



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E  
SAÚDE



**UMBELINA SOARES BORGES**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NOS SUBTIPOS DE CÂNCER  
DE MAMA LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO**

**TERESINA**

**2017**

**UMBELINA SOARES BORGES**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NOS SUBTIPOS DE CÂNCER  
DE MAMA LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde

**Área de Concentração:** Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

**Linha de Pesquisa:** Investigação para Diagnóstico em Saúde

**Orientador:** Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

**TERESINA**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde  
Serviço de Processamento Técnico

B732e Borges, Umbelina Soares.  
Estudo da expressão do antígeno ki-67 nos subtipos de câncer de mama luminal A e triplo negativo / Umbelina Soares Borges. -- Teresina, 2017.  
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2017.

“Orientação : Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa.”

Bibliografia

1. Carcinoma Mamário. 2. Luminal A. 3. Triplo Negativo. 4. Antígeno ki-67. 5. Prognóstico. I. Título II. Universidade Federal do Piauí.

CDD 616.994 49

**UMBELINA SOARES BORGES**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NOS SUBTIPOS DE CÂNCER  
DE MAMA LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

**Linha de Pesquisa:** Investigação para Diagnóstico em Saúde

Data da defesa: 23 de Junho de 2017

Banca examinadora:

---

**Presidente:** Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

---

**1º Examinador:** Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior

---

**2º examinador:** Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos

---

**Suplente:** Prof. Dr. Rafael de Deus

---

**DEDICATÓRIA**

Dedico primeiramente a **Deus**, por estar sempre guiando meus caminhos, me fortalecendo diante de todos os obstáculos e por ter permitido galgar mais esta conquista na minha vida.

Aos meus pais **Benedito Borges da Silva e Maria de Fátima Soares Borges**, e a meus irmãos **Carine Borges e Rafael Borges**, por todo afeto, apoio e incentivos durante esta jornada.

**DEDICATÓRIA ESPECIAL**

Ao **Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa**, pela inteligência com que orientou este estudo, mestre que se configura como um marco em minha formação como pesquisadora, pois me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, a quem serei eternamente grata.



## **AGRADECIMENTOS**

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Aos colegas do Mestrado em Ciências e Saúde, dentre eles **Anatole, Danylo, Conceição e demais alunos do mestrado e doutorado**, agradeço não apenas pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, união, força e superação desde o início desta caminhada.

À **Amanda e Ivissom**, agradeço pelo carinho, apoio, companheirismo e respeito. Houve meses de cansaço físico e emocional, mas juntos lutamos e enfrentamos todos os obstáculos.

À colega e amiga do doutorado em Biotecnologia **Carla Solange Escórcio Dourado**, pelo companheirismo e ajuda na coleta de dados.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitor da Universidade Federal do Piauí** pela existência desta pós-graduação stricto sensu trabalhando na qualificação de recurso humano no Piauí.

Ao **Diretor do Centro de Ciências e Saúde, Prof. Dr. Viriato Campelo**, pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS e pela valiosa colaboração ao Mestrado em Ciência e Saúde, como pesquisador e professor.

Ao professor **Dr. Airton Mendes Conde Júnior**, professor e coordenador deste Mestrado, pelos ensinamentos e apoio essencial à realização do nosso estudo

Aos **professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições, sem as quais não teria sido possível a concretização deste estudo.

A secretária do Mestrado em Ciências e Saúde **Edilene** pelo cuidado, apoio, carinho e amizade.

Aos **funcionários da Ginecologia e Mastologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular a Senhoras Efigênia, Toinha, Socorro, Eugênia e a todos os outros.

**RESUMO**



**Introdução:** As estratégias terapêuticas e prognósticas do carcinoma mamário têm levado em consideração principalmente a expressão dos receptores hormonais, como receptor de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), permitindo a subclassificação molecular do carcinoma mamário nos subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 hiperexpresso e Triplo negativo. A proliferação celular por meio da expressão do antígeno Ki-67 é uma determinante chave na agressividade tumoral, sendo considerados menos e mais agressivos, o Luminal A e o Triplo negativo, respectivamente, contudo há escassez de estudos comparando a expressão do Ki-67 entre estes dois subtipos em um número significativo de células. **Objetivo:** Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 nos subtipos moleculares de carcinoma mamário luminal A e triplo negativo. **Metodologia:** Estudo retrospectivo realizado em blocos de parafina de carcinoma mamário arquivados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Getúlio Vargas e Hospital São Marcos há menos de cinco anos. Cinquenta e nove casos foram imunoistoquimicamente divididos em dois grupos, Luminal A com 29 casos e Triplo Negativo com 30 casos. Foram consideradas positivas para a expressão do Ki-67, as células com núcleo corado em marrom. Os dados foram analisados estatisticamente usando o teste t de Student, Mann-Whitney, teste exato de Fisher e Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi 10,14 nos carcinomas de mama do subtipo Luminal A e 77,22 nos carcinomas de mama do subtipo Triplo negativo e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). **Conclusão:** A expressão da proteína Ki-67 foi significativamente maior nos carcinomas de mama do subtipo molecular Triplo Negativo em comparação com o subtipo molecular Luminal A.

**Palavras chaves:** Carcinoma mamário, luminal A, triplo negativo, antígeno ki-67, prognóstico.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** The therapeutic and prognostic strategies of mammary carcinoma have mainly taken into account the expression of the hormonal receptors, such as estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor (HER-2), allowing molecular subclassification of breast carcinoma in the Luminal A, Luminal B, HER2 hyperexpressed and Triple negative subtypes. Cellular proliferation through Ki-67 antigen expression is a key determinant of tumor aggressiveness, with less and more aggressive tumors being considered Luminal A and Triple negative, respectively. However, there is a scarcity of studies comparing Ki-67 expression between These two subtypes into a significant number of cells.

**Objective:** To evaluate Ki-67 antigen expression in the Luminal A and Triple negative mammary carcinoma subtypes. **Methodology:** Retrospective study performed in paraffin blocks of mammary carcinoma archived in the Pathology Department of Hospital Getúlio Vargas and Hospital São Marcos for less than five years. Fifty-nine cases were immunohistochemically divided into two groups, Luminal A with 29 cases and Triple Negative with 30 cases. Cells were considered positive for Ki-67 when presented brown-stained nuclei. Data were statistically analyzed using Student's t-test, Mann-Whitney, Fisher exact test and Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The mean percentage of nuclei stained with anti-ki-67 was 10.14 in breast carcinomas of the Luminal A subtype and 77.22 in triple-negative subtype breast carcinomas and this difference was statistically significant ( $p < 0, 0001$ ).

