 2013, sendo 2.542 homens e 1.099 mulheres[2].

O carcinoma urotelial, também chamado de carcinoma de células transicionais, é o tipo morfológico mais comum de câncer de bexiga. Mais de 90% dos casos de câncer de bexiga são diagnosticados com esse tipo morfológico[2]. Embora 70% dos carcinomas de células transicionais não sejam inicialmente invasivos, tendem a progredir rapidamente quando não devidamente tratados. Destes, de 15% a 20% progridem para câncer invasivo[3]. Os fatores principais que definem a estratégia de tratamento para pacientes com câncer de bexiga são o estadiamento e o grau do tumor, e a presença de metástase[4,5]. Entretanto, esses indicadores convencionais estabelecidos não garantem uma predição precisa quanto ao prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga[1,6].

Como outras neoplasias malignas, o carcinoma de bexiga é resultado de alterações adquiridas; essas alterações podem se manifestar como indução de oncogenes, perda de genes supressores de tumor, danos aos mecanismos de reparo do DNA, ou interrupção da homeostase do ciclo celular[7]. Um aspecto da célula normal é a “morte celular programada”, ou apoptose, que é uma via de morte celular induzida por um programa de suicídio finamente regulado no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu próprio DNA e suas proteínas nucleares e citoplasmáticas[8]. Defeitos nos mecanismos de apoptose podem estender anomalamente a vida da célula, favorecendo o acúmulo de mutações genéticas e a tendência para transformação neoplásica[7,8]. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer[9,10].

A apoptose resulta da ativação de enzimas chamadas caspases, que depende de um equilíbrio entre a produção de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Duas vias distintas convergem para a ativação das caspases: a via mitocondrial (intrínseca) e a via dos receptores de morte (extrínseca)[8,9]. Os inibidores de apoptose (IAPs) são inibidores fisiológicos da apoptose cuja função é bloquear a ativação das caspases, tornando as células insensíveis ao estímulo apoptótico[11,12,13,14].

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica dos inibidores da apoptose XIAP e survivina, assim como seu antagonista SMAC/Diablo no carcinoma urotelial de bexiga, correlacionando estes achados com proliferação celular, índice apoptótico e o prognóstico dos pacientes. Esta avaliação possibilitaria um melhor entendimento quanto à evolução dos pacientes, visando escolha de terapêutica mais adequada e seguimento mais assíduo, mesmo quando o tumor, no momento diagnóstico, se apresente como uma lesão não invasiva.

Métodos

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo a partir de amostra obtida do total de lesões com diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga feito por biópsia, ressecção transuretral de bexiga ou cistectomia, provenientes do serviço de Patologia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 1980 a 2000 (vinte anos). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina – UNESP / Botucatu – SP.

As informações sobre os tumores foram obtidas a partir dos laudos anatomopatológicos. Os dados epidemiológicos, aspectos evolutivos, como seguimento dos pacientes, tempo de sobrevida, óbito por carcinoma vesical ou por outras doenças, foram observados nos prontuários médicos e são referentes aos atendimentos realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. As lâminas dos espécimes anatomopatológicos foram avaliadas por dois patologistas (FOL e LJCNB) para identificação do tipo histológico do tumor, o grau da lesão e presença ou não de invasão.

Foram excluídos os pacientes cujos prontuários médicos ou blocos de parafina não foram encontrados, e biópsias cujos blocos de parafina que não apresentavam condições técnicas para realização de análise imuno-histoquímica.

Técnica de Tissue Microarray (TMA)

A partir das lâminas obtidas, foram selecionadas duas áreas morfologicamente significativas do carcinoma. Tais lâminas, com as áreas já selecionadas, foram sobrepostas aos respectivos blocos e em cada um destes foram delimitados os locais de extração do material. De cada bloco foram extraídos dois cilindros de 1 mm de diâmetro que foram depositados nos blocos receptores.

Técnica de Imuno-histoquímica

As lâminas foram desparafinizadas em xilol a 60ºC por 20 minutos, seguida por 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. Após, foram lavadas em água corrente e destilada.

Para a reação imuno-histoquímica, a solução tampão citrato10 mM 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, sendo após 3 minutos girada novamente para 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 destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H2O2 a 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada. Findadas as trocas, as lâminas passaram por água corrente e destilada. A solução salina tamponada foi lavada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

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

Foi feita lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos cada. Em seguida, sucedeu-se à incubação das laminas com NovoLink Post PrimaryBlock (NovoLink Max Polymer, LeicaBiosystems 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, sendo realizadas 3 trocas de 3 minutos cada.

A etapa seguinte foi a incubação em solução substrato: 100 mg 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 100 mL de PBS por 5 minutos a 37ºC, ao abrigo da luz.

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

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, sendo que foram lavadas em água corrente e em água destilada antes e após este procedimento. Seguiu-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 Entellann (Merck, 1.07961, Damstadt, Alemanha).

Análise Imuno-histoquímica

O padrão de positividade para os anticorpos primários anti-proteínas XIAP, Survivina, SMAC/Diablo, Caspase-3 clivada, Ki-67 e p53 foi o aparecimento de coloração marrom-acastanhada na área nuclear ou no citoplasma da célula. Foram usados como controle positivo lâminas contendo cortes histológicos comprovados anteriormente como positivos para os marcadores a serem utilizados. As mesmas lâminas foram usadas como controle negativo, subtraindo-se o anticorpo primário da reação.

Os critérios para avaliação das proteínas p53, survivina e SMAC/Diablo foram: intensidade da marcação nuclear (p53 e survivina) e citoplasmática (survivina e SMAC/Diablo) em escala de 0 a 2, sendo 0 considerado negativo, 1 considerado fraco e 2 considerado forte. O critério para avaliação do inibidor da apoptose XIAP foi: intensidade da marcação nuclear em escala de 0 a 1, sendo 0 considerado negativo e 1 considerado positivo.

Para a avaliação do índice apoptótico, foi utilizado o marcador caspase-3-clivada, observando-se a positividade citoplasmática em células isoladas a cada 100 células no campo com marcação mais intensa e numerosa ("*hot spot*"). Observamos também se o campo com maior marcação se localizava no meio do tumor ou em células neoplásicas na superfície das papilas. O critério utilizado foi: 0 para positividade no meio do tumor e 1 para positividade na superfície da papila.

Para a avaliação da proliferação celular foi utilizado o marcador Ki-67 contando-se os núcleos positivos e calculada sua porcentagem em relação ao total. Foram feitas três análises diferentes com os resultados obtidos, utilizando na primeira análise: até 15% dos núcleos positivos foi atribuído 0, acima de 15% de positividade foi atribuído 1. Na segunda análise, foi atribuído 0 quando até 25% dos núcleos estavam positivos, e 1 quando havia mais de 25% de positividade nuclear. Na terceira análise, houve três estratificações, com até 10% de positividade (atribuído 0), de 11% a 25% de positividade (atribuído 1) e mais de 25% de positividade (atribuído 2).

