



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYARA BOCCHI

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki67 E p53:
MARCADORES DE AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE
MAMA EM PACIENTES JOVENS**

Londrina
2019

MAYARA BOCCHI

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki67 E p53:
MARCADORES DE AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE
MAMA EM PACIENTES JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B664	<p>Bocchi, Mayara. Expressão das proteínas Ki67 e p53: marcadores de agressividade do câncer de mama em pacientes jovens / Mayara Bocchi. - Londrina, 2019. 53 f. : il.</p> <p>Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe. Coorientador: Marla Karine Amarante.) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Câncer de mama - 2. Receptores hormonais - 3. Detecção precoce - 4. Parâmetros clinicopatológicos - I. Ehara Watanabe, Maria Angelica. II. Amarante, Marla Karine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 61</p>
------	---

MAYARA BOCCHI

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Ki67 E p53:
MARCADORES DE AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE MAMA EM
PACIENTES JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Carolina Batista Ariza
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Londrina, 26 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela sabedoria e força para conquistar mais uma etapa da minha vida. Por sempre estar ao meu lado sempre, cuidando dos meus passos e me abençoando.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe**, pelo voto de confiança e oportunidade de fazer parte desta equipe. Por ser esse exemplo de mulher maravilhosa, que sempre luta por todos nós. Uma verdadeira mãe científica. Obrigada pela dedicação, conhecimento e carinho. Serei eternamente grata por Deus ter enviado à senhora para fazer parte da minha vida.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Marla Karine Amarante**, por sua orientação, dedicação e por todos os seus conselhos. Agradeço a sua amizade e seu carinho. É uma honra poder trabalhar com você.

À banca examinadora, **Profa. Dra. Danielle Venturini** e **Profa. Dra. Carolina Batista Ariza**, que generosamente aceitaram o convite para a avaliação e correção do presente trabalho, contribuindo com todo o seu conhecimento e experiência. Muito obrigada!

Aos amigos **Alberto Yoichi Sakaguchi**, **Caroline Yukari Motoori Fernandes**, **Glauco Akelington Freire Vitiello**, **Luiz Henrique Fernandes Spolador**, **Mariana Ussó Campaner**, **Mariana de Oliveira Pinsetta**, **Matheus Dominato Munuera**, **Nathália de Sousa Pereira**, **Sarah Lott Moretto**, **Vânia Darc de Castro**; agradeço pelo companheirismo, por toda a ajuda, conselhos e pelos excelentes momentos que passamos juntos. Obrigada por fazerem parte da minha família científica.

Aos meus pais, **Sueli Michelângelo Bocchi** e **Edson Bocchi**. Obrigada por sempre me incentivarem buscar conhecimento e por acreditarem no meu potencial. Pelos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse ter um futuro melhor. Pelos puxões de orelha quando necessários, por não me deixarem desistir dos meus sonhos, por ouvirem meus desabafos e por me aconselharem. Vocês são meu porto seguro. Agradeço também a minha irmã, **Mayra Bocchi**, pela companhia, amizade e por sempre torcer pela minha felicidade. Amo muito vocês!

Ao meu noivo, **Eduardo Vignoto Fernandes**, pelo companheirismo, ajuda e conselhos. Por sempre me apoiar e torcer por mim. Obrigada por sempre

estar ao meu lado, por cuidar de mim e por me fazer a mulher mais feliz desse mundo. Te amo!

Às agências de fomento, **Universidade sem Fronteiras** - Fundo Paraná, Programa de Extensão da Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Fundação Araucária, Pró-Reitoria de Extensão/Universidade Estadual de Londrina, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

À todas as **pacientes** que generosamente aceitaram participar desse estudo. Muito obrigada!

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

BOCCHI, Mayara. **Expressão das proteínas Ki67 e p53:** marcadores de agressividade do câncer de mama em pacientes jovens. 2019. 53 f. Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A importância do câncer de mama em mulheres jovens emergiu em todo o mundo como um fator prognóstico negativo independente. Além disso, em comparação com pacientes com idade mais avançada, as pacientes jovens com câncer de mama apresentam um curso mais agressivo, prognóstico menos favorável e piores taxas de sobrevivência. Sendo assim, o conhecimento sobre biomarcadores preditivos para o câncer de mama podem auxiliar no diagnóstico precoce dessas pacientes jovens. Este trabalho teve como objetivo verificar o percentual de mulheres jovens acometidas pelo câncer de mama e avaliar a associação entre parâmetros clinicopatológicos e a idade. Um total de 233 amostras de tumor primário de pacientes com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Londrina, foram analisadas quanto as seguintes características clinicopatológicas: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), tamanho do tumor, acometimento de linfonodos/metástases, grau histológico (GH), índice de proliferação celular (Ki67) e proteína p53 em relação a idade. Foi verificado que 44 pacientes (18,9%) apresentaram idade inferior a 44 anos e foi encontrada associação entre a idade jovem e a positividade para o marcador p53 ($p = 0,017$). A idade jovem (<44 anos) também foi relacionada com um índice de proliferação celular elevado (Ki67 > 30%) ($p = 0,014$) como também com as características clinicopatológicas mais agressivas do tumor, como negatividade para RE e RP ($p = 0,001$), positividade para superexpressão de HER2 ($p = 0,010$), grau histológico mais elevado ($p = 0,001$), tamanho do tumor > 3,0 cm ($p = 0,001$) e positividade para p53 ($p = 0,010$). Quanto aos subtipos de câncer de mama, foi encontrado que o Luminal A e o Triplo-negativo estavam associados com o Ki67 $\leq 15\%$ (baixo) e Ki67 > 30% (alto), respectivamente ($p < 0,001$). A crescente incidência do câncer de mama e mortalidade de mulheres jovens latino-americanas merece atenção dos órgãos de Saúde Pública. Portanto, torna-se cada vez mais necessário promover estratégias de detecção e diagnóstico precoce do câncer de mama. O presente estudo demonstrou que as proteínas Ki67 e p53 podem ser utilizadas como marcadores de agressividade no câncer de mama em pacientes jovens.

Palavras-chave: Câncer de mama. Receptores hormonais. Detecção precoce. Parâmetros clinicopatológicos.

BOCCHI, Mayara. **Expression of Ki67 and p53 proteins: breast cancer aggressivity markers in young patients.** 2019. 53 p. Master's degree in Clinical and Laboratory Physiopathology – Londrina State University, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The importance of breast cancer (BC) in young women emerged in all over the world as an independent negative prognostic factor. Besides that, in comparison to patients with an advanced age, young patients with BC presents a more aggressive clinical course, less favorable prognose and worse survival rate. Therefore, knowledge about predictive biomarkers for BC can help in the early diagnosis of these young patients. This study aimed to verify the percentage of young women diagnosed with BC and to evaluate the association between clinicalpathological parameters and age. A total of 233 primary tumor samples from BC patients, treated at Londrina Cancer Hospital, were analyzed for the following clinicalpathological features: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor 2 receptor (HER2), tumor size, lymph nodes involvement, histological grade, cell proliferation index (Ki67) and status of p53 protein in relation to age. It was found that 44 patients (18.9%) presented age under 44 years old and an association was found between young age and positivity for p53 marker ($p = 0.017$). Young age (< 44 years old) was also related to a high cell proliferation index ($Ki67 > 30\%$) ($p = 0.014$) as well as the most aggressive clinicopathological features, such as negativity for ER and PR ($p = 0.001$), positivity for HER2 overexpression ($p = 0.010$), highest histological grade ($p = 0.001$), tumor size > 3.0 cm ($p = 0.001$) and positivity for p53 ($p = 0.010$). For BC subtypes, it was found that Luminal A and Triple-negative were associated with $Ki67 \leq 15\%$ (low) and $Ki67 > 30\%$ (high), respectively ($p < 0.001$). The increasing incidence of breast cancer and mortality in young Latin American women deserves attention from public health agencies. Therefore, it is becoming increasingly necessary to promote early detection and diagnosis strategies for breast cancer. From these data, the present study demonstrated that the proteins Ki67 and p53 can be used as markers of aggressiveness in BC in young patients.

Keywords: Breast cancer. Hormonal receptor. Early detection. Clinicopathological parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Aspecto imunohistoquímico de tumor de mama positivo para proteína p5323
- Figura 2** – Coloração imunohistoquímica para Ki67, usando o clone MIB-125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação clínica de tumores quanto ao tamanho (T).....	17
Tabela 2 – Classificação clínica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (N).....	17
Tabela 3 – Classificação de metástases em câncer de mama (M).....	17
Tabela 4 – Estadiamento clínico de câncer de mama.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
h	Hora
BRCA1	Gene do Câncer de Mama 1 (<i>Breast Cancer Gene 1</i>)
BRCA2	Gene do Câncer de Mama 2 (<i>Breast Cancer Gene 2</i>)
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>)
GH	Grau de Diferenciação Histológica
HER2	Receptor Do Fator De Crescimento Epidermal Humano tipo 2 (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ki67	Índice de Proliferação Celular (<i>Cell Proliferation Index</i>)
NAC	Quimioterapia Neoadjuvante
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína do Gene Supressor de Tumor (<i>tumor suppressor gene protein</i>)
RE	Receptor de estrogênio (<i>estrogen receptor</i>)
RP	Receptor de progesterona (<i>progesterone receptor</i>)
UICC	União Internacional de Controle ao Câncer
TN	Triplo-negativo
TNM	Sistema Tumor-Nódulo-Metástase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	CARCINOMA MAMÁRIO	14
2.1.1	Classificação Morfológica e Clínica do Câncer de Mama	15
2.1.2	Subtipos Moleculares do Câncer de Mama	18
2.2	CÂNCER DE MAMA EM MULHERES JOVENS	20
2.3	PROTEÍNA P53	22
2.4	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (KI67)	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVOS GERAIS	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	IMUNOHISTOQUÍMICA	27
4.2	ANÁLISE DOS DADOS	27
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	29
6	CONCLUSÃO	40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXOS	48
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina	48
	ANEXO B – Parecer do Hospital do Câncer de Londrina	53

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética cuja evolução conduz a inúmeras alterações no DNA. Dentre os diferentes tipos de câncer, o de mama é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com aproximadamente 627 mil óbitos estimados para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Apesar de ser considerado um tumor relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por esta doença continuam elevadas no Brasil (14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2017) (INCA, 2018).

Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver essa doença, dentre eles podemos destacar a idade. Porém, apesar de a idade ser considerada um fator de risco para o câncer de mama, estudos têm mostrado uma alta porcentagem de mulheres jovens acometidas por essa doença. Em âmbito mundial, a proporção em mulheres com idade inferior a 40 anos e 44 anos é de 11% e 20%, respectivamente (BRAY et al., 2018). Para esse grupo de pacientes, são recomendadas estratégias para diagnóstico e reconhecimento precoce, a fim de melhor atender suas necessidades multifacetadas.

O índice de proliferação celular (Ki67) e o p53 (proteína do gene supressor de tumor) são proteínas não histonas essenciais para o ciclo celular. Um alto Ki67 e mutações em p53 estão relacionadas com a proliferação celular desordenada, portanto, podem indicar um mau prognóstico em pacientes com câncer de mama, estando associadas com maiores taxas de recorrência e morte (PETITJEAN et al., 2007; MORIMOTO et al., 2008). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se as proteínas Ki67 e p53 podem ser utilizadas como marcadores de agressividade no câncer de mama em mulheres jovens.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A incidência e mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial. Em âmbito mundial, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, para o ano de 2040, podem-se esperar quase 30 milhões de casos de câncer e cerca de 17 milhões de mortes por esta doença. Já para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estimou para o biênio 2018-2019, cerca de 600 mil novos casos de câncer para cada ano (INCA, 2018).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, as neoplasias corresponderam a segunda principal causa de mortalidade (18,2%) no Brasil em 2016, seguida apenas de doenças cardiovasculares, com 29,7% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O aumento da incidência desta doença afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento devido a diversos fatores, dentre os quais se destacam o aumento da expectativa de vida, e conseqüentemente envelhecimento populacional, além da crescente exposição a fatores de risco (INCA, 2018).

O câncer caracteriza-se pela proliferação desregulada de células e surge a partir de alterações essenciais na fisiologia celular, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento dos tumores malignos. Dentre as alterações essenciais podem ser citadas: suficiência em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão à apoptose e do sistema imunológico, potencial ilimitado de replicação, angiogênese aumentada, indução de processo inflamatório, desregulação do metabolismo energético, instabilidade genômica, invasão tecidual e disseminação à distância (metástase) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Embora a célula tumoral represente o principal foco no desenvolvimento de uma neoplasia, é importante considerar que a massa tumoral não é composta apenas de células neoplásicas, mas de um conjunto de células tumorais e elementos não neoplásicos, tais como células mesenquimais e componentes dos sistemas vascular e imunológico, que contribuem substancialmente para a carcinogênese, progressão tumoral e metástase das células transformadas (KERKAR e RESTIFO, 2012). A interação entre os tumores e seu microambiente é complexa e difícil de decifrar e sua compreensão é

fundamental para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas (FRIDMAN et al., 2012).

2.1 Carcinoma Mamário

O câncer de mama é um relevante problema de saúde pública, considerando o número de mulheres que são diagnosticadas e de óbitos que acontecem anualmente por esta doença. De acordo com as últimas estatísticas mundiais do GLOBOCAN 2018, foram estimados 2,1 milhões de casos novos de câncer e 627 mil óbitos pela doença (BRAY et al., 2018). No Brasil, a estimativa do biênio 2018-2019 é de cerca de 59.700 novos casos para cada ano. Com exceção dos tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100mil), Sudeste (69,50/100mil), Centro-Oeste (51,96/100mil) e Nordeste (40,36/100mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100mil), seguido apenas pelo câncer de colo de útero (INCA, 2018).

A taxa de sobrevida em cinco anos no Brasil aumentou entre os períodos de 1995 a 1999 e 2005 a 2009 (de 78% para 87%) (ALLEMANI et al., 2015), corroborando com as taxas de sobrevida em países desenvolvidos, com aproximadamente 85% durante o período de 2005 a 2009. Esse aumento se deve a melhorias no rastreamento da população, levando ao aumento da detecção precoce, e a utilização de terapias mais eficazes (STEWART e WILD, 2014). Já em países de baixa e média renda, o câncer de mama é detectado em estágios mais avançados, reduzindo significativamente a sobrevida das pacientes (INCA, 2018).

São diversos os diversos fatores que estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver essa doença, tais como: idade, fatores hereditários, fatores hormonais e fatores comportamentais/ambientais (TRICHOPOULOS et al., 2008). O envelhecimento é um fator de risco importante para o câncer de mama, sendo a incidência maior em mulheres acima dos 40 anos de idade (SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2017). Geralmente, mulheres diagnosticadas nessa faixa etária apresentam porcentagem aumentada do receptor de estrogênio (RE) positivo (BAN e GODELLAS, 2014).

Atualmente, estima-se que cerca de 5% a 10% dos cânceres de mama estejam associados à predisposição hereditária (INCA 2018). O risco de

desenvolver a doença se torna 2,5 vezes maior em mulheres com dois ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama (BREWER, et al., 2017). A suscetibilidade herdada pode ser atribuída a mutações germinativas em genes autossômicos dominantes de alta penetrância, como os genes *BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer gen 1 e 2*) (FRANCKEN et al., 2013).

Os fatores hormonais estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com o aumento do risco quanto maior for a exposição. Esses fatores incluem: história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos), menopausa tardia (após 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade, uso de contraceptivos orais (estrogênio-progesterona) e a terapia de reposição hormonal pós-menopausa (INCA, 2018).

Os fatores comportamentais e ambientais incluem o uso excessivo de bebida alcoólica, sobrepeso e obesidade na pós-menopausa e a exposição à radiação ionizante (MAKAREM, et al., 2013; JUNG, et al., 2016; INCA, 2018). O risco de câncer de mama devido à radiação ionizante é proporcional à dose e à frequência (TRICHOPOULOS et al., 2008). O tabaco tem sido reconhecido pelo *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como um agente carcinogênico com limitada evidência de aumento do risco de câncer de mama em humanos (IARC, 2016).

A apresentação do câncer de mama é bastante heterogênea, tratando-se de um conjunto de doenças distintas em etiologia e comportamento clínico (POLYAK, 2007). Esta heterogeneidade representa um desafio, surgindo à necessidade de categorizar os pacientes como forma de guiar o manejo clínico e a escolha do tratamento apropriado para cada paciente (TAHERIAN-FARD, SRIHARI e RAGAN, 2015).

2.1.1 Classificação morfológica e clínica do câncer de mama

Os tumores de mama podem ser classificados de acordo com o tipo de célula e a sua forma de organização no tumor. Cerca de 95% das malignidades mamárias são adenocarcinomas, divididos em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos (KUMAR et al., 2010) que diferem entre si pelo comportamento das células tumorais. O carcinoma *in situ* refere-se a uma proliferação neoplásica que se restringe a membrana basal. Quando as células tumorais rompem a membrana

basal e invadem o estroma mamário, é caracterizado como carcinoma invasivo (JAAFAR, 2015).

De acordo com a análise histológica, o carcinoma invasivo e o carcinoma *in situ* podem ser categorizados em diferentes subtipos, sendo os principais os carcinomas ductais e os carcinomas lobulares. Existem outros subtipos como o carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso, entre outros, porém são menos frequentemente observados na clínica (JAAFAR, 2015). Os tumores ductais se desenvolvem dos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores. Já os tumores lobulares se desenvolvem nos lóbulos e representam de 10 a 15% dos casos (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

O grau de diferenciação histológica (GH) é um método prognóstico para classificar carcinomas de mama com base na avaliação dos níveis de pleomorfismos nucleares, formação glandular/tubular e índice mitótico. Com base nesses parâmetros, o tumor é classificado em I, II ou III, no qual o I indica maior diferenciação histológica e, portanto, apresenta melhor prognóstico por assemelhar-se ao tecido de mama normal, enquanto o grau III corresponde ao tecido menos diferenciado e assemelha-se às células-tronco, indicando, portanto, pior prognóstico para a paciente (LESTER et al., 2009).

O estadiamento do câncer de mama tem grande importância no prognóstico e no tratamento de cada paciente. O sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), é o sistema de estadiamento mais amplamente utilizado no mundo (AJCC, 2010), o qual se baseia na extensão anatômica da doença. Os tumores primários são classificados considerando o tamanho do tumor (T), o acometimento de linfonodos (N) conforme a cadeia de drenagem linfática comprometida e na presença ou ausência de metástases (M) (AJCC, 2010). As tabelas 1, 2 e 3 apresentam a classificação Tumor-Nódulo-Metástase.

A avaliação desses parâmetros permite a classificação do estadiamento que varia de 0 a IV, conforme demonstra a Tabela 4 (AJCC, 2010).