**Conclusion:** Ki-67 protein expression was significantly higher in breast carcinomas of the molecular triple Negative subtype compared to the Luminal A subtype.

**Keywords:** Breast carcinoma, luminal A, triple negative, ki-67 antigen, prognosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

<b>Quadro 1</b>	Classificação molecular.....	25
<b>Figura 1</b>	Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.....	35
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma mamário Luminal A mostrando escassa concentração de núcleos corados em marrom expressando o antígeno Ki-67 (ampliação original, 400X).....	39
<b>Figura 3</b>	Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma Triplo negativo mostrando alta concentração de núcleos mostrando a expressão do antígeno Ki-67 em comparação com o subtipo Luminal A (ampliação original, 400X).....	40
<b>Figura 4</b>	Boxplot da porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki67 em carcinomas de mama do subtipo Luminal A e Triplo negativo.....	43



**LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1</b>	Características das pacientes.....	32
<b>Tabela 2</b>	Porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 entre os casos de câncer de mama Luminal A e Triplo Negativo.....	42

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

---

**(NCCN) :*National Comprehensive Cancer Network***

**TNBC: câncer de mama triplo negativo**

**FISH: hibridação in situ fluorescente**

**OMS: Organização Mundial de Saúde**

**HER2: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano-2**

**RE: Receptor de estrógeno**

**RP: Receptor de Progesterona**

**IHC: imunoistoquímica**

**KD: kilodaltons**

**RH: receptores hormonais**

**H2O2: peróxido de hidrogénio a 3%**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Tipo de estudo e local de realização.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Cálculo Amostral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Crterios de incluso da amostra.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Método Imunoistoquímico.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5</b>	<b>Método Quantitativo.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Método Estatístico.....</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Aspectos Legais e Éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO B-Comprovante de submissão do Artigo Científico daDissertação como requisito para defesa.....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública, sendo estimados 27 milhões de casos novos no mundo para o ano de 2030 (INCA, 2016). O câncer de mama é a neoplasia que mais comumente acomete mulheres no mundo, após o câncer de pele não melanoma (HUANG et al., 2016). Para o ano de 2012, foram estimados mais de 1.600.000 casos novos e uma taxa de mortalidade de 522.000 casos pela doença (FERLAY et al., 2015).

A incidência do câncer de mama é mais elevada nas regiões mais desenvolvidas do mundo em comparação com as regiões em desenvolvimento e subdesenvolvidas, com uma variação de 27 casos por 100.000 mulheres na África Oriental para 96 casos por 100.000 mulheres na Europa Ocidental (FERLAY et al., 2015). Nos Estados Unidos, cerca de 1 em 8 mulheres será diagnosticado o câncer de mama ao longo da vida (BAN & GODELLAS, 2014), respondendo por 32% de todos os novos casos de câncer, sendo a segunda principal causa de morte por câncer, após o câncer do pulmão (HADJIISKI et al., 2006; VEISY et al., 2015).

No Brasil, país em desenvolvimento, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres após o câncer de pele não melanoma, com uma incidência anual crescente, tendo sido estimado para o ano de 2016, cerca de 57.960 casos novos e 14.207 mortes pela doença (INCA, 2016). A mortalidade devido ao carcinoma mamário diminuiu e estabilizou entre 1994 e 2009 nas regiões mais desenvolvidas do Brasil, sul e sudeste, com uma maior taxa de mortalidade relativa na região nordeste do Brasil devido à baixa cobertura mamográfica (VIACAVA et al., 2009; FREITAS-JÚNIOR et al., 2012).

O câncer de mama no Brasil, por ocasião da apresentação, é comumente diagnosticado em estágios avançados. Consoante, Trufelli et al., (2008), a maioria dos cânceres de mama diagnosticados no Brasil não são tumores iniciais, tendo sido diagnosticados tumores em estágios I, II, III, IV em 25.7%, 42.4%, 25.8%, e 6.1% dos casos, respectivamente. O estadiamento do carcinoma mamário, por ocasião do diagnóstico, adicionado ao comportamento biológico da neoplasia são importantes para prognóstico e sobrevida das mulheres (TANG & TSE, 2016).



A propósito, os carcinomas mamários invasivos são heterogêneos, pois são tumores que mostram características patológicas, moleculares e comportamento biológico distintos (ZARDAVAS et al., 2015). Do ponto de vista morfológico, há 21 subtipos distintos de carcinoma mamário invasivo, de acordo com a definição da classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (LAKHANI et al., 2012). A classificação morfológica, o grau histológico, o status do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2), juntamente com o estágio do tumor, são estratégias correntes usadas para orientar o manejo clínico da paciente (TANG & TSE, 2016).

Atualmente, as estratégias terapêuticas e prognósticas do carcinoma mamário têm levado em consideração a expressão dos receptores hormonais, como receptor de estrogênio, progesterona e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), através do trabalho pioneiro de Perou et al. (2000), permitindo por meio da expressão gênica a subclassificação molecular do carcinoma mamário em cinco subtipos, tais como, Luminal A, Luminal B, HER2 hiperexpresso e Tripló negativo (PEROU et al., 2000).

A classificação baseada no 13<sup>o</sup> Consenso Internacional de Experts de St. Gallen inclui os subtipos moleculares de câncer de mama Luminal A, Luminal B (HER2 negativo), Luminal B (HER2 positivo), HER2 hiperexpresso e tripló negativo, sendo a imunohistoquímica comumente usada para medir a expressão do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e Ki-67 (EOM et al., 2016). Todavia, consoante Goldhirschet al. (2013), além dos subtipos moleculares de câncer de mama incluindo os receptores hormonais (RH), HER-2 e Ki-67, acrescenta também o subtipo basalóide com outros biomarcadores (Quadro 1).