Análise estatística

Foi usado o teste de associação de Goodman envolvendo contrastes entre e dentro de populações multinominais (Goodman, 1964; Goodman, 1965), considerando o nível de 5% de significância, na avaliação do grau histológico dos carcinomas uroteliais vesicais e seu status de invasão da camada muscular da bexiga, com os marcadores da apoptose estudados (XIAP, Smac/DIABLO, Survivina e local de prevalência do Índice Apoptótico (IA). Também usado para as mesmas associações entre índice de proliferação celular (Ki-67) com os marcadores apoptóticos estudados, e entre os mesmos marcadores, uns com outros, além da comparação entre os pacientes-controle e pacientes da casuística quanto a imunoexpressão de XIAP, Smac/DIABLO, Survivina nuclear e citoplasmática, p53, Ki-67 em escalas e localização preferencial do IA.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 2009) foi usado para avaliação da porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e sobrevida em meses com status de invasão da camada muscular da bexiga, com o grau histológico dos carcinomas uroteliais, com a localização preferencial do IA e também com imunorreação para XIAP, além da avaliação da sobrevida em meses com o grau histológico e status de invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial. A comparação entre os Índices Apoptótico (caspase-3-clivada) e de proliferação celular (Ki-67) dos pacientes-controle e dos pacientes da casuística também usou esse teste.

Para avaliar as associações entre p53, Survivina nuclear e citoplasmática, Smac/DIABLO, e entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e o índice de proliferação celular (Ki-67), foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementando o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 2009).

Na associação entre a porcentagem do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) e a sobrevida em meses foi usada a medida de associação de Spearman (Zar, 2009).

Resultados

De um total de 210 laudos de biópsias presentes nos arquivos do Departamento de Patologia da FMB, de pacientes diagnosticados com carcinoma de bexiga no período de 1980 a 2000 – UNESP, a amostra resultou em 67 casos após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, que foram submetidos ao estudo imuno-histoquímico para os marcadores XIAP, Survivina, Smac/DIABLO, caspase-3-clivada, Ki-67 e p53. Também foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico 17 biópsias vesicais sem alterações no exame anatomopatológico, para serem usados como casos-controle.

XIAP X Smac/DIABLO

Os carcinomas uroteliais de bexiga positivos para XIAP tiveram Smac/DIABLO significativamente positivo, forte (61,3%) ou fraco (29,0%), com menos de 10% dos casos positivos para XIAP sendo negativos para Smac/DIABLO (tabela 1).

XIAP X Survivina citoplasmática

Os carcinomas uroteliais dos pacientes da casuística com negatividade citoplasmática para Survivina foram também significativamente negativos para XIAP. Tumores com Survivina positiva fraca no citoplasma tiveram XIAP significantemente positiva (tabela 1).

Nenhum carcinoma urotelial negativo para XIAP mostrou imunoexpressão citoplasmática forte para Survivina. Os tumores com imunoexpressão positiva para XIAP mostraram relação significante com a imunoexpressão fraca para Survivina (tabela 1).

Esses nossos achados mostram uma ação sinérgica redundante da XIAP e da Survivina, quando positiva no citoplasma da célula neoplásica urotelial.

Não observamos associações entre a imunoexpressão de XIAP e de Survivina nuclear.

Smac/DIABLO X Survivina citoplasmática

Os tumores com negatividade citoplasmática para Survivina foram significativamente negativos para SMAC/Diablo (71,4%), ou com imunoexpressão fraca para esse antagonista (28,6%), e nenhum com reação forte. Aqueles com imunorreatividade citoplasmática fraca para

Survivina apresentaram significante imunorreatividade fraca para Smac/DIABLO (66.7%) (tabela 1).

Nenhum carcinoma negativo para Samc/DIABLO mostrou reação citoplasmática forte para Survivina (tabela 1). Os tumores com imunoexpressão forte para Smac/DIABLO relacionaram-se com reação citoplasmática fraca para Survivina (88,5%).

Smac/DIABLO X Survivina nuclear.

Os carcinomas uroteliais vesicais da nossa casuística negativos para SMAC/Diablo apresentaram associação significativamente direta com Survivina nuclear negativa (71,4%) ou fraca (28,6%), e nenhum dos tumores negativos para Smac/DIABLO teve imunoexpressão nuclear forte para Survivina (tabela 1).

Survivina citoplasmática X Survivina nuclear.

As negatividades citoplasmática e nuclear da Survivina associaram-se de modo significativo (90,9%), com menos de 10% dos tumores com citoplasma negativo tendo reação nuclear positiva fraca e nenhum com reação nuclear forte. As reações nucleares positivas (fracas ou fortes) correlacionaram-se com reações citoplasmáticas fracas (tabela 1).

Localização dos "hot-spots" do IA (caspase-3-clivada) X proliferação celular (Ki-67) em três níveis

Os tumores com baixa proliferação celular (Ki-67 até 10%)não apresentaram diferença significativa na localização dos *"hot-spots"* de apoptose, embora nessa faixa de proliferação celular encontramos a maior porcentagem de casos com o IA concentrado na superfície das papilas neoplásicas (36,4%). Porém os carcinomas com proliferação celular maior que 10% mostraram IA significativamente concentrada no meio do tumor (tabela 2).

Localização dos "hot-spots" do Índice Apoptótico (caspase-3-clivada) X XIAP

Os tumores com o IA concentrado na superfície das papilas neoplásicas foram sempre positivos para XIAP. Mais de dois terços dos carcinomas uroteliais com IA concentrado no meio do tumor foram também positivos para XIAP, e o inverso também teve significância, com a maioria dos tumores positivos para XIAP com IA concentrado no meio do tumor. O mesmo ocorreu com tumores negativos para XIAP, IA concentrado no meio dos ninhos de células tumorais (tabela 2).

Localização dos "hot-spots" do IA (caspase-3-clivada) X p53

A concentração do IA no meio do tumor teve associação significativa com p53 nuclear forte ou negativo. A reação nuclear fraca não apresentou significância com nenhuma das localizações do IA (tabela 2).

Localização dos "hot-spots" do IA (caspase-3-clivada) X Smac/DIABLO

Os carcinomas uroteliais negativos para Smac/DIABLO tiveram sempre IA no meio do tumor. Embora em todos os resultados para Smac/DIABLO tivéssemos associação com IA concentrado no meio do tumor, somente em casos Smac/DIABLO positivos (fraco ou forte) encontramos IA concentrado na superfície das papilas tumorais, ou em outras palavras, IA na superfície das papilas neoplásicas sempre foi acompanhado de positividade para Smac/DIABLO (tabela 2).

Localização dos "hot-spots" do IA (caspase-3-clivada) X Survivina citoplasmática

Os tumores com IA na superfície de papilas foram mais numerosos naqueles com reação citoplasmática fraca para Survivina, embora o único carcinoma com reação forte também apresentasse IA concentrada também nessa localização. Porém a maioria dos carcinomas com reação citoplasmática fraca para Survivina tinham IA concentrada no meio do tumor, assim como os negativos para Survivina (tabela 2).