Tabela 1 - Classificação clínica de tumores quanto ao tamanho (T)

Classificação	Característica
Tx	Tamanho tumoral não avaliado.
T0	Sem evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor com até 2 cm em sua maior dimensão.
T1mic	Carcinoma microinvasor.
T1a	Tumor com até 0,5 cm em sua maior dimensão.
T1b	Tumor maior que 0,5cm e com até 1cm em sua maior dimensão.
T1c	Tumor maior que 1cm e com até 2cm em sua maior dimensão.
T2	Tumor maior que 2 cm e com até 5cm em sua maior dimensão.
T3	Tumor maior que 5 cm em sua maior dimensão.
T4	Qualquer tamanho com extensão para pele ou parede torácica (acometimento do músculo grande peitoral não caracteriza T4).
T4a	Extensão para parede torácica.
T4b	Edema, ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites na mesma mama.
T4c	Associação de T4a e T4b.
T4d	Carcinoma inflamatório.

Fonte: AJCC (2010)

Tabela 2 - Classificação clínica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (N)

Classificação	Característica
Nx	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados.
N0	Ausência de metástases.
N1	Linfonodos homolaterais móveis comprometidos.
N2	N2a ou N2b.
N2a	Metástase para linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas.
N2b	Metástases clinicamente aparentes somente em linfonodos da cadeia mamária interna homolateral sem evidência clínica de metástase axilar.
N3	N3a, N3b ou N3c.
N3a	Metástase para linfonodos infraclaviculares homolaterais.
N3b	Metástase para linfonodos da cadeia mamária interna homolateral e para linfonodos axilares.
N3c	Metástase para linfonodos supraclaviculares homolaterais.

Fonte: AJCC (2010)

Tabela 3 - Classificação de metástases em câncer de mama (M)

Classificação	Característica
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Presença de metástase à distância.

Fonte: AJCC (2010)

Tabela 4 - Estadiamento clínico de câncer de mama

Estadiamento	Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à Distância (M)
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T0, T1	N1mi	M0
Estadio IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer T	M1

Fonte: AJCC (2010)

2.1.2 Subtipos moleculares do câncer de mama

O câncer de mama era classificado essencialmente em função da sua morfologia até o final da década de 1990. Entretanto, em 2000, Perou e colaboradores observaram que tumores com os mesmos tipo e grau histológico, diagnosticados no mesmo estágio apresentavam prognósticos diferentes e respondiam diferentemente aos tratamentos. Sendo assim, propuseram uma divisão para o câncer de mama em subgrupos distintos, com base em similaridades nos perfis de expressão gênica, usando a tecnologia de *microarrays*. Inicialmente foram identificados 4 subtipos moleculares: Luminal, HER2 superexpresso, basaloide e *normal-like* (PEROU et al., 2000; SØRLIE, et al., 2001).

Análises posteriores revelaram que o subtipo Luminal poderia ser subdividido em Luminal A e Luminal B. Um sexto subtipo, denominado claudina baixa, foi identificado mais recentemente, e seu fenótipo remete a células tronco tumorais. Tal classificação revela a heterogeneidade de carcinomas mamários e permite delinear tratamentos específicos para cada subtipo, utilizando moléculas expressas nesses tumores como alvos terapêuticos (EROLEs et al., 2012).

O subtipo Luminal A representa uma frequência de 30% a 40% de todos os cânceres de mama (FRAGOMENI, SCIALLI, JERUSS, 2018). Este subtipo geralmente está associado a um prognóstico altamente favorável,

apresentando a melhor taxa de sobrevida quando comparado com outros subtipos de tumor (TSOUTSOU et al., 2017). O perfil imunohistoquímico deste subtipo é caracterizado pela positividade para o receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), negatividade para a superexpressão do HER2 (Receptor Do Fator De Crescimento Epidermal Humano tipo 2) e Ki67 inferior a 20% (CHEANG et al., 2009; PRAT et al., 2013).

Os tumores de mama Luminal B estão associados a um prognóstico intermediário quando comparado ao subtipo molecular Luminal A, representando 20% a 30% dos cânceres de mama (FRAGOMENI, SCIAL LIS, JERUSS, 2018). São caracterizados pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais e positividade para a superexpressão do HER2, porém alguns tumores desse subtipo podem ser negativos para a superexpressão desse gene. Além disso, apresentam Ki67 maior que 20% (CHEANG et al., 2009). Devido ao aumento de expressão de genes relacionados à proliferação celular, os tumores Luminais B são mais agressivos quando comparados ao Luminal A (SØRLIE et al., 2001).

As pacientes que apresentam expressão tumoral de receptores hormonais (RE e RP), ou seja, pacientes com os subtipos Luminal A ou Luminal B, fazem uso da terapia com antiestrogênios, como o tamoxifeno ou inibidores da aromatase moduladores do receptor de estrogênio. O uso dessa terapia reduz a recorrência da doença e melhora a sobrevida geral de mulheres com câncer de mama (SLEDGE et al., 2014).

A superexpressão do oncogene *HER2* caracteriza o subtipo HER2 positivo, apresentando uma frequência de 12 a 20% dos tumores de mama (FRAGOMENI, SCIAL LIS, JERUSS, 2018). Este subtipo está associado a uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama (SØRLIE, T. et al., 2001), porém o advento do anticorpo monoclonal humanizado, o transtuzumabe, melhorou o curso natural desse subtipo da doença (ROMOND et al., 2005).

Representando 15% a 20% de todos os cânceres de mama, o subtipo basaloide ou *basal-like*, também conhecido como Triplo-negativo (TN), é definido pela ausência de expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e HER2 (FRAGOMENI, SCIAL LIS, JERUSS, 2018). Os perfis de expressão desse subtipo incluem além da falta ou baixa expressão de receptores hormonais e HER2, a alta expressão de marcadores basais (como queratinas 5, 6, 14, 17, EGFR) e genes relacionados à proliferação (DAI, CHEN, BAI, 2014). Os tumores *basal-like* são o

subtipo de pior prognóstico e comportamento clínico mais agressivo, além de apresentarem um maior risco de recorrência da doença (VUONG et al., 2014; TUN et al., 2014).

O subtipo *claudin-low*, é caracterizado pela baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e a E-caderina, além de uma moderada expressão de genes de proliferação celular (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Esse subtipo apresenta um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloide e os marcadores para sua caracterização estão sendo colocados, aos poucos, na prática clínica (CIRQUEIRA et al., 2011).

Devido ao elevado custo da técnica de *microarrays* para avaliar os perfis de expressão gênica, marcadores imunohistoquímicos são utilizados para delinear o tratamento e prever a evolução da doença, tais como RE, RP, HER2 e Ki67. Os receptores de estrógeno e progesterona são receptores hormonais que se ligam a hormônios circulantes mediando seus efeitos celulares (ROSEN, 1987; HASLAM, 1989). Esses receptores desempenham papéis importantes na carcinogênese da mama, cuja inibição é à base da terapia endócrina do câncer de mama (DAI, CHEN, BAI, 2014).

O HER2 é um receptor transmembrana tirosina quinase que regula o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular através de vias de sinalização diferentes. A superexpressão desse oncogene é um forte marcador preditivo de resposta à terapia anti-HER2 (WIEDUWILT e MOASSER, 2008). A proteína Ki67 é um marcador nuclear de proliferação celular ligada ao ciclo celular. Sua expressão aumentada em cânceres de mama se correlaciona a tumores de progressão rápida e pior prognóstico (VIALE et al., 2008). Esses quatro marcadores formam a base da definição imunohistoquímica dos subtipos moleculares (GOLDHIRSCH et al., 2013).

2.2 Câncer de Mama em Mulheres Jovens

Apesar de a idade ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, observa-se um aumento na incidência desta doença em pacientes jovens. Em âmbito mundial, a proporção dessa doença em mulheres com idade inferior a 40 anos e 44 anos é de 11% e 20%, respectivamente. No Brasil essa porcentagem é semelhante, representando 10,8% e 17,7% na

mesma faixa etária (BRAY et al., 2018). Já nos Estados Unidos, menos de 7% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres com menos de 40 anos de idade (DESANTIS et al., 2014).

No contexto de oncologia da mama, a definição de idade jovem pode variar de acordo com diversos estudos. Alguns autores consideram mulheres jovens com câncer de mama, àquelas com idades < 35, 40 ou 45 anos. Porém, existe uma subdivisão das pacientes que estão na pré-menopausa: considera-se a doença muito precoce em mulheres com idade inferior a 40 anos e doença relativamente precoce em mulheres com faixa etária entre 40 a 49 anos (REYNA e LEE, 2014).

A idade jovem no diagnóstico do câncer de mama está associada a um maior risco de recorrência e taxa de mortalidade (GNERLICH et al., 2009; CANCELLO et al., 2010; AZIM et al., 2012). Pacientes nessa faixa etária apresentam características clínicas e patológicas mais adversas do que pacientes com idade mais avançada (SHOSHANA e ANN, 2015). Devido à biologia tumoral mais agressiva, as pacientes jovens são diagnosticadas com maior grau histológico, tumores pouco diferenciados; maior envolvimento linfonodal, índice de proliferação e invasão linfovascular. Geralmente são tumores negativos para receptores hormonais (RE e RP) e superexpressores de HER2, além de apresentar taxas mais altas de recorrência em qualquer estágio clínico (COLLINS et al., 2012; COPSON et al., 2013; AZIM e PARTRIDGE, 2014; CHEN et al., 2016).

Um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres jovens são as mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, representando cerca de 66% a 75% de todos os casos de câncer de mama herdados (TICHY e ANDERS, 2013). A presença de mutações nesses genes pode afetar as decisões de tratamento, levando a discussões sobre a possibilidade de mastectomia profilática com base na avaliação de risco futuro (MENEN e HUNT, 2016). Para as mulheres portadoras dessas mutações, é recomendado um exame clínico das mamas a cada 6 meses a partir de 25 anos, ressonância magnética uma vez ao ano dos 25 aos 30 anos e mamografia anual e ressonância magnética após 30 anos (INCA, 2018).