**Quadro 1** - Classificação molecular

- **Luminal A: RH(+), Her-2(-), Ki-67 < 14%**
- **Luminal B: RH(+), Her-2(-), Ki-67 > 14% ou**  
**RH(+), RP < 20%; ou RH(+), Her-2+**
- **Hiperexpressor de Her-2: RH(-), Her-2(+)**
- **Triplo negativo: RH(-), Her-2(-)**
- **Basalóide: p63, CK5, CK14, EGFR**

Fonte: Adaptado de GOLDHIRSCH et al. 2013

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). Todavia, a progressão e agressividade tumoral, comprometendo o prognóstico, muito depende do equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, determinantes chaves na progressão tumoral (DOWSETT et al., 1999). Em particular, a proliferação celular é de enorme importância na determinação da agressividade e do prognóstico, assim como da orientação terapêutica do câncer de mama (SCHOLOTTER et al., 2008). Portanto, o conhecimento sobre a cinética do ciclo celular é vital para a compreensão de inúmeros processos fisiológicos e/ou patológicos.

O ciclo celular é um evento complexo que sofre diversas influências e a perfeita coordenação entre suas diferentes fases (G1, S, G2, M) permitirá a passagem à etapa posterior apenas quando o evento precedente tiver ocorrido por completo. Dentre os reguladores do ciclo celular destaca-se a proteína p53, cuja mutação no gene que a codifica é a alteração mais encontrada nos cânceres (ELSTON et al., 1998). A proteína p53 controla a fase G1 do ciclo celular, todavia o gene que codifica esta proteína está frequentemente alterado nos cânceres, ocasionando perda da função e incapacidade de o ciclo celular de uma célula com

um DNA defeituoso, com transmissão desse erro genético às células filhas. As mutações no gene p53 estão associadas aos cânceres de mama com fenótipos biológicos mais agressivos e pior prognóstico, devido à elevada taxa de proliferação celular (ELSTON et al., 1998; PEREIRA, 2004).

A proliferação celular pode ser quantificada por meio de marcadores associados à proliferação celular, que podem ser amplamente estudados através de diversas técnicas (SPYRATOS et al., 2002). A contagem de mitoses por meio da microscopia óptica convencional é um método classicamente utilizado para determinar a atividade proliferativa de tecido normal e neoplásico (JALAVA et al., 2005), porém é um método que tem pouca reprodutibilidade e identifica somente a fase M do ciclo celular, levando à busca de métodos reprodutíveis capazes de identificar as demais fases do ciclo celular (DOWSETT et al., 1999; LINDBOE & TORP, 2002).

GERDES et al. (1983) descreveram um anticorpo monoclonal murinho denominado Ki-67, capaz de reconhecer um antígeno nuclear associado à proliferação. Após este estudo, iniciou-se o emprego de anticorpos monoclonais contra epítomos específicos do ciclo celular (LELLE et al., 1987).

O ki-67 é um anticorpo monoclonal de camundongo da classe IgG1 obtido da fração nuclear bruta das células de Sternberg-Reed de Hodgkin, derivado da linhagem celular L-428. Seu nome se deve à cidade de origem, Kiel, no oeste da Alemanha, e ao clone de produção do anticorpo obtido na 67ª placa de cultura (GERDES et al., 1983).

É um dos anticorpos mais utilizados e reage com uma proteína (antígeno) não histona, de peso molecular de 395 e 345 KD, localizada no núcleo, possivelmente associada ao nucléolo ou componentes fibrilares, presente em todas as fases ativas do ciclo celular, ou seja, G1, S, G2 e M, mas ausente em G0 (GERDES et al., 1984).

Proteína esta ou antígeno localizado no núcleo celular, que costumeiramente também é denominada antígeno ou proteína Ki-67 (LOPES-COSTA et al., 2010)

Tem aplicabilidade clínica como fator prognóstico na proliferação celular do carcinoma de mama, porém, este método apresenta como importante limitação o fato de poder ser usado apenas em material congelado, pois o anticorpo Ki-67 de primeira geração não foi capaz de identificar o epítipo antigênico nuclear em tecido fixado e parafinado. Provavelmente isto decorra da destruição de parte do antígeno pelo processo de fixação com formaldeído (GERDES et al., 1983).

Empregando-se partes recombinantes do antígeno Ki-67 e usando-se técnica de (SHI;KEY;KALRA, 1991) para a recuperação antigênica por meio de calor do forno de micro-ondas, vários anticorpos de segunda geração foram desenvolvidos. Além da equivalência ao anticorpo Ki-67 no tecido congelado, os clones Ki-S3, Ki-S5, MIB-1 e MIB-3 puderam ser empregados em tecido fixado e parafinado, sendo o MIB-1 o anticorpo mais utilizado na avaliação da expressão do antígeno Ki-67 em tecido mamário humano normal e neoplásico (WEIDNER et al., 1994; LEERS et al., 1997).

Os marcadores de proliferação, expressos como percentagem de células no ciclo celular, foram desenvolvidos e usados como discriminantes de fenótipos malignos mais agressivos e são geralmente expressos pela coloração imunoistoquímica (IHC) do antígeno Ki-67 do ciclo celular. Contudo, a melhor abordagem para a avaliação e interpretação do Ki-67 na prática clínica ainda é um assunto de debate entre os patologistas (PETRELLI et al., 2015). Todavia, o antígeno Ki-67 é uma proteína importante que pode estar envolvida na promoção da gênese e desenvolvimento do câncer de mama ao afetar a proliferação e migração de células cancerosas (YUAN et al., 2016).

Portanto, a expressão da proteína Ki-67 avaliada por imunoistoquímica é um

método importante na rotina de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sem plataformas biomoleculares, apesar das deficiências técnicas. Quando disponível, a classificação genômica é mais adequada para classificar os subtipos moleculares e determinar o prognóstico do câncer de mama tanto na configuração adjuvante quanto neoadjuvante (EL BENNA et al., 2015).

O subtipo molecular Luminal, no nosso meio, é classificado principalmente com base no nível de expressão de Ki-67, sendo o luminal A considerado um dos tumores menos agressivos por ter uma baixa proliferação celular. Por outro lado, o subtipo molecular triplo negativo de carcinomamamário mostra uma maior agressividade por apresentar uma maior taxa de proliferação celular (GLAJCAR et al., 2017), que é um ponto chave não só para o estabelecimento de estratégias prognósticas quanto para o planejamento terapêutico.