Localização dos "hot-spots" do IA (caspase-3-clivada) X Survivina nuclear

Os carcinomas com Survivina nuclear forte sempre tiveram o IA concentrado no meio do tumor. Essa localização também se associou à reação nuclear fraca ou negativa para Survivina. Porém, quando o IA concentrou-se na superfície de papilas, a reação nuclear para Survivina foi negativa ou fraca (tabela 2).

Proliferação celular (Ki-67) em três níveis X p53

Em relação às categorias de proliferação celular acima de 11%, não se verificou diferença na imunoexpressão de p53. Em relação à proliferação até 10% a única diferença ocorreu entre p53 negativa (7,1%) e as positivas, fraca (64,3%) ou forte (28,6%) (tabela 3).

Proliferação celular (Ki-67) em três níveis X XIAP

Nos dois níveis observados de imunoexpressão de XIAP (negativa ou positiva fraca) não verificamos diferenças significativas na proliferação celular. Nos tumores com alta proliferação celular (Ki-67 acima de 25%), constatamos uma maioria significativa de

carcinomas com imunoexpressão positiva para XIAP (72,2%). Essa relação também foi encontrada nos tumores com Ki-67 até 10%, onde 83,3% foram positivos para XIAP (tabela 3).

Proliferação celular (Ki-67) em três níveis X Smac/DIABLO

Na categoria de proliferação celular baixa (até 10%) tivemos associação significativa com imunoexpressão positiva forte para Smac/DIABLO (71,5%). Assim carcinomas uroteliais da bexiga com imunoexpressão forte para Smac/DIABLO têm significativamente menor proliferação celular (tabela 3).

Proliferação celular (Ki-67) em três níveis X Survivina

Verificamos proliferação celular significantemente associada à imunoexpressão citoplasmática fraca de Survivina. Isso indicaria apenas um maior número de pacientes nessa categoria imunoexpressão de Survivina (tabela 3).

Nos três níveis de imunoexpressão de Survivina nuclear ou citoplasmática não verificamos associação com a proliferação celular (tabela 3).

p53 X XIAP

Os casos positivos para XIAP associaram-se com positividade nuclear para p53, fraca ou forte. Casos p53 negativos mostraram associação com XIAP negativo, enquanto a positividade nuclear fraca ou forte para p53 associou-se com a positividade para XIAP (tabela 4).

p53 X Smac/DIABLO

Verificamos associação apenas da reação fraca para p53 com positividade para Smac/DIABLO, fraca ou forte (tabela 4).

p53 X Survivina citoplasmática

Os tumores negativos para p53 mostraram associação significativa com a reação citoplasmática fraca para Survivina, do mesmo modo que a reação fraca para p53 (tabela 4). A reação forte para p53 mostrou a mesma associação. Porém os tumores que tiveram reação citoplasmática forte para Survivina não mostraram reação nuclear forte para p53 em nenhum paciente. Não verificamos associações significativas entre a proteína p53 e a reação nuclear para Survivina.

Coeficiente de correlação de Spearman entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística (SVm) e a porcentagem do Índice Apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%).

Verificamos uma relação inversa entre a porcentagem do Índice Apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%) e entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística (SVm), onde temos pacientes com menores Índices Apoptóticos com maior sobrevida em meses, e pacientes com menor tempo de sobrevida em meses apresentando altos Índices Apoptóticos (tabela 5).

Mediana e valores mínimos e máximos de sobrevida em meses (SVm) segundo o status de invasão tumoral da camada muscular da bexiga por carcinoma urotelial (IM), dos pacientes da nossa casuística.

Observamos claramente uma sobrevida significativamente maior entre os pacientes sem invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial (mediana de 76,5 meses, e valor máximo de 334 meses), comparados àqueles com camada muscular infiltrada pela neoplasia (mediana de 7 meses, tempo máximo de 129 meses) (tabela 6).

Mediana e valores mínimos e máximos de sobrevida em meses (SVm) segundo o grau histológico do carcinoma urotelial da bexiga dos pacientes da casuística (GH).

Os pacientes portadores de carcinomas uroteliais de baixo grau apresentaram sobrevida maior (mediana de 76,5 meses, valor máximo de 334 meses) comparados aos que apresentaram carcinomas uroteliais de alto grau (mediana de 8,5 meses, tempo máximo de sobrevida de 142 meses) (tabela 7). Notamos ainda que a sobrevida dos pacientes com carcinomas de alto grau foi ligeiramente maior que aqueles sem invasão da camada muscular (tabela 6).

Comparação dos resultados (mediana e valores mínimo e máximo) da porcentagem do IA obtido com a caspase-3-clivada e da porcentagem do índice de proliferação celular obtido com Ki-67 (variáveis contínuas) dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, com esses mesmos resultados obtidos na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

Verificamos que em ambos os marcadores os valores para os pacientes-controle são significativamente menores do que os encontrados nos pacientes portadores de carcinoma urotelial de bexiga da nossa casuística (tabela 8).

Comparação dos resultados dos marcadores imuno-histoquímicos da apoptose estudados -XIAP, Survivina citoplasmática e nuclear- e Smac/DIABLO nos tumores dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, e na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

A tabela 9 mostra de modo notável a negatividade para XIAP e Smac/DIABLO no urotélio normal, não neoplásico. A proteína XIAP apresentou imunoexpressão forte em apenas uma amostra de tecido urotelial normal de paciente-controle, sendo a única reação imuno-histoquímica forte para XIAP verificada em todo esse experimento, porém XIAP foi positiva no urotélio de todos os pacientes-controle, com reação fraca. Nenhum dos 49 pacientes da casuística com resultados válidos para XIAP teve reação forte, com mais de um quarto desses pacientes com reação negativa, e mais de 70% com reação positiva fraca. Chama a atenção o fato de que a reação imuno-histoquímica para Smac/DIABLO foi forte em todos os urotélios dos pacientes-controle, com padrão granular citoplasmático bem definido, e nos carcinomas uroteliais observamos reação semelhante em 57,1% dos casos. A reação negativa para SMAC ocorreu em 28,6% dos carcinomas da nossa amostra.

A reação citoplasmática para Survivina mostrou quadro semelhante de falta negatividade nos tecidos normais, onde as reações dividiram-se por igual em fracas e fortes, sempre positivas. Os carcinomas uroteliais mostraram 20,8% de negatividade citoplasmática para Survivina, com o restante das reações quase sempre positivas fracas. Já a reação imuno-histoquímica nuclear para Survivina foi negativa em 71,4% dos urotélios normais, com demais reações positivas geralmente fracas nesses tecidos. A reação nuclear para Survivina foi positiva em mais de 55% dos tecidos tumorais, sendo principalmente fraca (34%).

Comparação dos resultados dos marcadores imuno-histoquímicos Ki-67 categorizado em três (até 10%, 11 a 25%, mais de 25%) ou dois intervalos de valores (com limiar em 15% e com limiar em 25%), e p53 nos tumores dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, e na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

A proteína p53 não mostrou reação forte em nenhum dos urotélios dos pacientes-controle, sendo fraca em dois terços deles. A reação nuclear para p53 foi forte em quase metade (44,6%) dos carcinomas uroteliais, com até 12,5% de negatividade completa e 42,9% de reações fracas (tabela 10).