A idade jovem, por si só, não deve ser usada para prescrever uma terapia mais agressiva. A escolha do tratamento também deve incluir as características biológicas do tumor (RE/RP, HER2, Ki67, GH), estágio e comorbidades. As diretrizes internacionais incluem como opções de tratamento a

terapia endócrina, quimioterapia multiagente, terapia biológica direcionada ou combinação entre elas. Essas recomendações são semelhantes às das mulheres em idade mais avançada (GOLDHIRSCH et al., 2013).

O cenário genético do câncer de mama em mulheres jovens é complexo, pois além dessas pacientes serem geralmente diagnosticadas com tumores mais agressivos, elas enfrentam inúmeros desafios psicológicos, como maior incidência de mastectomia radical, menopausa prematura e infertilidade (CHEN et al., 2016; FREDHOLM et al., 2016; RADECKA e LITWINIUK, 2016). Portanto, há uma necessidade crucial de elucidar a biologia desses tumores, a fim de estabelecer estratégias de prevenção, detecção precoce, tratamento adequado e assistência à sobrevivência dessas mulheres (LIANOS, ZORAS e ROUKOS, 2013).

2.3 Proteína p53

A origem e o desenvolvimento neoplásico são caracterizados por alterações em dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação, retardando a progressão do ciclo celular, bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada (VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998).

O gene *TP53* é um supressor tumoral que age na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular. Está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína de 53 kDa a qual desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, induzindo o reparo do DNA ou apoptose (HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000; LANE e LEVINE, 2010)

A proteína p53 está envolvida na homeostasia e na manutenção da integridade celular, impedindo o acúmulo de alterações genéticas (ROSSNER et al., 2009). Mutações em p53 podem alterar suas funções celulares, levando à proliferação desordenada (WEINBERG et al., 1991).

Mutações no gene p53 resultam em alterações moleculares e meia vida prolongada, levando ao acúmulo nuclear dessa proteína. O método de imunohistoquímica (IHQ) detecta esse acúmulo anormal e atua como um indicador indireto da mutação no gene p53 (Figura 1). Portanto, pode ser utilizado como indicador de mau prognóstico em pacientes com câncer de mama. A expressão da

proteína p53 mutada está associada com elevadas taxas de proliferação celular tumoral, maior recorrência da doença e morte (PETITJEAN et al., 2007).

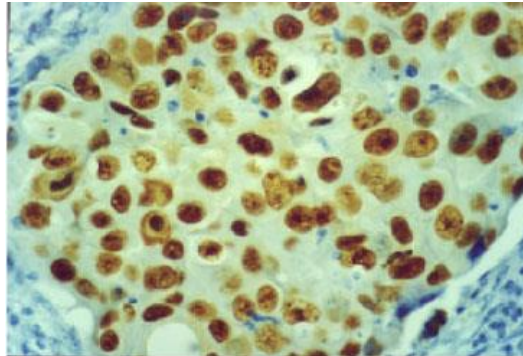


Figura 1 - Aspecto imunohistoquímico de tumor de mama positivo para proteína p53 (BOLASÉLL et al., 2000).

2.4 Índice de Proliferação Celular (Ki67)

O Ki67, uma proteína não-histona, foi originalmente identificado por Gerdes e colaboradores em 1938 como um antígeno nuclear de uma linhagem celular derivada do linfoma de Hodgkin. O nome “Ki” foi dado em homenagem à Universidade de Kiel, na Alemanha, onde o trabalho foi realizado e “67” refere-se ao número de clones do anticorpo capaz de detectá-lo em uma placa de 96 poços (GERDES et al., 1983). A expressão da proteína Ki67 está associada à atividade proliferativa de células em tumores malignos, permitindo que seja utilizada como um marcador de agressividade tumoral (BROWN e GATTER, 2002; KLÖPPEL, PERREN e HEITZ, 2004).

A proteína Ki67 não é expressa nas células em repouso (fase G0), mas pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) (BERESFORD, WILSON e MAKRIS, 2006). A quantidade desta proteína durante o ciclo celular é regulada por um equilíbrio entre síntese e degradação, como indicado por sua curta meia-vida de 1 a 1,5 h (RAHMANZADEH et al., 2007). Durante a fase G1 e início da fase S, os níveis de Ki67 são baixos, alcançando a expressão máxima durante a mitose. Já na anáfase e na telófase, ocorre uma acentuada diminuição nos níveis de expressão (KEY et al., 1991; BERESFORD, WILSON e MAKRIS, 2006). O Ki67 é encontrado no núcleo celular durante a interfase, enquanto que na mitose, a proteína está presente na superfície cromossômica (ISOLA, HELIN e KALLIONIEMI, 1990).

Essa superfície cromossômica, chamada de camada pericromossômica, funciona como uma película protetora ao redor dos cromossomos (YASUDA e MAUL, 1990). O Ki67 é um componente importante desta camada, sendo responsável por localizar os componentes nucleolares nos cromossomos, desempenhando um papel na segregação nucleolar entre as células filhas (BOOTH et al., 2014). Quando ocorre depleção desta proteína, a camada pericromossômica pode se romper, desestabilizando os componentes nucleolares durante a mitose, resultando em montagem prejudicada do fuso e distribuição assimétrica nas células filhas (BOOTH et al., 2014; CUYLEN et al., 2016).

Alguns estudos mostram que o Ki67 também pode atuar como um surfactante devido ao seu tamanho e alta densidade de aminoácidos carregados positivamente (CUYLEN et al., 2016). Desse modo, permite a motilidade dos cromossomos e sua interação com o fuso mitótico, impedindo a agregação dos cromossomos mitóticos (TAKAGI et al., 2016; CUYLEN et al., 2016). Além disso, acredita-se que esta proteína esteja envolvida na compactação e organização da heterocromatina (SOBECKI et al., 2016). A função do Ki67 não está completamente elucidada, porém há evidências de seu papel na divisão celular e na síntese do RNA ribossômico. Essas características podem explicar a ligação entre proliferação e expressão de Ki67 (RAHMANZADEH et al., 2007; PENAULT-LLORCA e RADOSEVIC-ROBIN, 2017).

O Ki67 é utilizado como um indicador da proliferação celular (GEYER et al., 2012), sendo considerado um marcador prognóstico e preditivo das neoplasias mamárias. Além de ser facilmente avaliado e reprodutível, a técnica de IHQ para o Ki67 se destaca por ser sensível, ter preço acessível e por poder ser avaliado em amostras tumorais embebidas em parafina (KEY et al., 1993). O consenso de St. Gallen, realizado em 2015, estabeleceu que a classificação baseada na análise IHQ dos RE, RP, HER2 e Ki67 seria aceita no caso de indisponibilidade de testes moleculares para definição de subtipos moleculares (COATES et al., 2015).

Na clínica, o Ki67 é utilizado principalmente para diferenciar os tumores Luminais A dos tumores Luminais B nos cânceres de mama ER+ / HER2- (PENAULT-LLORCA e RADOSEVIC-ROBIN, 2017). No consenso de St. Gallen em 2015 ficou acordado que o ponto de corte para essa diferenciação seria entre 20-29% (COATES et al., 2015). Sua utilização como um marcador de proliferação

celular mostrou que o percentual de células positivas para Ki67 pode ser usado para estratificar os pacientes (WIESNER et al., 2009). Assim, pacientes com baixo índice de proliferação celular estão associados a um menor crescimento tumoral e melhor prognóstico, enquanto que pacientes com um Ki67 elevado apresentam pior prognóstico (YEHI; MIES, 2008).

A atividade proliferativa dos tumores pode ser determinada pela técnica de IHQ (LI et al., 2015) e o anticorpo monoclonal de camundongo MIB-1 é o mais utilizado para a detecção do Ki67 (Figura 2) (PATHMANATHAN e BALLEINE, 2013). O índice de proliferação celular refere-se ao percentual de núcleos celulares que apresentam coloração positiva para Ki67 nas células neoplásicas. Para a sua interpretação, deve-se levar em conta que a expressão do Ki67 varia ao longo do ciclo celular (URRUTICOECHEA, SMITH e DOWSETT, 2005). A pontuação deve envolver a contagem de pelo menos 1000 células e que 500 células sejam aceitas como o mínimo absoluto (DOWSETT et al., 2011).

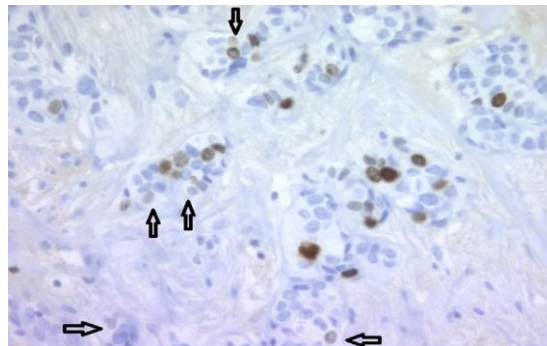


Figura 2 - Coloração imunohistoquímica para Ki67, usando o clone MIB-1 (400x). Qualquer intensidade de coloração nuclear indica uma célula Ki67 positiva. As setas mostram núcleos positivos marcados em marrom (PENAULT-LLORCA e RADOSEVIC-ROBIN, 2017).