Todavia, até onde investigamos não encontramos estudos comparando a análise da expressão do antígeno Ki-67 entre um subtipo de câncer de mama considerado menos agressivo como luminal A e um mais agressivo como o triplo negativo com uma quantificação de pelo menos 600 células por caso, ou seja, mais precisa do que do que uma análise baseada em estimativa e isto nos levou ao desenho do presente estudo.

## **2. OBJETIVO**

---

Avaliar a comparação da expressão do antígeno Ki-67 entre os subtipos moleculares de carcinomas de mama Luminal A e Triplo Negativo.

### **3. METODOLOGIA**

---



### 3.1- Tipo do Estudo e Local da Realização:

Trata-se de um estudo envolvendo casos de carcinoma ductalinfiltrante de mama de pacientes atendidas no hospital Getúlio Vargas / Universidade Federal do Piauí e Hospital São Marcos nos últimos cinco anos, período de 2012 a 2017, na cidade de Teresina – Piauí. O estudo envolveu os blocos de 72 pacientes com câncer de mama, distribuídas em dois grupos: câncer Luminal A e triplo negativo, com características homogêneas em relação à idade da menarca, paridade, status menopausal, estadiamento clínico e heterogêneas em relação à média de idade e o status axilar (Tabela 1).

### 3.2- Cálculo Amostral:

Baseado nos objetivos do estudo, o cálculo do dimensionamento amostral foi realizado para testar duas médias amostrais independentes do mesmo tamanho (grupo de casos x grupo de controle). Assim, para comparar duas proporções supondo, com base na literatura, seus valores iguais a 25% e 60%, com poder de 80% e nível de significância de 5%, podemos utilizar a fórmula apresentada em Glantz (2002):

$$n = \frac{A \left[ 1 + \sqrt{1 + \frac{4\delta}{A}} \right]^2}{4\delta^2}$$

$$A = \left[ z_{\alpha(2)} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2$$

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2}$$

$$\delta = |p_1 - p_2|$$

com  $p_1=0,25$ ,  $p_2=0,6$ ;  $z_{\alpha(2)}=1.96$  e  $z_{1-\beta}=0,84$ . Nesse caso, obtemos  $n= 35,59$ , ou seja,

n=36 unidades amostrais por grupo.

Setenta e dois casos de carcinoma mamário, previamente fixados em formol a 10% e armazenados em blocos de parafina, foram histologicamente distribuídos em dois grupos de 36 casos, subtipo molecular triplo negativo e subtipo Luminal A, todavia por motivos técnicos, foram utilizados apenas 59 blocos, sendo 30 do subtipo Triplo negativo e 29 Luminal A.

Foram escolhidos de forma aleatória simples, entre todos os tumores que preencherem os critérios de inclusão, por intermédio de sorteio realizado pelo programa SPSS 20.0.

### **3.3- Critérios de Inclusão da Amostra:**

Somente carcinomas de mama do subtipo molecular luminal A e triplo negativo.

Os casos não submetidos a qualquer forma de tratamento prévio a cirurgia primária.

Tumores armazenados em blocos de parafina há no máximo cinco anos.

### **3.4- Método Imunoistoquímico:**

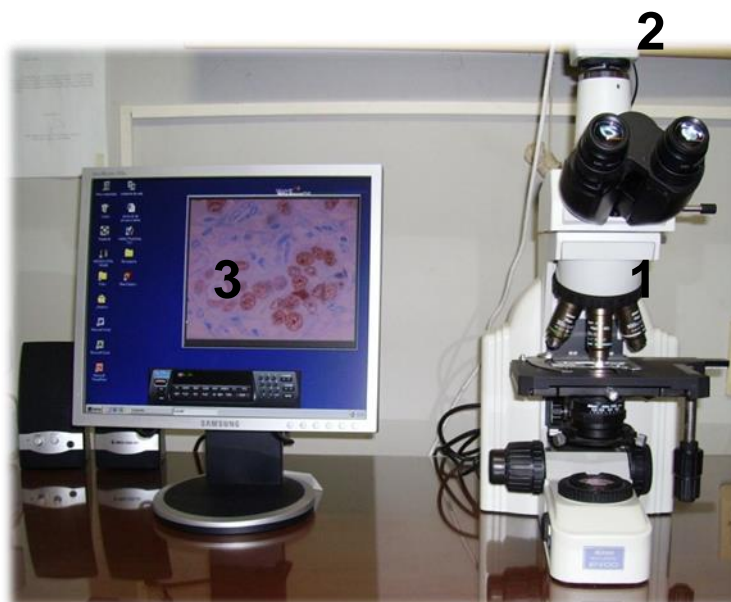
A imunoistoquímica para a avaliação da expressão da proteína Ki-67, utilizou amostras de câncer de mama fixadas em formalina tamponada que foram cortadas em secções de 3 micrômetros de espessura. Em seguida, as secções foram desparafinadas em xilol durante 5 min, desidratadas em etanol absoluto e lavadas em solução salina tamponada a pH 7,4 durante 5 min. Subsequentemente, as secções foram tratadas durante 5 min com peróxido de hidrogénio a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluído em solução tamponada para bloquear o peróxido endógeno. Para a recuperação do antigénio, as lâminas foram colocadas em racks contendo ácido cítrico a 0,21% (pH 6,0) e aquecidas num forno de microondas durante 15 min à potência máxima. Foi adicionada uma solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS-Tween) às lâminas depois de terem sido deixadas arrefecer

durante 20 min. As amostras de tecido foram incubadas durante a noite a 4-8 ° C com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 primário de rato (clone MIB1, Ref. M7240, Dako, Carpinteria, USA / 1: 4800), Ref. M0887, Dako, Carpinteria, USA / 1: 2000). As lâminas foram então lavadas com PBS-Tween e instiladas com reagente secundário (anti-ratinho BA 2000, Vector, Burlingame, EUA), incubadas durante 60 min à temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS-Tween e instiladas com a detecção ABC Elite (PK 6100, Vector, Burlingame USA), incubados durante 45 minutos à temperatura ambiente, lavados novamente com PBS-Tween, instilados com DAB (tetrahydroclorato de diaminobenzidina, Ref. D5637, Sigma, St. Louis, EUA) e incubados durante cinco minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contrastadas com hematoxilina, coradas com solução amoniacal, desidratadas com etanol absoluto, passadas através de frascos de Coplin contendo xilol e montadas em resina Permount. As células que expressaram as proteínas Ki-67 foram identificadas pela coloração castanho escuro do núcleo.

