



Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

CARLA SOLANGE DE MELO ESCÓRCIO DOURADO

**ESTUDO DO HER2 POR qPCR E EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS KI-67 E BCL-2
NO CARCINOMA MAMÁRIO**

TERESINA
2017

CARLA SOLANGE DE MELO ESCÓRCIO DOURADO

**ESTUDO DO HER2 POR qPCR E EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS KI-67 E BCL-2
NO CARCINOMA MAMÁRIO**

Tese de Doutorado apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de doutora.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientação: Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA
2017

CARLA SOLANGE DE MELO ESCÓRCIO DOURADO

ESTUDO DO HER2 POR QPCR E EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS KI-67 E BCL-2
NO CARCINOMA MAMÁRIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) Ponto Focal Piauí, como requisito para a obtenção do título de doutora.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva
Presidente
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Membro titular
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Membro titular
Prof^ª. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior
Membro titular
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima
Membro titular
Universidade Estadual do Piauí – UESPI

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a **Deus** por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, **José Escórcio de Sousa (saudades eternas)** e **Avelina Rosa de Melo Sousa**, que me ensinou a ter fé.

Aos meus filhos, **Caio Escórcio Lima Dourado** e **Eduardo Escórcio Lima Dourado**, que trouxeram muita alegria para minha vida, um amor especial. Ambos souberam compreender a importância dos momentos de ausência.

Ao meu esposo, **José Charles Lima Dourado**, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões, dando-me, desta forma, força para enfrentar todas as adversidades durante a realização desta tese.

Aos meus irmãos, em especial a **Verbênia, Rita, Francisca, Júnior, Eduardo, Vanusa e Fernanda**, por terem me proporcionado educação, por torcerem por mim, por cada palavra de incentivo, e, apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, por transmitir seus conhecimentos, por ter confiado em mim e aceitar me orientar mesmo sem me conhecer, dedicando parte de seu tempo à conclusão desta tese. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período.

AGRADECIMENTOS

A **CAPES** pela criação e suporte ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

À **Coordenação Geral da RENORBIO, Coordenação do Ponto Focal Piauí e à Universidade Federal do Piauí**, pela oportunidade e apoio recebido durante a realização da pesquisa.

Ao Magnífico Reitor, **Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes** e à Vice-Reitora, **Profª. Drª. Nadir do Nascimento Nogueira**, pelo grande incentivo à pesquisa em nossa Instituição.

À **Profª. Drª. Carla Eiras** (Coordenadora local) e ao **prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima** (Vice-coordenador local), assim como aos demais **Professores** da RENORBIO Ponto Focal Piauí pela condução do curso.

A minha amiga, **Luana Mota Martins**, pelas preciosas conversas que tivemos durante esta jornada. Obrigada pelo carinho e pelas horas de confidências!

Aos colegas, **Larisse Campos Verdes, João Paulo, Danylo Rafael, Maria da Conceição Barros Oliveira e Umbelina Borges**, obrigada pela dedicação, ajuda na realização deste estudo, aliados à amizade, à prontidão e aos ensinamentos que me proporcionaram durante o período em que trabalhamos juntos.

Aos demais colegas do curso, **Camila Revoredo, Fabiane Sampaio, Gilmara Rodrigues, Cléciton Tavares e Adelson Ribeiro** pelo apoio, amizade, união, força e ajuda no desenvolvimento deste estudo.

À minha cunhada e comadre, **Jacqueline Dourado**, pelo apoio, amizade, carinho e atenção sempre zelosa comigo.

À **Cecé**, que por muitos dias e horas cuidou dos meus filhos, não somente durante minha ausência na concretização deste sonho, mas sempre!

Às secretárias da RENORBIO **Deusilene e Eliana**.

Aos Mastologistas: **Dr. Ricardo Keyson, Dr^a. Jaqueline Lopes e Dr. Pedro Vitor Lopes Costa** pela ajuda na coleta dos dados e seleção das pacientes, imprescindíveis à realização deste trabalho.

À patologista **Dr^a. Lina Gomes** e à **Diana**, funcionária do setor de patologia do Hospital São Marcos, pela colaboração técnica na preparação dos blocos e lâminas.

À **Edilene**, secretária do Mestrado Ciências e Saúde, pelo apoio, carinho e amizade.

Às funcionárias da Ginecologia e Mastologia do HGV: **D. Efigênia, D. Toinha, D.Socorro, D. Isabel, Urcimar e Eugênia**.

Ao **Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa**, Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (Lableish) pela autorização para a realização da pesquisa de biologia molecular no laboratório do Hospital Natan Portella.

Ao **Prof. Dr. Vladimir Costa Silva**, minha gratidão pelos ensinamentos e paciência na minha formação como pesquisadora junto ao Laboratório de Biologia Molecular.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste sonho.

ESCÓRCIO-DOURADO, C. S. M. Estudo do HER2 por qPCR e expressão dos antígenos Ki-67 e Bcl-2 no carcinoma mamário. 98p. **Tese de Doutorado** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres de países ocidentais e no Brasil, em 2016, foi responsável por cerca de 14.206 mortes. O diagnóstico precoce e o uso de biomarcadores são importantes nas estratégias terapêuticas, prognósticas e redução da mortalidade. O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) é um marcador tumoral que, quando hiperexpresso aumenta a proliferação celular e reduz a apoptose ou morte celular programada, comumente avaliada pelos biomarcadores Ki-67 e Bcl-2, respectivamente. Portanto, os biomarcadores HER2, Ki-67 e Bcl-2 estão envolvidos na agressividade tumoral, planejamento terapêutico e prognóstico. Os receptores de estrógeno e progesterona, a proteína Ki-67 e o HER2 permitem a classificação molecular do carcinoma mamário em cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo. Os biomarcadores HER2, Ki-67 e Bcl-2 têm sido os mais estudados no câncer de mama em relação ao prognóstico e tratamento, todavia há controvérsias. Tais achados nos levaram a estudar o polimorfismo do gene HER2 (rs1136201) e a expressão dos antígenos Ki-67 e Bcl-2 no câncer de mama. Esta tese foi estruturada em três capítulos. No capítulo I avaliou-se a presença do polimorfismo do gene HER2 (rs1136201) entre mulheres com câncer de mama (caso) e sem câncer de mama (controle), não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa dos genótipos GG e AG entre casos e controles ($p= 1$). No capítulo II, objetivou-se comparar a expressão do antígeno Ki-67 entre os subtipos moleculares de câncer de mama luminal A e triplo negativo, em que foi mostrada uma porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 de 10,14 e 77,22 no luminal A e triplo negativo, respectivamente ($p < 0,0001$). No capítulo III objetivou-se comparar a expressão imunohistoquímica da proteína Bcl-2 entre os subtipos moleculares de câncer de mama luminal A e triplo negativo, tendo sido mostrada uma expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 significativamente maior no triplo negativo (86,7%) em comparação ao luminal A (40,0%), ($p < 0,0003$).

Palavras-chave: Câncer de Mama. Polimorfismo genético. Biomarcadores. Proliferação celular. Apoptose.

ESCÓRCIO- DOURADO, C. S. M. Study of HER2 by qPCR and expression of Ki-67 and Bcl-2 antigens in mammary carcinoma. 98p. Post-Graduate Program in Biotechnology - Federal University of Piauí, Teresina, 2017.

Breast cancer is the most common neoplasm in women in Western countries and in Brazil in 2016, was responsible for about 14,206 deaths. Early diagnosis and use of biomarkers are important in therapeutic, prognostic and mortality reduction strategies. Type 2 human epidermal growth factor (HER2) receptor is a tumor marker that, when hyperexpressed, increases cell proliferation and reduces apoptosis or programmed cell death, commonly assessed by Ki-67 and Bcl-2 biomarkers, respectively. Therefore, the HER2, Ki-67 and Bcl-2 biomarkers are involved in tumor aggressiveness, therapeutic planning and prognosis. Estrogen and progesterone receptors, Ki-67 protein and HER2 allow the molecular classification of mammary carcinoma into five molecular subtypes: luminal A, luminal B, HER2 and triple negative. Biomarkers HER2, Ki-67 and Bcl-2 have been the most studied in breast cancer in relation to prognosis and treatment, however there are controversies. These findings led us to study the HER2 gene polymorphism (rs1136201) and Ki-67 and Bcl-2 antigen expression in breast cancer. This thesis was structured in three chapters. In Chapter I, the presence of HER2 gene polymorphism (rs1136201) among women with breast cancer (case) and without breast cancer (control) was evaluated, with no statistically significant difference between the GG and AG genotypes between cases and controls ($p = 1$). In Chapter II, we aimed to compare Ki-67 antigen expression between the molecular subtypes of luminal A and triple negative breast cancer, in which a mean percentage of nuclei stained with anti-ki-67 of 10.14 and 77,22 in luminal A and triple negative, respectively ($p < 0.0001$). In Chapter III we aimed to compare the immunohistochemical expression of Bcl-2 protein between the molecular subtypes of luminal A and triple negative breast cancer, showing an expression of the significantly higher anti-apoptotic protein Bcl-2 in the triple negative (86, 7%) compared to luminal A (40.0%), ($p < 0.0003$).

Keywords: Breast Cancer. Genetic polymorphism. Biomarkers. Cell proliferation. Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Bcl-2	Proteína de Linfoma de Células B
CK	Citoqueratina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HER2	Receptor Epidérmico Humano 2
Ile	Isoleucina
Ki-67	Índice de Proliferação Celular
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase de Transcrição Reversa
RE	Receptor de Estrogênio
RH	Receptor Hormonal
RNA_m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RP	Receptor de Progesterona
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TK	Tirosina Kinase
Val	Valina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Etapas da carcinogênese	26
Tabela 2	Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama	28
Figura 3	Ativação do receptor HER2	30

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Identificação de códigos de genes e SNP usados no teste TaqMan® Life Technologies	49
Tabela 2	Características das pacientes e genotipagem do gene HER2 SNP rs1136201 nos pacientes de caso e controle	51
Tabela 3	Genotipagem do gene HER2 SNP rs1136201 em mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas	52

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Características das pacientes	64
Figura 1	Fotomicrografias de cortes histológicos de carcinoma de mama luminal A e triplo negativo	66
Figura 2	Boxplot da porcentagem de células com núcleos corados com Ki-67 nos grupos de câncer de mama luminal A e triplo negativo	67
Tabela 2	Porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 no carcinoma de mama luminal A e triplo negativo	68

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Características das pacientes	78
Figura 1	Fotomicrografias de cortes histológicos de câncer de mama	81
Tabela 2	Porcentagem de casos com células Bcl-2-positivas nos subtipos de câncer de mama luminal A e triplo-negativo	81

Sumário

1.INTRODUÇÃO GERAL	22
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 Carcinogênese Mamária	26
2.2 Fatores Prognóstico no Câncer de Mama	27
2.3 Classificação Molecular.....	28
2.4. HER2	29
2.5. Ki-67.....	31
2.6. Bcl-2	32
2.7. Polimorfismo	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 1.....	43
Polimorfismo genético do receptor do fator de crescimento epidérmico humano em mulheres com câncer de mama	44
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	48
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 2.....	58
Estudo comparativo da expressão do antígeno Ki-67 entre os subtipos de câncer de mama luminal A e triplo negativo.....	59
RESUMO.....	61
INTRODUÇÃO.....	62

MATERIAL E MÉTODOS.....	63
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 3.....	73
Expressão do antígeno Bcl-2 no câncer de mama luminal A e triplo negativo.....	74
RESUMO.....	76
INTRODUÇÃO.....	77
MATERIAL E MÉTODOS.....	78
RESULTADOS	80
DISCUSSÃO	81
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
ANEXOS	90
ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa	91
ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo original derivado da tese.....	96
ANEXO C - Comprovante de publicação de artigo original derivado da tese.....	97
ANEXO D – Comprovante de publicação de artigo original derivado da tese.....	98

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo câncer mais comum no mundo e o câncer mais frequente entre as mulheres com 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, o que corresponde a 25% de todos os cânceres e a quinta causa de morte por câncer com 522.000 mortes (FERLAY et al., 2015). Estima-se que em 2020 haverá no mundo um aumento de 26% na incidência de novos casos, sobretudo em países em desenvolvimento (CHATTOPADHYAY et al., 2014). Nos Estados Unidos da América, o câncer de mama destaca-se em primeiro lugar entre os três tipos de câncer mais diagnosticados em mulheres, com uma taxa de mortalidade de 28.3/100.00 quando comparado a 36.4/100.00 em mulheres africanas (IHEMELANDU et al., 2007).

No Brasil, no ano de 2016 foram diagnosticados 57.960 casos novos de câncer de mama e 14.260 mortes em mulheres, sendo o primeiro câncer mais comum em mulheres após o câncer de pele não melanoma. Embora, as taxas de mortalidade sejam elevadas, se diagnosticado e tratado oportunamente, o câncer de mama pode ser considerado uma doença de prognóstico relativamente bom. Todavia, no Brasil a doença continua sendo diagnosticada em estágios avançados quando comparada com países desenvolvidos (INCA, 2016).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, na qual tumores mamários que apresentam as mesmas características histológicas e que podem ter comportamentos clínicos distintos expressos pela sua biologia. Essas diferenças podem ser justificadas pela existência de cinco subtipos moleculares de carcinoma mamário que se relacionam com a agressividade e prognóstico tumoral, tais como luminal A, luminal B, HER2 (Human Epidermal Receptor 2) superexpresso, triplo negativo e normal-like (PEROU et al., 2000). Os subtipos luminais, em particular o luminal A, têm sido associados a prognósticos mais favoráveis, enquanto o triplo negativo e o HER2 superexpresso estão associados a uma maior agressividade e prognóstico desfavorável (SERRA et al., 2014). Todavia, a avaliação genômica é o padrão ouro para a classificação dos tumores mamários, porém ela é complexa e de alto custo, o que impossibilita seu uso na prática clínica, principalmente em países em desenvolvimento (GOLDHIRSCH et al., 2013).

A avaliação imunoistoquímica, consoante Goldhirsch et al. (2013), além dos receptores hormonais (RH), HER2 e do Ki-67, acrescenta outros biomarcadores para inclusão do subtipo basalóide. Todos estes marcadores são rotineiramente usados na clínica para estratificar as pacientes com câncer de mama com o intuito de

predizer o prognóstico, selecionar a terapêutica, assim como para incluir pacientes em ensaios clínicos (PRAT et al., 2015). A progressão e a agressividade tumoral, comprometendo o prognóstico, muito depende do equilíbrio entre a proliferação celular, avaliada principalmente pela expressão do Ki-67, e a apoptose, avaliada principalmente pela expressão do Bcl-2, que são determinantes chaves na progressão tumoral (DOWSETT et al., 1999). Todavia, os tumores que apresentam hiperexpressão do HER2 mostram uma maior proliferação e agressividade tumoral com pior prognóstico. Alterações genéticas, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é importante, pois vários estudos tem mostrado associação da variante polimórfica Ile655Val ou rs1136201 do gene HER2 com um maior risco para câncer de mama (KARA et al., 2010; MA et al., 2011). A hiperexpressão do gene HER2 pode ser avaliada imunoistoquimicamente, todavia o padrão ouro é avaliação quantitativa por PCR em tempo real (qPCR) (SU et al., 2015).