O curso clínico das doenças tem sido relacionado com a taxa de proliferação celular tumoral. A partir disso, tem-se buscado meios para a determinação da mesma, como complemento diagnóstico. O grande desafio da utilização do Ki67 está na padronização da metodologia e em seus valores de corte, a fim de garantir resultados reprodutíveis e clinicamente relevantes (PATHMANATHAN e BALLEINE, 2013). Portanto, o uso criterioso do índice de proliferação celular, em combinação com características histopatológicas estabelecidas, pode servir como um indicador preditivo no câncer de mama agressivo (MORIMOTO et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a idade ao diagnóstico em relação aos parâmetros clinicopatológicos das mulheres com câncer de mama atendidas no Hospital do Câncer de Londrina.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os principais parâmetros clinicopatológicos (RE, RP, GH, Ki67, p53, tamanho tumoral e metástases) das pacientes de acordo com a idade;
- Estratificar as pacientes com câncer de mama de acordo com o subtipo molecular e índice de proliferação celular;
- Correlacionar os parâmetros clinicopatológicos com o Ki67 de acordo com a idade das pacientes.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo, unicêntrico, que avaliou prontuários de 233 pacientes com câncer de mama diagnosticados no Hospital do Câncer de Londrina, Paraná, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional (CAAE: 73557317.0.0000.5231). Para o desenho retrospectivo do estudo, todas as amostras foram coletadas com o consentimento livre e esclarecido de todas as pacientes. Como critério de inclusão, todas as pacientes apresentaram resultados de IHQ para o Ki67.

4.1 Imunohistoquímica

A técnica de IHQ para determinar os subtipos do câncer de mama foi realizada por patologistas do Hospital do Câncer de Londrina, que seguiram os critérios de pontuação da Sociedade Americana de Oncologia Clínica / Faculdade de Patologistas Americanos (HAMMOND et al., 2010). As 233 amostras eram de tecido tumoral e foram avaliadas quanto aos seguintes marcadores: receptores hormonais (RE e RP), HER2, p53 e Ki67.

4.2 Análise dos Dados

Os parâmetros clinicopatológicos como GH, presença ou não de metástases e tamanho tumoral, foram determinados de acordo com os critérios de classificação da União de Controle Internacional do Câncer (SOBIN, GOSPODAROWICZ e WITTEKIND, 2009). Esses parâmetros, juntamente com a idade das pacientes, foram obtidos de prontuários eletrônicos do Hospital do Câncer de Londrina.

A partir dos dados obtidos pela técnica de IHQ e da análise dos prontuários, avaliamos as características clinicopatológicas do tumor em relação à idade e as 233 pacientes foram divididas em dois subgrupos: pacientes com idade inferior a 44 anos e pacientes com idade igual ou superior a 44 anos. Já para a análise do Ki67, as 233 pacientes foram divididas em 3 subgrupos: Ki67 baixo ($\leq 15\%$), moderado (16-30%) e alto ($> 30\%$), seguindo o que foi proposto no consenso de St. Gallen de 2009 (GOLDHIRSCH et al., 2009).

4.3 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software IBM® SPSS® *Statistics* 20.0 (IBM®, Armonk, Nova York, EUA) usando o teste qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado, e regressão logística multinomial. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico e será submetido à revista *Clinical and Experimental Medicine* ISSN: 1591-9528 – Springer Classificação Qualis: B1

EXPRESSION OF Ki67 AND p53 PROTEINS: BREAST CANCER AGGRESSIVITY MARKERS IN BRAZILIAN YOUNG PATIENTS

ABSTRACT

Background: The increase in breast cancer (BC) cases in young women is of great importance since their diagnoses and tumor behavior are generally more aggressive than in their older counterparts. For this group of patients, strategies are recommended for early diagnosis and recognition to pay attention to their multifaceted needs. **Methods:** In this work, 233 samples of primary BC at Londrina Cancer Hospital, Brazil, were analyzed for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and cell proliferation index (Ki67). Age was analyzed regarding clinicopathologic parameters. **Results:** Around 54% of the young patients (<44years) were positive for p53 status ($p=0.017$) and 45.5% presented Ki67 > 30%. ($p=0.014$). Tumors from patients with high Ki67 had the following characteristics: negative for ER and PR ($p=0.001$), positive for HER2 overexpression ($p=0.01$), <44 years ($p=0.01$), tumor histological grade III ($p=0.001$), tumor size > 3.0 cm ($p=0.001$), and positive for p53 ($p=0.01$). **Conclusion:** It was verified that the proliferation index Ki67 was significantly increased in young BC patients, up to 44 years, and this study indicates that tumor cells in young BC patients are in intense proliferation of BC.

Keywords: breast cancer, Ki67, hormonal receptors, young patients

INTRODUCTION

Regarding public health, breast cancer (BC) in young women is an important issue, especially in Latin American countries, where the proportion of BC in young patients aged <40 and <44 years reaches 11% and 20% respectively, and is a higher proportion than in the United States and Canada, which are close to 5% and 11% in the respective age groups (FERLAY et al., 2013).

The definition of a “young woman” in the field of breast oncology varies, with most articles referring to women under ages 35, 40, or 45 as “young” (GABRIEL; DOMCHEK, 2010).

Hormone receptors, HER2 oncogene, Ki67, and p53 proteins are the most well-established breast molecular markers with prognostic and/or therapeutic value (BANIN HIRATA et al., 2014). The young BC patients frequently present more aggressive pathological features and advanced stages at diagnosis, a greater proportion of triple-negative (TN) and HER2-overexpressing tumors, and higher rates of systemic relapse at any clinical stage compared with older women (BLEYER et al., 2008; HAN et al., 2004).

RAGAB et al. (2018) agree with the finding that the expression of Ki67 may aid in the prognostic information obtained from classical prognostic indicators and can also provide data of significant value for other important prognostic factors, including involvement of axillary lymph nodes and histological grading. Because of the relatively rare incidence of BC in 40-year-old women in developed countries, there is little experience in this subject, and as each year there is an increase in the group of young patients with BC, more knowledge about markers may assist in the investigation of better therapy.

Despite advances in current molecular techniques, the immunohistochemistry technique for hormone receptors and HER2 is widely used in laboratories in the country. These three markers, which are considered basic, remain the most important predictors (RAKHA; GREEN, 2017). Although the Ki67 proliferation index is not endorsed as a guideline for adjuvant chemotherapy because of the lack of consensus from experts, this marker can be considered to identify patients most likely to respond to a given therapy (LUANGXAY et al., 2019). Therefore, the objective of the present study was to evaluate the prevalence of human BC cancer

subtypes using immunohistochemistry results (ER, PR, HER2, Ki67 and p53) and their correlation with age.

METHODS

This descriptive, retrospective, single center study evaluated 233 BC patients who were diagnosed in the Londrina Cancer Hospital, Parana, Brazil. This study was approved by the institutional ethics committee (CAAE: 73557317.0.0000.5231). For the retrospective design of the study, all samples were collected with the informed consent from all patients. As inclusion criteria, all patients presented IHC results for Ki67. Clinical data such as histological grade, presence of metastasis and tumor size were determined according to the classification criteria of the International Cancer Control Union (SOBIN, GOSPODAROWICZ and WITTEKIND, 2009). These parameters, along with the age of the patients, were obtained through the analysis of electronic medical records of the Londrina Cancer Hospital. The results of tumor markers (ER, PR, HER2 overexpression, p53 status and Ki67 index) were obtained from the immunohistochemistry technique performed on tumor tissue samples from the same patients, following the American Society of Clinical Oncology scoring criteria / College of American Pathologists (HAMMOND et al., 2010). From the analysis of these data, we evaluated age and Ki67 index in relation to the main clinicopathological characteristics of the tumor (ER, PR, HER2 overexpression, p53 status, histological grade, tumor size and metastasis). All statistical analyses were performed in IBM® SPSS® Statistics 20.0 *software* (IBM®, Armonk, New York, USA) using the Chi-square test or Fisher's exact test, and multinomial logistic regression. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The 233 cases of primary BC at Londrina Cancer Hospital, Brazil, constituted this study. ER, PR, HER2 and Ki67 were assessed in each case. The age was analyzed regarding various clinicopathologic prognostic parameters: tumor size, tumor type, lymph node status, and histologic tumor grade. The women were relatively young, with a mean age of 55 years.

In the present study, 44 patients were aged less than 44 years (18.9%). Although the menopausal state was not known, more than half (55.4%) were less than 50 years of age. Approximately 48.48% of the patients presented 1.5 to 3.0 cm-sized large tumors, and 46.87% showed nodal metastasis. The subtypes regarding hormonal receptors and HER2+, showed 67.2% for Luminal A, 11.4% for Luminal B, 6.6% for HER2 and 14.8% TN BC. Around 54% of the young patients (<44years) presented positivity for p53 status ($p=0.017$) and 45.5% presented Ki67 >30% ($p=0.014$). It was verified that the Ki67 proliferation index was significantly increased in young BC patients (Table 1).

Regarding hormonal receptors for Ki67, luminal A tumors were found to be predominantly Ki67 $\leq 15\%$ while TN subtype showed Ki67 > 30% (Figure 1).

Table 1. Clinical parameters of BC patients according to age.