### **3.5- Método Quantitativo:**

Foi realizada utilizando um microscópio (Nikon Eclipse E-400, microscópio óptico, Tokyo, Japão) conectado a uma câmera de vídeo colorida (Samsung digital câmera CHC-370N, Seul, Coreia) que capturou a imagem e transmitiu a um computador equipado com o programa Imagelab, versão 2.3, desenvolvido pela Softium Informática Ltda. (São Paulo, Brasil) para a avaliação das imagens (Figura 1).

Para a expressão do antígeno Ki-67, foram contadas no mínimo 600 células coradas ou não, usando um aumento de 400x, iniciando pelas áreas com maior expressão das células marcadas. Em cada lâmina, a porcentagem de células foi obtida da razão entre o número de células com núcleo corado e o total de células, multiplicada por 100.



**Figura 1:** Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.

Fonte: Arquivo pessoal

### **3.6- Método Estatístico:**

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o teste t de Student para comparação das proporções médias de células coradas nos dois grupos (triplo negativo e Luminal A). As características das pacientes entre os dois grupos foram analisadas usando os testes não paramétrico de Mann-Whitney, teste exato de Fisher para variáveis categóricas e Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ).

### **3.7- Aspectos Legais e Éticos:**

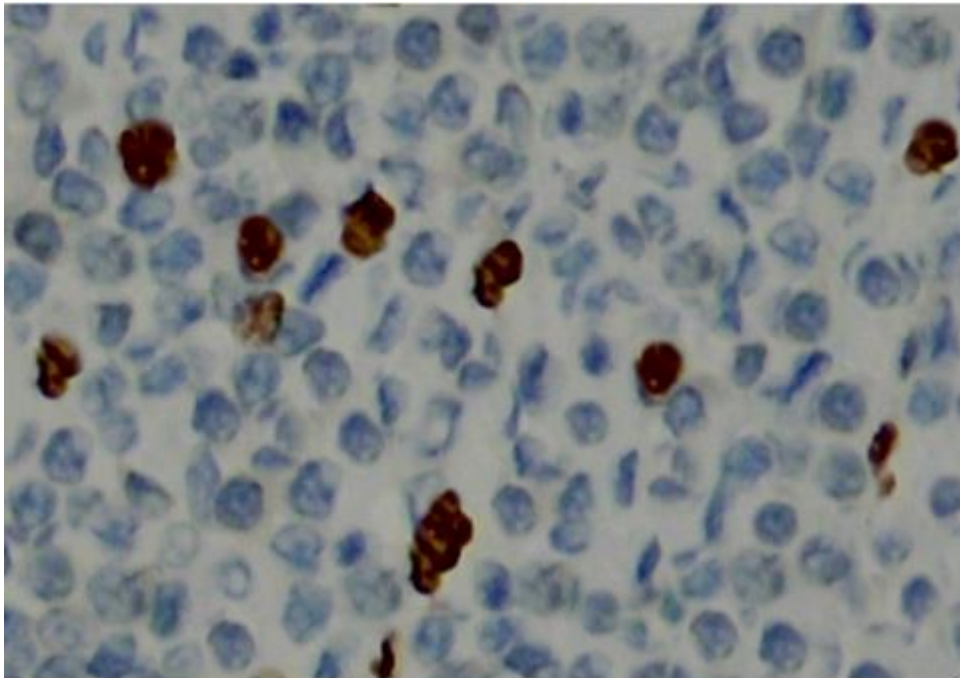
O trabalho foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí com um aditivo feito a um projeto guarda-chuva da linha de pesquisa do orientador intitulado “Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária”, sob o número de registro CAAE 43447015.8.0000.5214.

#### **4. RESULTADOS**

---

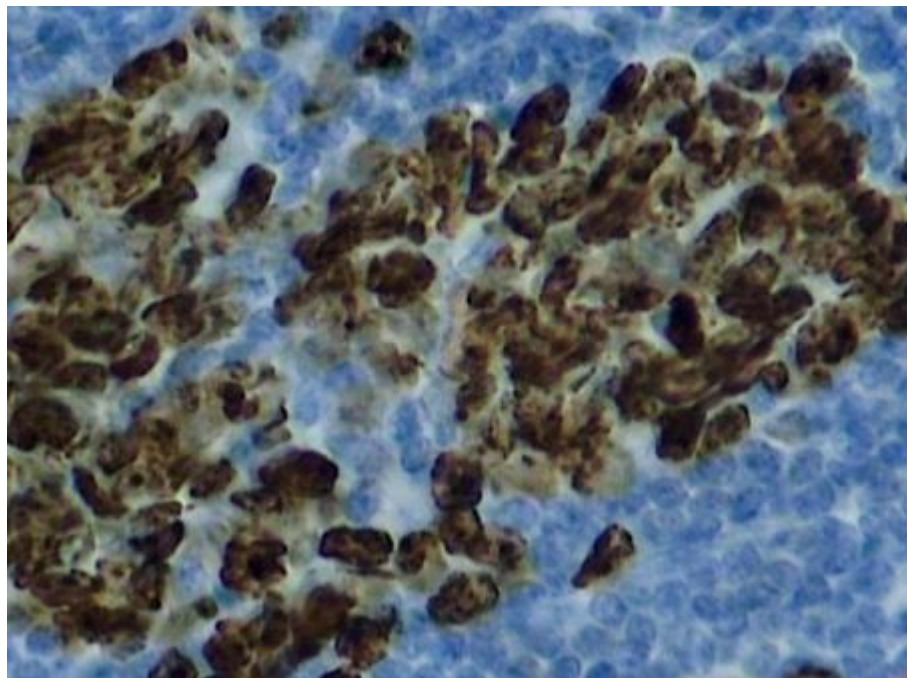
O estudo à microscopia de luz mostrou uma maior concentração de células com núcleos corados com anti-Ki-67 no grupo de carcinoma mamário do subtipo molecular Triplo negativo em comparação com o subtipo Luminal A (Figuras 2 e 3).