Quanto ao escalonamento do índice de proliferação celular pelo Ki-67, todos os tecidos uroteliais normais dos pacientes-controle mostraram reações abaixo de 25%, com mais de três quartos abaixo dos 15%, e pouco menos de 70% abaixo de 10%. Dos tecidos tumorais, quase metade (47,2%) estavam acima de 25%, mais de dois terços (67,9%) acima de 15%, e 28,3% com proliferação celular em até 10% nas células tumorais (tabela 10).

Coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses (SVm) dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP e Smac/DIABLO.

Em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados. Apesar disso, a mediana de sobrevida em meses dos pacientes com carcinomas uroteliais com reação para XIAP positiva foi de 36 meses, contra 12,5 meses daqueles com XIAP negativa.

Coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses (SVm) dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão citoplasmática ou nuclear de Survivina.

Em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados.

Coeficiente e valores mínimo e máximo da porcentagem do Índice Apoptótico (IA%) obtido com a caspase-3-clivada nos carcinomas uroteliais dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP e Smac/DIABLO.

Em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados.

Coeficiente e valores mínimo e máximo da porcentagem do Índice Apoptótico (IA%) obtido com a caspase-3-clivada nos carcinomas uroteliais dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão citoplasmática ou nuclear de Survivina.

Em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados.

Associação entre o Status de Invasão da Camada Muscular da bexiga com os marcadores da apoptose estudados.

Tanto os carcinomas invasivos quanto os não invasivos tem a localização predominante dos "*hot-spots*" do índice apoptótico obtido através da reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada no meio do tumor, porém essa diferença é muito maior nos carcinomas

uroteliais invasivos que nos não invasivos (tabela 11). Porém quando consideramos a localização do IA, verificamos uma relação inversa significante com carcinomas não invasivos tendo localização do IA nas superfícies de papilas tumorais em maior porcentagem que os carcinomas invasivos.

A imunoexpressão nuclear da Survivina é em geral significativamente negativa (56,0%) nos carcinomas invasivos que nos não invasivos (tabela 11). A imunoexpressão citoplasmática é em geral fraca, tanto nos carcinomas invasivos quanto nos não invasivos.

Quanto à imunoexpressão de Smac/DIABLO, os carcinomas não invasivos têm significativamente mais reações fortes que os invasivos. O mesmo acontece com a reação para XIAP, com mais carcinomas não invasivos positivos comparados aos invasivos (tabela 11).

Associação entre o grau histológico do carcinoma urotelial da bexiga com os marcadores da apoptose estudados.

A localização dos *"hot-spots"* do Índice Apoptótico (reação positiva para caspase-3-clivada) nas superfícies das papilas neoplásicas é significativamente maior nos carcinomas de baixo (mais de 85%, 6 casos contra 1) que nos de alto grau (tabela 12). Quanto à imunoexpressão nuclear da Survivina, mais da metade dos carcinomas uroteliais de alto grau histológico mostram reação negativa (55,2%), e mais de 80% desses carcinomas não apresentam reação nuclear forte (tabela 12). A reação citoplasmática da Survivina também apresentou resultado semelhante, com nenhum carcinoma urotelial de alto grau com reação forte. Os carcinomas de baixo grau tiveram predominância de reações citoplasmáticas fracas para Survivina.

A imunoexpressão de Smac/DIABLO foi significativamente forte nos carcinomas de alto grau (56,7%), com 90% desses tumores com reações positivas para Smac/DIABLO (tabela 12). Os carcinomas de baixo grau apresentaram quadro semelhante, porém sem significância estatística.

Os carcinomas uroteliais de baixo grau mostraram reação positiva para XIAP de modo estatisticamente significante (85%). Nos carcinomas de alto grau essa predominância não teve significância estatística.

Discussão

Observamos uma provável tentativa de contrabalancear a ação do aumento da imunoexpressão da XIAP, inibindo a apoptose no tecido tumoral, com um aumento significativo da imunoexpressão de Smac/DIABLO favorecendo a eliminação das células tumorais por apoptose. Entretanto, dados da literatura mostram que, quanto maior a expressão de XIAP, pior prognóstico[16,18,20], enquanto que os níveis séricos de Smac/DIABLO em pacientes com câncer de bexiga são inversamente proporcionais ao grau histológico e ao estadiamento da doença[17]. Temos também então um balanço positivo entre Smac/DIABLO e Survivina citoplasmática semelhante ao da Smac/DIABLO com a outra IAP estudada, a XIAP. Imunoexpressão citoplasmática de Survivina é geralmente compensada por aumento da imunoexpressão de Smac/DIABLO.

Os carcinomas uroteliais dos pacientes da casuística com negatividade citoplasmática para Survivina foram também significativamente negativos para XIAP, demonstrando uma sinergia entre os Inibidores da Apoptose, o que está de acordo com a literatura [11, 13, 14].

Os carcinomas uroteliais vesicais da nossa casuística que foram negativos para Smac/DIABLO apresentaram associação significativa direta com Survivina nuclear negativa (71,4%) ou fraca (28,6%), e nenhum dos tumores negativos para Smac/DIABLO teve imunoexpressão nuclear forte para Survivina. Essas associações novamente mostraram que as IAPs estudadas e seu antagonista SMAC/Diablo são modulados em paralelo, com aumento de umas proteínas contrabalançado pelo aumento da outra.

As negatividades citoplasmática e nuclear da Survivina associaram-se de modo significativo (90,9%), com menos de 10% dos tumores com citoplasma negativo tendo reação nuclear positiva fraca e nenhum com reação nuclear forte. As reações nucleares positivas (fracas ou fortes) correlacionaram-se com reações citoplasmáticas fracas. Vemos uma tendência de combinação entre reações citoplasmáticas e nucleares desse marcador antiapoptótico. Isso pode dever-se a dificuldade de separar-se uma reação citoplasmática de uma nuclear combinada, ou que a localização celular dessa proteína tenha comportamento mais sutil do que podemos observar nesse estudo. É uma questão que deverá ser investigada em ensaios específicos.

Os tumores com o índice apoptótico (IA) concentrado na superfície das papilas neoplásicas foram sempre positivos para XIAP. Mais de dois terços dos carcinomas uroteliais com IA concentrado no meio do tumor foram também positivos para XIAP, e o inverso também teve significância, com a maioria dos tumores positivos para XIAP com IA concentrado no

meio do tumor. O mesmo ocorreu com tumores negativos para XIAP, IA concentrado no meio dos ninhos de células tumorais. Esses achados mostram o número pequeno de tumores com índice apoptótico na superfície papilar, porém todos eles positivos para XIAP, merecendo estudo específico.

Tanto os carcinomas uroteliais que apresentaram positividade forte ou negatividade para p53 tiveram índice apoptótico concentrado no meio do tumor, o que não nos permitiu fazer nenhuma correlação quanto a esses dois marcadores. Já tumores Smac/DIABLO negativo sempre foram acompanhados de índice apoptótico concentrado no meio do tumor, o que era esperado e corrobora a função dessa proteína como principal inibidora das IAPs, liberando a caspase-3 para efetuar o processo apoptótico[17].