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo avaliar a presença do polimorfismo do HER2 por qPCR e a expressão de Ki-67 e Bcl-2 nos subtipos moleculares de carcinoma mamário.

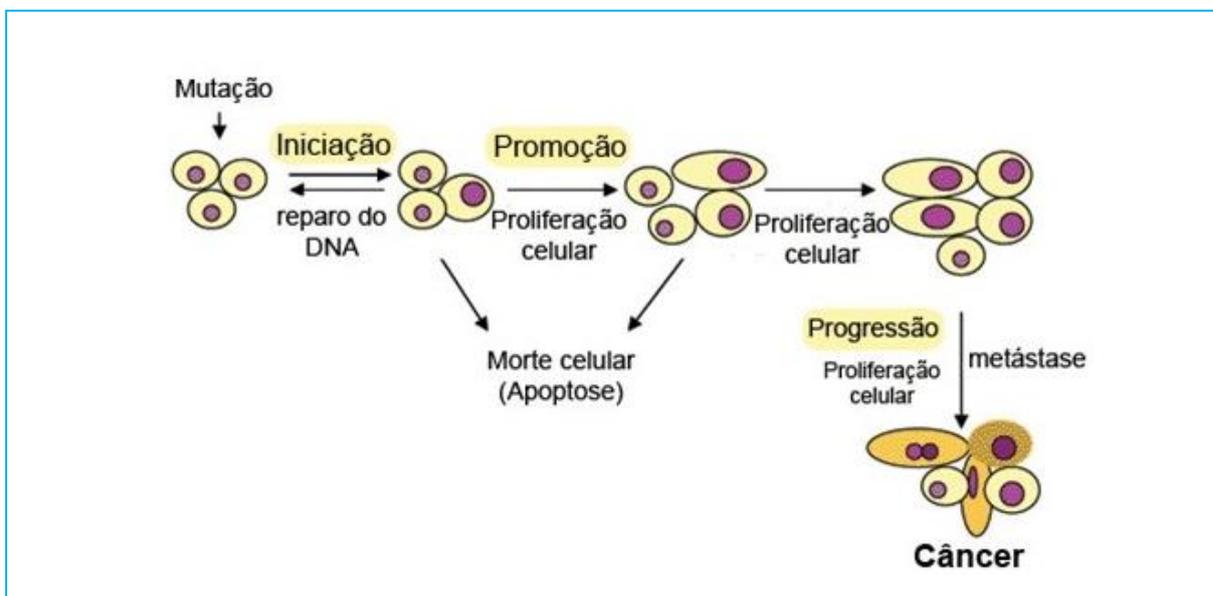
O conteúdo descrito neste estudo está estruturado sob a forma de capítulos, conforme segue: o capítulo I trata do estudo que avaliou a presença do polimorfismo do gene HER2 entre mulheres com câncer de mama (caso) e sem câncer de mama (controle), o que gerou um artigo submetido ao jornal médico “European Journal of Cancer” (Qualis A1 em Biotecnologia). O capítulo II trata de uma comparação dos antígenos Ki-67 entre os subtipos moleculares de câncer de mama luminal A e triplo negativo, que resultou em um artigo publicado no jornal médico “Medical Oncology” (B1 em Biotecnologia). Por sua vez, o capítulo III comparou a expressão imunoistoquímica da proteína Bcl-2 entre os subtipos moleculares de câncer de mama luminal A e triplo negativo, publicado no jornal “Medical Oncology” (B1 em Biotecnologia).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carcinogênese Mamária

A carcinogênese mamária compreende três fases: a iniciação, caracterizada pela exposição das células aos carcinógenos com conseqüente mutação e formação de clones celulares atípicos; a promoção, constituída pela multiplicação destes clones celulares e a progressão na qual as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e, pela perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornam-se invasivas (COOPER, 1995; MAREEL; LEROY, 2003).

Figura 1. Etapas da carcinogênese.



Fonte: Adaptado de INCA, 2010.

Na primeira fase os eventos genéticos envolvidos são a ativação dos protooncogenes e a perda do bloqueio de genes supressores do tumor. Os protooncogenes são genes promotores do crescimento e da diferenciação celular que controlam a divisão mitótica ordenada das células (McKINNEL, 1998). Uma vez ativados promovem síntese protéica estimuladora do crescimento e da proliferação celular anormal (BADANO; KATSANISS, 2002).

Na promoção, segunda fase da carcinogênese, os estímulos específicos necessários para que ocorra o desenvolvimento do tumor são os hormônios esteróides, as reações inflamatórias e os fatores de crescimento (ARIGA et al., 2005).

A progressão caracteriza-se pela capacidade de invasão e metastatização. No câncer de mama essa fase atinge mais comumente os ossos, o fígado e o

pulmão. Todavia, o comprometimento dos linfonodos regionais e a invasão da via linfática estão relacionados com a sobrevida e o tipo de tratamento. Contudo, vale ressaltar que o intervalo de tempo entre o diagnóstico e o aparecimento da primeira metástase é inversamente proporcional ao número de linfonodos positivos (GULBEN et al., 2007).

2.2. Fatores Prognósticos no Câncer de Mama

Fatores prognósticos são biomarcadores produzidos pelo tumor ou por células normais do paciente, em resposta ao tumor, que podem ser medidos durante o diagnóstico clínico e/ou laboratorial que determinam o nível de comprometimento da lesão e fornecem informações sobre o estado global do câncer do paciente, independentemente da terapia (LANGLANDS et al., 2013). A rigor, são proteínas envolvidas com a oncogênese e a atividade proliferativa do tumor (KAUFMANN; PUSZTAI, 2011).

A propósito, o tamanho do tumor, o tipo e grau histológicos, o estado dos gânglios, a invasão vascular, a expressão do Receptor de Estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e a superexpressão do HER2 são importantes fatores prognósticos norteadores das decisões terapêuticas para pacientes com câncer de mama (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011).

Por outro lado, a extensão da disseminação do tumor no organismo e os sistemas de estadiamento servem como parâmetros clínicos para se obter estratégias prognósticas. A caracterização do estadiamento das neoplasias mais utilizado é a classificação TNM (T= Tumor Primário; N= Gânglios Linfáticos; M= Metástase à Distância) (SOBIN et al., 2009). De acordo com esta classificação o tamanho do tumor, a presença de células tumorais dentro dos espaços vasculares linfáticos ou pequenos capilares que rodeiam o tumor e a presença de metástase à distância determinam um pior prognóstico para o câncer de mama (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009).

2.3. Classificação Molecular

A partir da análise de painéis de expressão gênica foi possível classificar o câncer de mama em cinco subtipos moleculares que se correlacionam com o prognóstico: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso, triplo negativo e basal ou basalóide (Tabela 1) (BASTIEN; RODRÍGUEZ-LESCURE; EBBERT, 2012). Esses subtipos apresentam diferenças tanto na expressão de genes como no prognóstico e na resposta à terapêutica (BARROS; LEITE 2015).

Tabela 1. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.

Subtipo molecular	Classificação
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14%
Basal ou Basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo Negativo	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-
HER2 superexpresso	RE-, RP- e HER2+

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoceratina 5.

Fonte: Adaptado de Cirqueira et al., 2011.

Os subtipos luminais receberam essa denominação devido à similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (SOTIRIOU et al., 2003). O luminal A, apresenta RE e/ou RP positivos, ausência de HER2 e baixa taxa de proliferação (Ki-67<14%), corresponde a cerca de 60% dos carcinomas mamários, e em relação aos outros subtipos, é o de melhor prognóstico (WEIGEL; DOWSETT, 2010). Já o luminal B, cujo fenótipo é RE e/ou RP positivos, foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 (SORLIE et al., 2004). A avaliação do índice de proliferação celular mais elevado (Ki-67>14%), o que o distingue do luminal A. O luminal B corresponde a cerca de 30% dos carcinomas de mama (PEROU et al., 2000; PRAT et al., 2013).

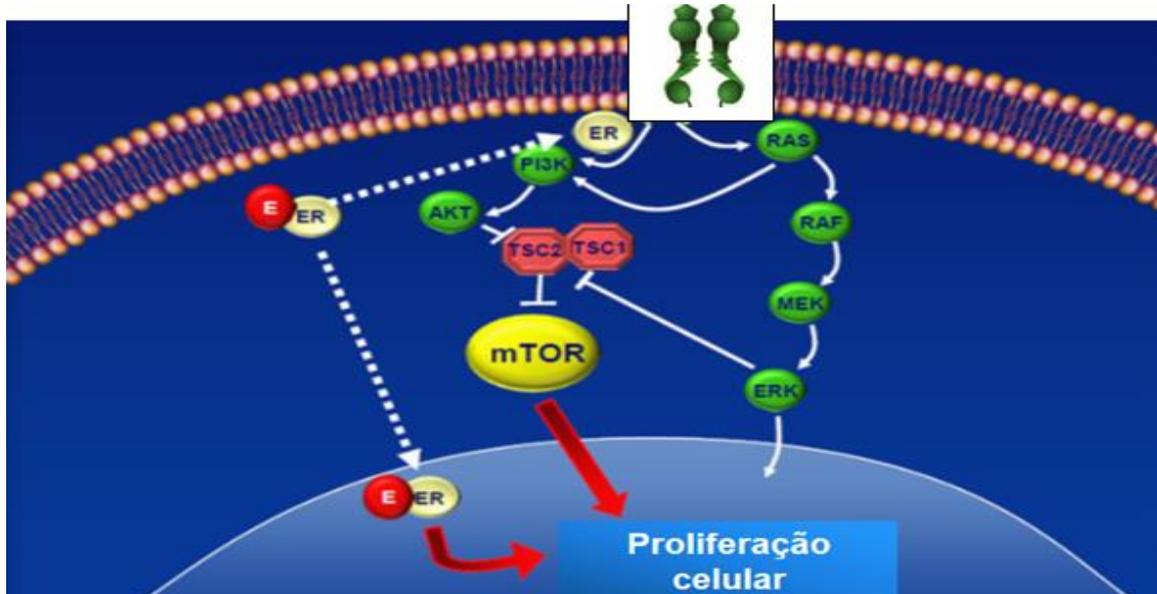
O subtipo triplo negativo corresponde a cerca de 20% dos carcinomas de mama (PRAT et al., 2013), além de ser o que apresenta menor sobrevida é também o que exibe características mais agressivas, alta graduação histológica e nuclear, alto índice mitótico, maior frequência de metástases regionais e à distância (STIVAL et al., 2012).

O HER2 superexpresso possui elevada expressão da oncoproteína HER2 e receptores hormonais negativos (SOTIRIOU et al., 2003). Em geral, esse subtipo corresponde a cerca de 20% dos casos (CIRQUEIRA et al., 2011). Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica (WOLFF et al., 2007).

2.4. HER2

Os receptores HER são proteínas transmembranares que ligam o fator de crescimento epidérmico (EGF) ou outros fatores. Estão entre os 58 receptores tirosina-quinase (TK) humanos já descobertos. Quando estimulados por ligantes formam dímeros que se transfosforilam vindo em seguida a transdução de sinais intracelulares que leva à invasão e ao crescimento de células malignas (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Em geral, no câncer esses receptores encontram-se desregulados, e essa desregulação pode ser ativada a partir de uma variedade de mecanismos, dentre os quais se destacam: mutações, superexpressão do receptor, superprodução de ligantes ou ainda a associação destes dois últimos mecanismos (LEITE et al., 2014). A interação entre receptor e ligante resultará em homo ou heterodimerização, levando a autofosforilação cruzada dos resíduos citoplasmáticos de TK, que por sua vez irão funcionar como sítios para moléculas sinalizadoras, responsáveis pela inicialização da cascata de eventos intracelulares que culminará na formação dos mais variados efeitos pró-carcinogênicos (Figura 3) (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Figura 3. Ativação do receptor HER2.

Fonte: Adaptado de Yue, 2007.

A superexpressão do HER2 pode estar associada a maior agressividade biológica em vários tipos de tumores sólidos, incluindo os carcinomas do pulmão, cólon, ovário, da bexiga, e da cabeça e pescoço. A estimulação desse receptor medeia vários acontecimentos que são críticos para a formação e progressão do tumor, incluindo proliferação, invasão e angiogênese (CHATTOPADHYAY et al., 2014).

Vários estudos clínicos já relataram uma associação positiva entre sua superexpressão e o prognóstico desfavorável do câncer de mama (GOLDHIRSCH et al., 2013; CHATTOPADHYAY et al., 2014). Desta forma subtipos moleculares de câncer de mama que apresentam amplificação do gene HER2 ou superexpressão da proteína HER2 são chamados HER2-positivo. Estes tendem a crescer mais rapidamente, são mais propensos a se disseminar e recidivar em comparação com o subtipo HER2-negativo (BUIRAGO; UEMURA; SENA, 2011). De Potter; Schelfhout (1995) atribuíram esse fato ao aumento de atividade metastática das células tumorais que expressavam a proteína.

Atualmente a imunohistoquímica é o método auxiliar e indispensável para a identificação do HER2, sobretudo porque permite detectar a expressão aumentada da proteína sem que a amplificação do gene esteja presente (BARROS; LEITE, 2015). A propósito, a amplificação do gene já foi descrita em cerca de 25% dos

carcinomas mamários. Entretanto, sua expressão aumentada foi detectada em aproximadamente 20% de todos os casos de câncer de mama (DONG et al., 2008).

Do ponto de vista clínico, o HER2 é um importante biomarcador no câncer de mama, pois sua expressão aumentada será determinante para a escolha da quimioterapia. Assim, a detecção precoce do status HER2 pode trazer grandes benefícios para as pacientes e contribuir fortemente para a tomada de decisão sobre o tratamento a ser seguido no câncer de mama (SU et al., 2015).

A superexpressão do HER2, descrita em vários tipos de tumores sólidos, incluindo o de câncer de pulmão, mama, cabeça e pescoço, gástrico, próstata, bexiga, ovário, carcinoma colo retal e glioblastomas, indicou associação negativa entre sobrevida, em particular no câncer de mama. Dentre os mecanismos que contribuíram para isto destacam-se a ativação da transcrição e a amplificação do gene (YK et al., 2011).

2.5. Ki-67

O antígeno Ki-67 foi originalmente descrito por Gerdes; Schwab; Lemke (1983), na cidade de Kiel (“Ki”), após a imunização de camundongos com linfoma de Hodking (67 se refere ao número do clone), como uma proteína nuclear não histona. O Ki-67 não é expresso em células em repouso (G0), mas pode ser detectada na fase G1 e M do ciclo celular (GERDES; SCHWAB; LEMKE, 1983). Sua utilização como um marcador de proliferação celular mostrou que o percentual de células positivas para Ki-67 pode ser usado para estratificar pacientes como de bom prognóstico ou prognóstico desfavorável (WIESNER et al., 2009). Assim, baixo índice de proliferação celular foi associado a menor crescimento tumoral e melhor prognóstico (YEHI; MIES, 2008). Além disso, a expressão de Ki-67 é um dos parâmetros que são utilizados para caracterizar os diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (SILVA et al., 2012).

O Ki-67 é expresso em níveis baixos no tecido mamário saudável e no epitélio normal adjacente ao fibroadenoma (<3%) (DA SILVA; LOPES; GEBRIM, 2006; KONTZOGLOU et al., 2013). Clarke et al. (2007) relataram que no tecido saudável o Ki-67 é expresso exclusivamente em células RE negativas e que as células RE positivas não proliferam sob circunstâncias normais, já no tecido maligno ocorre proliferação em ambas as células. O Ki-67 é um fator de proliferação facilmente

avaliado e reprodutível e pode ser uma ferramenta tanto de prognóstico como para a seleção do tratamento adjuvante a ser instituído. Existem muitos marcadores de proliferação, mas o Ki-67 se destaca pelo fato de ser muito sensível, ter um preço acessível, ser de fácil execução, ser reprodutível, além de ter a vantagem de poder ser avaliado em amostras tumorais emblocadas em parafina (KEY et al., 1993).

2.6. Bcl-2

A via mitocondrial da apoptose é controlada pela família das proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), entre as proteínas mais estudadas, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica) (CASTEDO et al., 2004). Os membros dessa família inibem a apoptose, através da inibição da liberação do Citocromo c. Desta forma, a expressão de Bcl-2 inibe a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabiliza o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER; THOMPSON, 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como lesão ao DNA, elevam a expressão das proteínas pró-apoptóticas, esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004).

A expressão de Bcl-2 no câncer de mama, ao contrário do que poderia ser esperado por ter uma ação anti-apoptótica, representa um bom prognóstico e indica boa resposta ao tamoxifeno (GOLDHIRSCH et al., 2009). Elledge et al. (1997) relataram que a presença de Bcl-2 no carcinoma mamário está correlacionada com a presença de RE e com uma maior sobrevida livre da doença. Desde a última década, a apoptose vem sendo alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a elucidação dos complexos mecanismos de resistência à radio e à quimioterapia (NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004). Estudos clínicos e pré-clínicos com drogas que têm por alvo membros da família Bcl-2 foram bem sucedidos, as estratégias clínicas consistiram em induzir a morte nas células tumorais através do bloqueio de genes ou substituição da função desses genes com o uso de moléculas recombinantes, pois se acredita que a redução na atividade da Bcl-2 é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (NICHOLSON, 2000; OLTERS DORF et al., 2005; KIM et al., 2006).

2.7. Polimorfismo

O polimorfismo genético manifesta-se quando duas ou mais formas diferentes de um mesmo gene, alelos, ocorrem simultaneamente em uma mesma população (BROCKMOLLER; TZVETKOV, 2008). As variações nas sequências de nucleotídeos podem ser substituições, deleções, inserções e duplicação ou deleção de genes. A propósito, um gene será considerado polimórfico quando o alelo menos frequente ocorrer na população com uma frequência maior que 1% (MILLER et al., 2001).

Dentre os polimorfismos relacionados com o câncer de mama destaca-se o SNP, que apresenta duas possibilidades de nucleotídeos na sequência do DNA e geralmente formam 3 possibilidades de genótipos, que podem ou não diferir em fenótipos (BROCKMOLLER et al., 2008). Estas variações genotípicas podem influenciar a taxa de transcrição gênica, a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), ou a quantidade e atividade das proteínas (RISCH, 2000).

A presença de SNP tem sido frequentemente implicada na carcinogênese de uma variedade de tumores sólidos, incluindo os carcinomas de mama, pulmão, cólon, ovário, bexiga, cabeça e pescoço (DONG et al., 2008). A propósito uma das mais importantes mutações genéticas no cancer de mama é o SNP do gene do HER2, variante rs1136201, localizado no cromossomo 17q21 (MA et al., 2011), que consiste na substituição do aminoácido Valina (G) pela Isoleucina (A) no códon 655 (**GTC > ATC**) no domínio transmembranar do receptor HER2 (EL-MOUGY et al., 2008).

Vários estudos demonstraram resultados controversos em relação à associação deste SNP e o risco de câncer de mama (KARA et al., 2010; DAHAREB, MURRAY, 2011; MA et al., 2011). Embora, ainda que não tenha sido completamente esclarecida a associação do SNP HER2 (rs1136201) e o risco de câncer de mama (DAHAREB; MURRAY, 2011), Fleishman et al. (2002) demonstraram que a presença de Val (G) na posição transmembranar estabiliza a formação de um dímero ativo da proteína que predispõe uma auto-atividade do receptor HER2. Em adição, Takano et al. (1995) sugeriram que a substituição de Ile (A) por Val (G) no códon 655 pode alterar a hidrofobicidade da proteína HER2, afetando a estabilidade conformacional dos domínios hidrofóbicos, como o domínio transmembrana, promovendo a transdução de sinais intracelulares que leva à invasão e ao

crescimento de células malignas. Assim, as controvérsias e escassez de estudos envolvendo os biomarcadores HER2, Ki-67 e Bcl-2 nos subtipos moleculares de câncer de mama, nos levaram a estudar a associação entre o polimorfismo da variante rs1136201 do HER2 por qPCR e o risco para câncer de mama, comparação da expressão do antígeno Ki-67 entre os subtipos de câncer de mama luminal A e triplo negativo e a expressão do antígeno Ki-67 e Bcl-2 no câncer de mama luminal A e triplo negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIGA, R.; ZARIF, A.; KORASICK, J. et al. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. **Breast J.**, v. 11, n. 4, p. 278-280, 2005.

BADANO, J. L.; KATSANIS, N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. **Nat Rev Genet.**, v. 3, n.10, p. 779-89, 2002.

BARROS S.D.; LEITE K.R.M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Rev Bras Mastologia**, v. 25, n. 4, p.146-55, 2015.

BASTIEN, R.R.; RODRÍGUEZ-LESCURE, A.; EBBERT, M.T. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. **BMC Med Genomics**, v. 4, n. 5, p. 39-44, 2012.

BROCKMÖLLER, J; TZVETKOV, M.V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. **Eur J Clin Pharmacol.** v.64, p.133-157, 2008.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M.C.F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com Ciências Saúde**, v. 22, n.1, p.69-82, 2011.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.L.; ROUMIER, T. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825-837, 2004.

CHATTOPADHYAY, S.; SIDDIQUI, S.; AKHTAR, S. et al. Genetic polymorphisms of ESR1, ESR2, CYP17A1, and CYP19A1 and the risk of breast cancer: a case control study from North India. **Tumor Biol**, v. 35, p. 4517-27, 2014.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. **Cancer J Clin.**, v.59, n. 5, p. 303-13, 2009.

CIRQUEIRA, M.B.; MOREIRA, M.A.R.; SOARES, L.R. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, p. 17-25, 2011.

CLARKE, R.B.; HOWELL, A.; POTTEN, C.S. et al. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. **Cancer Res**, v. 57, p. 4987-4991, 2007.

CONNOLLY, J.; KEMPSON, R.; LIVOLSI, V. et al. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. Association of Directors of Anatomic and Surgical. **Pathology**, 2004.

COOPER, G.M. *Oncogenes*. 2.ed. Boston : Jones and Barlett, 1995. 384p.

DAHABREH, I. J.; MURRAY, S. Lack of replication for the association between HER2 I655V polymorphism and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol.**, v. 35, p. 503-509, 2011.

DA SILVA, B.B.; LOPES, I.M.; GEBRIM, L.H. Effects of raloxifene on normal breast tissue from premenopausal women. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 95, n. 2, p. 99-103, 2006.

DE POTTER, C.R.; SCHELFHOUT, A.M. The neu-protein and breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 426, p. 107-115, 1995.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 53, p. 153-59, 2004.

DONG, L.M.; POTTER, J.D.; WHITE, E. et al. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. **JAMA**, v. 299, p. 2423-2436, 2008.

DOWSETT, M.; ARCHER, C.; ASSERSOHN, L. et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.6, n.1, p.25-28, 1999.

ELLEDGE, R.M.; GREEN, S.; HOWES, L. et al. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. **J Clin Oncol**. v. 15, p. 1916-1922, 1997.

EL-MOUGY, H.; SARHAN, O.; FATAH, W.A. et al. Plasma Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 levels (HER-2) and HER-2 codon 655 polymorphism in Females Suffering from Breast Cancer. **J. Am. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 546-552, 2012.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v.136, n.5, p. E359-86, 2015.

FLEISHMAN, S.J.; SCHLESSINGER, J.; BEN-TAL, N. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 15937–15940, 2002.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v. 31, p. 13-20, 1983.

GOBBI, H.; PEREZ, A.A.; BALABRAM, D. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients. **Diagn Pathol.**, v. 3, n. 9, p. 220-227, 2014.

GOLDHIRSCH, A.; INGLE, J.N.; GELBER, R.D. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. **Ann Oncol**, v. 20, p. 1319–1329, 2009.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E.P.; COATES, A.S. et al. Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**, v.24, n.9, p.2206-23, 2013.

GULBEN, K.; BERBEROĞLU, U.; CENGİZ, A. et al. Prognostic factors affecting locoregional recurrence in patients with stage IIIB noninflammatory breast cancer. **World J. Surg**, v. 31, n. 9, p. 1724-1730, 2007.

HAN, X.; DIAO, L.; XU, Y. et al. Association between the HER2 Ile655Val polymorphism and response to trastuzumab in women with operable primary breast cancer. **Ann. Oncol.**, v. 25, p. 1158–1164, 2014.

IHEMELANDU, C.U.; LEFFALL, L.D.; DEWITTY, R.L. et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. **J Sur Res**, v. 143, p.143: 109-118, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em: 28 dez. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle de Câncer. Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf. Acesso em: 23 set. 2017.

KARA, N.; KARAKUS, N.; ULUSOY, A. et al. P53 codon 72 and HER2 codon 655 polymorphisms in Turkish breast cancer patients. **DNA Cell Biol**, v. 29, p. 387-92, 2010.

KAUFMANN, M.; PUSZTAI, L. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: consensus recommendations from an International Expert Panel. **Cancer**, v. 117, n. 8, 1575-82, 2011.

KEY, G.; BECKER, M.H.; BARON, B. et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1–3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. **Lab Invest**, v. 68, p. 629-636, 1993.

KIM, R.; EMI, M.; MATSUURA, K. et al. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. **Cancer Gene Ther.**, v. 14, p. 1-14, 2006.

KONTZOGLOU, K.; PALLA, V.; KARAOLANIS, G. et al. Correlation between Ki67 and Breast Cancer Prognosis. **Oncol**, v. 84, p. 219–225, 2013.

LANGLANDS, F.E.; HORGAN, K.; DODWELL, D.D. et al. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. **Br J Radiol.**, v. 86, n.2, p. 1023-33, 2013.

LEITE, M.S.; GIACOMIN, L.C.; PIRANDA, D.N. et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms are associated with prognostic features of breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, n. 190, p. 313-25, 2014.

LEMMON, M.A.; SCHLESSINGER. J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, p. 1117-34, 2010.

MA, Y.; YANG, J.; ZHANG, P. et al. Lack of association between HER2 codon 655 polymorphism and breast cancer susceptibility: meta-analysis of 22 studies involving 19,341 subjects. **Breast Cancer Res Treat**, v. 125, p. 237-241, 2011.

MALHOTRA, G.K.; ZHAO, X.; BAND, H. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol & Therapy**, v. 10, n. 10, p.955-960, 2010.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev**, v.83, p.337-376, 2003.

McKINNELL, R.G. Cancer genetics. In: McKINNELL, et al. (Ed.). The biological basis of cancer. Cambridge : Cambridge University, 1998. p.79-114.

MILLER, M.C.; MOHRENWEISER, H.W.; BELL, D,A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicol. Lett.**, v. 120, p. 269-280, 2001.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-16, 2000.

OLTERSDFORF, T.; ELMORE, S.W.; SHOEMAKER, A.R. et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v. 435, p. 677-81, 2005.

PEROU, C.M.; SØRLIE, T.; EISEN, M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n.6797, p.747-52, 2000.

PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PRAT, A.; ADAMO, B.; CHEANG, M.C. et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. **Oncologist**, v. 18, n. 2, p. 123-33, 2013.

PRAT, A.; PINEDA, E.; ADAMO, B. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v.24, n. 2, p.26-35, 2015.

RAKHA, E.A.; REIS-FILHO, J.S.; ELLIS, I.O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, p. 293-308, 2010.

RISCH, N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 847-856, 2000.

ROSEN, P.P.; GROSHEN, S.; KINNE, D.W. et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow up. **J Clin Oncol.**, v.11, p.2090-100,1993.

SERRA, K.P.; RAMALHO S.; TORRESAN R. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 36, n. 12, p.575-80, 2014.

SILVA, A.G.; EWALD, I.; SAPIENZA, M. et al. Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intragenetic deletion. **BMC Cancer**, n.12, p.237, 2012.

SOBIN, L.H.; GOSPODAROWICZ, M.K.; WITTEKIND, C. et al. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. **International Union Against Cancer - UICC**: Wiley-Blackwell; 2009.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRAMI, R. et al. Gene expression. Patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci Usa**, v. 98, p. 108-19, 2004.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.Y.; MCSHANE, L.M. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 33-39, 2003.

STINGL, J.; CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, p.791-9, 2009.

STIVAL, R.A.; MARTINS, L.R.A.; PAGANINI, J. et al. Impacto do fenótipo triplo-negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil central. **Rev Bras Mastologia**, v. 22, n. 1, p. 6-12, 2012.

SU, Y.; JIANG, Y.; SUN, S. et al. Effects of HER2 genetic polymorphisms on its protein expression in breast cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 39, p. 1123–1127, 2015.

TAKANO, K.; OGASAHARA, K.; KANEDA, H. et al. Contribution of hydrophobic residues to the stability of human lysozyme: calorimetric studies and X-ray structural analysis of the five isoleucine to valine mutants. **J Mol Biol**, v. 254, p. 62-76, 1995.

VANDER, H.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nat Cell Biol.**, v. 1, p. E209-16, 1999.

WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. 245-62, 2010.

WIESNER, F.G.; MAGENER, A.; FASCHING, P.A. et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. **Breast**, v. 18, p. 135–141, 2009.

WOLFF, A.; HAMMOND, M.E.; SCHWARTZ, J.N. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol.**, v. 25, p. 118-45, 2007.

YEHI, T.; MIES, C. Application of immunohistochemistry to breast lesions. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 3, p. 349-358, 2008.

YK, W.; GAO, C.F.; YUN, T. et al. Assessment of ERBB2 and EGFR gene amplification and protein expression in gastric carcinoma by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Molecular Cytogenetics**, v. 4, n. 14, p. 27-35, 2011.

YUE, W. J. Oncogenes. **Steroid Biochem Mol Biol**, v. 106, p. 102-110, 2007.

CAPÍTULO 1

Polimorfismo genético do receptor do fator de crescimento epidérmico humano em mulheres com câncer de mama

Artigo submetido ao European Journal of Cancer

ISSN: 0959-8049

Impact Factor (JIF): 6.029

QUALIS A1 EM BIOTECNOLOGIA

Polimorfismo genético do receptor do fator de crescimento epidérmico humano em mulheres com câncer de mama

Carla Solange Escórcio-Dourado^{a,b}, Tacyana Pires de Carvalho Costa^a, Larysse Maira Campos-Verdes^b, Airlane Pereira Alencar^d, Danylo Raphael Costa-Silva^a, José Charles Lima Dourado^a, Vladimir Costa Silva^c, Benedito Borges da Silva^{a, b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Avenida Universitária, Teresina 64049-550, Piauí, Brasil

^bPostgraduate Program in Health Sciences, Universidade Federal do Piauí, Frei Serafim Avenue 2280, Teresina 64001-020, Brasil

^cDepartamento de Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, Rua Arthur de Vasconcelos 151, Teresina 64001-450, Brasil

^dDepartamento de Estatística, Universidade de São Paulo, 1010 Rua Matão, São Paulo 03178-200, São Paulo, Brasil

Autor Correspondente

Benedito Borges da Silva
Avenida Elias João Tajra, 1260
CEP 64049-300, Jockey
Teresina, Piauí, Brazil
Phone: +55 86 3232 5063
Fax: +55 86 3215 0470
Email: beneditoborges@globo.com

RESUMO. A presença de polimorfismo no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) pode promover várias alterações celulares no cancer de mama, incluindo metástase e aumento da agressividade da doença. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de single nucleotide polymorphism do gene HER2 no codon 655 em mulheres com câncer de mama. O estudo incluiu 140 mulheres, sendo 70 casos (câncer de mama) e 70 controles (sem câncer de mama). O genótipo GG esteve presente em 1 mulher (1,4%) em ambos os grupos caso e controle ($p= 0,32$), enquanto o genótipo AG ocorreu em 19 (27,2%) mulheres do grupo de casos e em 13 (18,6%) mulheres do grupo controle ($p= 1$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo GG e AG nos casos e controles em mulheres na pré-menopausa ($p= 1$), assim como não houve diferença significativa entre mulheres pós-menopáusicas de caso e controle ($p= 0,14$). No estudo atual, o polimorfismo do gene HER2 no codon 655 não apresentou associação estatisticamente significativa com câncer de mama, tanto em mulheres pré-menopáusicas quanto pós-menopáusicas.

Palavras-chave: Câncer de mama. Polimorfismo genético. HER2. qPCR. Menopausa.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo câncer de maior ocorrência no mundo e o câncer mais frequente entre as mulheres com 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, o que correspondeu a 25% de todos os cânceres, e representou a quinta causa de morte por câncer com 522.000 mortes [1]. Estima-se que até 2020 haverá no mundo um aumento de 26% na incidência de novos casos, sobretudo em países em desenvolvimento [2]. Nos Estados Unidos da América, o câncer de mama destaca-se em primeiro lugar entre os três tipos de câncer mais diagnosticados em mulheres, com uma taxa de mortalidade de 48.9/100.000 quando comparado a 63.2/100.000 em mulheres africanas, país em desenvolvimento [1]. Já no Brasil, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres após o câncer de pele não melanoma, tendo sido estimado para o ano de 2016, cerca de 57.960 casos novos e 14.260 mortes pela doença [3].

Vários estudos tem demonstrado uma associação entre as alterações genéticas e a carcinogênese mamária, provocada principalmente por mutações em oncogenes essenciais [4-8]. A propósito, o HER2 é um proto-oncogene com importante papel no prognóstico do câncer de mama, sendo, portanto um alvo natural para estudos sobre polimorfismos. O gene HER2 (c-erbB-2 ou HER2/neu) localizado no cromossomo 17q21 é um dos membros da família de receptores do fator de crescimento epidérmico, os carcinomas mamários que apresentam superexpressão do HER2 são mais agressivos em comparação aos outros subtipos moleculares, apresenta rápido crescimento tumoral, aumento do risco de recorrência após cirurgia, resistência à terapia hormonal e pouca resposta à quimioterapia convencional [13].

A propósito uma das mais importantes mutações genéticas no cancer de mama é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), [12]. Vários estudos de genotipagem correlacionaram o polimorfismo do gene HER2 Ile655Val (rs1136201) e o risco de câncer de mama. Todavia, os resultados têm sido inconsistentes e controversos, embora a maioria dos autores tenha sugerido uma associação positiva entre a presença deste SNP e o risco de desenvolvimento da doença [4-8, 12-15]. Dessa forma, nos propusemos a estudar o polimorfismo do gene HER2 Ile655Val (rs1136201) em mulheres com câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e amostras de sangue

Este é um estudo transversal controlado, envolvendo pacientes da Clínica ambulatorial de mastologia do Hospital Getúlio Vargas (HGV) e laboratório de Biologia Molecular do Hospital Natan Portela, Universidade Federal do Piauí, entre outubro de 2014 e dezembro de 2016. O estudo incluiu 140 mulheres, divididas em grupos de casos (com câncer de mama, N = 70) e controle (sem câncer de mama, N = 70). Incluído neste estudo foram pacientes com câncer de mama confirmado histologicamente e pacientes saudáveis (controles) confirmados por exame físico e testes de imagem que foram negativos para malignidade. Excluídos do estudo, as mulheres eram mais velhas que 80 e aqueles que sofrem de doenças hepáticas, metabólicas, cardiovasculares ou renais ou que relatam outros tipos de malignidade. Foram extraídos três ml de sangue por um técnico especializado usando seringas descartáveis e agulhas após consulta médica. O sangue total foi armazenado em um frasco próprio contendo anticoagulante (EDTA), conservado em um congelador, a -20°C.

Extração de DNA

Para a extração do DNA de leucócitos da amostra, utilizou-se o PureLink Genomic® DNA Mini Kit (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

Genotipagem

Após o isolamento, a concentração de DNA foi determinada pela espectrofotometria Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A genotipagem foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A técnica RT-PCR permite a detecção da intensidade da emissão de fluorescência devido à amplificação da sequência de DNA alvo durante cada ciclo, com uma sensibilidade e especificidade elevadas. Permite uma análise comparativa da expressão gênica entre as amostras no ponto de partida da fase de amplificação exponencial, na qual não há saturação de amplificação. Como a enzima Taq polimerase replica o DNA em cada ciclo de reação de PCR e um fluoróforo que emite fluorescência é liberado. A quantificação da emissão de fluorescência indica o número exato de cópias de DNA inicialmente presentes. A quantificação absoluta de

DNA em uma amostra é realizada com o uso de uma curva padrão, obtida por amplificação de quantidades conhecidas do mesmo DNA. Os ensaios de genotipagem de SNP contêm uma sonda marcada com corante VIC® e uma sonda marcada com corante FAM™. As sondas TaqMan® incorporam a tecnologia MGB, onde a sonda VIC® detecta o alelo 1 e a sonda FAM™ detecta o alelo 2. Procedimentos: As reações foram realizadas em volumes finais de 20 µL por paciente, contendo: 10 µL TaqMan® Genotipagem Master Mix; 0,5 µL de sonda TaqMan® personalizada para genotipagem de SNPs do gene humano HER-2 (SNP ID rs1136201.Cod.C___7452451_1_sequence VIC / FAM: CGCCCCAGCCCTCTGACGTCCATC [A / G] CTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGCT (Tabela 1); 5,5 µL de DNA desionizado / livre de RNA água e 4 µL de amostra de DNA por paciente, esses volumes foram distribuídos em placas de reação de 96 poços (MicroAmp_ Fast Optical 96-Well Reaction Plate), 0,1 mL (Applied Biosystems, EUA) em duplicado. A amplificação foi realizada usando Fast Real-Time PCR System 7500 com software SDS 2.2 incorporado para genótipos SNP (Applied Biosystems, EUA), nas seguintes etapas: (1) pré-PCR, com duração de 1 min a 60°C; (2) pré-incubação da mistura de reação a 95°C durante 10 minutos, (3) termociclagem a 95°C durante 15 e 60°C durante 60 ciclos e 40 ciclos e pós-PCR com duração de 1 min a 60°C. Os dados de fluorescência foram capturados durante 40 ciclos de reação. Controle de qualidade de RT-PCR foi avaliado por seleção aleatória de 20% das amostras totais para re genotipagem por um técnico independente.

Tabela 1 Identificação de códigos de genes e SNP usados no teste TaqMan® Life Technologies.

Gene HER2	Sequência VIC/FAM
rs1136201 A>G	CGCCCCAGCCCTCTGACGTCCATC[AG]TCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGCT

Análise estatística

O teste do χ^2 foi utilizado para determinar se a distribuição do genótipo era conforme o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência de genótipos foi comparada

entre mulheres com câncer de mama e mulheres sem a doença de um grupo controle, usando o teste exato de Fisher. O odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC) foram calculados usando o teste exato de Fisher devido a baixas frequências em linhas. O significado estatístico foi definido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

A média de idade das pacientes e o desvio padrão foi de $49,1 \pm 11,1$ anos para os casos e $45,4 \pm 12,8$ para os controles (Tabela 2). O genótipo GG esteve presente em 1 mulher (1,4%) em ambos os grupos caso e controle ($p = 0,32$), enquanto o genótipo AG ocorreu em 19 (27,2%) mulheres do grupo de casos e em 13 (18,6%) mulheres do grupo controle ($p = 1$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo GG e AG nos casos e controles em mulheres na pré-menopausa ($p = 1$), assim como não houve diferença entre mulheres pós-menopáusicas de caso e controle ($p = 0,14$) (Tabela 3).

Tabela 2 Características das pacientes e genotipagem do gene HER2 SNP rs1136201 nos pacientes de caso e controle.

Características	Caso	Controle		
N	70	70		
Média de idade (DP)	49,1 (\pm 11,1)	45,4 (\pm 12,8)		
Pré-menopausal	39	33		
Pós-menopausal	31	37		
	Caso (%)	Controle (%)	p	OR (95% IC)
rs1136201				
AA	50 (71,4)	46 (65,7)	-	1
AG	19 (27,2)	23 (32,9)	1	1,08 (0,34-3,4)
GG	1 (1,4)	1 (1,4)	0.32	1,59 (0,68-3,81)

Não houve diferença estatisticamente significativa do genótipo SNP rs1136201 entre os grupos de casos e controles ($p > 0,05$). O odds ratio (OR) não foi significativamente maior entre os grupos.

Tabela 3 Genotipagem do gene HER2 SNP rs1136201 em mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas.

	Pré-menopausal				Pós-menopausal			
	Caso	Controle	p	OR (95% IC)	Caso	Controle	p	OR (95% IC)
AA	30	26	-	1	20	20	-	1
A/G	8	6	0,7	1,1 (0,34-3,4)	11	17	0,14	2,7 (0,6-13,6)
GG	1	1	1	1,4 (0,23-4,3)	0	0	-	-

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos SNP rs1136201 no grupo de casos e grupo controle ($p > 0,05$), bem como no grupo pós-menopausa ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

No câncer o HER2 pode ser desregulado a partir de uma variedade de mecanismos, dentre os quais se destacam mutações, polimorfismos, superexpressão do receptor, superprodução de ligantes ou ainda a associação destes dois últimos mecanismos [16]. Análises de clones de DNA humanos identificaram um polimorfismo na região de codificação transmembrana no códon 655 do gene HER2. Este polimorfismo que codifica isoleucina (Ile; ATC) ou valina (Val; GTC) foi relatado em diferentes tipos de câncer [17]. Fleishman et al. [18] demonstraram que a presença de Val (G) na posição transmembranar estabiliza a formação de um dímero ativo da proteína que predispõe uma auto-atividade do receptor HER-2. Em adição, Takano et al. [19] sugeriram que a substituição de Ile (A) por Val (G) no códon 655 pode alterar a hidrofobicidade da proteína HER2, afetando a estabilidade conformacional dos domínios hidrofóbicos, como o domínio transmembranar. Nakajima et al. [20] sugeriram que no câncer de mama a

presença desse polimorfismo aumenta a dimerização, a autofosforilação e a atividade tirosina quinase do HER-2, o que pode causar a transformação celular.

No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os genótipos dos grupos caso e controle, assim como também não houve diferenças entre os grupos supracitados com relação a pré e a pós-menopausa para a variante rs1136201 ($p>0,05$). Um estudo caso-controle realizado em mulheres chinesas sugeriu que o homozigoto GG foi associado a um risco aumentado de câncer de mama [4]. Lee et al. [15] investigaram o SNP do gene HER2 Ile655Val em mulheres taiwanesas com câncer de mama inicial. Os autores sugeriram que a presença do genótipo G pode ser um fator de risco para a doença de início precoce em Taiwan. Por outro lado, outros autores sugeriram que a presença do homozigoto GG pode ser um fator de risco para o câncer de mama em mulheres africanas [21,22]. Ma et al. [23] demonstraram que o genótipo heterozigoto AG apresentou uma modesta associação com o risco de câncer de mama. Já Kara et al. [7] demonstraram que o SNP do gene HER2 não foi associado com o aumento do risco de câncer de mama em mulheres turcas. Corroborando com esses achados Breyer et al. [12] não observaram associação entre esse SNP e o risco de câncer de mama.

A propósito, AbdRaboh et al. [6] hipotetizaram que o polimorfismo do gene HER2 Ile655Val pode ser considerado um biomarcador genético de susceptibilidade para o risco de cancer de mama, mas não um fator confiável para estimar a agressividade da doença. Todavia, sabe-se que a associação entre o SNP do gene HER2 Ile655Val (rs1136201) e o risco de câncer de mama ainda não foi completamente esclarecido [13]. Furrer et al. [24] estudaram a associação do polimorfismo com câncer de mama HER2 positivo não metastático e hipotetizaram que o SNP do gene HER2 Ile655Val pode desempenhar um papel significativo na carcinogênese mamária em mulheres caucasianas. Por outro lado, Watrowski et al. [14] não demonstraram nenhuma associação entre esse SNP e a susceptibilidade ao câncer de mama em mulheres caucasianas. Nossos resultados estão de acordo com os achados de vários autores que realizaram desenho de estudo semelhante [7, 11,14], em que a presença do polimorfismo Ile655Val do gene HER2 em mulheres com câncer de mama não apresentou diferença estatisticamente significativa, entre casos e controles.

Vários autores demonstraram resultados controversos em relação à associação do SNP do gene HER2 Ile655Val e o risco de câncer de mama [7, 12, 14, 15, 23, 24]. Todavia, é importante levar em consideração que esses estudos foram realizados em diferentes grupos étnicos e que o polimorfismo genético apresenta variações somáticas em diferentes etnias [6]. Embora, os resultados do presente estudo não tenham demonstrado uma associação estatisticamente significativa entre o SNP do gene HER2 Ile655Val e o câncer de mama, nós sugerimos que estudos futuros devem ser realizados, particularmente entre a população brasileira, incluindo um tamanho amostral maior, pois nossa diversa miscigenação favorece a distribuição de variantes genômicas sem um perfil bem definido. No presente estudo, não houve associação significativa entre o SNP do gene HER2 (rs1136201) e o câncer de mama. No entanto, sugerimos a realização de estudos futuros em diferentes grupos populacionais, com tamanho amostral maior.

REFERÊNCIAS

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 359–386.
- [2] Chattopadhyay S, Siddiqui S, Akhtar S, Najm MZ, Husain SA. Genetic polymorphisms of ESR1, ESR2, CYP17A1, and CYP19A1 and the risk of breast cancer: a case control study from North India, *Tumor Biol* 2014; 35:4517-4527.
- [3] Estimate 2016: Incidence of Cancer in Brazil, National Cancer Institute (INCA), Available in: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.
- [4] Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, et al. Population-based, case–control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 412–417.

- [5] Kallel I, Kharrat N, Al-fadhly S, Rebai M, Khabir A, Boudawara TS et al. HER-2 polymorphisms and breast cancer in Tunisian women. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2010; 14:29-35.
- [6] N.R. AbdRaboh, H.H. Shehata, M.B. Ahmed, F.A. Bayoumi, HER1 R497K and HER2 I655V polymorphisms are linked to development of breast cancer, *Dis Markers* 34 (2013) 407-417.
- [7] Kara N, Karakus N, Ulusoy A, Ozaslan C, Gungor B, Bagci H. P53 codon 72 and HER2 codon 655 polymorphisms in Turkish breast cancer patients. *DNA Cell Biol* 2010;29:387-92.
- [8] Siddig A, Mohamed AO, Kamal H, Awad S, Hassan AH, Zilahi E, et al. HER-2/neu I655Val polymorphism and the risk of breast cancer a case-control study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1138: 84-94.
- [9] Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998;34:791-808.
- [10] McKean-Cowdin R, Kolonel LN, Press MF, Pike MC, Henderson BE. Germline HER-2 variant and breast cancer risk by stage of disease. *Cancer Res* 2001;61:8393-8394.
- [11] Benusiglio PR, Lesueur F, Luccarini C, Conroy DM, Shah M, Easton DF, et al. Common ERBB2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2005;7:204-209.
- [12] Breyer JP, Sanders ME, Airey DC, Cai Q, Yaspan BL, Schuyler PA, et al. Heritable Variation of ERBB2 and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;18:1252-1258.

- [13] Dahabreh IJ, Murray S. Lack of replication for the association between HER2 I655V polymorphism and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2011; 35:503-509.
- [14] Watrowski R, Castillo-Tong DC, Wolf A, Schuster E, Fischer MB, Speiser P, et al. HER2 codon 655 (Ile/Val) polymorphism and breast cancer in Austrian women. *Anticancer Res* 2015;12:6667e70.
- [15] Lee SC, Hou MF, Hsieh PC, Wu SH, Hou LA, Ma H, et al. A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism and risk of breast cancer in Taiwan. *Clin Biochem* 2008; 41:121e5.
- [16] Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implication for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;35:115-32.
- [17] Papewalis J, Nikitin AY, Rajewsky MF. G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5452.
- [18] Fleishman SJ, Schlessinger J, Ben-Tal N. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15937–15940.
- [19] Takano K, Ogasahara K, Kaneda H, Yamagata Y, Fujii S, Kanaya E, et al. Contribution of hydrophobic residues to the stability of human lysozyme: calorimetric studies and X-ray structural analysis of the five isoleucine to valine mutants. *J Mol Biol* 1995;254: 62–76.
- [20] Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi S, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erbB-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999;85:1894–1902.

- [21] Lu S, Wang Z, Liu H, Hao X. HER2 Ile655Val polymorphism contributes to breast cancer risk: evidence from 27 case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:771–778.
- [22] Wang HW, Liu LT, Lang ZF, Guo S, Gong H, Guan H, et al. Polymorphisms of ERBB2 and breast cancer risk: a meta-analysis of 26 studies involving 35,088 subjects. *J Surg Oncol* 2013;108:337-41.
- [23] Ma Y, Yang J, Zhang P, Liu Z, Yang Z, Qin H. Lack of association between HER2 codon 655 polymorphism and breast cancer susceptibility: meta-analysis of 22 studies involving 19,341 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:237–241.
- [24] Furrer D, Lemieux J, Côté MA, Provencher L, Laflamme C, Barabé F, et al. Evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in normal and breast tumor tissues and their link with breast cancer prognostic factors. *The Breast* 2016; 30:191-196.

CAPÍTULO 2

Estudo comparativo da expressão do antígeno Ki-67 entre os subtipos de câncer de mama luminal A e triplo negativo

Artigo publicado no jornal Medical Oncology

ISSN: 1559-131X (Online)

Impact Factor (JIF): 2.634

QUALIS B1 BIOTECNOLOGIA

Umbelina Soares Borges¹, Danylo Rafael Costa-Silva^{1,2}, João Paulo da Silva Sampaio¹, Carla Solange Escórcio-Dourado², Airton Mendes Conde Jr¹, Viriato Campelo¹, Luiz Henrique Gebrim³, Benedito Borges da Silva^{1,2}, Pedro Vitor Lopes-Costa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, Teresina, Piauí, Brasil

²Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO),
Teresina, Piauí, Brasil

³Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Autor Correspondente

Benedito Borges da Silva
Avenida Elias João Tajra, 1260
CEP 64049-300, Jockey
Teresina, Piauí, Brasil
Phone: +55 86 3232 5063
Fax: +55 86 3215 0470
Email: beneditoborges@globo.com

RESUMO. Os biomarcadores de tumores, como os receptores hormonais, HER2 e Ki-67, são utilizados de maneira robusta na prática clínica para classificação de subtipos moleculares de câncer de mama. A proliferação celular avaliada pela expressão do antígeno Ki-67 é importante para determinar a agressividade do tumor. No entanto, há uma escassez de estudos que comparam a expressão de Ki-67 entre subtipos moleculares de câncer de mama, particularmente entre tumores cada vez mais agressivos, como subtipos luminal A e triplo-negativo, o que nos levou ao estudo atual. Foram analisadas amostras de carcinoma ductal invasivo de 59 pacientes, que foram divididas em dois grupos: luminal A (n = 29) e triplo negativo (n = 30). Para a reação imunoistoquímica, as amostras foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (clone MIB1) e células que expressam a proteína Ki-67 foram identificadas por coloração castanho escuro dos núcleos, contando pelo menos 600 células por slide. As porcentagens médias de núcleos corados foram analisadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$). A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi de 10,14 e 77,22 em câncer de mama luminal A e triplas negativas, respectivamente ($p < 0,0001$). Nosso estudo mostrou uma alta proliferação celular de câncer de mama triplo negativo em comparação com a luminal A, justificando sua agressividade e desfecho clínico fraco.

Palavras-chave: Câncer de mama. Subtipos moleculares. Luminal A. Triplo negativo. Ki-67.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia que mais comumente acomete mulheres no mundo, após o câncer de pele não melanoma [1]. O câncer de mama é mais comum em países desenvolvidos, nos Estados Unidos cerca de 1 em 8 mulheres será diagnosticado o câncer de mama ao longo da vida [2] e é responsável pela segunda principal causa de morte por câncer, após o câncer do pulmão [3,4]. No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres após o câncer de pele não melanoma, tendo sido estimado para o ano de 2016 cerca de 57.960 casos novos e 14.207 mortes pela doença [5].

O estadiamento do carcinoma mamário, por ocasião do diagnóstico, adicionado ao comportamento biológico da neoplasia são importantes para prognóstico e sobrevida das mulheres [6]. O carcinoma mamário invasivo é uma neoplasia heterogênea, pois mostra características patológicas, moleculares e comportamento biológico distintos, que têm influência no prognóstico e planejamento terapêutico [7]. As estratégias terapêuticas e prognósticas do carcinoma mamário têm levado em consideração, além da proliferação celular, a expressão dos receptores hormonais (RH), tais como receptor de estrogênio (RE), progesterona (PgR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), através do trabalho pioneiro de Perou et al. [8], permitindo por meio da expressão gênica a subclassificação molecular do carcinoma mamário em cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2 hiperexpresso e Triplo negativo (receptores hormonais negativos e Her-2 negativo). Esta classificação pode ser mimetizada por um painel imunoistoquímico, que se tornou padrão na patologia de rotina, mas quando disponível a gradação genômica é melhor para a subclassificação molecular [9].

Todos os biomarcadores supracitados são importantes para classificação molecular do câncer mamário, todavia a proliferação celular, analisada principalmente pela expressão da proteína Ki-67, devido sua sensibilidade, é de grande importância na determinação da agressividade e do prognóstico tumoral, assim como na orientação terapêutica [10,11]. Todavia, para o nosso melhor conhecimento, até onde investigamos, há poucos estudos na literatura avaliando a expressão do antígeno Ki-67 em cânceres de mama altamente agressivos como os triplos negativos [12] e uma maior escassez de estudos comparando a expressão da proteína Ki-67 entre o triplo negativo e um tumor menos agressivo como o Luminal A [13,14], o que nos levou à concepção do presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

O estudo envolveu amostras de carcinoma invasivo ductal de 59 mulheres submetidas a tratamento na Clínica de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas, Universidade Federal do Piauí, de dezembro de 2015 a janeiro de 2017. Os critérios de inclusão para o estudo foram o diagnóstico prévio de carcinoma ductal invasivo, ausência de gravidez e tratamento anterior de câncer de mama. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado antes da admissão.

Desenho do estudo

As pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com o subtipo molecular de câncer de mama: Grupo A: luminal A, n = 29 e Grupo B: triplo negativo, n = 30. Os grupos foram considerados homogêneos em relação à idade na menarca, paridade, estado da menopausa e estágio clínico do tumor e considerado não homogêneo em relação à idade e ao estado dos linfonodos axilares (Tabela 1). As mulheres foram submetidas à biópsia para diagnóstico de câncer de mama e ressecção de amostra de tumor primário no momento da cirurgia definitiva para estudo histológico e imunoistoquímico.

Tabela 1. Características das pacientes.

	Luminal A (n=29)	Triplo- Negativo (n=30)	P valor
Idade (anos)			
Média	44,8	51,6	0,013
Menarca (anos)			
Média	12,3	12,4	0,938
Paridade			
Sim	22	25	0,532
Não	7	2	
Menopausa			
sim	8	12	0,412
Não	21	18	
Estadiamento			
I	19	18	1,000
II	8	9	
III	2	3	
Status axilar			
Positivo	4	14	0,010
Negativo	25	16	

Imunoistoquímica Ki-67

Para a avaliação imunoistoquímica da expressão do Ki-67, as amostras tumorais foram fixadas em formalina tamponada durante um período de 12-24 horas e depois cortadas em seções de 3 µm de espessura. As amostras foram processadas e coradas com hematoxilina-eosina para confirmar o diagnóstico de carcinoma ductal invasivo. As seções foram então desparafinadas em xilol durante 5 minutos, desidratadas em etanol absoluto e lavadas em solução salina tamponada a pH 7,4 durante 5 minutos. Em seguida, as seções foram tratadas com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), diluídas em solução tamponada durante 5 minutos para bloquear o peróxido endógeno. Para a recuperação do antígeno, as lâminas

foram colocadas em racks contendo 0,21% de ácido cítrico (pH 6,0) e aquecidas em um forno de microondas ajustado com potência máxima durante 15 minutos. Foi adicionada solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS-Tween) a lâminas que foram arrefecidas durante 20 minutos. As amostras de tecido foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 de rato primário (clone MIB1, Ref. M7240, Dako, Carpinteria, USA / 1: 4800) a 4-8°C durante a noite. As lâminas foram seguidamente lavadas com PBS-Tween e incutidas com reagente secundário (Anti-mouse BA 2000, Vector, Burlingame, EUA), incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente, lavadas pela segunda vez com PBS-Tween e instiladas com o ABC Sistema de detecção de elite (PK 6100, Vector, Burlingame, EUA), incubado durante 45 minutos à temperatura ambiente, lavado pela terceira vez com PBS-Tween, instilado com DAB (tetrahydrocloro de diaminobenzidina, Ref. D5637, Sigma, St. Louis, EUA) e incubou-se durante 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contrastadas com hematoxilina, coradas com solução de nitrato de prata amoniacal, desidratadas com etanol absoluto, embebidas brevemente em séries de xilol e montadas na resina Permout. As células que expressam a proteína Ki-67 foram identificadas por coloração marrom escuro dos núcleos.

Método Quantitativo

A quantificação foi realizada por dois observadores cegos sem conhecimento prévio de nenhum dos casos. Um microscópio de luz (Nikon Eclipse E-400, microscópio óptico, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera de vídeo a cores (câmera digital Samsung CHC-370N, Seul, Coreia) foi usado. A imagem foi capturada e transmitida para um computador equipado com o programa de software Imagelab®, versão 2.3. O programa foi desenvolvido pela Softium Informática Ltda. (São Paulo, Brasil) para análise de imagens. Para a expressão de Ki-67, um número mínimo de 600 células foi contado em cada lâmina com uma ampliação de 400X, seja corado por anticorpos anti-Ki-67 ou não, começando na área de maior expressão de Ki-67. A percentagem de células coradas para cada caso foi obtida pela razão entre o número de células contendo núcleos corados e não corados multiplicados por 100.

Análise Estatística

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a homogeneidade entre ambos os grupos em relação à idade do paciente. O teste exato de Fisher e o teste de Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para avaliar a idade na menarca, paridade, estado dos linfonodos axilares e estágio tumoral. O teste t de Student foi usado para comparar a porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 entre os dois grupos ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Em nosso estudo, a microscopia óptica mostrou uma maior concentração de células com núcleos corados com anti-Ki-67 no grupo triplo-negativo, em comparação com o grupo luminal A (Figura 1). A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi de 10,14 e 77,22 em carcinomas de mama luminal A e triplo negativo, respectivamente ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Esta diferença é melhor enfatizada na porcentagem média de núcleos corados entre grupos de tumores de mama luminal A e triplas negativas (Figura 2).

Fig. 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de carcinoma de mama luminal A e triplo negativo. Observe uma alta concentração de núcleos corados com Ki-67 no câncer de mama triplo-negativo (B) em comparação com núcleos corados com Ki-67 esparsos no grupo luminal A (A).

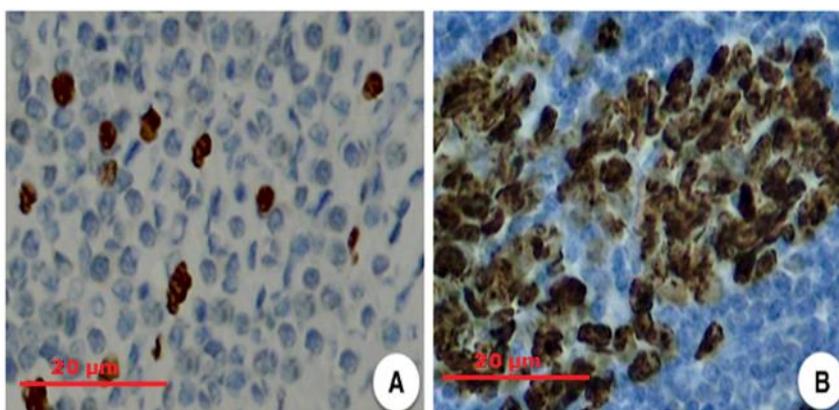


Fig. 2. Boxplot da porcentagem de células com núcleos corados com Ki-67 nos grupos de câncer de mama luminal A e triplo negativo.

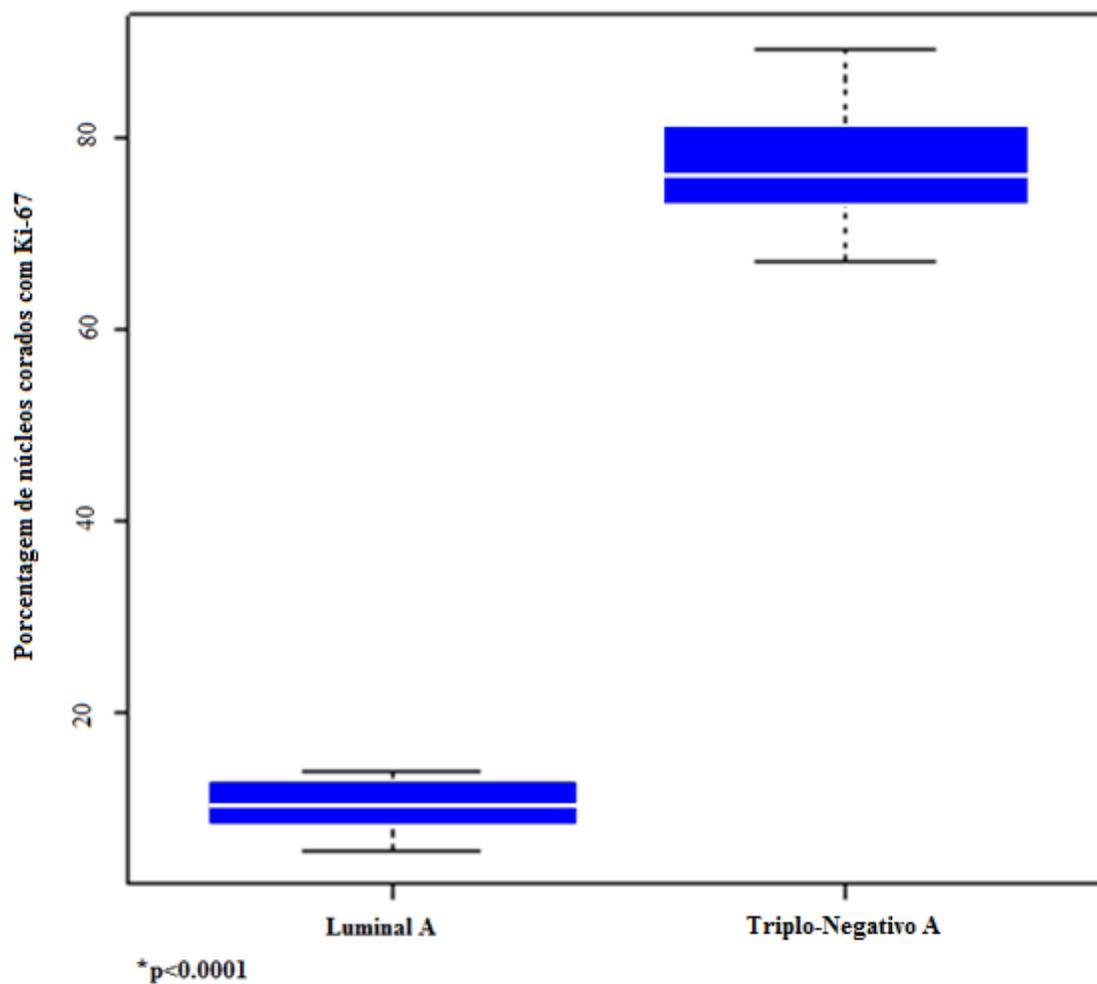


Tabela 2. Porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 no carcinoma de mama luminal A e triplo negativo.

	n	Média	EP médio	Mediana	Mínimo	Máximo
Luminal A	29	10,14	0,44	9,97	5,43	13,79
Triplo-Negativo	30	*77,22	0,87	76,38	67,11	89,55

* A diferença de núcleos corados com Ki-67 foi significativamente maior no carcinoma mamário Triplo negativo em comparação com subtipo Luminal A ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

A atividade proliferativa celular, uma importante função celular, está intimamente relacionada ao comportamento do câncer de mama [15]. Das várias técnicas que têm sido desenvolvidas para avaliar a proliferação, uma das mais largamente usada é a determinação imunoistoquímica do antígeno Ki-67, marcador sensível de proliferação celular [16] e que tem sido confirmado como fator prognóstico e preditivo independentes [17]. O valor do Ki-67 é um importante parâmetro na subclassificação dos tumores luminais em luminal A (RH+, Ki-67<14% e HER2 negativo) considerado de bom prognóstico e o subtipo luminal B com Ki-67>14% e considerado de prognóstico desfavorável, consoante o 13ST Consenso Gallen [18]. Portanto, o câncer de mama triplo negativo tem uma maior atividade proliferativa e considerado ter comportamento clínico mais agressivo e um maior risco de recidiva e mortalidade [19].

O presente estudo mostrou que o carcinoma de mama triplo negativo apresentou uma porcentagem de núcleos celulares expressando a proteína Ki-67 significativamente maior que o carcinoma luminal A. A propósito, os tumores mais agressivos como o triplo negativo e o HER2 hiperexpresso apresentam um sistema de defesa intratumoral menos atuante e por conseguinte uma alta taxa de proliferação celular, ao contrário do luminal A que apresenta uma rede de defesa intratumoral mais densa e mais atuante com uma menor proliferação celular [12].

A proliferação celular exagerada e a migração de células tumorais são características básicas da patologia tumoral durante a progressão do câncer, responsáveis pela disseminação da doença e formação de metástases [19]. A proliferação aberrante e a migração de células tumorais são uma característica da patologia tumoral durante a progressão do câncer. O antígeno Ki-67, portanto, pode estar envolvido na gênese e desenvolvimento do câncer de mama por afetar a proliferação e migração de células cancerosas favorecendo a formação de metástases principalmente nos cânceres com menor defesa intratumoral [20]. A propósito, os mastócitos (MCs) são células derivadas da medula óssea que armazenam numerosos mediadores que modulam funções de outras células imunes, quer melhorando resposta imunológica ou induzindo tolerância imune. Os MCs são também uma das primeiras células a infiltrar o câncer, podendo tanto promover quanto suprimir o crescimento tumoral [12, 21-23].

Alguns autores têm mostrado fortes correlações nas expressões dos receptores hormonais e Ki-67 entre cânceres primários da mama e metástase linfonodais axilares, tendo sido também observada uma moderada concordância em suas características fenotípicas. Todavia alterações sempre existiram pela heterogeneidade do câncer mamário e um terço destas alterações podem ter implicações terapêuticas. Assim, as metástases linfonodais dos tumores com alta expressão de Ki-67 precisam de melhor análise para obtenção de completa informação terapêutica [24].

No presente estudo, os dois grupos de câncer de mama, luminal A e triplo negativo, eram homogêneos, exceto com relação à média de idade e o status axilar. Os linfonodos axilares positivos foram mais comuns no câncer de mama triplo negativo e está de acordo com a literatura [24]. Por outro lado, a média de idade foi menor no câncer luminal A e significativamente maior no triplo negativo, o que vai de encontro com a literatura, pois o subtipo luminal A é mais frequente nas mulheres acima dos 40 anos, pois a proliferação celular mamária diminui a partir desta idade [25].

CONCLUSÃO

Mostramos no presente estudo que a expressão do antígeno Ki-67 em pelo menos 600 células por lâmina foi significativamente maior em câncer de mama triplo negativo em comparação com o luminal A. No entanto, estudos adicionais com um

tamanho de amostra maior são necessários para avaliar melhor o papel da expressão do Ki-67 entre os subtipos moleculares do câncer de mama.

Informação de financiamento. Este estudo não teve financiamento.

Aprovação ética. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (Teresina, Brasil, aprovação nº 43447015.8.0000.5214). Toda a pesquisa está em conformidade com os termos da Declaração de Helsinque de 1964 e suas alterações posteriores ou padrões éticos comparáveis.

Conflito de interesses. Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- 1.Hadjjiiski L, Sahiner B, Helvie MA, Chan HP, Roubidoux MA, Paramagul C et al. Shen J (2006) Breast masses: computer-aided diagnosis with serial mammograms. *Radiology* 240 (2):343-56.
- 2.Perou CM, Sørliie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52.
- 3.El Benna H, Zribi A, Laabidi S, Haddaoui A, Mlika M, Skhiri H et al. (2015) Ki-67: role in diagnosis, prognosis and follow-up after treatment of breast cancers. *Tunis Med* 93(12):737-41.
- 4.Glajcar A, Szpor J, Pacek A, Tyrak KE, Chan F, Streb J et al. (2017) The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. *Virchows Arch* 470(5):505-515.
- 5.da Silva BB, Lopes IM, Gebrim LH Effects of raloxifene on normal breast tissue from premenopausal women (2006). *Breast Cancer Res Treat* 95(2):99-103.
- 6.Goldhirsch EP, Winer AS, Coates RD, Gelber M, Piccart-Gebhart B, Thürlimann HJ et al. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of
- 7.Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9): 2206–222.

8. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J et al. (2010) Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 25;7(5):e1000279.
9. de Souza Junior DA, Santana AC, da Silva EZ, Oliver C, Jamur MC (2015) The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *Biomed Res Int* 2015:142359.
10. Mandó P, Rizzo M, de la Puente CP, Maino M, Ponce C, Pombo MT et al. (2017) High Histologic Grade and High Ki-67 Expression Predict Phenotypic Alterations in Node Metastasis in Primary Breast Cancers. *J Breast Cancer* 20(2):170-175.
11. Yuan P, Xu B, Wang C, Zhang C, Sun M, Yuan L (2016) Ki-67 expression in Luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol Lett* 11(3):2101-210.
12. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH et al. (2011) Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res* 13(2):R22.
13. Kolečková M, Kolář Z, Ehrmann J, Kořínková G, Trojanec R (2017) Age-associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. *Oncol Lett* 13(6):4201-4207.
14. Huang S, Chong N, Lewis NE, Jia W, Xie G, Garmire LX (2016) Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis. *Genome Med* 8(1):34.
15. Tang P, Tse GM (2016) Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med* 140(8):806-14.
16. Wang W, Wu J, Zhang P, Fei X, Zong Y, Chen X et al. (2016) Prognostic and predictive value of Ki-67 in Triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 7(21):31079-87.
17. Veisy A, Lotfinejad S, Salehi K, Zhian F (2015) Risk of breast cancer in relation to reproductive factors in North-West of Iran, 2013-2014. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(2):451-5.
18. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M (2015) Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* 12(7):381-94.

19. Maciel TT, Moura IC, Hermine O (2015) The role of mast cells in cancers. *F1000 Prime Rep* 5;7:09.
20. Ban KA, Godellas CV (2014) Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 23(3):409-22.
21. da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62(10):698-738.
22. Schlotter CM, Vogt U, Allgayer H, Brandt B (2008) Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 10(4):211.
23. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M (2005) Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 23(28):7212-20.
24. Daidone MG, Silvestrini R (2001) Prognostic and predictive role of proliferation indices in adjuvant therapy of breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30:27-35.
25. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1):13-20.
26. Estimate 2016: Incidence of Cancer in Brazil. National Cancer Institute (INCA), Available in: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.

CAPÍTULO 3

Expressão do antígeno Bcl-2 no câncer de mama luminal A e triplo negativo

Artigo publicado no jornal Medical Oncology

ISSN: 1559-131X (Online)

Impact Factor (JIF): 2.634

QUALIS B1 BIOTECNOLOGIA

Carla Solange Escórcio-Dourado¹, Luana Mota Martins¹, Camila Maria Simplício Revoredo¹, Fabiane Araújo Sampaio¹, João Paulo da Silva Sampaio², Umbelina Soares Borges², Francisco Adelson Alves-Ribeiro¹, Cléciton Braga Tavares¹, José Charles Lima Dourado¹, Benedito Borges da Silva^{1, 2, 3}

¹Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO),

²Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, Teresina, Piauí, Brasil

Teresina, Piauí, Brasil

³Ambulatório de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas, Teresina, Piauí, Brasil

Autor Correspondente

Benedito Borges da Silva

Avenida Elias João Tajra, 1260

CEP 64049-300, Jockey

Teresina, Piauí, Brasil

Phone: +55 86 3232 5063

Fax: +55 86 3215 0470

Email: beneditoborges@globo.com

RESUMO. Diversos biomarcadores para o prognóstico do câncer de mama têm sido comumente usados na prática clínica de rotina, tais como receptores hormonais, ki-67 e expressão do HER2. Nos anos mais recentes, o Bcl-2 tem sido reconhecido como um importante fator prognóstico no câncer de mama, embora haja controvérsias sobre os resultados de sua expressão. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do antígeno Bcl-2 no câncer de mama luminal A e triplo negativo. Este estudo envolveu 60 mulheres com carcinoma ductal invasivo. As pacientes foram divididas em dois grupos: grupo A (luminal A) e grupo B (triplo negativo) com 30 casos cada. A imunoistoquímica foi realizada no câncer de mama para avaliar a expressão do antígeno Bcl-2. O teste exato de Fisher foi realizado no câncer de mama para avaliar a expressão do antígeno Bcl-2 e a significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. A porcentagem média de casos com células que expressam Bcl-2 nos grupos A e B foi de 26 (86,7%) e 12 (40,0%), respectivamente ($p < 0,0003$). No presente estudo, houve maior expressão da expressão de proteína Bcl-2 antiapoptótica no câncer de mama luminal A em comparação com o câncer de mama triplo negativo.

Palavras-chave: Apoptose. Agressão. Prognóstico. Carcinoma mamário. Mama.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com muitos subtipos que diferem em suas características histológicas e biológicas [1]. A propósito, há cinco subtipos moleculares de carcinoma mamário que apresentam relação com a agressividade e o prognóstico tumoral, tais como luminal A, luminal B, HER2 superexpresso, triplo negativo e normal-like [2]. Os subtipos luminais têm sido associados a prognósticos mais favoráveis, enquanto o câncer de mama triplo negativo e o HER2 superexpresso estão associados a uma maior agressividade e prognóstico desfavorável [3]. Todavia, a avaliação genômica é o padrão ouro para a classificação dos tumores mamários, porém ela é complexa e de alto custo, o que impossibilita seu uso na prática clínica, principalmente em países em desenvolvimento [4].

A avaliação imunoistoquímica, além dos receptores hormonais (RH), HER2 e do Ki-67, pode incluir outros marcadores que podem ser usados na clínica para estratificar as pacientes com câncer de mama com o intuito de predizer o prognóstico, selecionar a terapêutica, assim como também para inclusão em ensaios clínicos [5,6]. Todavia, a progressão e a agressividade tumoral, comprometendo o prognóstico, depende muito do equilíbrio entre a proliferação celular e apoptose, avaliadas pela expressão das proteínas Ki-67 e Bcl-2, respectivamente [7]. A propósito, a Bcl-2 é uma proteína com ação antiapoptótica originalmente encontrada em células B foliculares humanas de linfoma, contudo vários estudos já mostraram sua relação com diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama [8-10]. O valor prognóstico da Bcl-2 tem sido mostrado em vários estudos [11-14] e apesar de possuir atividade antiapoptótica tem sido associada a um prognóstico favorável [10,15,16].

Muitos estudos têm avaliado a expressão da proteína Bcl-2 no câncer de mama, no entanto, para o nosso melhor conhecimento, este é o primeiro estudo a comparar a expressão do antígeno Bcl-2 entre os subtipos de câncer de mama luminal A e triplo negativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí e todos os pacientes deram seu consentimento informado assinado antes do início do estudo. Sessenta mulheres com câncer de mama foram incluídas entre outubro de 2015 e dezembro de 2016. Os pacientes com câncer de mama foram recrutados na clínica de mastologia do Hospital Getúlio Vargas, Universidade Federal do Piauí. Aqueles pacientes com câncer de mama que têm conhecimento preliminar do tratamento da doença foram excluídos do estudo.

Desenho do Estudo

Este estudo envolveu carcinoma ductal invasivo de 60 mulheres. As pacientes foram divididas em dois grupos: grupo A (luminal A, n = 30) e grupo B (triplo negativo, n = 30). Estes grupos também foram considerados homogêneos em relação à idade, status menopausal, paridade e status axilar (Tabela 1).

Tabela 1 Características das pacientes do estudo.

	Luminal A (n=30)	Triplo negativo (n=30)	P valor
Idade (anos)			
Média ±DP	44,9 ± 6,7	51,18 ± 3,92	0,013*
Paridade			
Sim	23	25	0,532
Não	7	5	
Status Menopausal			
Sim	8	12	0,412
Não	22	18	
Status Axilar			
Positivo	5	14	0,010*
Negativo	25	16	

*Diferença estatisticamente significativa

Expressão Imunoistoquímica para Bcl-2

Para a avaliação imunoistoquímica da expressão da proteína Bcl-2, as amostras de câncer de mama fixadas em formalina tamponada foram cortadas em seções de 3 µm de espessura. Em seguida, as seções foram desparafinadas em xilol durante 5 minutos, desidratadas em etanol absoluto e lavadas em solução salina tamponada a pH 7,4 durante 5 min. Posteriormente, para bloquear o peróxido endógeno, as seções foram tratadas durante 5 minutos com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em solução tamponada. Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram colocadas em racks contendo 0,21% de ácido cítrico (pH 6,0) e aquecidas em um forno de microondas durante 15 min com potência máxima. Foi adicionada solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS-Tween) as lâminas depois de terem deixado arrefecer durante 20 min. As amostras de tecido foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 de rato (clone 124, Ref. M0887, Dako; 1: 2000) e incubadas durante a noite a 4 a 8°C. As lâminas foram então lavadas com PBS-Tween e incutidas com reagente secundário (anti-mouse BA 2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA), incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS-Tween e instiladas com ABC Elite sistema de detecção (PK 6100, Vector Laboratories), incubado durante 45 minutos à temperatura ambiente, lavado mais uma vez com PBS-Tween, instilado com DAB (tetrahydrocloro de 3-30-diaminobenzidina, Ref. D5637, Sigma, St. Louis, MO), e incubou-se por 5 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina, coradas com solução amoniacal, desidratadas com etanol absoluto, passadas através de Coplinjars contendo xilol e montadas na resina Permount. As células Bcl-2 proteínas foram identificadas pela coloração castanho escuro do citoplasma.

Método Quantitativo

A quantificação foi realizada por dois observadores que não tinham conhecimento prévio de nenhum dos casos. Foi realizado com um microscópio de luz (Eclipse E-400, microscópio óptico, Nikon, Tóquio, Japão) conectado a uma videocâmera a cores (câmera digital CHC-370 N, Samsung, Seul, Coréia), que capturou a imagem e transmitiu-a para computador equipado com o programa de

software Imagelab, versão 2.3, desenvolvido pela Softium Informática (São Paulo, Brasil) para análise de imagens. A imunorreação de Bcl-2 foi avaliada semiquantitativamente de acordo com os critérios estabelecidos por van Slooten et al. [17] levando em consideração os seguintes parâmetros: intensidade da coloração celular (I) e fração de células neoplásicas coradas (F). A intensidade da coloração celular foi classificada da seguinte forma: 0 (negativo), 1 (corado fraco), 2 (moderadamente corado) ou 3 (fortemente corado). A fração de células coradas foi classificada da seguinte forma: 0 (0 a 25%), 1 (25 a 75%) ou 2 (75 a 100%). O resultado final foi o resultado da combinação dos dois parâmetros (I e F) e variou de 0 a 6. Casos com pontuação final ≥ 3 foram classificados como positivos para Bcl-2. Em todos os casos, a coloração acastanhada no citoplasma foi adotada como padrão para a positividade [17].

Analises Estatística

O teste t de Student foi utilizado para verificar a homogeneidade entre os dois grupos com respeito a idade do paciente. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a paridade e o status menopausal entre os dois grupos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar o número de partos. A comparação das proporções de casos com células que expressaram Bcl-2 no câncer de mama nos dois grupos foi realizada pelo teste χ^2 [18]. A significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

RESULTADOS

O estudo à microscopia de luz mostrou uma maior concentração de células com citoplasmas corados com anti-Bcl-2 no grupo de carcinoma mamário do subtipo molecular luminal A em comparação ao triplo negativo (Figura 1). A porcentagem de células coradas intensamente para Bcl-2 foi maior no câncer de mama do subtipo molecular luminal A em comparação ao triplo negativo. O número de casos expressando o antígeno Bcl-2 foi 26 (86,7%) e 4 (13,3%) no grupo A (luminal A) e B (triplo negativo), respectivamente (Tabela 2). A porcentagem de casos com células positivas para Bcl-2 no grupo A foi estatisticamente significativamente maior em relação ao grupo B ($p < 0,0003$).

Fig. 1 Fotomicrografias de cortes histológicos de uma porção de câncer de mama. Observe uma baixa concentração de células com citoplasmas coradas em marrom por Bcl-2 nos pacientes com câncer de mama triplo negativo (A) em comparação com citoplasmas corados de cor de alta intensidade no grupo do grupo luminal A (B).

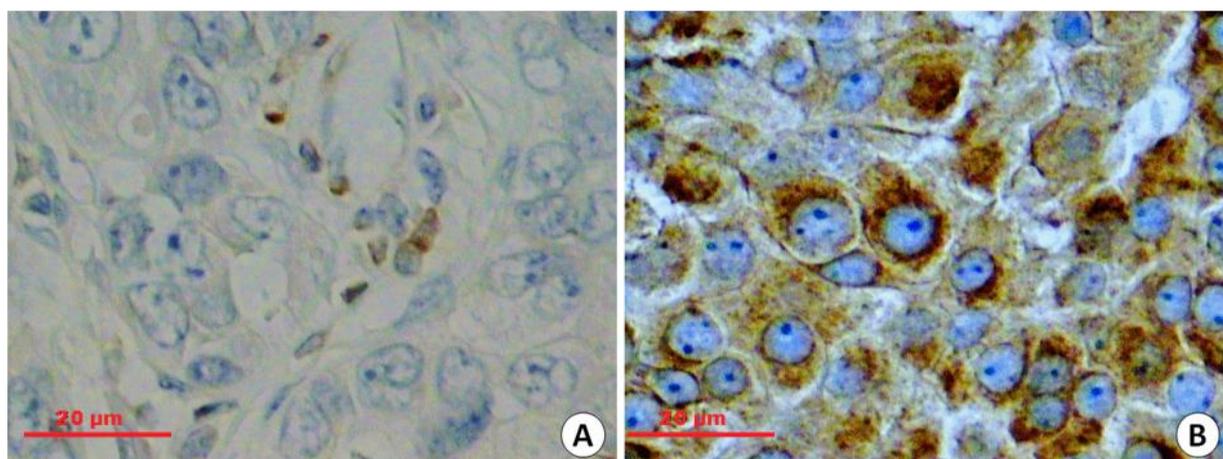


Tabela 2 Porcentagem de casos com células Bcl-2-positivas nos subtipos de câncer de mama luminal A e triplo-negativo.

Grupos	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Triplo-negativo	12 (40,0)	18 (60,0)	30 (100,0)
Luminal A	26 (86,7) *	4 (13,3)	30 (100,0)
Total	38 (63,3)	22 (36,7)	60 (100,0)

* Houve aumento estatisticamente significativo da expressão de Bcl-2 em A luminal em comparação com o subtipo de câncer de mama triplo negativo ($p < 0,0003$).

DISCUSSÃO

A proteína Bcl-2 é um dos membros da família Bcl-2 de proteínas que atuam regulando a morte celular programada ou apoptose, que possui duas subfamílias de

proteínas, uma pro-apoptótica que favorece a morte celular cuja principal representante é a Bax e a outra antia-apoptótica, que bloqueia a apoptose, representada principalmente pela Bcl-2 [19], expressa no epitélio glandular normal [20]. Todavia no câncer de mama, a expressão de Bcl-2 tem sido associada a fatores de melhor prognóstico, tais como neoplasias bem diferenciadas ou grau histológico 1, receptor de estrogênio positivo e menor índice de proliferação celular [21]. Na mama, a Bcl-2 é regulada pelo estrogênio como resultado direto da indução transcricional [22].

No presente estudo, as pacientes com câncer de mama luminal A apresentaram maior expressão de Bcl-2 em comparação com as mulheres com câncer triplo negativo. Os dois grupos foram homogêneos em relação à idade, status hormonal, paridade e status axilar. Apesar de muitos estudos já terem avaliado a importância clínica da expressão da Bcl-2 no câncer de mama, os resultados têm sido inconsistentes e controversos, todavia a maioria dos autores sugerem uma associação positiva entre o aumento da expressão da Bcl-2 e o desfecho clínico favorável [10,15-16, 20-21, 23-26].

Alguns autores correlacionaram a expressão da Bcl-2 do câncer de mama triplo negativo com a expressão do Bcl-2 de outros subtipos moleculares de carcinomas primários de mama. El-Mageed et al. [27] mostraram que o câncer triplo negativo apresentou a expressão do Bcl-2 significativamente menos correlacionada com características clínico-patológicas de bom prognóstico, tais como idade jovem, status axilar e tamanho tumoral pequeno, concluindo que a expressão de Bcl-2 foi similar em todos os subtipos moleculares de câncer de mama.

Por outro lado, outros estudos mostraram que o tumor triplo negativo apresentou menor expressão de Bcl-2 em comparação aos outros subtipos moleculares [20,29-30]. Ba et al. [30] compararam a expressão de Bcl-2 no câncer triplo negativo com os outros subtipos moleculares e mostraram um resultado benéfico da menor expressão de Bcl-2 em alguns pacientes com câncer de mama triplo negativo. Além disso, Kallel-Bayoudh et al. [20] estudaram o papel da Bcl-2 com biomarcadores já conhecidos no câncer de mama, tais como receptores hormonais, HER2 superexpresso e características clínico-patológicas e concluíram que o câncer de mama triplo negativo expressou menos Bcl-2 que os outros subtipos moleculares, tendo sugerido a inclusão da expressão do Bcl-2 como

biomarcador em associação com os outros usados rotineiramente no câncer de mama.

Eom et al. [15] analisaram o papel da Bcl-2 como marcador prognóstico nos subtipos moleculares classificados de acordo com 13º Consenso St. Gallen, em uma amostra de 605 casos e mostraram uma expressão positiva de Bcl-2 associada com os receptores hormonais positivos, HER2 superexpresso negativo e cancer de mama luminal A. Estes achados levaram aos autores concluir que a expressão da proteína Bcl-2 pode ser um biomarcador que apresenta correlação com o subtipo de cancer de mama de bom prognóstico como o luminal A. De maneira similar, Dawon et al. [28] revelaram que a maior expressão de Bcl-2 esteve correlacionada com o cancer de mama menos agressivo. Honma et al. [16] sugeriram que o prognóstico favorável no câncer de mama mediante a expressão da proteína Bcl-2 no subtipo luminal A parece refletir uma ação contrária da Bcl-2 à do receptor de estrogênio que favorece a apoptose. Embora, nossos achados tenham revelado maior expressão da Bcl-2 no cancer de mama luminal A, sugerimos a realização de estudos futuros com um maior tamanho amostral para melhor definir a expressão da proteína Bcl-2 como um biomarcador no prognóstico do câncer de mama.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram uma maior expressão de Bcl-2 em mulheres com câncer de mama luminal A em comparação com o subtipo molecular triplo negativo.

Informação de financiamento. Este estudo não teve financiamento.

Aprovação ética. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (Teresina, Brasil, aprovação nº 43447015.8.0000.5214). Toda a pesquisa está em conformidade com os termos da Declaração de Helsinque de 1964 e suas alterações posteriores ou padrões éticos comparáveis.

Conflito de interesses. Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1160-7.
2. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406:747-52.
3. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010; 28:1684-91.
4. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011; 22: 1736-47.
5. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013; 24:2206-23.
6. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of

progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31:203-9.

7. Dowsett M, Archer C, Assersohn L, Gregory RK, Ellis PA, Salter J, Chang J, Mainwaring P, Boeddinghaus I, Johnston SR, Powles TJ, Smith IE. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 1999; 6:25-8.

8. Zhao L, Yu N, Guo T, Hou Y, Zeng Z, Yang X, Hu P, Tang X, Wang J, Liu M. Tissue biomarkers for prognosis of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23:1047-54.

9. Cheng H, Wang X, Li T, Chen L. Bcl-2 expression and patient survival in gastric cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Med Oncol.* 2015; 32:389.

10. Bold RJ, Hess KR, Pearson AS, Grau AM, Sinicrope FA, Jennings M, McConkey DJ, Bucana CD, Cleary KR, Hallin PA, Chiao PJ, Abbruzzese JL, Evans DB. Prognostic factors in resectable pancreatic cancer: p53 and bcl-2. *J Gastrointest Surg.* 1999; 3:263-77.

11. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ. *Br J Cancer.* 1994; 69:135-9.

12. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86:499-504.

13. Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol.* 1994; 145:1191-8.

14. Eom YH, Kim HS, Lee A, Song BJ, Chae BJ. BCL2 as a subtype-specific prognostic marker for breast cancer. *J Breast Cancer*. 2016; 19:252-60.
15. Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T, Akiyama F. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer*. 2015; 15:698.
16. van Slooten HJ, Clahsen PC, van Dierendonck JH, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, van de Velde CJ, van de Vijver MJ. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer*. 1996; 74:78-85.
17. Agresti A. *Categorical data analysis*. 2nd ed. New York: Wiley, 2002.
18. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*. 2015; 89:289-317.
19. Kallel-Bayoudh I, Hassen HB, Khabir A, Boujelbene N, Daoud J, Frikha M, Sallemi-Boudawara T, Aifa S, Rebaï A. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Med Oncol*. 2001; 28:S55-61.
20. Zaha DC, Lazăr E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53:155-60.
21. Leung LK, Wang TT. Paradoxical regulation of Bcl-2 family proteins by 17beta-oestradiol in human breast cancer cells MCF-7. *Br J Cancer*. 1999; 81:387-92.
22. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 9:1799-805.

- 23.Hwang KT, Han W, Kim J, Moon HG, Oh S, Song YS, Kim YA, Chang MS, Noh DY. Prognostic influence of BCL2 on molecular subtypes of breast cancer. *J Breast Cancer*. 2017; 20:54-64.
- 24.Berardo MD, Elledge RM, de Moor C, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer*. 1998; 82:1296-302.
- 25.Elledge RM, Green S, Howes L, Clark GM, Berardo M, Allred DC, Pugh R, Ciocca D, Radvin P, O'sullivan J, Rivkin S, Martino S, Osborne CK. Bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol*.1997; 15:1916-22.
- 26.Abd El-Hafez A, Shawky Mohamed Ael-A, Elesawy BH. Different prognostic factors correlate with Bcl-2 expression among triple negative and non-triple negative breast cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14:1037-41.
- 27.de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137:183-92.
- 28.Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between "triple-negative" and non-"triple-negative" tumors. *Hum Pathol*. 2012; 43:23-30.
- 29.Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010; 103:668-75.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise do polimorfismo genético do receptor do fator de crescimento epidérmico humano em mulheres com câncer de mama não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos genótipos entre os grupos caso e controle, assim como também não houve diferença do SNP do gene HER2 para a variante rs1136201 entre os grupos caso e controle em relação ao status menopausal, ou seja, pré-menopausa versus pós-menopausa.

O presente estudo também mostrou uma expressão significativamente maior da proliferação celular, avaliada pela expressão da proteína Ki-67, do câncer de mama triplo negativo em comparação ao subtipo molecular luminal A, portanto o que demonstra a importância da expressão do biomarcador Ki-67 no estudo da agressividade tumoral e orientação terapêutica.

Por outro lado, o câncer de mama luminal A, de prognóstico mais favorável, apresentou uma maior expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em comparação ao triplo negativo, que tem prognóstico desfavorável, o que está de acordo com a literatura, que mostra que os cânceres de outras localizações, menos agressivos, apresentam maior expressão do biomarcador Bcl-2.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador: benedito borges da silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43447015.8.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.022.962

Data da Relatoria: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta uma proposta de pesquisa de Mestrado intitulada: " Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária". Justifica a relevância da investigação devido a necessidade de identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas, utilizados como fatores prognósticos das neoplasias mamárias como elemento facilitador do entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação, a diferenciação e o desenvolvimento de metástases tumorais. Inicialmente os marcadores tumorais eram identificados por meio de técnicas moleculares ou bioquímicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Objetivo Secundário: Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na neoplasia mamária; Avaliar as concentrações plasmáticas de metaloproteinases 2 e 9; Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco* Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes e zinco; Avaliar a associação entre as metaloproteinases 2 e 9 com parâmetros de zinco; Correlacionar o polimorfismo do receptor

do fator de crescimento epidérmico e os subtipos moleculares de câncer de mama; Relacionar os dados antropométricos com subtipos moleculares de câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos o pesquisador diz no Protocolo que: "Não há nenhum risco aos participantes da pesquisa". No entanto no TCLE afirma que "Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, [...] adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade". Sendo o TCLE o documento de acesso aos participantes a descrição dos riscos foi considerada.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa receberão uma orientação nutricional de acordo com as necessidades após todas as coletas de dados; Bem como receberão todos os resultados referente as análises realizadas durante a pesquisa. Acrescentando, ainda no TCLE que; "As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentação".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracteriza-se como um estudo quantitativo do tipo grupo controle, para identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. A população será constituída de pacientes portadoras de câncer de mama, atendidas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (lôcus da investigação), no período de julho de 2015 a julho de 2018 que serão submetidas a tratamento especializado. Do universo populacional será selecionado o grupo controle constituído por 40 pacientes portadoras de fibroadenoma. Define como critérios de inclusão serem pacientes portadoras de câncer de mama, comprovado histologicamente; Mulheres com idade maior que 20 anos sem qualquer tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico. Como critério de Exclusão: ter sido submetida a tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico; Mulheres com idade menor que 20 anos; Mulheres que não aceitaram participar do estudo; Mulheres com uso de suplementos alimentares. Para a coleta

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

de dados serão realizados os seguintes procedimentos: Anteriormente a coleta de sangue, o peso corporal será determinado utilizando uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima de 150 kg, graduada em 100 gramas. A estatura será medida com um antropômetro marca Secar, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa. O peso e a estatura serão medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas. O índice de massa corpórea será calculado a partir do peso da participante do estudo dividido pela sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000). A medida da circunferência da cintura será realizada com as mulheres em pé, utilizando uma fita métrica não extensível, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para a avaliação do consumo alimentar será utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de três dias, compreendendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. O consumo alimentar de macronutrientes e zinco será calculado pelo software Nutwin, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). Para verificar a adequação da ingestão alimentar de zinco das participantes do estudo, será utilizado como referência a Estimated Average Requirement (EAR), contida nas DRI's (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Amostras de 20 mL de sangue venoso serão coletadas no período de 7:30 às 8:30 horas, estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. O sangue colhido será distribuído em tubo contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 L/mL de sangue) para a análise de zinco (10 mL), tubo contendo EDTA para análise das metaloproteinases 2 e 9 (5 mL) e para análise do receptor do fator de crescimento epidérmico (5 mL). O plasma será separado do sangue total por centrifugação a 1831xg durante 15 minutos a 4°C, sendo o mesmo extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e armazenado em freezer a -20°C. Para separação dos eritrócitos será utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária será lavada com 5mL de solução salina isotônica 0,9%, sendo então homogeneizada lentamente por inversão e centrifugado a 2493xg por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O procedimento descrito será realizado três vezes, para remover contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina será aspirada, descartada e a massa eritrocitária será cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de -20°C para análise de zinco e hemoglobina. As pacientes serão submetidas a procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica do tumor, exérese dos tumores benignos

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

(fibroadenoma) e biópsia (Core biopsy) das neoplasias malignas. A seguir, as amostras de tumor serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina para confirmação diagnóstica. Para tal, as amostras serão então fixadas em formol tamponado, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 ° C (MASSON, 1956). Após este processo, parte da amostra será submetida a cortes seriados consecutivos e corados com hematoxilina-eosina. O bloco será então armazenado para posterior avaliação imunohistoquímica. A análise das metaloproteinases será realizada com base na plataforma Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit (HMMP2MAG-55K).

Análise dos dados: Para a comparação dos grupos estudados quanto às variáveis envolvidas neste estudo, será realizado o teste t de Student, aplicada uma ANOVA – análise de variância, seguida do teste de Tukey para identificar as possíveis diferenças nas comparações entre os grupos. A diferença considerada significativa será quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança adotado será de 95%. Na análise das variáveis possivelmente inter-relacionadas será utilizado o coeficiente de Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios. Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 466/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 1.022.962

TERESINA, 14 de Abril de 2015

Assinado por:
Adrianna de Alencar Setubal Santos
(Coordenador)

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo original derivado da tese.

----- Mensagem original -----

Assunto:European Journal of Cancer: Submission Confirmation for Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism in women with breast cancer

Data:15/08/2017 17:49

De:"European Journal of Cancer" <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para:beneditoborges@globo.com

Responder para:"European Journal of Cancer" <ejcancer@elsevier.com>

Title: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism in women with breast cancer
European Journal Of Cancer
Original Research Article

Dear Professor da Silva

Thank you for your submission entitled "Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism in women with breast cancer" has been received by the European Journal Of Cancer

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ejc/>.

Your username is: beneditoborges@globo.com

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/ejc/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Regards

Yours sincerely

EJC Editorial Office
European Journal Of Cancer

ANEXO C – Comprovante de publicação de artigo original derivado da tese.

Med Oncol (2017)34:156
DOI 10.1007/s12032-017-1019-x



ORIGINAL PAPER

A comparative study of Ki-67 antigen expression between luminal A and triple-negative subtypes of breast cancer

Umbelina Soares Borges¹ · Danylo Raphael Costa-Silva² · João Paulo da Silva-Sampaio¹ ·
Carla Solange Escórcio-Dourado² · Airton Mendes Conde Jr.¹ · Viriato Campelo¹ ·
Luiz Henrique Gebrim³ · Benedito Borges da Silva^{1,2} · Pedro Vitor Lopes-Costa¹

Received: 23 July 2017 / Accepted: 31 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Tumor biomarkers such as hormone receptors, HER-2 and Ki-67 are used routinely in clinical practice for classification of molecular subtypes of breast cancer. Cell proliferation evaluated by Ki-67 antigen expression is important to determine tumor aggressiveness. However, there is a paucity of studies comparing Ki-67 expression in an expressive number of cells among molecular subtypes of breast cancer, particularly among less and more aggressive tumors, such as luminal A and triple-negative, which have led us to the present study. The current study included invasive ductal carcinoma samples of 59 patients, which were divided into two groups: luminal A ($n = 29$) and triple-negative ($n = 30$). For immunohistochemical reaction, the samples were incubated with monoclonal anti-Ki-67 antibody (clone MIB1) and cells expressing Ki-67 protein were identified by dark brown staining of the nuclei, counting at least 600 cells per slide. The mean percentages of stained nuclei were analyzed by Student's *t* test ($p < 0.05$). The mean percentage of nuclei stained with anti-ki-67 was 10.14 and 77.22 in luminal A and triple-negative breast cancers, respectively ($p < 0.0001$). Our study showed a high cell proliferation of triple-negative breast cancer in comparison with luminal A, justifying its aggressiveness and poor clinical outcome.

Keywords Breast cancer · Molecular subtypes · Luminal A · Triple-negative · Ki-67

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide, after non-melanoma skin cancer [1]. Breast cancer occurs most frequently in developed countries. In the United States, about 1 in 8 women will be diagnosed with breast cancer over the course of their lifetime [2] and the disease is responsible for the second main cause of cancer death, after lung cancer [3, 4]. In Brazil, breast cancer is the most common malignancy in women following non-melanoma skin cancer. For the year 2016, around 57,960 new cases of breast cancer and 14,207 deaths from the disease had been estimated [5].

Breast cancer staging at the time of diagnosis, along with biological behavior of tumor cells are important for patient prognosis and survival [6]. Invasive breast carcinoma is a heterogenous malignancy, due to its distinct pathological/molecular characteristics and biological behavior, which have an influence on prognosis and therapeutic planning [7]. In addition to cell proliferation, treatment and prognostic strategies of breast carcinoma have taken into consideration the expression of hormone receptors (HR), such as estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), first studied by Perou et al. [8]. In that pioneer study, gene expression permitted molecular sub-classification of breast carcinoma into five subtypes: luminal A, luminal B, HER2-overexpressed and triple-negative (hormone receptor negative and HER-2 negative) tumors. This classification may be mimicked by an immunohistochemical panel, which has become standard

✉ Benedito Borges da Silva
beneditoborges@globob.com

¹ Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Piauí, 2280 Frei Serafim Avenue, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil

² Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO), Teresina 64049-550, Brazil

³ Department of Mastology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo 04023-062, Brazil

ANEXO D – Comprovante de publicação de artigo original derivado da tese.

Med Oncol (2017)34:161
DOI 10.1007/s12032-017-1022-2



ORIGINAL PAPER

Bcl-2 antigen expression in luminal A and triple-negative breast cancer

Carla Solange Escórcio-Dourado¹ · Luana Mota Martins¹ · Camila Maria Simplício-Revoredo¹ · Fabiane Araújo Sampaio¹ · Cléciton Braga Tavares¹ · João Paulo da Silva-Sampaio² · Umbelina Soares Borges² · Francisco Adelson Alves-Ribeiro¹ · Pedro Vitor Lopes-Costa^{2,3} · José Charles Lima-Dourado¹ · Benedito Borges da Silva^{1,2,3,4}

Received: 3 August 2017 / Accepted: 8 August 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Biomarkers for the prognosis of breast cancer have been routinely used in clinical practice, including the expression of hormone receptors, Ki-67 and HER-2. More recently, Bcl-2 has been recognized as an important prognostic factor in breast cancer, although controversies persist with respect to the significance of its expression. The aim of the present study was to evaluate Bcl-2 antigen expression in luminal A and triple-negative breast cancer. Sixty women with invasive ductal carcinoma were included in the study and divided into two groups: Group A (luminal A) and Group B (triple-negative), with 30 cases in each group. Immunohistochemistry was performed on tissue sections to evaluate Bcl-2 antigen expression. Fisher's exact test was used to compare the proportions of cases with cells expressing Bcl-2 between the two subtype cancer groups, with statistical significance being established at $p < 0.05$. The number of cases with cells expressing Bcl-2 in Groups A and B was 26 (86.7%) and 12 (40.0%), respectively ($p < 0.0003$). In the present study, the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was greater in luminal A breast cancer tissue samples compared to triple-negative breast cancer.

Keywords Apoptosis · Tumor aggressiveness · Prognosis · Breast cancer · Bcl-2

Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease, with many subtypes that differ insofar as their histological and biological characteristics are concerned [1]. Five molecular subtypes of breast cancer have been associated with tumor aggressiveness and disease prognosis: luminal A, luminal B, HER2-enriched, triple-negative and normal-like [2]. The luminal subtypes have been associated with more favorable prognoses, while triple-negative and HER2-enriched breast cancers are associated with greater aggressiveness and unfavorable prognosis [3]. Genomic evaluation is the gold standard for the classification of breast tumors; nevertheless, it is complex and expensive, rendering its use in clinical practice prohibitive, particularly in developing countries [4].

The expression of hormone receptors, HER-2, Ki-67, and other markers in breast tissues, as assessed by immunohistochemistry, has been used in clinical practice to stratify breast cancer patients with the aim of predicting prognosis and selecting treatment. In clinical trials, the expression of these biomarkers determines the selection of patients according to the study inclusion criteria [5, 6]. The progression and aggressiveness of the tumor, factors that negatively affect prognosis, depend to a great extent on the balance between cell proliferation and apoptosis, evaluated by the expression of the Ki-67 and Bcl-2 proteins, respectively [7]. The protein Bcl-2 exerts an anti-apoptotic effect that was originally found in human follicular B cell lymphoma. Later, the association of Bcl-2 with different types of cancer, including breast cancer, was widely

✉ Benedito Borges da Silva
beneditoborges@globo.com

¹ Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil

² Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Piauí, Teresina 64049-550, Brazil

³ Department of Mastology, Getúlio Vargas Hospital, Teresina 64001-020, Brazil

⁴ Avenida Elias João Tajra 1260, Jockey, Teresina, Piauí 64049-300, Brazil

Published online: 11 August 2017