A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi 10,14 nos carcinomas de mama do subtipo Luminal A e 77,22 nos carcinomas de mama do subtipo Triplo negativo e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 1). Esta diferença está melhor enfatizada na mediana da porcentagem de núcleos corados entre os grupos de câncer de mama Luminal A e Triplo Negativo (Figura 4).



**Figura 2:** Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma mamário Luminal A mostrando escassa concentração de núcleos corados em marrom com expressão do antígeno Ki-67 (ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.



**Figura 3:** Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma Triplo negativo mostrando alta concentração de núcleos celulares com a expressão positiva do antígeno Ki-67 em comparação ao subtipo Luminal A (ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.



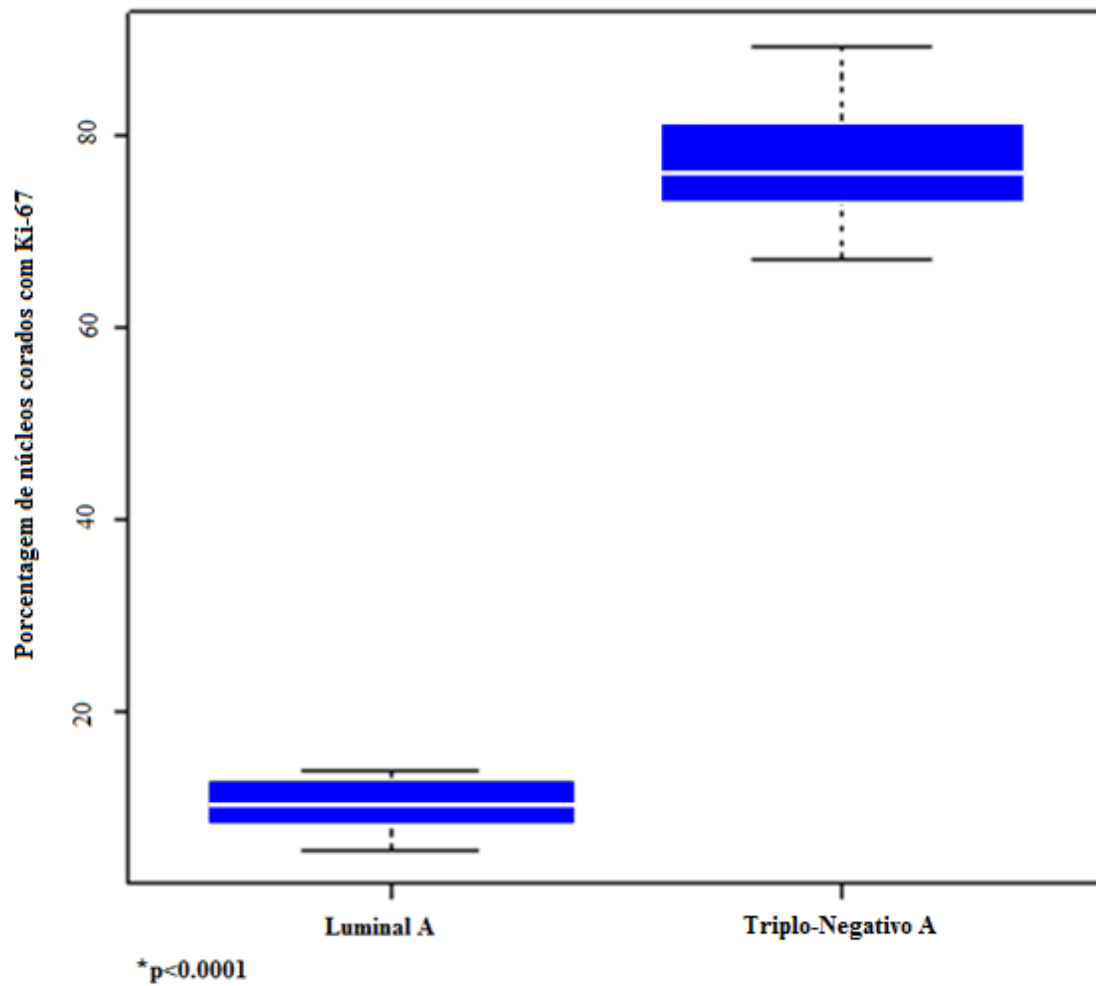
**Tabela 1:** Características das pacientes

	Luminal A (n=29)	Triplo- Negativo (n=30)	<i>P</i> 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	
Menopausal status			
sim	8	12	0.412
Não	21	18	
estádio			
I	19	18	1.000
II	8	9	
III	2	3	
Status axilar			
Positivo	4	14	0.010
Negativo	25	16	

**Tabela 2:** Porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 entre os casos de câncer 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 ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 4:** Boxplot da porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki-67 em carcinomas de mama do subtipo Luminal A e Triplo negativo.

## **5. DISCUSSÃO**

---

O câncer de mama é o câncer mais prevalente e a principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo e responde por cerca de 25% de todos os casos de câncer e 15% de todas as mortes por câncer em mulheres (YUAN et al., 2016). A sua classificação em subtipos moleculares é atualmente largamente aceita na prática clínica visando o estabelecimento de estratégias terapêuticas e prognósticas (TORRE et al., 2015).

Os subtipos moleculares são classificados de acordo com a expressão dos receptores hormonais (HR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) pelas diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). De acordo com as diretrizes da St. Gallen fatores adicionais estão envolvidos na classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama além de HR e HER2, incluindo principalmente o grau histológico e Ki-67 (HWANG et al., 2017).

Caldarella et al. (2013) avaliaram a distribuição dos subtipos moleculares de câncer de mama identificados com diferentes prognósticos e respostas moleculares em cânceres morfológicamente similares. Por meio da análise imunohistoquímica correntemente relatada em relatos de patologia de rotina, cinco subtipos foram definidos com base na expressão de ER ou PR, Ki-67 e HER2 consoante Goldhirschet al. (2013), os quais são luminal A ER/PR (positivos), HER2 negativo e Ki-67 menor que 14 %, luminal B (HER2 negativo) mostra ER/PR (positivos), HER2 negativo e Ki-67 maior a partir de 14 %, luminal B (HER2 positivo) apresenta ER/PR e HER2 positivos, tripló negativo mostra ER/PR (negativos) e HER2 negativo e HER2 hiperexpresso apresenta ER/PR (negativos) and HER2 positivo (CALDARELLA et al., 2013) .