Os tumores com IA na superfície de papilas foram mais numerosos naqueles com reação citoplasmática fraca para Survivina, embora o único carcinoma com reação forte também apresentasse IA concentrada nesta mesma localização. Porém a maioria dos carcinomas com reação citoplasmática fraca para Survivina tinham IA concentrada no meio do tumor, assim como os negativos para Survivina. Os carcinomas com Survivina nuclear forte sempre tiveram o IA concentrado no meio do tumor. Essa localização também se associou à reação nuclear fraca ou negativa para Survivina. Porém, quando o IA concentrou-se na superfície de papilas, a reação nuclear para Survivina foi negativa ou fraca. Os resultados da Survivina, tanto no citoplasma quanto no núcleo mostram que o número de casos com IA na superfície das papilas foi pequeno para atingir significância estatística.

Em relação ao índice de proliferação celular (Ki-67) e a expressão de p53, Ki-67 acima de 11% não se verificou diferença na imunoexpressão de p53. Já em relação aos dois níveis observados de imunoexpressão de XIAP (negativa ou positiva fraca), não verificamos diferenças significativas na proliferação celular. Nos tumores com alta proliferação celular (Ki-67 acima de 25%), constatamos uma maioria significativa de carcinomas com imunoexpressão positiva para XIAP (72,2%). Essa relação também foi encontrada nos tumores com Ki-67 até 10%, onde 83,3% foram positivos para XIAP. Esses resultados eram esperados, pois a XIAP é capaz de inibir diretamente a atividade enzimática das caspases através da sua ligação com as caspases-3 e 7, evitando a apoptose[14, 15, 16].

Na categoria de proliferação celular baixa (até 10%) tivemos associação significativa com imunoexpressão positiva forte para Smac/DIABLO (71,5%). Assim, carcinomas uroteliais da bexiga com imunoexpressão forte para Smac/DIABLO têm significativamente menor

proliferação celular, o que é esperado, já que Smac/DIABLO antagoniza a ação das IAPs, permitindo que ocorra a apoptose[16, 17]. Smac/DIABLO forte está presente em todos os urotélios não neoplásicos dos paciente-controle, assim como nos tumores da baixa proliferação celular, indicando um possível consumo dessa proteína em carcinomas mais agressivos.

Nos três níveis de imunoexpressão de Survivina nuclear ou citoplasmática não verificamos associação com a proliferação celular.

Os casos positivos para XIAP associaram-se com positividade nuclear para p53, fraca ou forte. Casos p53 negativos mostraram associação com XIAP negativo, enquanto a positividade nuclear fraca ou forte para p53 associou-se com a positividade para XIAP. Essa clara relação mostra que XIAP vai aumentar quando houver acúmulo da proteína p53 mutada, numa tentativa de evitar a apoptose iniciada, acarretando variações paralelas dessas duas proteínas.

Verificamos associação apenas da reação fraca para p53 com positividade para Smac/DIABLO, fraca ou forte. Resultados que corroboram os achados entre XIAP e Smac/DIABLO e entre p53 e XIAP, com variações paralelas em tentativas de compensação da atividade apoptótica.

Os tumores negativos para p53 mostraram associação significativa com a reação citoplasmática fraca para Survivina, do mesmo modo que a reação fraca para p53. A reação forte para p53 mostrou a mesma associação. Porém os tumores que tiveram reação citoplasmática forte para Survivina não mostraram reação nuclear forte para p53 em nenhum paciente. Esse último achado pode indicar que a presença citoplasmática da Survivina pode estar relacionada à via extrínseca da apoptose, não aumentando quando houver acúmulo nuclear da p53 mutada. Embora os mecanismos moleculares da survivina não estejam completamente elucidados, considera-se que a regulação da survivina esteja ligada a proteína p53 [3,7], o que requer estudos futuros para confirmação desta hipótese.

Verificamos uma relação inversa entre a porcentagem do índice apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%) e entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística, no qual temos pacientes com menores índices apoptóticos com maior sobrevida em meses, e pacientes com menor tempo de sobrevida em meses apresentando altos índices apoptóticos. A correlação entre alto índice apoptótico com pior prognóstico de outras neoplasias malignas já foi relatada na literatura[21]. É notável que os valores do IA nos pacientes-

controle foram sempre nulos, enquanto que nos pacientes com carcinoma urotelial variavam de nulo até 23%. Essas diferenças são visivelmente maiores do que as verificadas entre esses dois grupos com o índice de proliferação celular com Ki-67, onde podemos ver que mesmo na mucosa não tumoral temos proliferação celular que, embora significativamente menor na sua média que nos carcinomas uroteliais, refletem um "*turn-over*" celular secundário a eventos não neoplásicos. Isso indica que a avaliação do índice apoptótico com a caspase-3-clivada pode tornar-se mais uma ferramenta imuno-histoquímica para avaliação de lesões uroteliais da bexiga.

Observamos claramente uma sobrevida significativamente maior entre os pacientes sem invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial (mediana de 76,5 meses, e valor máximo de 334 meses), comparados àqueles com camada muscular infiltrada pela neoplasia (mediana de sete meses, tempo máximo de 129 meses). Esses achados são os esperados e estão em concordância com os dados extensamente conhecidos da literatura[22]. A coincidência de valores mínimos de sobrevida entre os dois grupos (até um mês) reflete intercorrências do ato cirúrgico.

Novamente temos resultados em acordo com a literatura, com pacientes portadores de carcinomas uroteliais de baixo grau com sobrevida maior (mediana de 76,5 meses, valor máximo de 334 meses) comparados aos que apresentaram carcinomas uroteliais de alto grau (mediana de 8,5 meses, tempo máximo de sobrevida de 142 meses). Notamos ainda que a sobrevida dos pacientes com carcinomas de alto grau foi ligeiramente maior que aqueles sem invasão da camada muscular. Este dado mostra a fundamental importância do status de invasão da camada muscular da bexiga, sobrepondo-se inclusive ao grau tumoral, pois carcinomas de alto grau, embora tenham maior risco de apresentar invasão da camada muscular, só vão comprometer o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes quando o fazem. Novamente, a coincidência de valores mínimos de sobrevida entre os dois grupos (até um mês) também reflete intercorrências do ato cirúrgico.

Em relação aos coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP, Smac/DIABLO e Survivina, em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados. Apesar disso, a mediana de sobrevida em meses dos pacientes com carcinomas uroteliais com reação para XIAP positiva foi de 36 meses, contra 12,5 meses daqueles com XIAP negativa.

Tanto os carcinomas invasivos quanto os não invasivos tem a localização predominante dos "*hot-spots*" do índice apoptótico obtido através da reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada no meio do tumor, porém essa diferença é muito maior nos carcinomas uroteliais invasivos que nos não invasivos. Porém quando consideramos a localização do IA, verificamos uma relação inversa significante com carcinomas não invasivos tendo localização do IA nas superfícies de papilas tumorais em maior porcentagem que os carcinomas invasivos.

