UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

João Paulo Oliveira da Costa

Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica
da topoisomerase III β nos carcinomas mamários

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, João Paulo Oliveira da.

Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β nos carcinomas mamários. Ribeirão Preto, 2010.
59 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.
Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo.

1. Câncer de mama. 2. Topoisomerase III β . 3. Fatores prognósticos. 4. Imunohistoquímica.

Nome: COSTA, João Paulo Oliveira da

Título: Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β nos carcinomas mamários

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas
Área de Concentração: Patologia
Opção: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

João Paulo Oliveira da Costa

Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β nos
carcinomas mamários

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas
Área de Concentração: Patologia
Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Ribeirão Preto

2010

Este trabalho contou com auxílio financeiro do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** (processo 470412/2007-0) e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (processo 2008/06461-1)

O presente trabalho resultou na seguinte publicação:

Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis.

Human Pathology. 2010, *no prelo*.

Sumário

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Relação entre dados clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica da topoisomerase III β

Tabela 2 – Relação entre marcadores imunoistoquímicos e expressão da topoisomerase III β

Tabela 3 – Modelo de Riscos Proporcionais de Cox

Lista de Figuras

Figura 1 – Ação das topoisomerases (no caso topoisomerase I) na forquilha de replicação, durante a formação de torções positivas na porção anterior da forquilha. Adaptado de Nitiss, 2006.

Figura 2 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até aparecimento de metástases à distância em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 3 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até óbito em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 4 – Fotomicrografia de carcinoma ductal mamário com forte imunoexpressão citoplasmática de topoisomerase III β (aumento de 400x).

Figura 5 – Microfotografias:

- A- Células neoplásicas positivas para HER-2 (imunohistoquímica, marcação de membrana, aumento de 400X)
- B- Células neoplásicas positivas para p53 (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- C- Células neoplásicas positivas para Ki-67 (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- D- Células neoplásicas positivas para RE (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- E- Células neoplásicas positivas para RP (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- F- Células neoplásicas positivas para BRCA-1 (imuno-histoquímica, marcação nuclear e citoplasmática, aumento de 400X)

Lista de Abreviaturas

BRCA-1 – *Breast cancer gene 1*

HCFMRP/USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico 2

Ki67 – antígeno de proliferação celular

RE- Receptor de estrógeno

RP- Receptor de progesterona

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RESUMO

COSTA, J.P.O. **Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β nos carcinomas mamários.** 2010. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Topoisomerases são enzimas nucleares que participam na regulação da estrutura do DNA nas células eucarióticas. A topoisomerase III β é o mais novo membro da família das topoisomerases. Seu papel no desenvolvimento dos tumores mamários ainda necessita ser investigado. O objetivo do presente estudo foi avaliar a imunoexpressão da topoisomerase III β nos carcinomas mamários, e comparar sua expressão com dados clinicopatológicos e marcadores imunohistoquímicos clássicos de importância prognóstica nos carcinomas mamários. Utilizando-se *tissue microarrays* contendo 171 casos de carcinomas ductais mamários primários, foi analisada a expressão imunohistoquímica de topoisomerase III β , receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER-2, Ki67, p53 e BRCA-1. Positividade para topoisomerase III β foi encontrada em 33,9% dos casos, e sua expressão relacionou-se com metástases à distância ($p=0.036$) e óbito ($p=0.006$). Negatividade para topoisomerase III β relacionou-se com negatividade para HER=2 ($p<0.001$), p53 ($p<0.001$) e BRCA-1 ($p=0.001$), e com baixa expressão de Ki-67 ($p<0.001$). Na Análise de Riscos Múltiplos de Cox, a expressão de topoisomerase III β foi um significativo preditor de sobrevida [razão de risco 3.006 (intervalo de confiança a 95%: 1.582-5.715); $p=0.001$]. Concluindo, a topoisomerase III β pode ser útil na avaliação do prognóstico de pacientes com câncer de mama, além de ser um fator independente de predição da sobrevida.

Palavras-chave: topoisomerase III β , carcinoma ductal mamário, imuno-histoquímica, prognóstico

ABSTRACT

COSTA, J.P.O. **Prognostic Significance of topoisomerase III β immunohistochemical expression in breast carcinomas.** 2010. Master's Dissertation. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2010.

Topoisomerases are ubiquitous nuclear enzymes that regulate DNA structure in eukaryotic cells. The role of topoisomerase III β , the newest member of the topoisomerase family, in the clinical outcome of breast cancer is still poorly understood. This study aims to investigate the immunoexpression of topoisomerase III β in breast cancer and its relationships with clinicopathological features and immunohistochemical markers of prognostic significance in breast pathology. Using tissue microarrays containing 171 cases of primary invasive breast cancer, we analyzed the immunoexpression of topoisomerase III β , estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, Ki67, p53 and BRCA-1. Immunostaining for topoisomerase III β was found in 33.9% of breast carcinomas, and immunopositivity was related with distant metastasis ($p=0.036$) and death ($p=0.006$). Decreased expression of topoisomerase III β was related with negativity with HER-2 ($p<0.001$), p53 ($p<0.001$) and BRCA1 ($p=0.001$) and low expression of Ki67 ($p<0.001$). In the multivariate analysis, topoisomerase III β expression was a significant predictor of survival [hazard ratio 3.006 (95% confidence interval 1.582-5.715); $p=0.001$]. In conclusion, topoisomerase III β expression can be a useful marker in assessing the prognosis of patients with breast cancer and is an independent predictor of survival.

Keywords: topoisomerase III β , breast ductal carcinoma, imunohistochemistry, prognosis

1- INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é o segundo câncer mais freqüente nos Estados Unidos da América (EUA), somente atrás dos tumores pulmonares, e o mais comum entre as mulheres. A previsão de incidência do câncer de mama, nos EUA, foi de 194.280 novos casos, e 40.610 mortes em 2009, sendo que, somente entre as mulheres, foram 19.2370 novos casos e 40.170 mortes. Estima-se que de cada 100 mil norte-americanas, aproximadamente 123 desenvolvam tumores mamários (JEMAL et al., 2009).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estão previstos para 2010, 49.400 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 51 casos para cada 100 mil mulheres. Sua distribuição é bastante heterogênea, sendo a Região Sudeste a de maior incidência, com um risco estimado de 68 casos para cada 100 mil mulheres. Em seguida aparecem a Região Sul (67/100000), Centro-Oeste (38/100000), Nordeste (28/100000) e Norte (16/100000), sendo o tumor mais incidente entre mulheres, exceto na Região Norte, onde ocupa a segunda colocação, somente atrás dos tumores do colo uterino (INCA, 2009).

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Países de maior padrão sócio-econômico têm apresentado declínio nos índices de mortalidade por câncer de mama, principalmente devido à introdução de programas de rastreamento de pacientes através de mamografias precoces, resultando na detecção de tumores em estágios cada vez menos avançados com o consequente incremento nos índices de sobrevida (SPRAGUE et al., 2010). Novas políticas de saúde pública associadas à intensa pesquisa em Mastologia têm levado a um aumento significativo no número de pacientes que sobrevivem ao câncer de mama nas últimas décadas (SOERJOMATARAM et al., 2008). Apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento dos tumores mamários em países desenvolvidos, no Brasil a taxa de mortalidade do câncer de mama cresceu 13,86%, quando se compara o período entre 1979 e 1983 e o período mais recente, entre 2002 e 2006 (INCA).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média cinco anos após o diagnóstico varia entre 75 a 88%, muito acima da média dos outros tumores, com 61% (COLEMAN et al., 2008; SOERJOMATARAM et al., 2008). Estes números foram possíveis não só pelo rastreamento precoce de tumores, mas também pela pesquisa ativa por biomarcadores de

importância prognóstica, que são importantes ferramentas para definir o tratamento e para estimar o curso clínico da doença (SOERJOMATARAM et al., 2008).

1.2 Marcadores de prognóstico no câncer de mama

Segundo a definição de Sargent et al., um marcador prognóstico é um fator capaz de prever o curso da doença de pacientes de maneira independente de outras variáveis (SARGENT et al., 2005). Talvez o maior benefício do estabelecimento de fatores de prognóstico seja uma maior precisão na definição das pacientes que não se beneficiam de terapia adjuvante, evitando assim os efeitos colaterais relacionados tanto à quimio e radioterapia, quanto a ressecções cirúrgicas com extensa mutilação (LØNNING, 2007).

De acordo com o guia norte-americano para a utilização de marcadores prognósticos, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos em 1990, são reconhecidos seis fatores de prognóstico principais em Patologia Mamária: presença ou ausência de metástases linfonodais, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, graduação nuclear, presença ou ausência de receptores hormonais, tipo histológico do tumor e taxa de proliferação celular (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH).

1.2.1 Dados clínico-patológicos

O tipo histológico do tumor mamário é um excelente indicativo do curso clínico da doença. Carcinomas lobulares, que respondem por aproximadamente 10% dos tumores malignos da mama, apresentam um melhor prognóstico quando comparados aos carcinomas ductais, que respondem por aproximadamente 70% do total de casos (COCQUYT et al., 2005).

Outro fator muito importante no prognóstico dos tumores mamários é o tamanho do tumor no momento do diagnóstico. Michaelson et al. demonstraram correlação entre o tamanho do tumor e redução no tempo de sobrevida das pacientes e aumento na probabilidade de metástases à distância (MICHAELSON et al., 2002). Do mesmo modo, em um trabalho coorte com 269 pacientes com tumores de estadiamento II, Vorgias et al (2001) demonstraram que o tamanho do tumor é um fator prognóstico independente, assim como idade, receptores hormonais (RP e RE) e a presença de metástases linfonodais.

A graduação histológica possui uma boa reprodutibilidade entre diferentes instituições de diferentes locais. A fim de tornar a graduação original, proposta por Bloom e Richardson, mais completa, Elston e Ellis, em 1991, propuseram uma modificação denominada Graduação Histológica de Nottingham. Este sistema é baseado em três componentes morfológicos: porcentagem de formação tubular, grau de pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. Cada componente recebe um valor de um a três, e a combinação de seus valores totais indica a graduação, sendo que os resultados entre três e cinco são classificados como grau I, seis e sete como grau II e oito e nove como grau III. (IGNATIADIS & SOTIRIOU, 2008). Alguns estudos demonstram que a classificação histológica é um fator independente de prognóstico, em determinadas populações, embora a falta de padronização da interpretação de seus componentes dificulte sua utilização como fator independente de prognóstico (VINCENT-SALOMON et al., 2001; KATO et al., 2001; IGNATIADIS & SOTIRIOU, 2008)

1.2.2 Marcadores imunohistoquímicos

1.2.2.1 Receptores hormonais

A expressão imunohistoquímica de receptores de estrógeno (RE) tem sido utilizada, na rotina diagnóstica, para identificar pacientes que se beneficiariam de um regime de terapia hormonal, assim como o receptor de progesterona (RP). O estrógeno é um hormônio esteroide fundamental para a fisiologia feminina e também em processos celulares básicos como proliferação e sobrevivência celular. Seu receptor é o responsável por muitos de seus efeitos, tanto no tecido mamário normal quanto no tecido neoplásico (MUSGROVE & SUTHERLAND, 2009). Essa ação do RE se dá através da regulação da transcrição através da ligação de seu ligante ao receptor e sua ação como um componente da membrana e de cascatas de sinalização citoplasmáticas (MUSGROVE & SUTHERLAND, 2009). Ao menos 70% dos tumores mamários são positivos para receptores de estrógeno, e sua positividade tem demonstrado resultados muito favoráveis em relação ao tratamento com tamoxifeno (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2005).

1.2.2.2 p53

O gene *TP53*, inicialmente descrito em 1979, foi o primeiro gene supressor tumoral a ser identificado, embora fosse inicialmente concebido como um oncogene responsável pela proliferação celular (VOGELSTEIN et al., 2000). Além de seu papel como supressor tumoral,

o p53 também é capaz de influenciar a expressão gênica de diversos genes responsáveis por processos como a regulação da glicólise e da autofagia, o reparo de danos genotóxicos, sobrevida celular e regulação de stress oxidativo, invasão e motilidade, senescência celular, angiogênese e diferenciação celular (VOUSDEN; LANE, 2007).

O p53 tem sido estudado como um fator de prognóstico em diversos tipos de tumores, entre eles os de cólon, de mama e no carcinoma epidermóide oral (OLIVEIRA et al., 2008; KIM et al., 2009; KIM et al., 2010; PANCIONE et al., 2010). O p53 também demonstrou, em alguns trabalhos clássicos, ser um forte preditor de recorrência e sobrevida (THOR et al., 1992; ISOLA et al., 1992). Entretanto, em trabalhos mais recentes, diversos autores não encontraram relação entre expressão tanto da proteína p53 quanto do gene *TP53* e sobrevida (BABA et al., 2010; BEGNAMI et al., 2010; COUTINHO-CAMILLO et al., 2010; HARIGOPAL et al., 2010).

Até o momento não existem estudos comparando a expressão de p53 e topoisomerase III β em tumores mamários.

1.2.2.3 Ki-67

O anticorpo Ki67 tem sido utilizado em diversos tipos de tumores desde sua identificação, em 1983 (GERDES et al., 1983). O antígeno Ki67 é considerado um marcador de proliferação celular, principalmente das fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, e geralmente relacionado à sobrevida e/ou sobrevida livre da doença em carcinomas mamários e outros tipos tumorais, como carcinomas neuroendócrinos de pele, cânceres de cólon e carcinomas orais (HAFIAN et al., 2004; COLOZZA et al., 2005; FERNÁNDEZ-FIGUERAS et al., 2005; JACQUEMIER et al., 2009; MA et al., 2009; MOTTA et al., 2009).

O Ki-67 tem sido o marcador de proliferação mais bem estudado em tumores mamários, e estudos indicam que sua expressão está associada a um maior índice de recorrência e a uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama, embora não tenha sido observado um valor prognóstico independente em relação a outras variáveis clinicopatológicas (TRIHIA et al., 2003; AZAMBUJA et al., 2007). O tecido mamário sem alteração neoplásica apresenta baixa expressão de Ki67, ao contrário do tecido neoplásico de alguns subtipos mais agressivos de tumores mamários (YERUSHALMI et al., 2010). O Ki67 não foi ainda universalmente incluído na rotina de diagnóstico dos tumores mamários, provavelmente pela falta de critérios de mensuração de Ki67, e falta de consenso de como essa mensuração poderia influenciar as decisões clínicas (CHEANG et al., 2009).

Não existem, ainda, estudos relacionando a expressão de Ki67 e as topoisomerases do tipo IA, incluindo a topoisomerase III β .

1.2.2.4 BRCA-1

O gene da susceptibilidade ao câncer de mama 1 (BRCA1, do inglês *breast cancer susceptibility gene-1*) é responsável por regular, ao menos em parte, eventos como ativação transcricional, reparo do DNA, apoptose, pontos de reparo do ciclo celular e a remodelação cromossômica (SOMASUNDARAM, 2003). O *BRCA1* está envolvido em tumores de mama e ovário familiares, agindo como um gene supressor tumoral, e a presença de mutações no *BRCA1* é um dos mais bem definidos fatores de risco para o desenvolvimento de tumores mamários familiares. De maneira interessante, os tumores hereditários com mutações em *BRCA1* respondem por menos de 10% do total de casos (RAKHA et al., 2007), e alterações em BRCA1 têm sido descritas como fatores de prognóstico em tumores esporádicos de mama e ovário, provavelmente devido ao seu papel na regulação do dano ao DNA (BOYD et al., 2000; MAJDAK et al., 2005; SILVA SOARES et al., 2010; MARGELI et al., 2010; huen ET AL., 2010).

Além de seu papel nos carcinomas de mama e ovário hereditários, BRCA1 também desempenha um importante papel na regulação do processo de reparo de danos ao DNA, mais especificamente durante a recombinação homóloga, assim como p53 e alguns tipos de topoisomerase. O papel do BRCA1, entretanto, nos carcinomas mamários positivos para a topoisomerase III β ainda necessita ser investigado.

1.2.2.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2)

O receptor humano do fator de crescimento epidermal 2 (HER2) pertence à família dos receptores do fator de crescimento epidérmico, originalmente identificado em neuroblastomas quimicamente induzidos. Sua expressão tem sido estudada em diversos tipos de cânceres, sendo o de mama o principal, pois cerca de 30% dos tumores mamários superexpressam o HER-2, e estes tumores apresentam pior prognóstico (SHIH et al., 1981; SLAMON et al., 1987). Em um trabalho pioneiro, Perou et al. demonstraram que tumores que apresentam uma superexpressão nos transcritos do gene *HER2/neu* e negatividade para receptores hormonais possuem um comportamento clínico mais agressivo do que tumores com concomitante superexpressão de receptores hormonais (PEROU et al., 2000).

O HER-2 é utilizado na rotina diagnóstica devido à sua importância como marcador prognóstico e também devido ao desenvolvimento de um agente terapêutico capaz de bloquear a ação deste receptor, o anticorpo trastuzumab (Herceptin®) (Payne et al., 2008).

Apesar dos avanços na pesquisa em marcadores de prognóstico nos tumores mamários, ainda não foi possível estabelecer um único marcador capaz de prever o comportamento clínico dos tumores de maneira fidedigna. Mesmo estudos com metodologias avançadas, como microarranjos de cDNA, ainda encontram dificuldades em adentrar a rotina dos hospitais, e beneficiar diretamente pacientes vítimas do câncer de mama.

Os marcadores hoje utilizados na rotina de diagnóstico são os receptores hormonais (receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona) e o receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2/*neu*). Nem mesmo estes consagrados marcadores são utilizados efetivamente como marcadores de prognóstico, e sim, como marcadores preditivos, ou seja, de resposta a tratamento, no caso dos receptores hormonais a resposta a hormonioterapia, e mais recentemente, no caso do HER-2/*neu*, para a utilização de seu anticorpo.

1.3 Topoisomerases

As topoisomerasas foram descobertas no contexto da apresentação da estrutura do DNA em dupla hélice (WATSON & CRICK, 1953). Apesar de o modelo explicar de maneira contundente a paridade das bases A-T e G-C na composição química dos diferentes seres vivos, muitos pesquisadores ainda apontavam problemas no modelo, como a observação de que seria difícil o acesso às bases posicionadas internamente à estrutura de dupla hélice sem que houvesse uma abertura, ainda que temporária, nesta hélice. Devido ao entrelaçamento da dupla hélice, esta abertura seria impossível sem a quebra da molécula, limitando então a praticidade do modelo proposto. Estes problemas só seriam solucionados em 1971, com a descoberta de uma proteína, inicialmente chamada de proteína ω , e, posteriormente, topoisomerase, capaz de alterar a topologia do DNA através da abertura de fendas temporárias nas hélices, facilitando tanto o acesso às bases internas quanto a resolução de problemas topológicos intrínsecos às diversas atividades celulares, como condensação dos cromossomos, replicação, transcrição, recombinação e secreção do DNA durante a mitose (WANG, 1971; DE LA TOUR, 2007; FORTERRE et al., 2007; CHAMPOUX, 2001).

Outro problema intrínseco às reações que envolvem o DNA é sua intrincada topologia. O DNA é um longo polímero, que em humanos atinge aproximadamente 2 metros de comprimento, incluído em um núcleo com aproximadamente 10^{-17} m^3 (NITISS, 2006). A compactação necessária para incluir uma estrutura tão grande em um espaço tão pequeno, cria domínios curvados de DNA (também conhecidos como “*loops*”), e pontos de contato entre suas bases. Durante a replicação, outro problema topológico é a geração de torções na porção de DNA que se encontra depois da forquilha de replicação e a presença de DNA com torção negativa na parte posterior à forquilha replicativa. O rearranjo das fitas de DNA tanto em situações de entrecruzamento, quanto em torção positiva ou negativa são resolvidos por diferentes tipos de topoisomerases (NITISS, 2006).

Figura 1 – Ação de topoisomerases (no caso topoisomerase I) na forquilha de replicação, durante a formação de torções positivas na porção anterior da forquilha. Adaptado de Nitiss, 2006.

Através desta função de quebra transitória da molécula de DNA as topoisomerases são responsáveis pelo relaxamento da estrutura de DNA, que se encontra negativamente

enovelada no DNA humano. Esta estrutura em hélice bastante enovelada apresenta uma facilidade maior de relaxamento, facilitando sobremaneira a ação das topoisomerases.

Além da função de relaxamento do DNA, as topoisomerases também têm como função desfazer nós presentes ao final do processo de duplicação do DNA. Durante a replicação, as duas duplas fitas de DNA geradas na reação podem se entrecruzar. Este entrecruzamento entre as moléculas bloqueia a separação dos cromossomos durante a mitose. Neste caso, uma topoisomerase do tipo II abre uma fenda transitória na dupla fita de DNA (caso haja uma fenda em uma das fitas este papel pode ser desempenhado por uma topoisomerase do tipo I) e desfaz o entrelaçamento entre os cromossomos, permitindo que a replicação possa ter sucesso (WATSON et al., 2004).

As topoisomerases são classificadas de acordo com o número de fitas de DNA que são capazes de romper. As enzimas do tipo I podem romper uma fita de DNA de cada vez, enquanto as do tipo II (topoisomerases II α , II β e SPO11) podem romper um par de fitas de DNA. Em humanos, as enzimas do tipo I são divididas em dois subgrupos: IA, formado pelas topoisomerases III α e III β , e IB, composto pela topoisomerase I e pela topoisomerase I mitocondrial (WANG, 2002).

As topoisomerases do tipo II têm sido alvo de diversos estudos em diferentes tipos de cânceres devido ao número de compostos farmacêuticos que atuam diretamente sobre estas enzimas, como antraciclinas, etoposide, doxorubicina (inibidores de topoisomerase II α) e derivados da campotecina, como topotecan e irinotecan (inibidores da topoisomerase I) (NITISS et al., 2009; POMMIER et al., 2006). Estes compostos agem ligando-se às topoisomerases e as inativam, deixando abertas as quebras no DNA formadas por essas enzimas. Este processo leva a uma fragmentação no DNA e à morte celular por apoptose, com intensidade dependente do número de enzimas em atividade (LODGE et al., 2001; NITISS et al., 2009).

A topoisomerase II α é a mais estudada dentre as topoisomerases. A antraciclina é um bloqueador de ação da enzima, que impede que esta seja capaz de promover a religação da dupla fita de DNA, desencadeando o processo apoptótico desta célula. Devido à sua localização, na região cromossômica 17q12-17q21, muito próxima à localização do gene *HER2*, muitos estudos tem tentado identificar seu papel na fisiopatologia dos tumores mamários. Sua expressão tem sido associada a uma menor sobrevida global, e principalmente, sua ausência de expressão tem sido associada a uma resistência a tratamentos baseados em

antraciclina (NIELSEN et al., 2008). Em um estudo clínico de fase III, Wong e colaboradores encontraram forte relação entre aumento na expressão gênica de *TOP2A* e aparecimento precoce da neoplasia, diminuição na sobrevida e quimioresistência em pacientes submetidos a tratamento com quimioterapia baseada em doxorubicina. Em linfomas de Hodgkin, a expressão imunoistoquímica da topoisomerase II α demonstrou ser um marcador de prognóstico independente de qualquer outra variável (DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU et al., 2008; PROVENCIO et al., 2003).

Inibidores da topoisomerase I estão entre os mais utilizados agentes anticâncer na prática clínica (ROTHENBERG, 1997). Devido à importância clínica da expressão de topoisomerase I, diversos estudos têm sido realizados no intuito de avaliar seu efeito preditivo a um regime de tratamento baseado em seus inibidores, tornando esta enzima uma das mais bem estudadas da família das topoisomerases. A topoisomerase I é inibida pela campotecina durante a fase de abertura da fita simples de DNA. Durante a cisão da fita de DNA, a campotecina (e derivados) se liga ao complexo de clivagem da topoisomerase I (TOP1cc, do inglês *topoisomerase I cleavage complex*), impedindo que o processo de religação da fita de DNA seja realizado, levando a uma parada no ciclo celular e entrada no processo de apoptose (NITISS, 2006).

A despeito dos intensos estudos envolvendo as topoisomerases, mais especificamente as topoisomerases I e II α , as outras topoisomerases têm funções e padrões de expressão pouco conhecidos.

As topoisomerases do tipo IA possuem uma conformação de quatro domínios e uma fenda de aproximadamente 25 Å de diâmetro em seu centro. Os domínios I e IV são conectados entre si e formam um sítio de ligação ao DNA no topo da enzima. O segundo domínio, que consiste de dois domínios que se separam na sequência, se localiza na parte superior da proteína e é responsável por sua curvatura. O domínio III funciona como um local de passagem, onde uma fita simples de DNA entra e sai da fenda da enzima durante o ciclo catalítico. O mecanismo de ação das topoisomerases do tipo IA foi proposto após diversos estudos estruturais e bioquímicos (VIARD et al., 2007; DEKKER et al., 2002; CHENG et al., 2004), e consiste de uma reação de cinco passos. No primeiro passo a enzima se liga a uma fita de DNA de maneira covalente, e, ao contrário das topoisomerases do tipo II, esta ligação se dá sem uso de ATP. No segundo passo, uma tirosina da enzima ataca um fosfato da fita de DNA, resultando em uma quebra no DNA. O terceiro passo envolve a movimentação do domínio III, realizando uma abertura na fenda, permitindo que esta acomode a fita simples de DNA. Após a acomodação da fita única, o domínio III se fecha, para permitir a religação da

fita de DNA anteriormente cortada no 2º passo. O quinto passo consiste no relaxamento do domínio III, que libera a fita de DNA, e reinicia o ciclo funcional (XIONG et al., 2008, CHAMPOUX, 2002a; CHAMPOUX, 2002b).

A topoisomerase III α é uma enzima do tipo IA localizada na região cromossômica 17p11.2-12 (HANAI et al., 1996). Até o momento, apenas um trabalho estudou a expressão imunohistoquímica desta enzima em tumores (ZHANG et al., 2005). Apesar da pouca informação disponível sobre o papel da enzima tanto no tecido normal como durante a tumorigênese, Li e Wang (1998) demonstraram, em um estudo *in vitro*, que a topoisomerase III α é capaz de relaxar apenas parcialmente fitas de DNA negativamente torçionadas (LI & WANG, 1998). Neste mesmo estudo, camundongos *knockout* para o gene *TOP3A* mostraram-se inviáveis durante fases precoces da embriogênese e há evidências de que a topoisomerase III α pode desempenhar um papel na separação de cromátides durante a replicação cromossômica (LI & WANG, 1998). Estudos investigando o papel desta enzima no desenvolvimento de tumores mamários, e seu impacto como fator prognóstico estão, neste momento, em andamento por nosso grupo de pesquisa.

1.3.1 Topoisomerase III β

A enzima topoisomerase III β é o mais recente membro da família das topoisomerases do tipo I em humanos. A topoisomerase III β é considerada uma variante da topoisomerase III α . Seu gene está localizado no cromossomo 22q11-12 (KAWASAKI et al., 1997).

Uma das funções da topoisomerase III β é promover o relaxamento de fitas de DNA que se encontram demasiado enoveladas. Este relaxamento é promovido pela abertura de uma fenda na fita simples de DNA e o giro da fita complementar, desfazendo o enovelamento. A proteína se desliga da fita de DNA quando a força de tensão deste DNA atinge um valor baixo, indicando que o processo de relaxamento não mais é necessário (WANG et al., 2002). A topoisomerase III β também desempenha um importante papel no reparo por recombinação, removendo intermediários da recombinação antes da segregação de cromossomos, evitando, desse modo, danos à estrutura do DNA da célula (ZHU et al., 2001).

Em um estudo com camundongos geneticamente modificados com deleção do gene *TOP3 β* , Kwan e Wang (2001) observaram que estes camundongos sobrevivem até a idade adulta, mas têm sobrevida menor que os camundongos do tipo selvagem. Os camundongos

knockout tiveram uma sobrevida de 15 meses, enquanto os camundongos sem deleção genética sobreviveram por mais de dois anos (KWAN AND WANG, 2001).

Um elegante estudo com cultura de células demonstrou algumas funções anteriormente desconhecidas da topoisomerase III β . Fibroblastos embriogênicos com deleção no gene *TOP3 β* demonstraram capacidade de proliferação duas vezes menor do que fibroblastos controle, e uma maior sensibilidade a danos ao DNA gerados por radiação UV B, e tratamento com hidroximetilureia. A causa desta diferença na capacidade proliferativa demonstrou ser fruto de um aumento nos níveis de dano ao DNA, identificados por um aumento nos níveis da histona H2AX, comparado com as células controle. E o achado principal deste estudo, entretanto, foi que, em células *knockout* para topoisomerase III β , havia uma ativação deficiente de p53, ao contrário das células controle. Este foi o primeiro trabalho a aventar a possibilidade de a enzima topoisomerase III β exercer um papel na ativação da resposta celular ao dano ao DNA (MOHANTY et al., 2007).

1.3.2 Topoisomerase III β na Recombinação Homóloga

A recombinação homóloga (RH) é um dos cinco processos de reparo do DNA, que incluem também o reparo por excisão de nucleotídeos (em inglês *nucleotide-excision repair*, *NER*), reparo por excisão de bases (em inglês *base-excision repair*, *BER*), união terminal não-homóloga (em inglês *non-homologous end-joining*, *NHEJ*) e reparo de erros de pareamentos (em inglês *mismatch repair*, *MMR*) (SENGUPTA & HARRIS, 2005). A recombinação homóloga é um processo fundamental, presente em todos os organismos vivos, que auxilia na conservação do genoma, no reparo de cromossomos danificados e prevenção de falhas na forquilha replicativa. Durante a RH, uma sequência perdida em uma dupla fita de DNA é reparada por uma troca física pela mesma sequência de uma segunda cópia do DNA. Erros durante a recombinação homóloga estão entre as causas de cânceres de mama, ovário e outros tipos em pacientes com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além de falhas na coordenação da resposta ao dano, possivelmente influenciadas por perda de função da proteína p53 (JASIN, 2002).

A topoisomerase III β também demonstrou desempenhar um papel ativo na recombinação homóloga (KWAN et al., 2003). Alguns tipos de dano aos cromossomos acarretam em um forte impedimento para a replicação, e a recombinação do DNA

comprometido com sua cromátide irmã é capaz de reestabelecer a força de replicação e dar continuidade ao processo de divisão celular (MICHEL et al., 2004; SENGUPTA & HARRIS, 2005).

O papel da topoisomerase III β nos tumores mamários segue pouco compreendido, e o objetivo deste estudo foi investigar o impacto prognóstico da expressão imunoistoquímica da topoisomerase III β nos carcinomas ductais de mama, e sua relação com a sobrevida dos pacientes, com achados clínico-patológicos e com fatores prognósticos como receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), BRCA1, receptor do fator de crescimento epidermal-2 (HER-2) e o marcador de proliferação celular Ki-67.

2- OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivos verificar:

1. A expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β nos carcinomas mamários;
2. A relação entre a expressão da topoisomerase III β com a expressão protéica dos genes supressores tumorais BRCA1 e p53;
3. A relação entre a expressão da topoisomerase III β com parâmetros clínico-patológicos de importância prognóstica nos carcinomas mamários, incluindo a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), a expressão do HER-2 e o índice proliferativo (Ki-67).
4. A relação entre a expressão da topoisomerase III β com sobrevida global e sobrevida livre de doença.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Um total de 198 casos de carcinomas ductais de mama feminina, diagnosticados entre 1994 e 1998, foram coletados do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes informações: idade, status menopausal, tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos regionais, recorrência, metástases à distância, morte, sobrevida específica do câncer de mama, sobrevida livre de metástases e sobrevida livre da doença. Sobrevida específica do câncer de mama (SECM) foi definida como o número de meses desde o diagnóstico até a morte devido ao câncer de mama. A sobrevida livre de metástases (SLM) foi considerada como o tempo entre o diagnóstico e o aparecimento de metástases à distância, em meses, e a sobrevida livre da doença (SLD) como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o aparecimento de recorrências ou metástases, também em meses. Casos com outras causas de morte foram excluídos do estudo. Os casos foram graduados histologicamente de acordo com as definições de Scarff-Bloom & Richardson e modificados por Elston & Ellis (Fitzgibbons et al., 1999). Resumidamente, este sistema consiste em três componentes (diferenciação celular, pleomorfismo e índice mitótico). Cada componente recebe uma pontuação de 1 a 3 e são somados e categorizados como grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) ou grau III (indiferenciado). Nenhum dos pacientes havia recebido nenhum tipo de tratamento anterior ao diagnóstico. O protocolo de estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki, em 1975, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local.

3.2 Microarranjos Teciduais (*Tissue Microarrays*)

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram revisadas por um patologista (ARS) para delimitar a área mais significativa de cada tumor, que foi, posteriormente, utilizada para a construção do microarranjo tecidual (TMA, do inglês *tissue microarray*) em bloco de parafina. A construção do bloco de microarranjo tecidual foi gentilmente realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, da Fundação Antônio Prudente. Para a construção do TMA, amostras das biópsias, de um mm cada, foram retiradas dos blocos doadores e transferidos para o bloco receptor, utilizando o

aparelho Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Foram realizados cortes de três micrômetros do bloco de microarranjos utilizando o sistema Paraffin Tape-transfer System (instrumedics, Saint Louis, USA). Um dos cortes foi corado com H&E para confirmar a presença de tumor por microscopia de luz. As reações de imunoistoquímica foram realizadas em duas diferentes lâminas para aumentar a confiabilidade dos resultados.

3.3 Imunohistoquímica (IHQ)

Todas as amostras teciduais foram rotineiramente fixadas em formalina neutra 4% e embebidas em parafina. As reações de IHQ foram realizadas utilizando-se o kit NovolinkTM Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). Os cortes foram desparafinados em xileno e reidratados em uma série de alcoóis. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0.3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Os cortes foram, então, submetidos à reativação antigênica em um tampão citrato a 10mM e colocados em panela de pressão por 40 minutos. Após a recuperação antigênica, as amostras foram resfriadas por 30 minutos e encubadas a 4 °C *overnight* com o anticorpo primário. A diluição e a marca dos anticorpos utilizados neste estudo foram: topoisomerase III β (1:100, policlonal, Santa Cruz, Palo Alto, USA), p53 (1:50, clone DO-7, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), receptor de estrógeno (RE) (1:100 clone 6F11, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), receptor de progesterona (RP) (1:100, clone 16, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), Ki67 (1:100, clone MM1, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), BRCA1 (1:50, clone MS13, Serotec, Oxford, UK) e c-erbB-2 (HER-2) (1:100, clone CB11, Novocastra, Newcastle upon Tyne). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o bloqueio pós-anticorpo primário por 30 minutos e incubados com o polímero por mais 30 minutos (ambos parte do kit NovolinkTM Max Polymer Detection System). A reação foi corada por diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina. Os cortes foram, então, desidratados em uma série de alcoóis e montados em Permount (Fischer, Fairlawn, NJ). Amídalas foram utilizadas como controle positivo para topoisomerase III β e Ki67. Casos de carcinomas ductais sabidamente positivos para p53, RE, RP, BRCA1 e HER-2 foram utilizados como controles positivos para esses marcadores. Controles negativos foram realizados suprimindo-se os anticorpos primários.

Para definir o ponto de corte que definiria os casos positivos e negativos para topoisomerase III β , seguimos o critério estabelecido por Di Leo e colaboradores, em 2001.

Todas as lâminas foram interpretadas por dois pesquisadores (ARS e JPOC), que informaram o percentual de células marcadas em cada caso (de 0% a 100%). Neste momento, nenhum dos pesquisadores tinha acesso aos dados clínicos de cada caso. A partir da interpretação das lâminas, foi calculado o valor médio de porcentagem de células apresentando marcação, e este foi utilizado como valor de corte e a partir deste ponto (30%), foram considerados os casos positivos (acima de 30%) e negativos (abaixo de 30%) (Di Leo et al., 2001). Os casos em que mais de 10% das células neoplásicas foram marcadas para Ki67 (marcação nuclear) foram considerados com um alto índice proliferativo. Os casos foram interpretados como RE, RP, BRCA1 e p53 positivos quando mais de 10% das células neoplásicas mostravam marcação nuclear (Fitzgibbons et al., 1999; MANGIA et al., 2009).

A expressão de HER-2 foi graduada de acordo com a proporção de marcação de membrana. O escore 0 foi aplicado quando não havia marcação ou menos de 30% das membranas apresentavam marcação. O escore 1+ englobava marcação fraca ou parcial da membrana em mais de 30% das células. A expressão foi considerada 2+ quando havia marcação de fraca a moderada em mais de 30% das células tumorais. O escore 3+ foi utilizado quando houve marcação forte e completa das membranas de mais de 30% das células. Carcinomas com escore 0 e 1+ foram considerados negativos e com escore 3+ foram considerados positivos. Casos com classificação 2+ foram submetidos à hibridização cromogênica *in situ* (CISH) para HER-2 e o centrômero do cromossomo 17.

3.4 Hibridização cromogênica *in situ* (CISH)

Foram realizados cortes de 3 µm nos blocos de TMA utilizando-se o sistema Paraffin tape-transfer (Instrumedics, Saint Louis, USA). O kit ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe (Zytovision, Bremerhaven, Germany) foi utilizado para a detecção do gene de HER-2 e do cromossomo 17 (CEN 17). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Usando este kit, dois sinais verdes (HER-2) e dois vermelhos (CEN 17) eram esperados em um núcleo normal. HER-2 foi considerado amplificado quando a relação HER-2/CEN 17 era ≥ 2 na média de 60 células (Wolff et al., 2007). Para fins estatísticos, apenas casos classificados como 2+ foram submetidos à hibridização, e aqueles com amplificação no CISH foram considerados positivos.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa PASW Statistics 18.0 (Chicago, IL, USA). A relação entre a topoisomerase III β , achados imunoistoquímicos e clinicopatológicos foi avaliada utilizando-se tabelas cruzadas e aplicando-se o teste de χ^2 (três ou mais variáveis) ou teste exato de Fisher (duas variáveis) e todos os testes foram realizados em duplicata. O modelo de Kaplan-Meier com o teste de log-rank foi utilizado para estimar e comparar a sobrevida específica da doença, a sobrevida livre de doença e a sobrevida livre de metástases. Para observar o valor prognóstico independente da topoisomerase III β foi realizado um Modelo de Riscos Proporcionais de Cox (Cox, 1972). Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4- RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes e dos tumores

Inicialmente foram selecionadas 198 pacientes, mas, para a análise final, 27 foram excluídas por não possuírem material suficiente para as reações de imuno-histoquímica ou por faltar informações clínicas necessárias (idade, status menopausal, tamanho do tumor, metástases em linfonodos regionais, recorrência, metástases à distância e morte). A casuística final foi, portanto, de 171 casos.

A relação entre a topoisomerase III β e os achados clinicopatológicos encontra-se representada na Tabela 2. A idade das pacientes incluídas no estudo variou de 19 a 91 anos (média, 57 anos). Os tumores foram classificados como grau I (69 [40.4%]), grau II (82 [48%]) e grau III (20 [11.7%]). Todos os tumores foram diagnosticados como carcinomas ductais invasivos, com tamanhos variando entre 1 e 18 cm (média de 4.45 cm). Cinquenta pacientes (31%) não estavam na pré menopausa e 118 já eram menopausadas (69%). Trinta e seis pacientes (21.1%) tinham tumores de menos de 2 cm em seu maior comprimento, 76 tinham tumores entre 2 e 5 cm (44.4%) e 59 tinham tumores maiores que 5 cm (34.5%). Sessenta e sete (39.2%) foram diagnosticadas sem comprometimento de linfonodos, enquanto 104 (60.8%) apresentavam metástases em linfonodos. De acordo com o Sistema de Estadiamento Clínico, criado pelo Comitê Americano para o Câncer (AJCC) (Singletary et al., 2003), dezesseis (9.4%) tinham estadiamento I, 38 (22.2%) tinham estadiamento IIa, 27 (15.8%) tinham estadiamento IIb, 22 (12.9%) tinham estadiamento IIIa, 52 (30.4%) foram classificados como IIIb e 16 (9.4%) como estágio IV. Cento e quarenta e seis pacientes (85.4%) não apresentaram recorrência da doença, enquanto 25 (14.6%) tiveram recorrência. Setenta e cinco (43.9%) pacientes apresentaram metástases à distância e 96 (56.1%) não tiveram sinais de metástases. A expressão de topoisomerase III β está relacionada ao aparecimento de metastases à distância ($p=0.036$), e à morte em decorrência da doença ($p=0.006$), mas não com a idade ($p=0.868$), status menopausal ($p=0.862$), estadiamento clínico ($p=0.950$), grau histológico ($p=0.516$), comprometimento de linfonodos ($p=0.869$), ou recorrência ($p=1.000$).

Tabela 1 – Relação entre dados clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de topoisomerase III β

Característica	Topo III β +	Topo III β -	p-valor
Idade (anos)			0.868
<50	21	43	
>50	37	70	
Status menstrual			0.862
Pré-menopausal	41	77	
Pós-menopausal	17	36	
Tamanho do tumor (cm)			0.918
<2	12	24	
2-5	27	49	
>5	19	40	
Graduação histológica			0.519
Bloom & Richardson			
I	20	49	
II	31	51	
III	7	13	
Estadiamento clínico			0.950
I	7	9	
IIa	12	26	
IIb	8	19	
IIIa	7	15	
IIIb	18	34	
IV	6	10	
Recorrência			1.000
Sim	8	17	
Não	50	96	
Comprometimento de linfonodos			0.869
Sim	36	68	
Não	22	45	
Metástase			0.036
Sim	32	43	
Não	26	70	
Morte			0.006
Sim	35	42	
Não	23	71	

Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes

4.2 Análise das reações de imunohistoquímica

Das 171 amostras estudadas, positividade para topoisomerase III β foi encontrada em 58 (33.9%) carcinomas. O índice de marcação quantitativo variou entre 0% e 100% de células marcadas em seu citoplasma. O índice de positividade para RE, RP, p53 e BRCA1 foi, respectivamente, 60.2% (104 casos), 45.6% (78 casos), 33.9% (58 casos), and 49.7% (82 casos). Na reação de BRCA1, 6 amostras não possuíam material suficiente para análise, e foram excluídos. Alto índice de expressão de Ki67 foi observado em 27 casos (15.8%). Sobre a expressão de HER-2, 100 casos (58.5%) foram classificados como 0, 27 casos (15.8%) foram classificados como 1+, 21 casos (12.3%) foram classificados como 2+ e 23 casos (13.5%) foram classificados como 3+. Destes 21 casos classificados como 2+, após a realização da hibridização cromogênica *in situ* (CISH) 11 foram considerados amplificados para HER-2 enquanto 10 foram considerados negativos. A expressão da topoisomerase III β relacionou-se com uma baixa expressão de Ki67 ($p<0.001$), BRCA1 ($p=0.001$), p53 ($p<0.001$) e HER-2 ($p<0.001$), mas não com RE ($p=0.191$) e RP ($p=0.630$).

Tabela 2 – Relação entre marcadores imunoistoquímicos e expressão de topoisomerase III β

Marcador	Topo III β +	Topo III β -	P-valor
RE			0.191
Pos	39	64	
Neg	19	49	
RP			0.630
Pos	28	50	
Neg	30	63	
Ki67			<0.001 ^a
Pos	19	8	
Neg	39	105	
p53			<0.001 ^a
Pos	41	17	
Neg	40	73	
HER-2			<0.001 ^a
Pos	22	12	
Neg	36	101	
BRCA1			
Pos	37	45	0.001 ^a

4.3 Relação entre a expressão da topoisomerase III β e sobrevida

O período de seguimento das pacientes incluídas no estudo variou de 1 a 164 meses (média de 63 meses), e a média da sobrevida específica da doença foi de 96 meses. Utilizando-se a análise de sobrevida de Kaplan-Meier com o teste de log-rank, encontramos uma pior sobrevida no grupo positivo para topoisomerase III β ($p=0.006$), assim como uma pior sobrevida livre de metástases ($p=0.016$) (Figuras 2 e 3), mas não foram encontradas diferenças significativas em relação à sobrevida livre da doença. Na análise multivariada, a expressão da topoisomerase III β teve um efeito significativo em prever a sobrevida [HR 2.711 (intervalo de confiança de 95% [CI] 1.484-4.955); $p=0.001$]. Os resultados da análise multivariada são mostrados na Tabela 3.

Figura 2 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até aparecimento de metástases a distância em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Figura 3 – Curva de sobrevida de Kaplan Meyer, analisada pelo modelo *log rank* de Mantel-Cox, com tempo até óbito em função do índice de pacientes com câncer de mama.

Tabela 3 – Modelo de Riscos Proporcionais de Cox

Característica	β	EP	RR	IC 95%	P-valor
Tamanho do tumor					
<2			1		
2-5	0.995	0.506	2.705	1.004-7.288	0.049
>5	1.228	0.524	3.414	1.222-9.537	0.019
Topo III β	0.997	0.308	2.711	1.484-4.955	0.001
Graduação Histológica (Bloom-Richardson)					
I			1		
II	1.040	0.352	2.830	1.420-5.637	0.003
III	1.433	0.463	4.193	1.690-10.399	0.002
LN	0.784	0.357	2.189	1.088-4.406	0.028
Metástases à distância	1.803	0.337	6.070	3.138-11.740	<0.001

LN: comprometimento linfonodal; RR: risco relativo, IC 95%, intervalo de confiança de 95%; EP: erro padrão.
São mostrados apenas os parâmetros estatisticamente significantes.

Figura 4 – Fotomicrografia de carcinoma ductal mamário com forte imunoexpressão citoplasmática de topoisomerase III β (aumento de 400x).

Figura 5 – Microfotografias:

- A- Células neoplásicas positivas para HER-2 (imunohistoquímica, marcação de membrana, aumento de 400X)
- B- Células neoplásicas positivas para p53 (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- C- Células neoplásicas positivas para Ki-67 (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- D- Células neoplásicas positivas para RE (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- E- Células neoplásicas positivas para RP (imunohistoquímica, marcação nuclear, aumento de 400X)
- F- Células neoplásicas positivas para BRCA-1 (imuno-histoquímica, marcação nuclear e citoplasmática, aumento de 400X)

5- DISCUSSÃO

Muito esforço tem sido empreendido na busca de marcadores que possam indicar, no momento do diagnóstico, o comportamento clínico dos tumores de mama, o que poderia evitar que pacientes com tumores de comportamento pouco agressivo fossem submetidas a tratamentos demasiado radicais de maneira desnecessária, e evitando que pacientes com tumores de comportamento mais agressivo fossem tratadas com menos rigor, resultando em um curso clínico desfavorável.

Diversos estudos têm proposto que a expressão imunohistoquímica das topoisomerases poderia indicar o estado proliferativo tanto de células somáticas quanto de células tumorais (MCGROGAN et al., 2003; KORKOLOPOULOU et al., 2001; KONSTANTINIDOU et al., 2001; SCHINDLBECK et al., 2007). Estudos em diferentes tipos de cânceres têm demonstrado que a enzima topoisomerase II α tem uma forte relação de co-expressão com Ki67 (DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU et al., 2008; SCHINDLBECK et al., 2007). De acordo com Hafian et al., a enzima topoisomerase II α pode, inclusive, ser considerada um marcador de proliferação mais confiável do que Ki-67, pois pode ser detectado durante as fases S, G2 e M, mostrando apenas células que efetivamente estão em divisão celular. A fim de acessar o papel da topoisomerases III β no estado proliferativo dos carcinomas ductais mamários comparamos sua expressão à do anticorpo KI67.

Neste estudo encontramos uma relação entre a negatividade da topoisomerase III β e uma baixa expressão de Ki67 e encontramos uma forte correlação entre as expressões de topoisomerase III β e Ki67, como já relatado para topoisomerase II α . Esta diminuição no potencial replicativo das células deficientes em topoisomerase III β já havia sido observada por Mohanty e colaboradores, em 2008. Estes autores observaram que, em fibroblastos embriogênicos murínicos deficientes em topoisomerase III β , a divisão celular era mais lenta que em seus pares topoisomerase III β -positivos e relacionaram este baixo potencial replicativo a uma maior sensibilidade genotóxica (MOHANTY et al., 2008). Esse achado indica que, assim como a topoisomerase II α tem forte relação com o estado proliferativo das células (NIELSEN et al., 2008), a topoisomerase III β também pode ser capaz de refletir o estado proliferativo dos carcinomas ductais da mama.

O oncogene HER-2/*neu* encontra-se superexpresso em 15 a 30% de diversos tipos de tumores, e sua expressão é considerada um fator de mau prognóstico em tumores de mama e ovário (HENGSTLER et al., 1999; MANO et al., 2007). Diversos estudos observaram uma

forte relação entre a superexpressão do HER-2 e alterações na expressão da topoisomerase II α , devido à proximidade do *locus* gênico das 2 proteínas, no braço longo do cromossomo 17 (O'MALLEY et al., 2009). Entretanto, outros estudos demonstraram que uma modificação nos padrões de expressão da topoisomerase II α pode não ocorrer somente por esta proximidade genética, pois os dois genes, apesar de próximos pertenceriam a 2 amplicons diferentes e, quando co-amplificados, seriam resultado de duas diferentes mutações. (ARRIOLA et al., 2007; Mano et al., 2007). No presente estudo, encontramos relação entre a negatividade para HER-2 e a negatividade da topoisomerase III β . A expressão de HER-2 está associada a um aumento na sua dimerização com outros membros da família dos receptores do fator de crescimento epidermal, resultando na ativação de vias que aumentam a sinalização proliferativa para o núcleo (IGNATIADIS et al., 2009). A negatividade para a proteína HER-2 nos carcinomas mamários negativos para a topoisomerase III β indica que este subgrupo de pacientes pode ser um subtipo menos agressivo de carcinomas ductais de mama.

Dentre os genes reguladores da recombinação homóloga que se segue à quebra de fitas de DNA, destaca-se o *BRCA1*, responsável pelos tumores mamários do tipo familiar. O gene *BRCA1*, além de seu papel nos carcinomas mamários hereditários, encontra-se envolvido na resposta ao dano ao DNA, associado à proteína RAD51, que se acumula nos focos de lesão ao DNA, e a γ H2AX (uma forma fosforilada da histona H2AX), que é a primeira a sinalizar estes danos. Aumentos nos níveis de γ H2AX produzem o recrutamento de fatores envolvidos no reparo do dano ao DNA, como RAD51 e BRCA1. Embora a função do BRCA1 nos focos de lesão seja ainda pouco compreendida, estudos sugerem que, devido a sua atividade de ubiquitina ligase E3, o BRCA1 seja responsável pela ubiquitinação de proteínas no local de lesão, facilitando a resposta ao dano (HUEN 2010; Morris & SOLOMON, 2004; POLANOWSKA et al., 2006; CHEN et al., 2004, ZHAO et al., 2007). Outra possível função do BRCA1 no reparo do dano ao DNA seria sua capacidade de fosforilação de várias proteínas envolvidas na sinalização do dano pela via de sinalização ATM (*ataxia telangiectasia*)-ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*), incluindo a fosforilação de p53, checkpoint kinase 1 e 2 (HUEN, 2010).

O gene *TP53* desempenha um importante papel no contexto da recombinação homóloga, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O p53 é considerado o controlador da recombinação homóloga (RH), e sua inativação resulta em um aumento da RH, tanto na sua forma espontânea quanto na forma induzida por stress (SENGUPTA & HARRIS, 2005). Existem indícios de que o p53 seria responsável por checar o andamento da RH, reconhecendo locais

com defeitos e restringindo a troca de bases entre seqüência imperfeitas, além de suprimir os rearranjos capazes de causarem alterações tumorigênicas (DUDENHÖFFER et al., 1998).

A síntese de DNA (fase S do ciclo celular) está associada à formação de cortes e fendas no DNA, com consequente colapso das forças de replicação nos locais de fenda. Estas modificações na estrutura do DNA podem alterar a estabilidade cromossômica e causar mutações, no caso de não serem resolvidas a tempo. Além disso, diversos problemas de torção do DNA estão associados à síntese de DNA, como o stress torsional formado durante o avanço da força de replicação, a fusão de fitas devido a seu maior entrelaçamento e a formação de estruturas circulares capazes de impedir o avanço da força. Todos estes eventos são solucionados com o auxílio das topoisomerases, que além de auxiliar durante a fase S também auxiliam durante a condensação de cromossomos e a segregação, nas fases G2 e M do ciclo celular (BRANZEI; FOIANI, 2008).

O gene *BRCA1*, apesar de seu papel na síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (em inglês *HBOCS*), também tem um importante papel na regulação da recombinação homóloga como mecanismo de reparo de quebras na fita de DNA. No presente estudo, a positividade para topoisomerase III β relacionou-se à negatividade para BRCA1. A baixa expressão imunohistoquímica de BRCA1 não está necessariamente associada a mutações no gene, e sim a fatores epigenéticos, como metilação no DNA, perda da heterozigotidade e defeito no transporte intracelular do produto do gene BRCA1 (RIBEIRO-SILVA, 2005). O padrão de marcação imunohistoquímica do BRCA1 é diferente nos carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal. Enquanto a marcação no epitélio normal é exclusivamente nuclear, nos carcinomas pode ser exclusivamente nuclear, predominantemente nuclear, predominantemente citoplasmática ou exclusivamente citoplasmática. Na célula normal a proteína codificada pelo BRCA1 é sintetizada no citoplasma e transportada até o núcleo, onde desempenha seu papel regulador do ciclo celular. Acredita-se que no carcinoma ocorra um defeito nesse transporte, justificando sua expressão citoplasmática (RIBEIRO-SILVA, 2005). O fato dos carcinomas positivos para topoisomerase III β apresentarem defeitos epigenéticos em BRCA1 indica que, nestes casos, o recrutamento de fatores responsáveis pelo reestabelecimento do DNA lesionado, através da ativação de BRCA1, pode estar comprometido, o que ajudaria a explicar a baixa sobrevivência das pacientes topoisomerase III β positivas. Esta visão é corroborada pela relação entre positividade para topoisomerase III β e formas truncadas da proteína p53.

O supressor tumoral p53 age primariamente como um fator transcricional responsável pela ativação ou repressão de diversos genes-alvo. Ao contrário do que se imaginava, tumores que expressam formas mutantes de p53 não apenas perdem a capacidade de suprimir a formação do tumor, como também ganham novas propriedades oncogênicas, como resistência a esquemas terapêuticos e aumento na proliferação celular (BROSH, 2009).

Na técnica de imunohistoquímica, a presença de marcação para p53 indica uma forma truncada ou mutada da proteína, visto que em condições normais ela é rapidamente degradada por MDM2 após cumprir sua função. Nossos resultados demonstram que tumores com baixa expressão de topoisomerase III β apresentam negatividade imunohistoquímica para p53, isto é, a forma ativa de p53. Por outro lado, carcinomas com positividade para topoisomerase III β apresentaram positividade para p53, indicando que estes tumores, além de apresentarem defeitos epigenéticos em BRCA1, também apresentam formas truncadas ou mutadas de p53, o que poderia se refletir em defeitos durante o dano ao DNA. Altos níveis de topoisomerase III β poderiam indicar um maior número de lesões no DNA destas células, o que aconteceria devido à falha nos mecanismos de verificação do DNA, como demonstrado pelas variantes não funcionantes de p53 e BRCA1. Entretanto, devido ao pouco conhecimento sobre o papel da topoisomerase III β na carcinogênese dos tumores mamários, somente é possível especular as razões destas relações com BRCA1 e p53 até o momento.

Um melhor prognóstico foi encontrado entre as pacientes que apresentaram negatividade para topoisomerase III β . Não há estudos comparando a expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β ao prognóstico de tumores mamários. Porém, através do estudo de outras topoisomerasas, podemos aventar algumas hipóteses sobre o papel da topoisomerase III β em termos de sobrevida em carcinomas mamários. Estudos demonstram que um aumento na expressão de topoisomerase II α está associado de maneira independente a uma menor sobrevida livre da doença e/ou sobrevida global em carcinomas mamários, e a um fenótipo agressivo, a um estado mais avançado da doença e a um pior curso clínico em carcinomas de glândulas salivares. (RUDOLPH et al., 1999a; RUDOLPH et al., 1999b; MARUYA et al., 2009).

Em nosso trabalho a expressão de topoisomerase III β está significativamente relacionada de maneira independente com o tempo de morte dos indivíduos incluídos no estudo. Segundo a razão de risco, pacientes positivos para topoisomerase III β têm 2.7 vezes mais chance de morte pela doença do que os pacientes negativos para a enzima. A relação

independente entre a expressão da topoisomerase III β e a sobrevida específica da doença indica que a melhor sobrevida das pacientes topoisomerase III β negativas pode, ao menos em parte, ser explicada por uma melhor maquinaria de resolução de danos ao DNA, principalmente de fatores relacionados ao processo de recombinação homóloga, como indicado pela ausência de expressão de formas inativas de p53, a presença de formas não modificadas de BRCA1, e o baixo índice proliferativo destes tumores. Entretanto, novos estudos são necessários para que se confirme esta hipótese, e estudos entre a relação dos transcritos do gene *top3 β* e mutações em *TP53* já se encontram em andamento pelo nosso grupo.

Devido a este efeito independente em prever a sobrevida em tumores mamários, estes resultados sugerem que a imunoexpressão da topoisomerase III β pode ser utilizada como ferramenta para prever o curso da doença no futuro. Mais estudos, entretanto, são necessários para entender o papel da enzima topoisomerase III β no desenvolvimento dos tumores mamários e sua relação com outros marcadores imunoistoquímicos. Nossos estudos demonstram que a negatividade da enzima topoisomerase III β pode, no futuro, ser útil para identificar subgrupos de tumores mamários com um melhor prognóstico.

6- CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho podemos concluir que:

1. A topoisomerase III β encontra-se superexpressa em 39% dos carcinomas mamários;
2. Existe forte relação entre a expressão de topoisomerase III β e os genes reguladores do ciclo celular envolvidos na recombinação homóloga, BRCA1 e p53;
3. Existe relação entre a expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β com os marcadores prognósticos HER-2 e Ki-67.
4. Em carcinomas mamários, a expressão imunohistoquímica da topoisomerase III β mostrou ser um fator de prognóstico independente em termos de sobrevida específica da doença.

REFERÊNCIAS

Normatizado de acordo com o Sistema Vancouver

Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. **JAMA** 1993;269:2282-6.

Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106:181-9.

Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan A, Meyerhardt J, et al. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol*. 2010 May;176(5):2292-301.

Begnami M, Fregnani J, Nonogaki S, Soares F. Evaluation of cell cycle protein expression in gastric cancer: cyclin B1 expression and its prognostic implication. *Hum Pathol*. 2010 Mar.

Boyd J, Sonoda Y, Federici M, Bogomolnii F, Rhei E, Maresco D, et al. Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA*. 2000 May;283(17):2260-5.

Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr;9(4):297-308.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):701-13.

Champoux J. A first view of the structure of a type IA topoisomerase with bound DNA. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 May;23(5):199-201.

Champoux J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:369-413.

Champoux J. Type IA DNA topoisomerases: strictly one step at a time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep;99(19):11998-2000.

Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3738-43.

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

Cheng B, Feng J, Mulay V, Gadgil S, Tse-Dinh Y. Site-directed mutagenesis of residues involved in G Strand DNA binding by Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 2004 Sep;279(38):39207-13.

Cocquyt V, Van Belle S. Lobular carcinoma in situ and invasive lobular cancer of the breast. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005 Feb;17(1):55-60.

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008; 9: 730–56

Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart M. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*. 2005 Nov;16(11):1723-39.

Coutinho-Camillo C, Lourenço S, Nishimoto I, Kowalski L, Soares F. Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray. *Hum Pathol*. 2010 Mar.

de Azambuja E, Cardoso F, de Castro GJ, Colozza M, Mano M, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May;96(10):1504-13.

Dekker N, Rybenkov V, Duguet M, Crisona N, Cozzarelli N, Bensimon D, et al. The mechanism of type IA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep;99(19):12126-31.

Doussis-Anagnostopoulou I, Vassilakopoulos T, Thymara I, Korkolopoulou P, Angelopoulou M, Siakantaris M, et al. Topoisomerase II α expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar;14(6):1759-66.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.

Fernandez-Figueras M, Puig L, Musulen E, Gilaberte M, Ferrandiz C, Lerma E, et al. Prognostic significance of p27Kip1, p45Skp2 and Ki67 expression profiles in Merkel cell carcinoma, extracutaneous small cell carcinoma, and cutaneous squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2005 Jun;46(6):614-21.

Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre M. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. 2007 Apr;89(4):427-46.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; **31**: 13-20.

Hafian H, Venteo L, Sukhanova A, Nabiev I, Lefevre B, Pluot M. Immunohistochemical study of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II α , p53, and Ki-67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas. *Hum Pathol*. 2004 Jun;35(6):745-51.

Hanai R, Caron P, Wang J. Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr;93(8):3653-7.

Harigopal M, Barlow W, Tedeschi G, Porter P, Yeh I, Haskell C, et al. Multiplexed assessment of the Southwest Oncology Group-directed Intergroup Breast Cancer Trial S9313 by AQUA shows that both high and low levels of HER2 are associated with poor outcome. *Am J Pathol*. 2010 Apr;176(4):1639-47.

Hee Sung Kim • Cha Kyong Yom • Hee Jeong Kim • Jong Won Lee • Jin Hee Sohn • Jun Ho Kim • Yong Lai Park • Sei Hyun Ahn. Overexpression of p53 is correlated with poor outcome in premenopausal women with breast cancer treated with tamoxifen after chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Oct 6. [Epub ahead of print]

Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhöfer N, Meinert R, Arand M. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 1999 Jul 1;59(13):3206-14.

Huen M, Sy S, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Feb;11(2):138-48.

Ignatiadis M, Desmedt C, Sotiriou C, de Azambuja E, Piccart M. HER-2 as a target for breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar;15(6):1848-52.

Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology*. 2008;75(2):104-11.

Isola J, Wisakorpi T, Holli K, et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1109-14.

Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Monville F, Esterni B, Extra J, Houvenaeghel G, et al. Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(2):R23.

Jasin M. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene*. 2002 Dec;21(58):8981-93.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.

Kato T, Kameoka S, Kimura T, Soga N, Abe Y, Nishikawa T, et al. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for 377 Japanese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2001 Nov;70(1):65-74.

Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits J, et al. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res*. 1997 Mar;7(3):250-61.

Konstantinidou A, Patsouris E, Korkolopoulou P, Kavantzias N, Mahera H, Davaris P. DNA topoisomerase IIalpha expression correlates with cell proliferation but not with recurrence in intracranial meningiomas. *Histopathology*. 2001 Oct;39(4):402-8.

Korkolopoulou P, Angelopoulou M, Siakantari M, Mitropoulos F, Vassilakopoulos T, Zorzos H, et al. Evaluation of DNA topoisomerase II α expression provides independent prognostic information in non-Hodgkin's lymphomas. *Histopathology*. 2001 Jan;38(1):45-53.

Kwan K, Moens P, Wang J. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar;100(5):2526-31.

Kyubo Kim¹, Eui Kyu Chie¹, Wonshik Han², Dong-Young Noh², In Ae Park³, Do-Youn Oh⁴. Prognostic Value of p53 and bcl-2 Expression in Patients Treated with Breast Conservative Therapy. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 235-9.

Lodge A, Anderson J, Ng S, Fenwick F, Steward M, Haugk B, et al. Expression of topoisomerase III α in normal and neoplastic tissues determined by immunohistochemistry using a novel monoclonal antibody. *Br J Cancer*. 2000 Aug;83(4):498-505.

Lonning P. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Ann Oncol*. 2007 Sep;18 Suppl 8:viii3-7.

Ma Y, Peng J, Zhang P, Liu W, Huang L, Qin H. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2010 Jun;27(2):304-9.

MacGrogan G, Rudolph P, de Mascarel I, et al. DNA topoisomerase II α expression and the response to chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89:666-71.

Majdak E, Debniak J, Milczek T, Cornelisse C, Devilee P, Emerich J, et al. Prognostic impact of BRCA1 pathogenic and BRCA1/BRCA2 unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2005 Sep;104(5):1004-12.

Mano MS, Rosa DD, De Azambuja E, et al. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-II α and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2007;33:64-77.. 1999 Jul 1;59(13):3206-14.

Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One*. 2010;5(3):e9499.

Maruya S, Shirasaki T, Nagaki T, Kakehata S, Kurotaki H, Mizukami H, et al. Differential expression of topoisomerase IIalpha protein in salivary gland carcinomas: histogenetic and prognostic implications. *BMC Cancer*. 2009;9:72.

Michaelson JS, Silverstein M, Sgroi D, Cheongsiatmoy JA, Taghian A, Powell S, Hughes K, Comegno A, Tanabe KK, Smith B: The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. *Cancer* 98: 2133–2143, 2003

Michel B, Grompone G, Flores M, Bidnenko V. Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug;101(35):12783-8.

Mohanty S, Town T, Yagi T, Scheidig C, Kwan K, Allore H, et al. Defective p53 engagement after the induction of DNA damage in cells deficient in topoisomerase 3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr;105(13):5063-8.

Motta RR, Zettler C, Cambruzzi E, Jotz G, Berni R. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009 Jul-Aug;75(4):544-9.

Musgrove E, Sutherland R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Sep;9(9):631-43.

Nielsen K, Ejlersen B, Møller S, Jørgensen J, Knoop A, Knudsen H, et al. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncol*. 2008;47(4):725-34.

NIH Consensus Conference. Treatment of early stage breast cancer. *JAMA* 1991;265: 391–5.

Nitiss J. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):327-37.

Nitiss J. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):338-50.

Oliveira L, Ribeiro-Silva A, Costa J, Simões A, Matteo M, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Nov;106(5):685-95.

O'Malley FP, Chia S, Tu D, et al. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:644-50.

Pancione M, Forte N, Fucci A, Sabatino L, Febbraro A, Di Blasi A, et al. Prognostic role of beta-catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2010 Feb.

Payne S, Bowen R, Jones J, Wells C. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology*. 2008 Jan;52(1):82-90.

Perou C, Sorlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug;406(6797):747-52.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2006 Oct;6(10):789-802.

Provencio M, Corbacho C, Salas C, Millan I, Espana P, Bonilla F, et al. The topoisomerase IIalpha expression correlates with survival in patients with advanced Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr;9(4):1406-11.

Rakha E, El-Sheikh S, Kandil M, El-Sayed M, Green A, Ellis I. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol*. 2008 Jun;39(6):857-65.

RIBEIRO-SILVA A, GARCIA SB; CHAHUD F, ZUCOLOTO S. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2005;41:197-203.

Rothenberg M. Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol*. 1997 Sep;8(9):837-55.

Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm S, de Mascarel I, Trojani M, et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 May;55(1):61-71.

Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol*. 1999 Jan;187(2):207-16.

Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol* 2005; 23:2020–7.

Schindlbeck C, Hantschmann P, Zerzer M, Jahns B, Rjosk D, Janni W, et al. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 2007 Sep-Oct;17(5):1047-55.

Sengupta S, Harris C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):44-55.

Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M. & Weinberg, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981;290:261–264.

Silva Soares E, de Lima Santos S, Bueno A, Cavalli I, Cavalli L, Fouto Matias J, et al. Concomitant loss of heterozygosity at the BRCA1 and FHIT genes as a prognostic factor in sporadic breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 May;199(1):24-30.

Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER- 2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–82.

Soerjomataram I, Louwman M, Ribot J, Roukema J, Coebergh J. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Feb;107(3):309-30.

Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair—perhaps through transcription. *J Cell Biochem* 2003;88:1084-91.

Sprague B, Trentham-Dietz A, Burnside E. Socioeconomic disparities in the decline in invasive breast cancer incidence. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan.

Thor AD, Moso DH III, Edgerton SM, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:845–55.

Trihia H, Murray S, Price K, Gelber R, Golouh R, Goldhirsch A, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer*. 2003 Mar;97(5):1321-31.

Viard T, de la Tour C. Type IA topoisomerases: a simple puzzle? *Biochimie*. 2007 Apr;89(4):456-67.

Vincent-Salomon A, Carton M, Zafrani B, Freneaux P, Nicolas A, Massemin B, et al. Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases. *Cancer*. 2001 Jul;92(2):249-56.

Vogelstein B, Lane D, Levine A. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov;408(6810):307-10.

Vorgias G, Koukouras D, Paleogianni V, Tzoracoeleftherakis E. Prognostic significance of factors affecting disease free interval and overall survival for Stage II breast cancer in Greece. A multivariate cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Mar;95(1):100-4.

Vousden K, Lane D. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4):275-83.

Wang J. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):430-40.

Wang J. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol*. 1971 Feb;55(3):523-33.

WATSON J, CRICK F. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1953 May;171(4361):964-7.

Xiong B, Burk D, Shen J, Luo X, Liu H, Berghuis A. The type IA topoisomerase catalytic cycle: A normal mode analysis and molecular dynamics simulation. *Proteins*. 2008 Jun;71(4):1984-94.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):174-83.

Zhang W, Pan Y, Zhu L, Zhang J, Zhang M, Feng K, et al. [Expression of topoisomerase III alpha in epithelial ovarian tumors of different types and relation between the expression of topoisomerase III alpha and the clinical pathology of tumor]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Nov;85(42):2988-91.

Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9766-71.

pp. 187-220.