Prognostic Parameters	Age < 44 years n (%)	Age \geq 44 years n (%)	p-value
ER (n= 232)			
Positive	31 (70.5)	147 (78.2)	0.274
Negative	13 (29.5)	41 (21.8)	
PR (n= 232)			
Positive	20 (45.5)	98 (52.1)	0.425
Negative	24 (54.5)	90 (47.9)	
HER2 (n= 225)			
Positive	10 (23.2)	31 (17.0)	0.342
Negative	33 (76.7)	151 (83.0)	
HG (n= 221)			
I	4 (9.1)	20 (11.3)	0.915
II	18 (40.9)	71 (40.1)	
III	22 (50.0)	86 (48.6)	
p53 (n= 223)			
Positive	23 (54.8)	63 (34.8)	0.017*
Negative	19 (45.2)	118 (65.2)	
Ki67 (n=233)			
Low ($\leq 15\%$)	4 (9.0)	51 (27.0)	0.014*
Moderate (16-30%)	20 (45.5)	86 (45.4)	
High (> 30%)	20 (45.5)	52 (27.5)	
Metastasis (n= 224)			
Positive	21 (48.8)	84 (46.4)	0.774
Negative	22 (51.2)	97 (53.6)	
Tumor Size (n= 231)			
<1.5 cm	8 (18.6)	46 (24.5)	0.543
1,5-3.0 cm	24 (55.8)	88 (46.8)	
>3.0 cm	11 (25.6)	54 (28.7)	

Chi-square test. Data expressed as absolute number and percentage. * value of $p < 0.05$.

Patients with low Ki67 index had the following clinical characteristics: positive ER and PR, negative HER2, age ≥ 44 years, histological grade II, tumor size <3.0 cm and negative for p53. However, patients with high Ki67 had the following characteristics: negative ER and PR ($p=0.001$), positive HER2 overexpression ($p=0.01$), <44 years ($p=0.01$), tumor histological grade III ($p=0.001$), tumor size > 3.0 cm ($p=0.001$), and positive for p53 ($p=0.01$). Patients with positive ER and PR present a low to moderate Ki67. Patients with negative ER and PR have a high Ki67. Patients negative for the HER2 receptor had a low Ki67. For the histological grade, patients with grade I presented low Ki67 and patients with grade III presented high Ki67. For the age variable patients younger than 44 years had a high Ki67 and patients over 44 years, a low Ki67. Regarding tumor size, low Ki67 is associated with tumors smaller than 1.5 cm and moderate to high Ki67 is associated with tumors larger than 3.0 cm (Table 2).

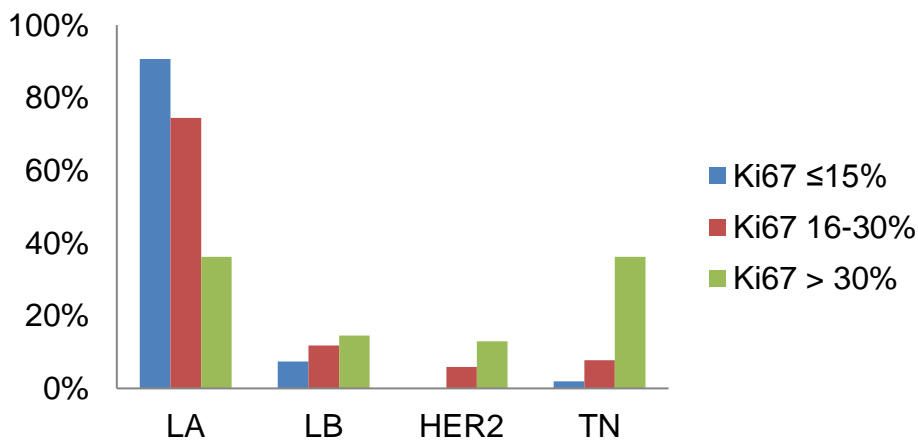


Figure 1. Distribution of breast cancer patients according to molecular subtype and Ki67. LA: Luminal A, LB: Luminal B.

Table 2. Clinical parameters of BC patients according to Ki67

Variable	Ki67 Low n (%)	Ki67 Moderate n (%)	Ki67 High n (%)	P- value	p-value		
					Ki67 Low x Moderate	Ki67 Low x High	Ki67 Moderate x High
Age (n= 233)							
< 44 years	4 (7.3)	20 (18.9)	20 (27.8)	0.010	0.003	0.922	0.004
≥ 44 years	51 (92.7)	86 (81.1)	52 (72.2)				
ER (n= 232)							
Positive	52 (94.5)	90 (85.7)	36 (50.0)	0.001	0.011	0.004	0.001
Negative	3 (5.5)	15 (14.3)	36 (50.0)				
PR (n= 232)							
Positive	46 (83.6)	52 (49.5)	20 (27.8)	0.001	0.001	0.001	0.922
Negative	9 (16.4)	53 (50.5)	52 (72.2)				
HER2 (n= 225)							
Positive	4 (7.4)	18 (17.6)	19 (27.5)	0.016	0.004	0.001	0.001
Negative	50 (92.6)	84 (82.4)	50 (72.5)				
HG (n= 221)							
I	13 (25.0)	9 (9.3)	2 (2.8)	0.001	0.001	0.001	0.837
II	25 (48.1)	42 (43.3)	22 (30.6)				
III	14 (26.9)	46 (47.4)	48 (66.7)				
p53 (n= 223)							
Positive	5 (9.1)	38 (38.4)	43 (62.3)	0.001	0.297	0.007	0.001
Negative	50 (90.9)	61 (61.6)	26 (37.7)				
Metastasis (n= 224)							
Positive	18 (34.0)	54 (52.4)	33 (48.5)	0.086	0.128	1.000	0.128
Negative	35 (66.0)	49 (47.6)	35 (51.5)				
Tumor Size (n= 231)							
<1,5cm	24 (44.4)	16 (15.1)	14 (19.7)	0.001	0.001	0.001	0.796
1,5-3,0cm	25 (46.3)	61 (57.5)	26 (36.6)				
>3,0cm	5 (9.3)	29 (27.4)	31 (43.7)				

Chi-square or Fisher's exact test where appropriate. Data expressed as absolute number and percentage. Multinomial logistic regression test.

DISCUSSION

In the present study, 44 patients aged less than 44 years (18.9%), compatible with the definition of a young patient within the area of breast cancer that is variable and may be considered while younger than 45 years as "young" (GABRIEL; DOMCHEK, 2010). Less than 7% of all BC cases in the United States are diagnosed in women younger than 40 years of age (DESANTIS et al., 2014) and the proportion of young women with breast cancer under the age of 44 years is 11% (FERLAY et al., 2013). In this context, although our study is monocentric, we can admit that the young age group with breast cancer is slightly increased.

In the present study, 54.8% of the young patients presented positivity for p53 (Table 1). In relation to breast cancer, the frequency of mutations in this gene is not very high, around 20-30% of the cases studied (BANIN HIRATA et al., 2014). However, several authors have shown that the identification of the type of mutation can lead to important conclusions regarding the survival and therapeutic response of the patients, as described in some reviews (BANIN HIRATA et al., 2014; BORRESEN-DALE, 2003).

Hormonal receptors (ER / PR) and HER2 receptor are the most established BC tumor markers (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2004). It is known that the Ki67 is a cell proliferation marker, a non-histone nuclear protein expressed throughout the active phase of the cell cycle, except G0 and early G1. The Ki67 is still a significant prognostic and reliable predictive marker in BC patients (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2004; SCHOLZEN; GERDES, 2000).

In the young patients, 45.5% presented Ki67 >30%. ($p=0.014$). A threshold value to define high and low Ki67 expression has not been well defined. It has been proposed that the Ki67 marking index was used at a threshold value of 14%, which many studies report on the staining level of $\geq 14\%$ as a high-risk group in terms of prognosis (CHEANG et al., 2009; WANG et al., 2016). Ki67 is a more efficient mitotic index marker, indicating cell proliferation (EL AMINE et al., 2016). Although 35% has been suggested as the best threshold value for Ki67 expression in order to predict the response to neoadjuvant chemotherapy and also to obtain a complete pathological response, larger studies are required to validate this cutoff point (JAIN et al., 2019). In the present study, the limit value considered for Ki67 was 30%, being an evident marker in young patients.

For clinical use, Ki67 provides positive predictive information on the response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (DE AZAMBUJA et al., 2007; JUNG et al., 2009). FASCHING et al. (2011) showed that the response to neoadjuvant chemotherapy in patients with elevated Ki67 (> 30%) was better than in other tumors (FASCHING et al., 2011). In addition, following neoadjuvant chemotherapy, Ki67 is still able to function as a prognostic marker (INGOLF et al., 2014). Neoadjuvant chemotherapy causes a decline in Ki67 expression in breast cancer samples (AVCI et al., 2015). Therefore, patients with high residual tumor Ki67 levels after chemotherapy treatment have a higher risk of recurrence and mortality (SUN et al., 2015), revealing a need for additional treatment after neoadjuvant chemotherapy (MINCKWITZ et al., 2013).

AHMED et al. (2018) verified a significant inverse relationship of ER and PR positivity with Ki67, while the values were directly proportional to the HER2 status and tumor grade. On the other hand, no any significant association was found between the Ki67 neither with the size of the tumor nor with the number of lymph node involved. In this context, YAN et al. (2015) verified that Ki67, as biomarker, were correlated with HER2, ER and PR. In the present study luminal subtype A tumors were found to be predominantly Ki67 <14% while TN subtype showed Ki67 >30% (Figure 1). Regarding tumor size, low Ki67 was associated with tumors smaller than 1.5 cm and moderate to high Ki67 is associated with tumors larger than 3.0 cm (Table 2). Therefore, a Ki67 immunoexpression assay may offer an independent predictive tumor marker for routine application in BC, indicating a poor prognosis in invasive ductal carcinoma.

Young age has been identified as an unfavorable prognostic factor in patients with BC (KATAOKA et al., 2016), when there is also high frequency of negative hormonal receptor tumors, advanced TNM staging, aggressive tumor features and poorer clinical outcome (COPSON et al., 2013; EUGENIO et al., 2016).