A proliferação celular por meio do uso do antígeno Ki-67 tem se mostrado como um marcador prognóstico no câncer de mama que tem sido amplamente estudado, sendo que a alta expressão do Ki-67 demonstrou estar correlacionada com o maior tamanho tumoral, maior grau histológico, envolvimento de linfonodos e

menor sobrevida, contudo há poucos estudos avaliando o Ki-67 em cânceres triplos negativos e uma maior escassez de estudos fazendo a comparação da expressão do Ki-67 entre o triplo negativo e o Luminal A (KEAM et al., 2011; WANG et al, 2016).

No presente estudo, a análise da expressão do antígeno Ki-67 em pelo menos 600 células em cada caso mostrou uma maior proporção de núcleos positivos para o Ki-67 no subtipo molecular Triplo negativo em comparação com o Luminal A. Estes achados foram confirmados pela análise quantitativa do estudo imunoistoquímico, que mostrou uma porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki-67 significativamente maior no grupo Triplo negativo em comparação com o Luminal A. Os dois grupos de pacientes são homogêneos, exceto em relação à média de idade e o status axilar, que foram significativamente maior e positivo, respectivamente, no grupo triplo negativo.

O câncer de mama Luminal A possui receptores hormonais positivos, HER2 negativo e Ki-67 <14%, portanto um tumor de baixa proliferação e agressividade tumoral e que responde bem à endocrinoterapia, ao contrário do câncer de mama triplo negativo (TNBC), que é um subtipo agressivo em que há falta de uma terapêutica alvo eficaz (PAN et al., 2017).

A proliferação aberrante e a migração de células tumorais são uma característica da patologia tumoral durante a progressão do câncer. O 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 (YUAN et al., 2016). A propósito, o subtipo molecular triplo negativo de carcinoma mamário, ao contrário do Luminal A, mostra uma maior agressividade por apresentar um sistema de defesa intratumoral menos atuante e por conseguinte uma alta taxa de proliferação celular (GLAJCAR et al., 2017)

A Conferência de Consensus de St. Gallen de 2011 e 2013 adicionou o Ki-67 para determinação das taxas de proliferação aos marcadores para categorização dos subtipos de câncer de mama em luminal A, luminal B, assim como os tipos

*basal-like* triplo negativo e HER2 hiperexpresso. Estes subtipos moleculares de câncer de mama têm sido propostos para servir como indicadores de fator de risco e prognóstico, todavia o seu papel em avaliar risco e prognóstico de um paciente individual tem suas limitações (LYU et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

O Ki-67 tem emergido como um método rápido e não dispendioso para detectar a proliferação celular no câncer de mama. Apesar das controvérsias com relação ao valor do ki-67, há fortes evidências na literatura que mostram o valor do antígeno Ki-67 como um marcador preditivo e prognóstico (ELKABLAWY et al. 2016).

Atualmente, os cânceres de mama têm sido categorizados de acordo com Goldhirschet al. (2013) em luminal A e luminal B, assim como HER2 e triplo negativo. Receptor de estrogênio e receptor de progesterona foram definidos como positivos para células com coloração nuclear marrom maior que 10%, enquanto o HER2 foi definido como positivo mediante uma coloração +++ (três cruces) em mais de 30% de células tumorais invasivas e um resultado de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de mais de seis cópias de genes HER2, por outro lado um resultado negativo foi definido por uma imunistoquímica 0 ou + e FISH menor que quatro cópias do gene HER2 por núcleo (PRAT et al., 2010; GOLDBHIRSCHET al., 2013).

Por sua vez, Wang et al. (2016) para identificar as células Ki-67 tumorais positivas usaram o método descrito por Bukholmet al. (2003), em que usaram 10 campos aleatórios, sendo contados ao acaso 500 células com núcleos corados em marrom pelo o anticorpo anti-Ki-67. A seguir foram contadas as porcentagens de células Ki-67 positivas, sendo até 14% definido como baixa expressão e acima de 14%, considerada expressão elevada. Portanto, um pouco similar ao método de quantificação de células ki-67 positivas realizado neste estudo, em que foram contadas aleatoriamente no mínimo 600 células.

As características das pacientes deste estudo mostraram que as mulheres com câncer de mama triplo negativo e luminal A eram homogêneas, exceto com relação ao status axilar e a média de idade. O status axilar mostrou positividade estatisticamente significativa no câncer de mama triplo negativo em comparação com

o luminal A, o que está de acordo com os poucos estudos da literatura ao mostrar que o triplo negativo está associado uma maior proliferação celular, maior tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos e menor sobrevida em comparação com o luminal A (KEAM et al., 2011; WANG et al, 2016).

Por outro lado, a média de idade das pacientes deste estudo foi significativamente maior no grupo de mulheres com tumor triplo negativo, o que não está de acordo com o relato de Kolečková et al. (2017) que mostrou uma incidência significativamente maior de triplo negativo entre 20 e 39 anos de idade, todavia tal achado poderia ser justificado pelo tamanho amostral.

Os achados do presente estudo mostraram uma expressão do antígeno Ki-67 estatisticamente significante maior no câncer de mama triplo negativo em comparação com o luminal A, todavia a média de idade de mulheres com tumor triplo negativo, que é mais comum em mulheres mais jovens, foi maior que a média de idade das mulheres com luminal A, assim, devido a escassez de estudos sobre tema, há necessidade de futuros estudos com um tamanho amostral maior para se fazer uma melhor correlação.



## **6. CONCLUSÕES**

---

A expressão da proteína Ki-67 foi significativamente maior nos carcinomas de mama do subtipo molecular triplo negativo em comparação com o subtipo molecular luminal A.

## REFERÊNCIAS

---

- BAN, K.A.; GODELLAS, C.V. Epidemiology of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** v.23, n.3, p.409-22, 2014.
- BUKHOLM, I.R. et al. Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. **J ClinPathol.** v.56, n.5, p.368-73, 2003.
- CALDARELLA, A. et al. Biological characteristics of interval cancers: a role for biomarkers in the breast cancer screening. **J Cancer Res ClinOncol.**v.139, n.2, p.181-5.2013
- DOWSETT, M. et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer.**v.6, n.1, p.25-28, 1999.
- EL BENNA, H. et al. Ki-67: role in diagnosis, prognosis and follow-up after treatment of breast cancers. **Tunis Med.** v.93, n.12, p.737-41, 2015.
- ELKABLAWY, M.A. et al. Ki67 expression in breast cancer. Correlation with prognostic markers and clinicopathological parameters in Saudi patients. **Saudi Med J.** v.37, n.2, p.137-41, 2016.
- ELSTON, C.W. et al. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. – **The Breast.** 3<sup>a</sup> ed. Churchill Livingstone. P.385-433, 1998.
- EOM, Y.H et al. 2016. BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer. **J Breast Cancer.**v.19, n.3, p.252-260, 2016.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer.** v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.
- FREITAS-JUNIOR, R. et al. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics (Sao Paulo).** v.67, n.7, p.731-7, 2012.
- GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol.**v.133, n.4, p.1710-5, 1984.

- GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**. v.31, p.1, p.13-20, 1983.
- GLAJCAR, A. et al. The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. **Virchows Arch**. v.470, n.5, p.505-515, 2017.
- GOLDHIRSCH, A. 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.
- HADJIISKI, L. et al. Breast masses: computer-aided diagnosis with serial mammograms. **Radiology**. v. 240, n.2, p. 343 -356, 2006.
- HUANG, S. et al. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis. **Genome Med**. v. 8, n.1, p. 34, 2016.
- HWANG, K.T. et al. Prognostic Influence of BCL2 on Molecular Subtypes of Breast Cancer. **J Breast Cancer**. v.20, n.1, p.54-64, 2017.
- 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>.
- JALAVA, P. et al. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cut points. **Anticancer Res**. v.25, n.3c, p.2535-42, 2005.
- KEAM B. et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. **Breast Cancer Res**. v.13, n.2, p.R22, 2011.
- KOLEČKOVÁ, M. et al. Age-associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. **Oncol Lett**. v.13, n.6, p.4201-4207, 2017.
- LAKHANI, S.R. et al. World Health Organization Classification of Tumours of the Breast. **Lyon, France: IARC press**; 2012.

LELLÉ, R.J. et al. Determination of growth fractions in benign breast disease (BBD) with monoclonal antibody Ki-67. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.113, n.1, p.73-7, 1987

LINDBOE, C.F.; TORP, S.H. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. **J Clin Pathol.** V.55, n.6, p.467-7, 2002.

LIU, Y. et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. **Breast Cancer Res Treat.** v.129, n.1, p.175-84, 2011.

LOPES-COSTA, P.V. et al. Cell Prolif. Evaluation of Ki-67 and Bcl-2 antigen expression in breast carcinomas of women treated with raloxifene. **Cell Prolif.** v.43, n.2, p.124-9, 2010.

PAN, Y. et al. P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. **PLoS One.** v.12, n.2, p.e0172324, 2017.

PEREIRA, F.E.L. degenerações-Morte celular-Alterações do interstício. In: FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia Geral.** Guanabara-koogan. P. 44-82, 2004.

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

PETRELLI, F. et al. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast Cancer Res Treat.** v.153, n.3, p.477-91, 2015.

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

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res.** v.12, n.5, p.R68, 2010.

SCHOLOTTER, C.M. et al. Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. **Breast Cancer Res.** v.10, n.4, p.211, 2008.

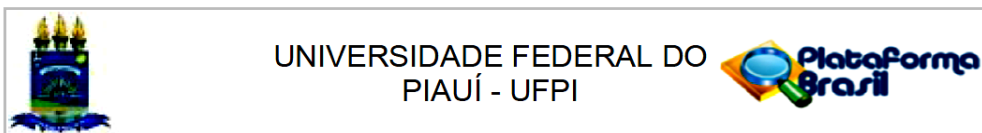
SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem.** v.39, n.6, p.741-8, 1991.

- SPYRATOS, F. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. **Cancer**. v.94, n.8, p.2151-9, 2002.
- TANG, P.; TSE, G.M. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. **Arch Pathol Lab Med**. v.140, n.8, p.806-14, 2016.
- TORRE, L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**. v.65, n.2, p.87-108, 2015
- TRUFELLI, D.C. et al. Analysis of delays in diagnosis and treatment of breast cancer patients at a public hospital. **Rev Assoc Med Bras**. v.54, n.1, p.72-6, 2008.
- VEISY, A. et al. Risk of breast cancer in relation to reproductive factors in North-West of Iran, 2013-2014. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 16, n.2, p. 451-455, 2015.
- VIACAVA, F.; SOUZA-JUNIOR, P.R.; MOREIRA, R.S. Estimates of mammography coverage according to health surveys in Brazil. **Rev Saude Publica**. v.43, n.2, p.117-25, 2009.
- WANG, W. et al. Prognostic and predictive value of Ki-67 in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**. v.7, n.21, p.31079-87, 2016.
- WEIDNER, N.; MOORE, D.H.; VARTANIAN, R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody. **Hum Pathol**. v.25, n.4, p.337-42, 1994.
- YUAN, P. et al. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. **Oncol Lett**. Mar; v.11, n.3, p.2101-2105, 2016.
- ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nat Rev Clin Oncol**. v.12, n.7, p.381-94, 2015.
- ZHOU, W. et al. Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. **BMC Cancer**. v.13, p.512, 2013.





## 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

## ANEXO B- Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa

### MEDO-D-17-01317 - Submission Confirmation

---



De **Medical Oncology (MEDO)**   
Remetente [em.medo.0.54bb52.449f679b@editorialmanager.com](mailto:em.medo.0.54bb52.449f679b@editorialmanager.com)   
Para [Benedito Borges da Silva](#)   
Data Hoje Dom. 16:08

Dear Professor da Silva,

Thank you for submitting your manuscript, A comparative study of Ki-67 antigen expression between luminal A and triple-negative subtypes of breast cancer, to Medical Oncology.

The submission id is: MEDO-D-17-01317

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://medo.edmgr.com/>

Your username is: bborges

Your password is: available at this

link [http://medo.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstn  
ame=Benedito&lastname=da++Silva&email address=beneditoborges@globo.c  
om](http://medo.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Benedito&lastname=da++Silva&email%20address=beneditoborges@globocom)

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Medical Oncology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.