A imunoexpressão nuclear da Survivina é em geral significativamente negativa (56,0%) nos carcinomas invasivos que nos não invasivos. A imunoexpressão citoplasmática é em geral fraca tanto nos carcinomas invasivos quanto nos não invasivos.

Quanto à imunoexpressão de Smac/DIABLO, os carcinomas não invasivos têm significativamente mais reações fortes que os invasivos. O mesmo acontece com a reação para XIAP, com mais carcinomas não invasivos positivos comparados aos invasivos.

A localização dos "*hot-spots*" do índice apoptótico (reação positiva para caspase-3-clivada) nas superfícies das papilas neoplásicas é significativamente maior nos carcinomas de baixo grau (mais de 85%, 6 casos contra 1) que nos de alto grau, podendo ser usados na diferenciação entre carcinomas de baixo e alto grau em casos em que esse diagnóstico diferencial for dificultado por morfologias limítrofes. Estudos específicos endereçados a esse tópico devem ser feitos para confirmar essa hipótese.

Quanto à imunoexpressão nuclear da Survivina, mais da metade dos carcinomas uroteliais de alto grau histológico mostram reação negativa (55,2%), e mais de 80% desses carcinomas não apresentam reação nuclear forte, podendo esse dado também ser usado no diagnóstico diferencial entre carcinomas uroteliais de baixo e alto grau, nos casos morfologicamente ambíguos. A reação citoplasmática da Survivina também apresentou resultado semelhante, com nenhum carcinoma urotelial de alto grau com reação forte. Os carcinomas de baixo grau tiveram predominância de reações citoplasmáticas fracas para Survivina.

A imunoexpressão de Smac/DIABLO foi significativamente forte nos carcinomas de alto grau (56,7%), com 90% desses tumores com reações positivas para Smac/DIABLO. Os carcinomas de baixo grau apresentaram quadro semelhante, porém sem significância estatística.

Os carcinomas uroteliais de baixo grau mostraram reação positiva para XIAP de modo estatisticamente significante (85%). Nos carcinomas de alto grau essa predominância não teve significância estatística.

Em relação ao coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP, Survivina e Smac/DIABLO, em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados.

Como limitações do estudo, destacamos que o prontuário médico não eletrônico foi a fonte de pesquisa de dados dos pacientes. Ressaltamos que são necessárias amostras mais amplas para consolidar os resultados.

Referências

1) Luo Y, Zhang X, Mo M, Tan Z, Huang L. High Ki-67 immunohistochemical reactivity correlates with poor prognostic in bladder carcinoma. Medicine. 2016; 95: 1-18.

2) Instituto Nacional do Câncer (Internet). Brasil: Portal do Instituto Nacional do Câncer (updated in 2016; cited in 2017 Jan 30). Avaliable from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf

3) Senol S, Yildirim A, Ceyran B, Uruc F, Zemheri E. Prognostic significance of survivin, β-catenin and p53 expression in urothelial carcinoma. Bosnian Journal of Basis Medical Science. 2015:15 (4):7-14.

4) Clark P, Agarval N, Biagioli M. Bladdercancer. J Natl Compr Canc Netw. 2013;11:446-475.

5) Mathieu R, Lucca I, Rouprêt M, Briganti, A, Shariat S. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder. Nature Reviews. Volume 13, August 2016. 471-479.

6) WHO (2014) Tumors of the urinary system and male genital organs. Edited by JN Eble, G Sauter, JI Epstein & IA Sesterhenn. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon pgs 89-120.

7) Sharp J, Hausladen D, Maher M, Wheeler M, Altieri. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. Frontiers of Bioscience. 2002; 7:36-41.

8) Kumar, Vinay. Robbins & Cotran. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

9) Grivicich I, Regner A, Rocha A. Morte Celular por Apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). Revista Brasileira de Cancerologia. 2007; 53(3): 335-343

10) Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature. 2000; 407: 810-16.

11) Dean E, Ranson M, Blackhall F, Volt S, Dive C. Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptosis proteins from laboratory to clinic. Cancer Treatment Reviews. 2007; 33: 203-212.

12) Costa H, Lima F, Barrezueta L, Oshima C, Siva Jr. 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.

13) Chen X, Wang T, Yang D, Wang J, Li X. Expression of the IAP protein Family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patientes. Oncology Letters. 2013; 5: 1278-1284.

14) Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. Onco Targets and Therapy. 2013; 6: 1285-1304.

15) Srivastava A, Singh P, Singh D, Dalela D, Rath S. Evaluation of urinary XIAP as a diagnostic biomarker of carcinoma of urinary bladder. Tumor Biology. 2014; 35: 8243-8248.

16) Augello C, Caruso L, Maggioni M, Donadon M, Montorsi M. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2009; 9: 125-135.

17) Mizutani Y, Katsuoka Y, Bonavida B. Low circulating serum levels of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) in patients with bladder cancer. International Journal of Oncology. 2012. 40: 1246-1250.

18) Li M, Yin Z, Na Y. XIAP as a prognostic marker of early recurrence of nonmuscular invasive bladder cancer. Chin Med J (Engl). 2007; 120 (6): 467-473.

19) Zhang Y, Zhu J, Tang Y. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. Diagn Pathol. 2011; 6-49.

20) Xiang G, Wen X, Wang H, Chen K, Liu H. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in humans in colorectal cancer and its correlation with prognosis. J Surg Oncol. 2009; 100 (8): 708-712.

21) Alcaide J, Funez R, Rueda A, Perez-Ruiz E, Pereda T. The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma. BMC Clin Pathol. 2013;10:13-24.

22) Hernández-Fernández C, Herranz-Amo F, Moralejo-Gárate M, Subirá-Ríos D, Caño-Velasco J et al. Actas Urol Esp. Infiltrating bladder cancer: prognostic factors, follow-up and treatment of relapses.2016; 16:210-223.

Tabela 1: Distribuição dos marcadores da apoptose IAPs e Smac/DIABLO nos carcinomas uroteliais da bexiga:

Marcador de apoptose		SMAC				Survivina citoplasmática				Survivina nuclear			
		neg	fraca	forte	total	neg	fraca	forte	total	neg	fraca	forte	total
XIAP	neg	4 (30,8%)	3 (23,1%)	6 (46,1%)	13	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0 (0%)	13	6 (46,2%)	4 (30,8%)	3 (23,0%)	13
	positiva	3 (9,7%)	9 (29,0%)	19 (61,3%)	31	4 (11,8%)	29 (85,3%)	1 (2,9%)	34	16 (47,1%)	12 (35,3%)	6 (17,6%)	34
SMAC	neg	–	–	–	–	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0%)	7	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0%)	7
	fraca	–	–	–	–	4 (33,3%)	8 (66,7%)	0 (0%)	12	7 (58,3%)	2 (16,7%)	3 (25,0%)	12
	forte	–	–	–	–	2 (7,7%)	23 (88,5%)	1 (3,8%)	26	8 (30,8%)	12 (46,2%)	6 (23,0%)	26
Survivina Citoplas-mática	neg	–	–	–	–	–	–	–	–	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0 (0%)	11
	fraca	–	–	–	–	–	–	–	–	13 (31,7%)	17 (41,5%)	11 (26,8%)	41
	forte	–	–	–	–	–	–	–	–	1 (100,0%)	0 (0%)	0 (0%)	1

Tabela 2: Distribuição dos marcadores da apoptose (IAPs e Smac/DIABLO), p53 e Ki-67 segundo o local de concentração dos "*hot-spots*" do Índice Apoptótico (IA) obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada, nos carcinomas uroteliais da bexiga.