It is necessary to call for community action on the increase in the incidence as well as the mortality of Latin American young women with BC. There is a need to investigate and monitor clinical and epidemiological data through a reliable BC database and consider the implementation of protocols to educate people and health professionals. The increasing involvement of young women with this malignancy should be considered as a priority of national programs in the fight against BC (VILLARREAL-GARZA et al., 2019).

VILLARREAL-GARZA et al. (2019) pointed to the important need to dedicate resources to improve early diagnosis and to promptly direct young women with BC. Additionally, to promote research on prevalence, biological characteristics and improve care in screening and diagnosis in the treatment for this young age group and implement programs of assistance to patients and family members. Recognition of the current BC outlook in young patients across the continent should shed some light on the importance of this critical issue.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Paraná Foundation, Extension Program "University Without Borders" of the Secretary of State for Science, Technology and Higher Education".

Informed consent: Informed consent was obtained from each participant before enrolling in this study.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- AHMED, S. T. et al. Proliferative Index (Ki67) for Prediction in Breast Duct Carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 19, n. 4, p. 955-959, Apr 25 2018.
- AVCI, N. et al. Neoadjuvant chemotherapy-induced changes in immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptor, HER2, and Ki-67 in patients with breast cancer. **J Buon**, v. 20, p. 45-9, 2015.
- BANIN HIRATA, B. K. et al. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Dis Markers**, v. 2014, p. 513158, 2014.
- BLEYER, A. et al. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 4, p. 288-98, Apr 2008.
- BORRESEN-DALE, A. L. TP53 and breast cancer. **Hum Mutat**, v. 21, n. 3, p. 292-300, Mar 2003.
- CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, May 20 2009.
- COPSON, E. et al. Prospective observational study of breast cancer treatment outcomes for UK women aged 18-40 years at diagnosis: the POSH study. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, n. 13, p. 978-88, Jul 3 2013.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br J Cancer**, v. 96, p. 1504-13, 2007.

DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 1, p. 52-62, Jan-Feb 2014.

EL AMINE, O. et al. Comparative study of two complementary proliferation markers in 200 breast carcinomas: Ki67 and mitotic index. **Tunis Med**, v. 94, n. 10, p. 587-593, Oct 2016.

ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 3, p. 109-18, 2004.

EUGENIO, D. S. et al. Breast cancer features in women under the age of 40 years. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 62, n. 8, p. 755-761, Nov 2016.

FASCHING, P. A. et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. **BMC Cancer**, v. 11, n. 486, p. 1-13, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374-403, Feb 2013.

GABRIEL, C. A.; DOMCHEK, S. M. Breast cancer in young women. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. 212, 2010.

HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, 2010.

HAN, W. et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. **BMC Cancer**, v. 4, p. 82, Nov 17 2004.

INGOLF, J. B. et al. Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? **BioMed Research International**, 2014.

JAIN, P. et al. Ki-67 labeling index as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Jpn J Clin Oncol**, v. 49, n. 4, p. 329-338, Apr 1 2019.

JUNG, S. Y. et al. Ki-67 expression gives additional prognostic information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 16, p. 1112-21, 2009.

KATAOKA, A. et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. **Breast Cancer Res Treat**, v. 160, n. 1, p. 163-172, Nov 2016.

LUANGXAY, T. et al. Subtypes of Breast Cancer in Lao P.D.R.: A Study in a Limited-Resource Setting. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 20, n. 2, p. 589-594, Feb 26 2019.

MINCKWITZ, G. et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 16, p. 4521-31, 2013.

RAGAB, H. M. et al. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. **J Genet Eng Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 479-484, Dec 2018.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 111-119, Feb 2017.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 311-22, Mar 2000.

SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K. and WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7th. Oxford, 2009.

SUN, J. et al. Associations and indications of Ki67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study. **Oncol Lett**, v. 10, n. 3, p. 1741-8, 2015.

VILLARREAL-GARZA, C. et al. Locally advanced breast cancer in young women in Latin America. **Ecancermedicalscience**, v. 13, p. 894, 2019.

WANG, J. et al. Value of Breast Cancer Molecular Subtypes and Ki67 Expression for the Prediction of Efficacy and Prognosis of Neoadjuvant Chemotherapy in a Chinese Population. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 18, p. e3518, May 2016.

YAN, J. et al. Relation between Ki-67, ER, PR, Her2/neu, p21, EGFR, and TOP II-alpha expression in invasive ductal breast cancer patients and correlations with prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 2, p. 823-9, 2015.

6 CONCLUSÃO

- Houve associação entre a idade jovem e a positividade de p53 ($p = 0,017$);
- Pacientes mais jovens (<44 anos) apresentaram índice de proliferação celular elevado (Ki67 > 30%) ($p = 0,014$);
- O índice de proliferação celular elevado (Ki67 > 30%) foi associado com características clínicopatológicas mais agressivas do tumor, como negatividade para RE e RP ($p = 0,001$), positividade para superexpressão de HER2 ($p = 0,01$), grau histológico tumoral III ($p = 0,001$), tamanho do tumor > 3,0 cm ($p = 0,001$) e positividade para p53 ($p = 0,01$), além de estar associado com a idade jovem (<44 anos) ($p = 0,01$);
- Os subtipos Luminal A e Triplo-negativo foram associados com o Ki67 $\leq 15\%$ (baixo) e Ki67 > 30% (alto), respectivamente ($p < 0,001$).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de mama em mulheres jovens tem se tornado um grave problema de saúde pública. Em nosso estudo, a idade jovem foi associada com características mais agressivas do tumor. Salienta-se a importância de promover estratégias de detecção e diagnóstico precoce neste grupo de mulheres, uma vez que o rastreamento através de mamografia é preconizado pelo SUS somente acima de 50 anos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJCC (2010). AJCC cancer Staging Manual, **Springer** – Verlag New York.
- ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet**, v. 385, p. 977-1010, 2015.
- BAN, K. A.; GODELLAS, C. V. Epidemiology of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 23, p. 409-422, 2014.
- BERESFORD, M. J.; WILSON, G. D.; MAKRIS, A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 216, p. 1-11, 2006.
- BOLASÉLL, A. H. T. et al. Prognostic Indicators in Lymph Node-Negative Breast Cancer: Estrogen Receptor and p53 and c-erbB-2 Protein Expression. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 22, n. 7, p. 449-454, 2000.
- BOOTH, D. G. et al. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery, **Elife**, v. 3, p. 1-22, 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade. 2016. Disponível em: < <http://svs.aids.gov.br/dashboard/situacao/saude.show.mtw>>. Acesso em: 24 setembro 2019.
- BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, p. 394-424, 2018.
- BREWER, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res Treat**, v. 165, n. 1, p. 193-200, 2017.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, p. 2-11, 2002.
- CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.
- CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, 2011.
- COATES, A. S. et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Ann Oncol**, v. 26, n. 8, p. 1533-1546, 2015.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308-312, 2016.

DAI, X.; CHEN, A.; BAI, Z. Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. **Scientific reports**, v. 4, p. 6566, 2014.

DESANTIS, C. et al. Breast Cancer Statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 64, p. 52-62, 2014.

DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 22, p.1656-1664, 2011.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 698-707, 2012.

FASCHING, P. A. et al. Ki67, chemotherapy response and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant therapy. **BMC Cancer**, v. 11, n. 486, p. 1-11, 2011.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 27, n. 1, p. 95-120, 2018.

FRANCKEN, A. B. et al. Breast cancer in women at high risk: The role of rapid genetic testing for BRCA1 and -2 mutations and the consequences for treatment strategies. **The Breast**, v. 22, n. 5, p. 561-568, 2013.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.

GEORGE, W. et al. Past, Present, and Future Challenges in Breast Cancer Treatment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 19, p. 1979-1986, 2014.

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, n. 1, p. 13-20, 1983

GEYER, F.C. et al. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. **Adv Anat Pathol**, v. 19, p. 39-53, 2012.

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

GOLDHIRSCH, A. et al. 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, p. 2206–2223, 2013.

HAINAUT, P. e HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Adv Cancer Res**, v. 77, p. 81-137, 2000.

HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, 2010.

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HASLAM, S. Z. The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2766-2772, 1989.

HAYES, M. M. et al. Squamous cell carcinoma in situ of the breast: a light microscopic and immunohistochemical study of a previously undescribed lesion. **Am J Surg Pathol**, v. 31, p. 1414-1419, 2007.

HERSCHKOWITZ, J. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. 1-17, 2007.

IARC, I. a F. R. O. C. **Monographs of Carcinogenic Risks to Humans and Handbooks of Cancer Prevention**. 2016.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2018.

ISOLA, J.; HELIN, H.; KALLIONIEMI, O. P. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki67 in MCF-7 cells. **Histochem J**, v. 22, p. 498-506, 1990.

JAAFAR, M. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, p. 23-31, 2015.

JUNG, S. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. **International journal of epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 916-928, 2016.

KATAOKA, A. et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. **Breast Cancer Res Treat**, v. 160, p. 163-172, 2016.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Res**, v. 72, n. 13, p. 3125-30, 2012.

KEY, G. 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.

KEY, G. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. **Cytometry**, v. 12, p. 42-49, 1991.

KLÖPPEL, G.; PERREN, A.; HEITZ, P. U. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1014, p. 13-27, 2004.

KUMAR, V. et al. **Patologia, Bases Patológicas das Doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: 2010. 1458.

LANE, D. e LEVINE, A. p53 research: the past thirty years and the next thirty years. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol**, v. 2, p. 1-11, 2010.

LESTER, S. C. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 10, p. 1515-38, 2009.

MAKAREM, N. et al. Dietary fat in breast cancer survival. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 319-348, 2013.

MENEN, R. S.; HUNT, K. K. Treatment of Young Patients with Breast Cancer. **The Breast Journal**, v. 22, n. 6, p. 667-672, 2016.

MORIMOTO, R. et al. Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. **Endocr J**, v. 55, p. 49-55, 2008.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 66, p. 512-516, 2013.

PENAULT-LLORCA, F.; RADOSEVIC-ROBIN, N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 166-171, 2017.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, p. 2157-2165, 2007.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

PRAT, A. et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.

- RAHMANZADEH, R. et al. Chromophore-assisted light inactivation of pKi67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. **Cell Prolif**, v. 40, n. 3, p. 422-430, 2007.
- ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1673-1684, 2005.
- ROSEN, P. P. Adenomyoepithelioma of the breast. **Hum Pathol**, v. 18, n. 12, p. 1232-1237, 1987.
- ROSSNER, P. et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 9, p. 3847-3857, 2009.
- ROUZIER, R. et al., Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5678-85, 2005.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.
- SLEDGE, G. W. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. **J Clin Oncol**. v. 32, n. 19, p. 1979-1986, 2014.
- SOBECKI, M. et al., The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin, **Elife**, v. 5, p. 1-33, 2016.
- SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K. and WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7th. Oxford, 2009.
- SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.
- STEWART, B.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. International Agency for Research on Cancer, WHO, 2014.
- TAHERIAN-FARD, A.; SRIHARI, S.; RAGAN, M. A. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. **Brief Bioinform**, v. 16, n. 3, p. 461-74, 2015.
- TAKAGI, M. et al. Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. **Genes Cells**, v. 21, n. 10, p. 1113-1124, 2016.
- TICHY, J. R.; LIM, E.; ANDERS, C. K. Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 11, p. 1060-1069, 2013.
- TRICHOPOULOS, D. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int J Cancer**. v. 122, n. 3, p. 481-485, 2008.
- TSOUTSOU, P. G. et al. How could breast cancer molecular features contribute to locoregional treatment decision making? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 110, p. 43-48, 2017.

TUN, N. et al. Risk of having BRCA1 mutation in high-risk women with triple-negative breast cancer: a meta-analysis. **Clin Genet**, v. 85, n. 1, p. 43-48, 2014.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 7212-7220, 2005.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 659-672, 2007.

VERMA, R. S. e N. G. TRIANTAFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 100, n. 1, p. 88-90, 1998.

VIALE, G. et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. **Journal of clinical oncology**, v. 26, p. 5569-5575, 2008.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1-14, 2014.

WALKER, R. A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 61, p. 689-696, 2008.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1138-1146, 1991.

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 10, p. 1566-1584, 2008.

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

YASUDA, Y.; MAUL, G. G. A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surface component. **Chromosoma**, v.99, n. 2, p. 152-160, 1990.

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

YERUSHALMI, R. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 2, p. 174-183, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 6

CAAE: 73557317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.638.782

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental/Uel. Segundo a pesquisadora o câncer ocorre decorrente da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, e sua evolução é dependente da interação tumor-hospedeiro. O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem estes tumores malignos. Dentro deste contexto, os aspectos imunológicos, moleculares e epigenéticos, das citocinas e dos receptores de quimiocinas e receptores de citocinas, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização foram os temas escolhidos para serem abordados neste projeto, uma vez que todos estes parâmetros podem ter relevância clínica e também constituírem alvos promissores que no futuro podem ser valiosos na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico. A pesquisa será realizada no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Uel. Serão selecionadas um total de 1150 amostras provenientes do Hospital de Câncer de Londrina: - 300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. A realização do ensaio de imuno-histoquímica. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia da

UEL. - 200 Amostras de tecido tumoral e saudável a fresco, de pacientes diagnosticados com cancer de mama, laringe e colorretal, provenientes de cirurgia para excisão do tumor do mesmo hospital para extração de DNA, RNA e sobrenadante. - 300 Amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos, que serão coletadas para obtenção de DNA, RNA e plasma para estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica e proteica. - 50 Amostras de medula de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias agudas (linfóide e mielóide) para extração de RNA e plasma. - 300 Amostras de sangue periférico e/ou saliva de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia, para extração de DNA, RNA e plasma. Serão realizados análise de PCR-RFLP para estudo das variantes alélicas polimórficas, análise de imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR quantitativo, análise da Expressão Proteica por ELISA. Os participantes da pesquisa serão convidados a participar do estudo durante o atendimento clínico no Serviço de Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

Objetivo da Pesquisa:

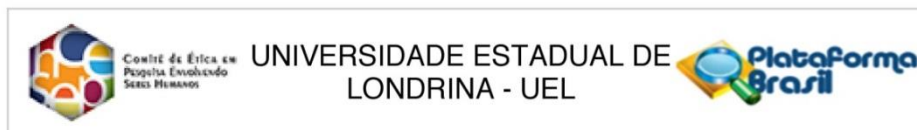
Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGFB1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INFg, das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

Objetivos Secundários:

• Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer

Endereço: LABESC - Sala 14	
Bairro: Campus Universitário	CEP: 86.057-970
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

de cólon, tumores de laringe e câncer colorretal e para os tumores pediátricos (tumor de Wilms, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemias agudas, linfomas e tumor adrenocortical).

- Avaliar a expressão gênica dos genes acima citados por PCR quantitativo.
- Realizar imunohistoquímica para FOXP3, TGFb1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, CXCL12 CCL5, SMAD,CXCR4,CCR5, p53 nos tecidos tumoral e saudável fixados em formalina tamponada e embebido em parafina, para avaliar a expressão proteica.
- Avaliar a expressão proteica por ELISA dos genes CXCL12, TGF-, FOXP3, CCL5 e INF gama.
- Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica e proteica desses genes.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos dos genes supracitados e compará-los com os dados clinicopatológicos dos pacientes com os diferentes tipos de câncer

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o risco que os participantes da pesquisa podem ter neste projeto é quanto ao desconforto na hora da coleta de sangue periférico, porém a coleta será efetuada por profissional habilitado seguindo-se todas as normas de biossegurança, e caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos coletores responsáveis. O estudo não trará benefícios diretos aos participantes, mas pretende-se obter marcadores que possam fornecer subsídios adicionais de auxílio prognóstico e delineamento terapêutico de pacientes com câncer de mama, cancer laringe e cancer colorretal e tumores pediátricos. Espera-se também obter uma integração maior entre as instituições colaboradoras, Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina. O envolvimento de pesquisadores colaboradores permitirá a formação de profissionais qualificados para atuarem nas áreas de Imunologia e Genética do câncer, disseminando o conhecimento. Pretende-se contribuir com um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos com a patogênese das doenças acima referidas e futuramente com a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, através da inclusão de marcadores que, de alguma forma, possam ser aplicados futuramente na prática clínica

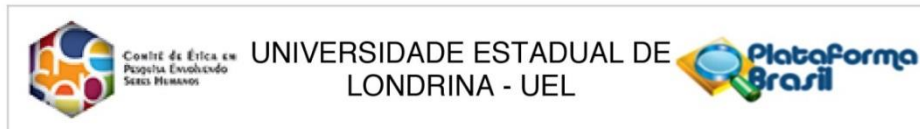
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto devidamente assinada pelo Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, cronograma adequado e orçamento detalhado. Apresentou 04 modelos de TCLE adequados em forma de convite (adultos e crianças caso e adulto

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 86.057-970
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

e crianças controle saudáveis). Apresentou ainda termo de autorização do hospital e declaração de 02 bioquímicas responsáveis pelas coletas das amostras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de emenda de projeto já aprovado. Justificativa da Emenda: Inclusão de metodologia: Será realizado questionário aos pacientes e participantes saudáveis do projeto intitulado "Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos Câncer". O TCLE foi readequado com a inclusão do questionário.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_111024_2_E4.pdf	25/04/2018 10:46:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianças.pdf	25/04/2018 10:45:28	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	25/04/2018 10:44:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	25/04/2018 10:43:35	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_anamnese.doc	09/04/2018 14:04:18	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	anamnese.doc	09/04/2018 14:00:50	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_APOBEC.pdf	08/03/2018 22:07:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Emenda.docx	29/11/2017 16:03:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigilo.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 07 de Maio de 2018

**Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)**

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455 **CEP:** 86.057-970
E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B – Parecer do Hospital do Câncer de Londrina

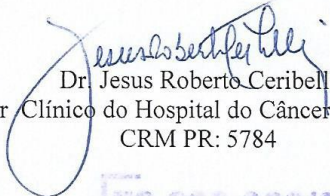


DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o Hospital do Câncer de Londrina é colaborador no Projeto de pesquisa com o tema **“Implicações prognósticas e terapêuticas de marcadores genéticos e imunológicos no câncer”** coordenado pela Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe da Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Patológicas, docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Patologia experimental. Neste Projeto, será realizado a obtenção de amostras e consulta aos prontuários de pacientes atendidos neste hospital. É evidente que nenhuma intervenção terapêutica será realizada pelos pesquisadores.

Sem mais nada a declarar, nos colocamos a disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Londrina, 12 de julho de 2017.


 Dr. Jesus Roberto Ceribelli
 Diretor Clínico do Hospital do Câncer de Londrina
 CRM PR: 5784

Dr. Jesus Roberto Ceribelli
 DIRETOR CLÍNICO - CRM/PR 5784
 Hospital do Câncer de Londrina

78.633.088/0001-76

INSTITUTO DE CÂNCER DE LONDRINA

Rua Lucilla Ballalai, 212
 Jardim Petrópolis
 CEP 86.015-520 - LONDRINA - PR

Rua Lucilla Ballalai, 212 – Jd Petrópolis - CEP 86.015-520 – Londrina - PR

Fones: (43) 3379-2613
 Home Page: www.hcl.org.br