Localização do I.A.	meio do tumor	superfície de papila	Total

XIAP	negativa	11 (100,0%)	0 (0%)	11
	positiva	23 (82,1%)	5 (17,9%)	28
SMAC	negativa	5 (100,0%)	0 (0%)	5
	fraca	10 (83,3%)	2 (17,4%)	12
	forte	19 (82,6%)	4 (17,4%)	23
Survivina citoplasmática	negativa	7 (87,5%)	1 (12,6%)	8
	fraca	27 (84,4%)	5 (15,6%)	32
	forte	0 (0%)	1 (100,0%)	1
Survivina nuclear	negativa	17 (80,9%)	4 (18,1%)	21
	fraca	11 (78,6%)	3 (21,4%)	14
	forte	6 (100,0%)	0 (0%)	6
Ki-67	até 10%	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11
	11 a 25%	9 (90,0%)	1 (10,0%)	10
	mais de 25%	18 (94,7%)	1 (5,3%)	19
p53	negativa	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5
	fraca	12 (75,0%)	4 (25,0%)	16
	forte	19 (90,5%)	2 (9,5%)	21

Tabela 3: Distribuição do índice de proliferação celular obtido através da reação imuno-histoquímica do Ki-67 categorizado em escala de 3 níveis.

	XIAP			Survivina citoplasmática				Survivina nuclear				SMAC				p53			
Ki 67	negativa	positiva	total	Negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	Total	negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	total
até 10%	2 (16,7%)	10 (83,3%)	12	1 (7,1%)	12 (85,8%)	1 (7,1%)	14	7 (50,0%)	3 (21,4%)	4 (28,6%)	14	1 (7,1%)	3 (21,4%)	10 (71,5%)	14	1 (7,1%)	9 (64,3%)	4 (28,6%)	14
11 a 25%	5 (50,0%)	5 (50,0%)	10	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0 (0%)	11	4 (36,4%)	6 (54,5%)	1 (9,1%)	11	3 (33,3%)	1 (11,1%)	5 (55,6%)	9	1 (7,7%)	5 (38,5%)	7 (53,8%)	13
mais de 25%	5 (23,8%)	16 (76,2%)	21	4 (18,2%)	18 (81,8%)	0 (0%)	22	11 (50,0%)	6 (27,3%)	5 (22,7%)	22	2 (9,5%)	9 (42,9%)	10 (47,6%)	21	4 (16,7%)	8 (33,3%)	12 (50,0%)	24

Tabela 4: Distribuição da imunoexpressão nuclear da proteína p53 segundo as proteínas inibidoras da apoptose XIAP e Survivina (reação nuclear ou citoplasmática) e seu antagonista Smac/DIABLO.

	XIAP			Survivina citoplasmática				Survivina nuclear				Smac/DIABLO			
p53	negativa	positiva	total	Negativa	Fraca	forte	total	Negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	total
negativa	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0 (0%)	6	4 (66,6%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6	1 (25,0%)	2 (50,0%)	1 (25,0%)	4

fraca	5 (23,8%)	16 (76,2%)	21	5 (23,8%)	15 (71,4%)	1 (4,8%)	21	11 (52,4%)	6 (26,6%)	4 (19,0%)	21	2 (9,5%)	6 (28,6%)	13 (61,9%)	21
forte	4 (21,1%)	15 (78,9%)	19	4 (17,4%)	19 (82,6%)	0 (0%)	23	8 (34,8%)	10 (43,5%)	5 (21,7%)	23	4 (18,2%)	6 (27,3%)	12 (54,5%)	22

Tabela 5: Coeficiente de correlação de Spearman entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística (SVm) e a porcentagem do Índice Apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%).

Associação	Coeficiente de Spearman	Valor de p
IA% x SVm	0,397	p=0,004

Tabela 6: Mediana e valores mínimos e máximos de sobrevida em meses (SVm) segundo o status de invasão tumoral da camada muscular da bexiga por carcinoma urotelial (IM), dos pacientes da nossa casuística.

Status de invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial		
não invasivo	invasivo	valor de p
76,5 (1,0; 334,0)	7,0 (1,0; 129,0)	p < 0,001

Tabela 7: Mediana e valores mínimos e máximos de sobrevida em meses (SVm) segundo o grau histológico do carcinoma urotelial da bexiga dos pacientes da casuística (GH).

Grau histológico do carcinoma urotelial da bexiga		
baixo grau	alto grau	valor de p
76,5 (1,0; 334,0)	8,5 (1,0; 142)	p < 0,001

Tabela 8: Comparação dos resultados (mediana e valores mínimo e máximo) da porcentagem do IA obtido com a caspase-3-clivada e da porcentagem do índice de proliferação celular obtido com Ki-67 (variáveis contínuas) dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, com esses mesmos resultados obtidos na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

	pacientes controle	pacientes casuística	valor de p
% de Ki-67	20,0 (1,0; 20,0)	25,0 (1,0; 70,0)	p < 0,001

% do I.A.	0,0 (0,0; 0,0)	5,0 (0,0; 23,0)	

Tabela 9: Comparação dos resultados dos marcadores imuno-histoquímicos da apoptose estudados -XIAP, Survivina citoplasmática e nuclear- e Smac/DIABLO nos tumores dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, e na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

Marcador	XIAP				SMAC				Survivina citoplasmática				Survivina nuclear			
Intensidade	neg	fraca	forte	total	neg	fraca	forte	total	neg	fraca	forte	total	Neg	fraca	forte	total
pacientes controle	0 (0,0%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)	15	0 (0%)	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14	10 (71,4%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)	14
pacientes casuística	14 (28,6%)	35 (71,4%)	0 (0,0%)	49	7 (14,3%)	14 (28,6%)	28 (57,1%)	49	11 (20,8%)	41 (77,4%)	1 (1,9%)	53	24 (45,3%)	18 (34,0%)	11 (20,8%)	53

Tabela 10: Comparação dos resultados dos marcadores imuno-histoquímicos Ki-67 categorizado em três (até 10%, 11 a 25%, mais de 25%) ou dois intervalos de valores (com limiar em 15% e com limiar em 25%), e p53 nos tumores dos pacientes com carcinomas uroteliais de bexiga da casuística, e na mucosa urotelial normal de pacientes-controle, sem carcinoma urotelial.

marcador	Ki-67 em 3 níveis				Ki-67 corte 15%			Ki-67 corte 25%			p53			
intensidade	≤10%	11a25%	>25%	total	≤15%	>15%	total	≤25%	>25%	total	neg	fraca	forte	total
pacientes controle	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0 (0%)	13	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13	13 (100%)	0 (0%)	13	5 (35,7%)	9 (64,3%)	0 (0%)	14
pacientes casuística	15 (28,3%)	13 (24,5%)	25 (47,2%)	53	17 (32,1%)	36 (67,9%)	53	28 (25,8%)	25 (47,2%)	53	7 (12,5%)	24 (42,9%)	25 (44,6%)	56

Tabela 11: Associação entre o Status de Invasão da Camada Muscular da bexiga com os marcadores da apoptose estudados.

Status de Invasão da bexiga	Localização do IA			Survivina Nuclear				Survivina Citoplasmática				SMAC				XIAP		
	meio do tumor	superfície de papila tumoral	total	negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	Total	negativa	positiva	total
não invasivo	13 (68,4%)	6 (31,6%)	19	10 (38,5%)	10 (38,5%)	6 (23,1%)	26	5 (19,2%)	20 (76,9%)	1 (3,8%)	26	3 (13,0%)	6 (26,1%)	14 (60.9%)	23	5 (21,7%)	18 (78,3%)	23
invasivo	24 (96,0%)	1 (4,0%)	25	14 (56,0%)	8 (32,0%)	3 (12,0%)	25	6 (24,0%)	19 (76,0%)	0 (0,0%)	25	4 (16,0%)	8 (32,0%)	13 (52,0%)	25	9 (36,0%)	16 (64,0%)	25

Tabela 12: Associação entre o grau histológico do carcinoma urotelial da bexiga com os marcadores da apoptose estudados.

Grau Histológico	Localização do IA			Survivina Nuclear				Survivina Citoplasmática				SMAC				XIAP		
	meio do tumor	superfície de papila tumoral	total	negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	total	negativa	fraca	forte	Total	negativa	positiva	total
baixo grau	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16	8 (33,3%)	10 (41,7%)	6 (25,0%)	24	4 (16,7%)	19 (79,2%)	1 (4,1%)	24	4 (21,1%)	4 (21,1%)	11 (57,8%)	19	3 (15,0%)	17 (85,0%)	20
alto grau	28 (96,6%)	1 (3,4%)	29	16 (55,2%)	8 (27,6%)	5 (17,6%)	29	7 (24,1%)	22 (75,9%)	0 (0,0%)	29	3 (10,0%)	10 (33,3%)	17 (56,7%)	30	11 (37,9%)	18 (62,1%)	29

Capítulo III – Conclusão

Conclusão

- Verificamos uma relação inversa entre a porcentagem do índice apoptótico obtido pela reação imuno-histoquímica com a caspase-3-clivada (IA%) e entre a sobrevida em meses dos pacientes da casuística.
- A sobrevida é significativamente maior entre os pacientes sem invasão da camada muscular da bexiga pelo carcinoma urotelial (mediana de 76,5 meses, e valor máximo de 334 meses), comparados àqueles com camada muscular infiltrada pela neoplasia (mediana de sete meses, tempo máximo de 129 meses).
- A localização dos "*hot-spots*" do índice apoptótico (reação positiva para caspase-3-clivada) nas superfícies das papilas neoplásicas é significativamente maior nos carcinomas de baixo grau que nos de alto grau.
- A imunoexpressão nuclear da Survivina é negativa nos carcinomas invasivos que nos não invasivos.
- Quanto à imunoexpressão de Smac/DIABLO, os carcinomas não invasivos têm significativamente mais reações fortes que os invasivos. O mesmo acontece com a reação para XIAP, com mais carcinomas não invasivos positivos comparados aos invasivos.
- Nos tumores com alta proliferação celular (Ki-67 acima de 25%), constatamos uma maioria significativa de carcinomas com imunoexpressão positiva para XIAP.
- Em relação ao coeficiente e valores mínimo e máximo da sobrevida em meses dos pacientes da casuística segundo a imunoexpressão das proteínas XIAP, Survivina e Smac/DIABLO, em nenhuma das avaliações o valor de p foi menor que 0,05, indicando a falta de significância desses resultados.

São necessárias novas pesquisas com amostras mais amplas para que se estabeleça correlação entre sobrevida dos pacientes e imunoexpressão dos inibidores da apoptoses XIAP e survivina e seu antagonista Smac/DIABLO.

Anexos

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de julho de 2011. Of. 258/11-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Dr. Flávio,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - **(Protocolo CEP 3903-2011)** "**Recuperação de dados clínicos, anatopatológicos e de sobrevida dos pacientes operados por carcinoma de bexiga urinária no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 1980 e 2000, que tenham disponíveis tecidos tumorais incluídos em parafina**", a ser conduzido por Leonardo Ribeiro do Nascimento, orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Profs. Drs. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, José Carlos Souza Trindade Filho, João Lauro Vianna de Camargo, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de **04 de Julho de 2.011**.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP."

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: smolina@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 23 de Junho de 2015 OF. 79/2015-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Caro Prof. Flávio,

Atendendo sua solicitação contida no ofício datado de 18 de junho de 2.015, **AUTORIZO**, a inclusão de **Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel (aluno de Mestrado)**, como colaboradora ao Projeto **(Protocolo CEP 3903/2011) "Recuperação de dados clínicos, anatomopatológicos e de sobrevida dos pacientes operados por carcinoma de bexiga urinária no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 1.980 a 2.000, que tenham disponíveis tecidos tumorais incluídos em parafina"** aprovado por este colegiado em 04/07/2011, ficando a equipe assim constituída:

Autor: Leonardo Ribeiro Nascimento
Orientador: Flávio de Oliveira Lima
Colaboradores: Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, José Carlos Souza Trindade Filho, João Lauro Viana de Camargo e **Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel**.

Atenciosamente,

Profª Drª Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP.

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: smolina@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 10 de setembro de 2015 Of. 114/2015-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Em relação ao Projeto de Pesquisa **(Protocolo CEP 3903-2011)** "Recuperação de dados clínicos, anatomopatológicos e de sobrevida dos pacientes operados por carcinoma de bexiga urinária no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 1980 a 2000, que tenham disponíveis tecidos tumorais incluídos em parafina", aprovado por este CEP em 04/07/2011, informo que em virtude da transformação do projeto em **Dissertação de Mestrado**, foram necessários acrescentar novos marcadores imunohistoquímicos (anticorpos) à saber: **"Marcador de Apoptose Caspase 3 clivada, os inibidores da apoptose (IAPs) XIAP e survivina e seu antagonista SMAC-DIABLO"**. Segundo os autores foi necessária essa inclusão desses marcadores por serem da linha de pesquisa do orientador e os resultados desta casuística terem apresentado potencial científico.

Novo Título do Projeto: "Apoptose no carcinoma urotelial de bexiga"
Autor: Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel
Orientador: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima
Colaboradores: Leonardo Ribeiro Nascimento (Iniciação Científica), Prof. Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus e Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho.

Atenciosamente,

Profª Drª Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP.