



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ÍCARO PEDRO DO NASCIMENTO

**ESTUDO PROSPECTIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16 POR IMUNO-
HISTOQUÍMICA EM CÂNCER DE MAMA**

RECIFE - PE

2023

ÍCARO PEDRO DO NASCIMENTO

**ESTUDO PROSPECTIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16 POR IMUNO-
HISTOQUÍMICA EM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfotecnologia.

Orientador: Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Recife-PE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Nascimento, Ícaro Pedro do.

Estudo prospectivo da expressão da proteína p16 por imuno-histoquímica em câncer de mama. / Ícaro Pedro do Nascimento. – 2023.

41 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, 2023.

Inclui referências.

1. Biomarcador. 2. Carcinoma ductal invasivo. 3. Ciclo celular. I. Silva Neto, Jacinto da Costa. (Orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB - 2023-108

ÍCARO PEDRO DO NASCIMENTO

" ESTUDO PROSPECTIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 POR IMUNO- HISTOQUÍMICA EM CÂNCER DE MAMA "

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 27/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
(Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª Rosa Valéria da Silva Amorim
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª Luciana Maria Silva de Seixas Maia
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^ª. Livia Caroline Alexandre de Araújo
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

¹Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife-PE - Brasil, 50670-901, Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE. Fone: (81) 2126.8515. Sítio: <https://www.ufpe.br/ppgm>

Dedico este trabalho a minha família que são meu porto seguro, minha força e meu apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir conquistar mais uma realização profissional.

A minha família pelo apoio, pelo carinho, por acolherem minhas escolhas profissionais e de vida.

Ao professor Dr. Jacinto da Costa Silva Neto por aceitar minha orientação, sou grato pelos ensinamentos e compreensão, fundamentais para concretização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia (PPGM) pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade para participarem deste trabalho e por suas valiosas contribuições.

A todos os amigos do PPGM pelo apoio em momentos difíceis, especialmente a Elayne Brito, pela companhia constante e pela ajuda inestimável.

Muito obrigado!

RESUMO

O carcinoma mamário é a principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo, constituindo um sério problema de saúde pública global. Nesse contexto, a utilização de técnicas imuno-histoquímicas pode contribuir para evidenciar marcadores que estão diretamente relacionados à carcinogênese mamária. O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão da proteína p16 em amostras de lesão mamária arquivadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para o estudo foram utilizadas 45 amostras de biópsia de lesão mamária, sendo 30 amostras submetidas a avaliação imuno-histoquímica da p16. Os resultados obtidos evidenciaram que as biopsias eram de participantes com idade média de 53,8 anos e pardas. Dos casos estudados, 33 (81,8%) foram classificados como malignos e 12 (26,66%) como benignos. Entre os tumores malignos, 27 (81,8%) foram diagnosticados como carcinoma ductal invasivo. Em relação a expressão da P16, a maioria das amostras diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo apresentou reação positiva para p16, no entanto reações positivas também foram observadas em fibroadenoma. Os dados evidenciaram que a expressão da p16 isoladamente apresenta uso limitado para prognóstico para câncer de mama nas condições avaliadas. Desse modo, recomenda-se realizar estudos adicionais para determinar um painel abrangente de proteínas que controlam o ciclo celular.

Palavras-chave: Biomarcador; Carcinoma ductal invasivo, Ciclo celular

ABSTRACT

Breast carcinoma is the leading cause of cancer-related death in women worldwide, posing a significant global public health issue. In this context, the application of immunohistochemical techniques can help identify markers directly associated with breast carcinogenesis. The objective of this study was to assess the expression of the p16 protein in breast lesion samples archived at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. A total of 45 biopsy samples of breast lesions were utilized, with 30 of them undergoing p16 immunohistochemical analysis. The results obtained indicated that the biopsies were obtained from individuals with an average age of 53.8 years and of brown ethnicity. Among the cases examined, 33 (81.8%) were classified as malignant, while 12 (26.66%) were classified as benign. Among the malignant tumors, 27 (81.8%) were identified as invasive ductal carcinoma. Concerning p16 expression, most samples diagnosed with invasive ductal carcinoma exhibited a positive reaction for p16. However, positive reactions were also observed in fibroadenoma cases. The data revealed that the use of p16 expression alone has limited utility as a prognostic marker for breast cancer under the evaluated conditions. Therefore, further studies are recommended to determine a comprehensive panel of proteins that regulate the cell cycle.

Keywords: Biomarker; Invasive ductal carcinoma, Cell cycle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo celular	16
Figura 2. Células do ducto mamário progredindo para carcinoma ductal invasivo. (a) epitélio normal; (b) hiperplasia ductal; (c) carcinoma <i>in situ</i> e (d) carcinoma invasivo	21
Figura 3. Características clínicas e demográficas das pacientes com câncer de mama	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos do câncer de mama	23
Tabela 2. Características clínicas e demográficas das pacientes com câncer de mama	27
Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica da p16 em amostras de lesão de mama	29
Tabela 4. Intensidade da expressão da p16 em diferentes tipos histológicos de câncer de mama	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
1.2 HIPÓTESE	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 CÂNCER	14
2.2 CICLO CELULAR E CÂNCER	15
2.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16	17
2.4 CÂNCER DE MAMA	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DE AMOSTRAS	24
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	25
3.3 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES	25
3.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	25
3.4.1 Reação imuno-histoquímica	25
3.4.2 Coloração imuno-histoquímica de p16	25
3.4.3 Método semiquantitativo para avaliação da imunorreação da p16	26
3.5 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	26
3.6 ANÁLISE DE DADOS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	32
ANEXO A - FOLHA DE ROSTO DA AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	39
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	40

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma mamário é o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, excluindo-se os tumores de pele não melanoma e a segunda principal causa de morte por câncer no mundo, constituindo um sério problema de saúde pública global (BRAY et al. 2018; SUN et al. 2021). Para o Brasil, a estimativa é de 66.280 novos casos de câncer de mama para o ano de 2022, resultando em uma taxa ajustada de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2021a). Em todas as regiões brasileiras o câncer de mama ocupa a primeira posição entre as mulheres. No Nordeste, 13.190 casos eram esperados para 2022, com risco de 44,29 casos por 100 mil mulheres. No estado de Pernambuco, a estimativa foi de 2.390 novos casos de câncer de mama no mesmo ano, com uma taxa de risco de 47,87 casos por 100 mil mulheres, valor superior à estimativa nacional (INCA, 2021b).

A estratégia mais eficaz para a prevenção do câncer de mama é a identificação precoce da lesão, por meio de exames clínicos, imagens diagnósticas, análise dos aspectos morfológicos das células e das características moleculares. Esses fatores são críticos na determinação do prognóstico da doença e na escolha do tratamento mais adequado (COLLATUZZO; BOFFETTA, 2023). Entretanto, um aspecto relevante em relação à prevenção do câncer de mama é que os fatores etiológicos da doença não são completamente definidos (KATUWAL et al.; 2020). Provavelmente, o câncer de mama surge da combinação de fatores genéticos (não modificáveis) e ambientais (modificáveis) (PETTAPIECE-PHILLIPS et al., 2015; CONSTANTINI et al., 2018). Alterações nos genes de suscetibilidade ao câncer de mama BRCA1 e BRCA2, hormônios esteroides sexuais e o estilo de vida, obesidade, tabagismo têm sido fortemente associados ao desenvolvimento do câncer (BRAY et al., 2018; KAMMIRE et al., 2022; SCHILSKY et al., 2020). As infecções por vírus oncogênicos também têm sido associadas ao desenvolvimento dessa neoplasia, entre esses vírus destaca-se o Papilomavirus humano (HPV) (LIMA, 2016; GUO et al., 2021).

A desregulação do ciclo celular é uma característica importante do câncer (KASTAN e BARTEK, 2004). Uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é a p16, que é consistentemente expressa no câncer (PALAFOX et al., 2022). A oncoproteína p16 atua regulando a via que é composta por ciclina D1, CDK4 e CDK6 e proteína Rb (retinoblastoma). A mutação de p16 pode levar a ativação da ciclina D1 (RANDY; POON, 2015), que se liga com outras proteínas, como por exemplo CDK4 e CDK6,

que quando são expressas denotam maior agressividade do tumor (KAMMIRE et al., 2022). O complexo formado promove a fosforilação da proteína Rb e a célula perde o controle que a mantém na fase G1 e entra descontroladamente na fase S (PAPADIMITRIOU et al., 2022). Desse modo, essas proteínas e suas interações são cruciais para entender os pontos-chave da supressão tumoral. Vale ressaltar que alterações em p16 podem levar à regulação negativa de genes, o que pode aumentar a incidência de câncer de células epiteliais (MAHAJAN et al., 2016).

Estudos realizados por meio de métodos imuno-histoquímicos demonstraram um aumento significativo nos níveis de p16 em pacientes com câncer de mama que receberam quimioterapia adjuvante, conforme relatado por KAMMIRE et al. (2022). Além disso, foi evidenciado que a expressão de p16 está correlacionada com fatores clinico-patológicos no câncer de mama (YANG et al., 2016). Embora alguns estudos relatem uma associação fraca entre a expressão imuno-histoquímica de p16 e o câncer de mama ductal invasivo, Kobierzycki et al. (2018) relataram que a desregulação do ciclo celular é o principal mecanismo envolvido no câncer de mama invasivo.

Nesse contexto, ressalta-se a necessidade de obter dados adicionais para avaliação mais detalhada da expressão da p16, especialmente em tumores mamários da população do Nordeste do Brasil, sobretudo na população Pernambucana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão da proteína p16 em amostras de lesão mamária arquivadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar o perfil das amostras de lesões mamárias subdividindo em lesões benignas e malignas, de acordo com o laudo histopatológico;
- ✓ Verificar os dados clínico-patológicos das pacientes e relacionar com a expressão da p16.
- ✓ Avaliar a eficácia da imuno-histoquímica para p16 aos diferentes tipos de câncer de mama.

1.2 HIPÓTESE

Foi testada a hipótese de que a expressão da p16 avaliada por imuno-histoquímica apresenta associação com diferentes subtipos de carcinoma mamário e com as condições clínico-patológicos das pacientes, tornando-se um fator prognóstico do câncer de mama.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER

O câncer é reconhecido por causar alterações em diversos processos celulares. Entre esses processos estão incluídos a transcrição, organização da cromatina, processamento de RNA, integridade genômica e sinalização, que são responsáveis por doenças caracterizadas por proliferação e crescimento celular desregulado, sobrevivência celular prolongada e reprogramação metabólica (MEHTA; ZHANG, 2022).

Por muitos anos, as mutações do DNA foram consideradas a principal causa do câncer, dando origem ao conceito mais popular e amplamente aceito no campo da biologia do câncer - a teoria da mutação somática (SAXENA et al., 2022). De acordo com essa teoria, uma mutação em uma única célula somática é o primeiro passo na formação do câncer (SONNENSCHNEIN et al, 2014). Essa mutação em uma célula é considerada suficiente para perturbar a regulação do ciclo celular, levando à proliferação celular descontrolada.

Recentemente, uma nova teoria sobre a origem e progressão do câncer foi proposta como alternativa à teoria da mutação somática. A teoria do campo de tecidos considera o câncer uma doença baseada em tecido (em vez de uma doença baseada em células), resultante de um desenvolvimento que não ocorreu de forma adequada (SOTO; SONNENSCHNEIN 2011). Segundo a teoria de organização de tecidos, a interação entre as células e o tecido circundante é o fator crucial na determinação do comportamento celular anormal e da formação do câncer (SONNENSCHNEIN; SOTO, 2015).

De todo modo, o câncer em humanos é uma doença complexa que resulta de interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais. No entanto, a taxa basal de mutação que ocorre naturalmente durante a replicação e o reparo do DNA em células em proliferação é um fator adicional que pode contribuir para carcinogênese, independentemente de fatores externos específicos (TRIVEDI et al., 2023). Assim, compreender esses processos naturais é essencial para avaliar a validade das diferentes teorias sobre a origem do câncer e desenvolver estratégias eficazes para preveni-lo e tratá-lo.

A prevenção e a política do câncer têm sido bem-sucedidas em destacar os fatores de risco do 'estilo de vida', como uso de tabaco, exposição ao sol, sedentarismo e, dieta (SCHILSKY et al., 2020). Além disso, o reconhecimento de carcinógenos químicos (como por exemplo, o amianto, o benzeno, o tabaco e seus derivados, o formaldeído e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e físicos (radiação ionizante, radiação gama e a radiação ultravioleta) aumentou a esperança de prevenir o câncer por meio da redução da exposição a esses agentes (TRIVEDI et al., 2023). Alguns agentes infecciosos também causam ou contribuem para cânceres humanos específicos ().

Estima-se que cerca de 20% dos cânceres estejam associados a infecções, tornando-se uma parcela significativa desse problema de saúde pública (FENG et al., 2008). Embora vários mecanismos sejam sugeridos para entender o papel da microbiota na etiologia do câncer, o mecanismo mais amplamente estudado envolve a regulação inflamatória, que recebeu considerável atenção científica, devido ao seu maior envolvimento na microbiota e na carcinogênese associada aos microrganismos (FRANCESCONI; HOU; GRIVENNIKOV, 2014).

Vale ressaltar que a prevenção é a maneira mais econômica de controlar a incidência de muitos tipos de câncer. Para criar estratégias de prevenção de câncer que sejam custo-efetivas, os pesquisadores precisam combinar o conhecimento sobre os fatores de risco (prevenção primária) ou abordagens para detecção precoce (prevenção secundária), com estimativas válidas da sua distribuição na população (COLLATUZZO; BOFFETTA, 2023).

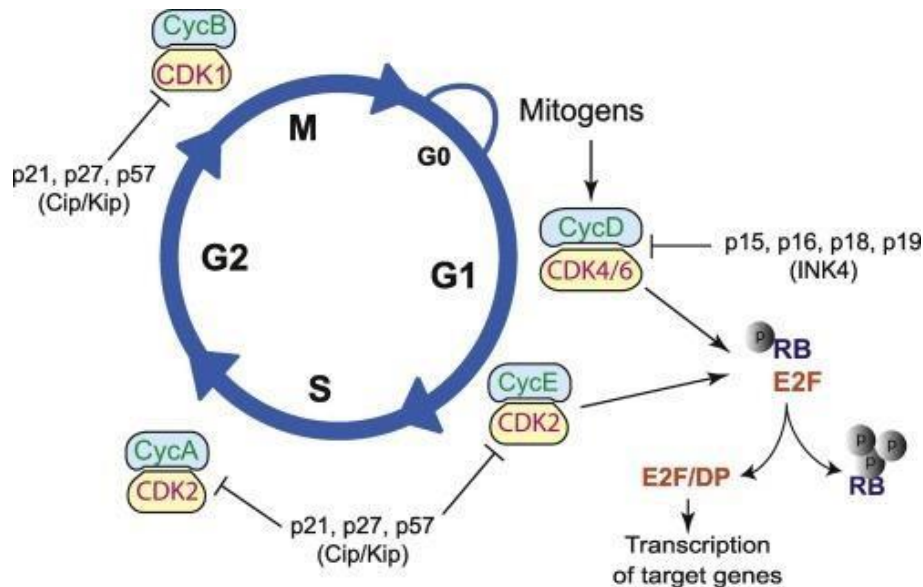
2.2 CICLO CELULAR E CÂNCER

A desregulação do ciclo celular é uma das principais causas de neoplasias malignas, mais conhecidas como câncer. (KASTAN e BARTEK, 2004). A proliferação e a progressão do câncer envolvem vias metabólicas alteradas como resultado da demanda contínua por energia e nutrientes (RANDY e POON, 2015).

As células eucarióticas dividem seu ciclo celular em dois períodos principais: o período mais longo, a interfase é composto por quatro fases diferentes: fase G1 (onde as células crescem ou entram em estado quiescente, G0), fase S (onde ocorre a síntese do DNA), G2 (células se preparam para a mitose) (Fig. 1). O segundo e mais curto período é a mitose, ou fase M, onde as células dividem o material genético e ocorre a citocinese. Para que uma célula quiescente se divida, sinais mitogênicos são

necessários para desencadear uma cascata de eventos que convergem na liberação de fatores de transcrição E2F que são responsáveis pela expressão de genes envolvidos na iniciação da fase S (LEAL-ESTEBAN, FAJAS, 2020).

Figura 1- Representação esquemática do ciclo celular



Fonte: Leal-Esteban, Fajas, 2020.

No ciclo celular, a transição pelas diferentes fases é fortemente controlada pelas ciclinas (cyc) e quinases dependentes de ciclina (CDKs), os inibidores de CDK (CDKI) e a família de proteínas do retinoblastoma (pRb) (PAPADIMITRIOU et al., 2022). A participação dos complexos CDKs-ciclinas ocorre quando as células quiescentes são estimuladas a entrarem em divisão, por meio de fatores de crescimentos externos (MEHTA; ZHANG, 2022). As primeiras CDKs a serem fosforiladas pela CDK- são as CDK4 e CDK6, que em associação com a ciclina D e p21WAF1 ou p27KIP1 e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), direciona o progresso da fase G1 para S (WEINBERG, 1995).

Convencionalmente, as ciclinas do tipo D (ciclinas D1, D2 ou D3) se acumulam em resposta a sinais mitogênicos fisiológicos ou sinais oncogênicos que conduzem a proliferação celular (DIEHL, 2002). No início da fase G1, as ciclinas D1, D2 e D3 se combinam com CDK4 e CDK6 ativados por sinalização extracelular (como citocinas, mitógenos, contatos célula-célula e indutores de diferenciação) e esse complexo posteriormente conduz a fosforilação do supressor de tumor do retinoblastoma (RB) e proteínas relacionadas (p107 e p130) (KNUDSEN et al., 2019).

No fim da fase G1 e início da fase S, em que os fatores externos não são mais necessários, os complexos ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2 são ativados, desencadeando a replicação do DNA. Após o término da síntese, ciclina B-CDK1 conduz o ciclo à mitose (SERRANO, 2000). Na divisão celular, o processo de passagem da fase G1 para a fase S pode ser limitado, sendo esse processo denominado senescência celular (CAMPISI; FAGANA, 2007). O termo "senescência celular" foi inicialmente usado para descrever o estado de parada proliferativa irreversível de células cultivadas que atingiram seu limite replicativo. Atualmente, esse termo é amplamente utilizado para descrever estados de parada do ciclo celular em diversas configurações biológicas *in vivo*. Esses estados incluem a perda associada à idade de capacidade regenerativa, supressão tumoral, inflamação, cicatrização de feridas e embriogênese (SHARPLESS; SHERR, 2015).

Alguns autores abordam o processo de senescência celular como um evento antagonista, no qual demonstraram que fibroblastos senescentes do estroma podem estimular a hiperproliferação e progressão a malignidade de células epiteliais pré-neoplásicas e neoplásicas *in vitro* e *in vivo*. Desse modo, a senescência protege os organismos do câncer no início da vida, mas promove a doença no período tardio da vida (SHARPLESS; SHERR, 2015; KAMMIRE et al., 2022).

A senescência celular tem sido associada a muitos fatores de estresse relacionados ao câncer e tem um papel importante na supressão tumoral. Nesse contexto, o supressor de tumor p16INK4A' (p16) é frequentemente apontado como um marcador de senescência.

2.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16

As CDKIs (inibidores de quinase dependente de ciclina) são proteínas reguladoras negativas que exercem a função de inibir a atividade das CDKs (quinases dependente de ciclina). A família INK4 (inibidores de CDK4), composta por quatro membros - p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c e p19INK4d - atua especificamente inibindo o complexo ciclina D/CDK4-6. Por outro lado, a família CIP/KIP (proteína que interage com CDK e proteína que interage com quinase) é composta por três membros - p21WAF1, p27KIP1 e p57KIP2 – os quais têm a capacidade de inibir todos os complexos ciclina-CDKs (SERRANO, 2000).

A p16, um conhecido inibidor do ciclo celular codificado pelo *locus* do gene CDKN2A (que também codifica p19), desempenha um papel importante na interrupção do ciclo celular e na manutenção do estado de senescência celular (RUNJHUN et al. 2022). A p16 é um inibidor de quinase dependente de ciclina que promove a parada do ciclo celular por inativar o supressor de tumor retinoblastoma (LI et al., 2011). Em última instância, a proteína p16 atua inibindo as atividades a jusante de fatores de transcrição, como o E2F1, resultando na interrupção da proliferação celular (LEAL-ESTEBAN, FAJAS, 2020).

Várias linhas de evidência suportam o papel da p16 como um supressor tumoral (ROMAGOSA et al., 2011; SHARPLESS; SHERR, 2015). Em células não cancerosas, a presença adequada de P16 limita a progressão do ciclo celular e evita a proliferação descontrolada de células. No entanto, em células cancerosas, a inativação ou mutação de P16 pode levar à hiperativação das CDKs e a progressão descontrolada do ciclo celular, favorecendo a formação de tumores (PAPADIMITRIOU et al., 2022). A hipermetilação, mutação ou deleção do gene que codifica p16 pode levar à regulação negativa do mesmo, o que aumenta a incidência de malignidades em certos tipos de câncer, como melanoma, carcinoma de células escamosas da orofaringe, câncer cervical e câncer de esôfago (MAHAJAN et al., 2016; MURPHY et al., 2004).

A p16 e a proteína de retinoblastoma (RB) existem em um loop de feedback negativo de modo que, na ausência de RB funcional, a expressão de p16 é aumentada (GUO et al., 2021). Foi demonstrado que a expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV podem inativar as funções supressoras de tumor do gene p53 e do retinoblastoma (Rb) (KIM et al., 2018) e na superexpressão recíproca da proteína p16. Desse p16 tem sido comumente utilizado como um marcador substituto para o status do HPV ().

A detecção por imuno-histoquímica de p16 é muito sensível para identificar infecções por HPV de alto risco (HR-HPV), transcricionalmente ativo em câncer (KIM et al., 2018). P16 é um indicador da atividade oncogênica da proteína E7 do vírus do papiloma humano (HPV). A proteína E7 tem a habilidade de se ligar à proteína Rb, o que resulta na rápida progressão do ciclo celular e perda de controle sobre a integridade do DNA. A conexão entre E7 e Rb libera a produção de p16 de seu controle por feedback negativo, aumentando seus níveis na célula, a fim de tentar inibir a proliferação descontrolada.

Em resumo, p16 é um indicador importante da atividade oncogênica da proteína E7 do HPV, e seus níveis elevados indicam uma possível progressão do câncer (PINTO; ZANINE, 2023). P16 indica muito mais do que a presença de um vírus de alto risco. O HPV de alto risco pode estar presente sem que nada aconteça, o p16 é um marcador sensível e específico de lesões potencialmente transformadoras (PINTO; ZANINE, 2023).

A avaliação da proteína p16 pode ser realizada por meio de métodos imuno-histoquímicos em amostras de tecidos com lesões pré-neoplásicas e de câncer (MURPHY, N. et al.2004). A expressão da p16 pode ser observada como coloração citoplasmática e/ou nuclear. Mutações nesta proteína e/ou sua inativação foram demonstradas em vários tipos de câncer. No material de biópsia, uma amostra é considerada p16 positiva quando 30-75% das células tumorais exibem coloração nuclear e citoplasmática difusa e confluyente moderada a forte (LEWIS et al., 2017). As amostras para as quais 50-70% das células exibem coloração requerem um teste mais específico (LEWIS et al., 2017).

Ainda há poucas informações disponíveis sobre a efetividade e a relevância prognóstica do p16 no câncer de mama. Embora a importância da expressão de p16 tenha sido reconhecida em vários tipos de cânceres humanos, sua relevância no câncer de mama ainda não foi amplamente estudada.

2.4 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea que apresenta amplo padrão de comportamento, evolução e resposta terapêutica, constituindo um sério problema de saúde pública (SUN et al. 2021). A incidência global estimada desta neoplasia é aproximadamente 2,3 milhões de casos, o que representa quase um quarto de todos os pacientes com câncer (IARC, 2020). Apesar dos avanços terapêuticos, o câncer de mama representa 15% da mortalidade total por câncer em mulheres, destacando-se como principal causa de morte por câncer em mulheres de todo mundo (BRAY et al., 2018).

No Brasil, estimam-se 66.280 novos casos de câncer de mama para cada ano entre 2020-2022, o que representa um risco estimado de 61,61 casos novos por 100 mil mulheres (INCA, 2021a). No Nordeste, 11.860 casos eram esperados para 2019, com risco de 40,36 casos por 100 mil mulheres. Em Pernambuco, o número de casos

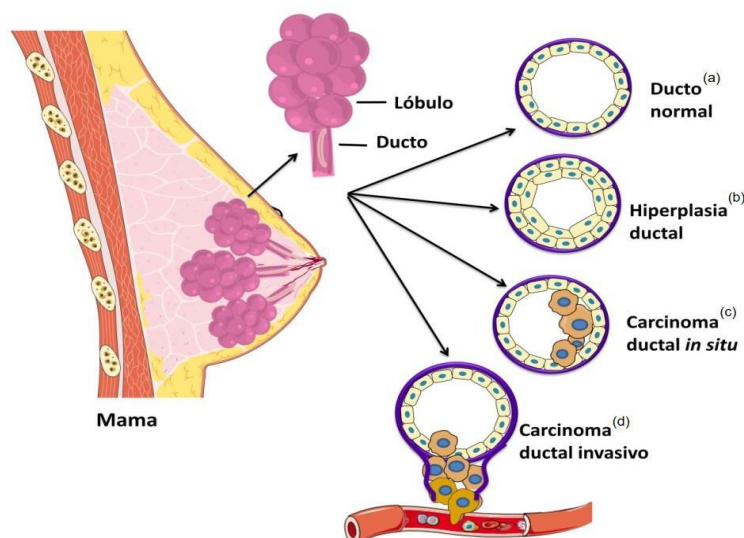
nesse mesmo ano foi estimado em 2.680, com risco de 54,37 casos por 100 mil mulheres, o que coloca o estado na nona posição em relação a incidência de câncer de mama (INCA, 2021b). Aliado à alta incidência desse tipo de câncer no país, destaca-se o fato das lesões serem diagnosticadas tardiamente, o que reduz as chances de tratamento adequado e a taxa de sobrevivência das pacientes (INCA, 2021b). Desse modo, a estratégia mais eficaz contra esse tipo de câncer ainda é a detecção precoce.

Além do atraso no diagnóstico e no acesso às terapias, fatores como condições socioeconômicas e geográficas estão associados a taxa de mortalidade pela doença no Brasil, que atingiu 18.068 em 2019 (LEE et al., 2012; INCA, 2020). Apesar da ampliação das ações de prevenção ao câncer de mama, o Sistema Único de Saúde (SUS) enfrenta desafios em relação ao acesso uniforme ao diagnóstico precoce por rastreamento mamográfico (TOMAZELLI; SILVA, 2017). Desta forma, é muito importante que o rastreamento do câncer de mama seja realizado de maneira efetiva, uma vez que o diagnóstico precoce é fator decisivo na determinação do prognóstico.

Além disso, o risco de morte entre pacientes com carcinoma de mama também depende de muitos outros fatores, como *status* do receptor de hormônio, histologia do câncer de mama e condições de saúde pré-existentes (KATUWAL et al., 2021). A classificação histológica do câncer de mama está intimamente relacionada a sua estrutura anatômica e ao tipo de célula envolvido no processo neoplásico (MALHOTRA et al., 2010; BARROS et al., 2015). A glândula mamária é dividida em lóbulos de glândulas túbulo-alveolares entremeadas por tecido conjuntivo e tecido adiposo; cada lóbulo possui o seu ducto excretor ou galactóforo. A neoplasia mamária se origina a partir do crescimento desordenado de células geneticamente modificadas que possuem grande habilidade de invasão tecidual (Figura 1).

A classificação histológica dos carcinomas de mama compreende os carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos que podem ser ductais e lobulares. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por células tumorais localizadas nos ductos ou lóbulos sem degradação da membrana basal ou invasão estromal (HONDERMARCK et al., 2008). Por outro lado, os carcinomas invasivos constituem um grupo de tumores epiteliais malignos que apresentam invasão de tecidos adjacentes que possuem elevada tendência para gerar metástases (BIANCHINI NCA. 2021).

Figura 2. Células do ducto mamário progredindo para carcinoma ductal invasivo. (a) epitélio normal; (b) hiperplasia ductal; (c) carcinoma *in situ* e (d) carcinoma invasivo.



Fonte: Lima, E.G. (2016)

Em relação aos carcinomas invasivos, o tipo mais frequente é o carcinoma ductal invasivo (50 a 75%), seguido do carcinoma lobular invasivo (5 a 15%). Os demais tipos encontrados são menos frequentes e incluem o carcinoma tubular, mucinoso, medular e metaplásico, entre outros (GOBBI, 2012). Os carcinomas ductais têm um crescimento local expansivo e tendência à disseminação via ductos locais, porém o carcinoma lobular, cresce de maneira insidiosa, sem um padrão radial, e com tendência a multicentricidade (INCA, 2011). Além disso, o carcinoma lobular apresenta maior taxa de bilateralidade e recidiva local.

O grau de diferenciação histológica é uma medida de grande utilidade na clínica e reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização. Segundo a OMS os tumores classificam-se em: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado) (SKALAND et al., 2008). Devido à alta heterogeneidade dos tumores de mama, a classificação anatomopatológica não é suficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e resposta à terapia (REIS-FILHO, 2006).

Testes diagnósticos desempenham um papel crítico no manejo do câncer de mama, particularmente o perfil molecular do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) por imuno-histoquímica (IHC) (SLOSTAD et al., 2022). Os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) estão localizados no núcleo do epitélio normal da mama e nas células neoplásicas e estão relacionados com a diferenciação tumoral, taxa de proliferação celular entre outras características prognósticas (ALLISON et al.,

2020). A determinação do status dos receptores é realizada rotineiramente em laboratórios de patologia por meio da imuno-histoquímica e se mostrou tão eficaz quanto os ensaios biológicos na predição da resposta às terapias hormonais e do desfecho da doença há muito tempo (ALISSON, et al., 2020; BELTJEANS et al., 2021).

O Receptor tipo-2 do fator de crescimento epidérmico humano é uma glicoproteína transmembrana com atividade semelhante ao receptor do fator de crescimento. Sua superexpressão está relacionada com maior grau histológico, maior agressividade tumoral, redução da sobrevida e aumento da recorrência e mortalidade das pacientes. Quanto à resistência aos tratamentos, os dados da literatura apesar de conflitantes evidenciam associações significativas (WOLFF et al., 2018; CIRQUEIRA et al., 2011).

Com base nos perfis de expressão gênica e informações dos receptores (ER, PR e HER2) e as características das células epiteliais, o câncer de mama é classificado em diferentes subtipos moleculares (CIRQUEIRA et al., 2011). O subtipo *Luminal A*, tem origem das células epiteliais dos lúmens ducto-lobulares e tende a crescer de forma relativamente lenta, apresenta melhor prognóstico. Por outro lado, o subtipo *Luminal B*, possui crescimento um pouco mais acelerado e possui prognóstico menos promissor quando comparado a *Luminal A*; a incidência é de aproximadamente 20 a 30% dos casos de câncer de mama (Breastcancer.org, 2019; DE BARROS; LEITE, 2015). O subtipo com superexpressão de HER-2, cresce mais rapidamente que os cânceres luminais e possui pior prognóstico.

O subtipo triplo-negativo é caracterizado por um percurso clínico agressivo e por apresentar pior prognóstico de todos (BIANCHINI et al., 2018). O câncer triplo-negativo representa aproximadamente 12% de todos os cânceres de mama (JONH et al., 2018). Geralmente são diagnosticados em mulheres mais jovens em comparação

com os outros grupos. Os subtipos de câncer de mama, segundo a expressão dos marcadores de imuno-histoquímicas (IHC) podem ser observados na Tabela 1.

O câncer de mama, assim como outras lesões neoplásicas é uma doença multifatorial, que provavelmente surge da combinação de fatores genéticos e ambientais (CONSTANTINI et al., 2018). Dentre os fatores individuais, a idade superior a 50 anos, vida reprodutiva, idade da menarca, menopausa tardia, maternidade e lactação, história familiar positiva de câncer de ovário e mama são de grande relevância (INCA, 2019; KATUWAL et al., 2021). Nesse contexto, o estilo de vida que inclui alimentação, sedentarismo, obesidade, consumo excessivo de álcool e tabagismo também são fatores relevantes na investigação da etiologia do carcinoma mamário (PETTAPIECE-PHILLIPS, et al, 2015).

Tabela 1. Classificação dos subtipos do câncer de mama

Subtipo Intrínseco	Classificação IHC (GOLDHIRSH et al., 2011)
Luminal A	“Luminal A” <i>RE</i> e ou <i>RP</i> positivo <i>HER2</i> negativo <i>Ki67</i> <14%
Luminal B	“Luminal B (<i>HER2</i> negativo)” <i>RE</i> e ou <i>RP</i> positivo <i>HER2</i> negativo <i>Ki67</i> ≥14% “Luminal B (<i>HER2</i> positivo)” <i>RE</i> e ou <i>RP</i> positivo Qualquer <i>Ki67</i> <i>HER2</i> sobre expresso ou amplificado
<i>HER2</i> positivo	“ <i>HER2</i> positivo (não luminal)” <i>HER2</i> sobre expresso ou amplificado <i>RE</i> e <i>RP</i> ausentes
Basal like	“Triplo negativo” <i>RE</i> e <i>RP</i> ausentes <i>HER2</i> negativo

Em relação aos fatores de risco genéticos que contribuem para o surgimento do carcinoma de mama estão as mutações nos genes *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*Breast cancer 2, early onset*) (BRAY et al., 2018). Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pela expressão de fatores que inibem o crescimento

celular, atuam no controle do ciclo celular, regulação da transcrição gênica e apoptose. Mulheres com uma mutação nos genes *BRCA1 / 2* enfrentam risco de desenvolver câncer de mama da ordem de 55%, em comparação com 12% na população em geral (BERRINO et al., 2015; ZHU et al., 2016).

Outro gene envolvido no desenvolvimento de várias neoplasias é o TP53 (localizado no braço curto do cromossomo 17). Esse gene atua como modulador do ciclo celular por bloqueio da divisão celular entre as fases G1 e S. No câncer de mama, mutações em TP53 estão associadas com a doença mais agressiva e pior sobrevida global (GASCO et al., 2002). A frequência das mutações no TP53 é em torno de 20 a 50%, observando-se alta expressão no câncer triplo negativo (WANG et al., 2015).

O uso da Imuno-histoquímica melhorou significativamente a precisão do diagnóstico dos carcinomas (FU et al., 2015; STIASNY et al., 2016), mas em alguns casos a interpretação dos resultados continua sendo um desafio (PEREIRA et al., 2021). Estudos realizados para avaliação da eficácia da expressão de p16 evidenciaram correlação entre a expressão e fatores clínico-patológicos em casos de câncer de mama (YANG et al., 2016). Enquanto outros estudos apontam para uma associação fraca entre a expressão imuno-histoquímica de p16 e o câncer de mama ductal invasivo (KOBIERZYCKI, et al., 2018).

De acordo com Yang et al (2016) a desregulação do ciclo celular no câncer de mama invasivo é frequentemente associada à expressão compensatória elevada de p16INK4a, sugerindo que esse gene desempenha um papel crucial na progressão tumoral. Dessa forma, a alta expressão de p16INK4a pode ser um marcador molecular específico importante para o câncer de mama invasivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E SELEÇÃO DE AMOSTRAS

Trata-se de um estudo observacional, analítico transversal. O estudo foi centrado em 45 amostras de tecido de mama (blocos parafinados de biopsia- core biopsia) de pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da UFPE (HC/UFPE) no período de 2018 a 2021. Os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório de Patologia do HC/UFPE, Recife, Pernambuco. Os blocos de parafina estavam

arquivados no setor de Anatomia Patológica do HC/UFPE. Dados clínico-patológicos das pacientes foram coletados dos prontuários.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas no estudo as amostras de biopsia de carcinoma mamário provenientes de pacientes adultas (18 anos ou mais) com laudo histopatológico e com material parafinado de amostras arquivado no Setor de Patologia do HC/UFPE. Pacientes que aceitaram participar do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram excluídas as amostras de tumores em bloco de parafina com danos, mal emblocados e/ou conservados. Também foram excluídas da pesquisa amostras de pacientes menores de 18 anos.

3.3 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

As informações coletadas dos prontuários das pacientes foram idade, cor, característica do tumor (maligno e benigno) e tipo histológico.

3.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.4.1 Reação imuno-histoquímica

Os blocos parafinados foram cortados em lâminas de 4 µm usando um micrótomo e, posteriormente, incubados em estufa a 60°C por quatro horas. Após a desparafinização e reidratação com álcool graduado (100%, 90%, 70% e 50% etanol e água destilada) por cinco minutos, procedeu-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por exposição a H₂O₂ 3% por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram tratadas com água destilada e solução salina tamponada com fosfato (PBS) por minutos.

3.4.2 Coloração imuno-histoquímica de p16

Para a coloração as lâminas foram incubadas durante uma noite a 4°C com anticorpo Anti-CDKN2A/p16INK4a(JC8) sc-56330 (Santa Cruz Biotechnology, code: G-175-405), na diluição 1:100. No dia seguinte, após lavagem com PBS por 5 minutos, as amostras foram incubadas por 15 minutos com o anticorpo amplificador, depois lavadas novamente com PBS, incubadas com o reagente de visualização HRP

(ImPRESS Polymer Reagent) por 30 minutos. Após essa etapa, foram efetuadas 2 lavagens com PBS, e incubadas por 5 minutos com a solução cromógena DAB do kit (o tempo foi padronizado conforme pilotos realizados anteriormente).

Após seguir rigorosamente o tempo de exposição ao cromógeno, as lâminas foram rapidamente lavadas em PBS, 2 vezes, por 5 minutos cada. Depois, realizou-se a lavagem com água e efetuou-se a contracoloração por 1 minuto e 30 segundos com hematoxilina diluída em 1:2 com água destilada. Por fim, as lâminas foram colocadas para secar verticalmente em papel toalha, montadas com com lamínula e Entellan® (Merk). Um controle negativo foi preparado a partir do mesmo bloco de tecido, mas incubado em solução tampão fosfato em vez do anticorpo primário. O controle positivo para imuno-histoquímica da p16 foi carcinoma de células escamosas cervical, que tem alta expressão de p16. A análise foi realizada de acordo com as recomendações do College of American Pathologists para análise do HPV em carcinomas de cabeça e pescoço usados na prática clínica de rotina (LEWIS et al., 2018).

3.4.3 Método semiquantitativo para avaliação da imunorreação da p16

A imunorreação da p16 foi interpretada da seguinte forma: alta expressão de p16 - tumores com coloração nuclear e citoplasmática $\geq 70\%$; expressão moderada de p16 - tumores com 30-70% de coloração nuclear e citoplasmática; baixa expressão de p16: tumores com 10-30% de coloração nuclear e citoplasmática, o que é considerado como expressão positiva anormal de p16; e p16 negativo: tumores com 1-10% de coloração nuclear e citoplasmática, considerados como expressão de p16 negativa normal.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 28508614.9.0000.5208 (Anexo A) ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

As participantes que aceitaram fazer parte da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B), garantindo que estavam cientes dos objetivos e procedimentos do estudo. É importante ressaltar que a

identidade das participantes foi preservada e que o projeto não interferiu nos procedimentos de rotina do serviço.

3.6 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados da expressão da p16 e das características clínico-patológicas das pacientes foram expressas como frequências e porcentagens. Para avaliar a associação entre a expressão da p16 e as variáveis clínico-patológicas das pacientes foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson.

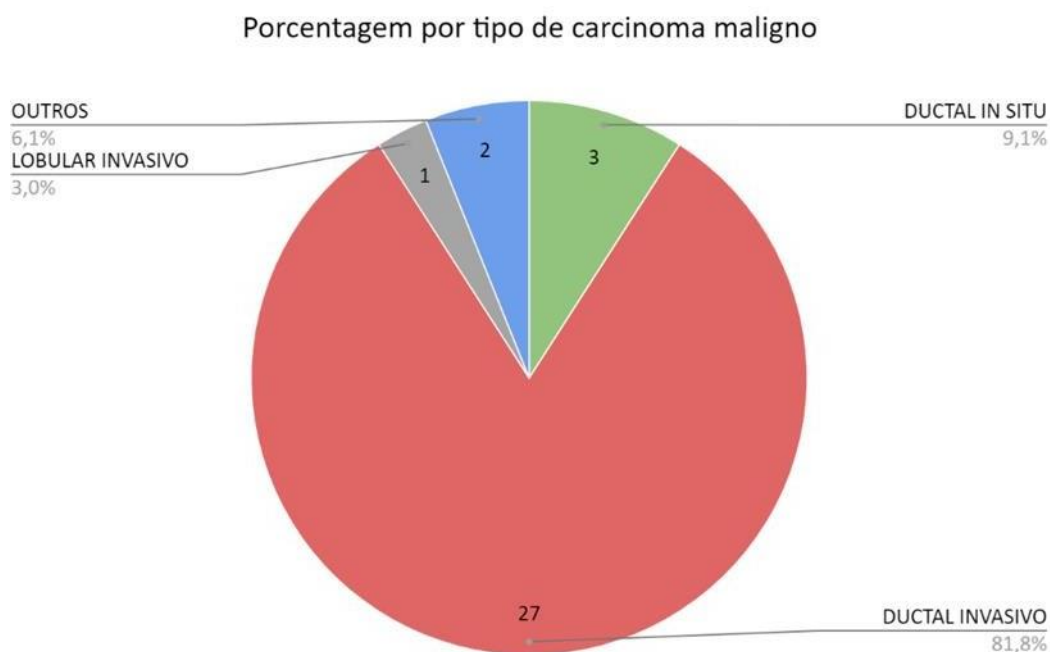
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo incluiu 45 casos de carcinoma mamário, dos quais 33 (81,8%) foram classificados como malignos e 12 como benignos (26,66%), sendo todos de fibroadenoma (Tabela 2). Quanto aos tumores malignos, 27 (81,8%) foram diagnosticados como carcinoma ductal invasivo, 3 (9,09%) como carcinoma ductal *in situ* e 1 (3,03%) como carcinoma lobular invasivo. Além disso, foram registrados 2 casos (6,06%) de outros tipos de carcinoma mamário (Figura 3). O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama, representando cerca de 70% a 80% de todos os tumores de mama (INCA, 2019).

Tabela 2 – Dados clínicos e demográficos das pacientes com câncer de mama coletados dos prontuários

Características	N=45
Idade (anos) (média)	53,8
Cor	
Branca	26 (57,7%)
Parda	14 (31,11%)
Preta	5 (11,1%)
Tipo de tumor	
Maligno	33 (81,8%)
Benigno	12 (26,66%)

Figura 3. Distribuição dos casos de carcinomas malignos observados nas pacientes do estudo



A média da idade das participantes foi de 53,8 anos (Tabela 2), a idade mínima foi de 28 e máxima de 87 anos. A faixa etária com maior incidência de câncer foi entre 40 e 60 anos (Tabela). No entanto, 11 pacientes apresentaram idade ao diagnóstico superior a 65 anos. Em relação a cor, maior número de participantes era parda (n=26), seguido por brancas (n=14) e negras (n=5).

No Brasil, o público-alvo para o rastreamento do câncer de mama com mamografia bilateral bienal são mulheres entre 50 e 69 anos. Contudo, mulheres com menos de 50 ou com 70 anos ou mais também devem realizar a mamografia de acordo com o risco da doença após avaliação médica (INCA, 2021). O sistema de classificação radiológica das mamografias, conhecido como *Breast Imaging-Reporting and Data System* (BI-RADS), é utilizado para indicar a necessidade de biópsia de mama. Desse modo, a biópsia de mama é relativamente comum em mulheres com 50 anos ou mais (INCA, 2021), o que está de acordo com a média de idade das pacientes que realizaram biópsia e tiveram as amostras analisadas no presente estudo. Vale destacar que apesar dos esforços de ampliação das medidas preventivas contra o câncer de mama, o Sistema Único de Saúde (SUS) enfrenta desafios no que diz

respeito ao acesso equitativo ao diagnóstico precoce por meio do rastreamento mamográfico (TOMAZELLI; SILVA, 2017).

Estudos epidemiológicos têm abordado as disparidades étnicas relacionadas ao câncer de mama (DESANTIS et al., 2016; DESHPANDE et al., 2009). A incidência entre mulheres negras é ligeiramente reduzida em comparação com mulheres brancas, entretanto alguns estudos demonstraram que as taxas de mortalidade entre mulheres negras são maiores (DESANTIS et al., 2016; YEDJOU et al., 2019).

Entre as 45 amostras selecionadas para o estudo, 15 apresentarem material insuficiente para avaliação imuno-histoquímica. Das amostras avaliadas quanto à expressão da p16 (n=30), 22 apresentaram imunorreatividade, sendo a maioria dos casos de imunorreatividade nuclear moderada (n=13; 59%) de acordo com a classificação adotada de expressão da p16. Oito amostras não expressaram a proteína p16, ou seja, foram classificadas como p16 negativas.

Estudos anteriores com câncer de mama relataram incidências de positividade p16 entre 31% e 90%, o que é comparável com os achados do presente estudo (KOBIERZYCKI et al., 2018; SALIH et al., 2021). No entanto, a ampla variação na positividade encontrada nos estudos, pode ser atribuída, em sua maioria, à sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de detecção utilizados, uma vez que esses fatores desempenham um papel importante na determinação da precisão dos resultados obtidos (SALIH et al., 2022; STIASNY et al., 2016).

Tabela 3. Expressão imuno-histoquímica da p16 em amostras de lesão de mama

Expressão Imuno-histoquímica p16	
Amostras elegíveis (n = 30)	30
Reação Positiva	22 (73,3%)
Reação Negativa	8 (26,7%)
Tipo de Reação positiva (n=22)	
Alta	6 (27%)
Moderada	13 (59%)
Baixa	3 (14%)

Alta expressão de p16: coloração nuclear e citoplasmática $\geq 70\%$; expressão moderada de p16: tumores com 30-70% de coloração nuclear e citoplasmática; baixa expressão de p16: tumores com 10-30% de coloração nuclear e citoplasmática, o que é considerado como expressão positiva anormal de p16; e p16 negativo: tumores com 1-10% de coloração nuclear e citoplasmática, considerados como expressão de p16 negativa normal.

A maioria das amostras diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo apresentou reação positiva para p16, com variação na intensidade de expressão entre baixa, moderada e alta, conforme evidenciado na Tabela 4. Cabe ressaltar que a alta expressão de p16 foi observada exclusivamente neste tipo histológico de câncer (Tabela 4). Segundo o estudo realizado por Yang et al. (2016), comumente observa-se uma desregulação do ciclo celular no câncer de mama invasivo, a qual está frequentemente associada a expressão aumentada compensatória do gene p16INK4a. De acordo com os autores esse achado sugere que o referido gene desempenha um papel fundamental na progressão tumoral no câncer de mama ductal invasivo. Desse modo, a elevada expressão do gene p16INK4 foi considerada um marcador molecular relevante para a identificação do câncer de mama invasivo. Por outro lado, estudos apontam para uma associação fraca entre a expressão imuno-histoquímica de p16 e o câncer de mama ductal invasivo (KOBIERZYCKI, et al., 2018).

Ainda em relação ao carcinoma ductal invasivo, reação negativa de p16 foi observada em três amostras (Tabela 4). Essa perda de expressão da p16 pode estar relacionada a diferentes mecanismos, como deleções gênicas, mutações ou silenciamento epigenético. Esses eventos podem ocorrer em neoplasias malignas não diretamente associadas ao HPV, como tumores de mama e carcinomas de cabeça e pescoço (MAHAJAN et al., 2016; KIM et al., 2018). Embora o DNA de alguns tipos de HPV tenha sido registrado em amostras de câncer, o possível papel causal do HPV ainda não está bem claro (LI et al., 2015).

Tabela 4. Intensidade da expressão da p16 em diferentes tipos histológicos de câncer de mama

Tipo Histológico	Baixa	Moderada	Alta	Negativa
Carcinoma Ductal In Situ	1	1	0	1
Carcinoma Ductal Invasivo	5	7	3	3
Carcinoma Lobular Invasivo	0	1	0	0
Fibroadenoma	0	3	0	3
Outros Carcinomas	0	1	0	1

Alta expressão de p16: coloração nuclear e citoplasmática $\geq 70\%$; expressão moderada de p16: tumores com 30-70% de coloração nuclear e citoplasmática; baixa expressão de p16: tumores com 10-30% de coloração nuclear e citoplasmática, o que é considerado como expressão positiva anormal de p16; e p16 negativo: tumores com 1-10% de coloração nuclear e citoplasmática, considerados como expressão de p16 negativa normal.

No presente estudo, três amostras de tumores benignos (fibroadenoma) apresentaram expressão positiva moderada da p16 (Tabela 4) e outras três demonstraram reação negativa (Tabela 4). Em estudo conduzido por GUO et al. (2021) a avaliação da expressão da p16 por imuno-histoquímica revelou resultados positivos em uma das 33 amostras (3,0%) de tecido de redução benigna da mama, assim como em dois casos (6,1%) de papiloma intraductal. Além disso, foram identificados três casos (9,1%) de redução benigna da mama e seis casos (18,8%) de papiloma intraductal com amplificação dos vírus HPV 16/18. Essa amplificação pode indicar uma associação entre esses tipos de lesões e os tipos de HPV de alto risco. Por outro lado, apenas um caso (3%) de papiloma intraductal apresentou expressão de HPV 6/11, enquanto nenhuma amostra de tecido de redução mamária apresentou essa expressão. Os achados do estudo de Guo et al. (2021) apontam a importância da avaliação da expressão da p16 e da detecção de tipos específicos de HPV para melhor compreensão da progressão das lesões mamárias benignas.

Algumas condições benignas também apresentam reação positiva de p16, como metaplasia tubária endocervical e glândulas endometriais (MURPHY et al., 2004). Coloração imuno-histoquímica para p16 no endométrio com glândulas endometriais normais mostraram uma variedade de padrões de coloração de citoplasmática negativa a positiva intensa coloração com positividade nuclear ocasional. Enquanto, o tecido cervical normal, tecido que compõe o colo do útero, não apresentou nenhuma reatividade da p16. De modo geral, a recomendação da literatura é que um amplo painel de marcadores imuno-histoquímicos, dos quais p16INK4A, deve ser usado na diferenciação lesões benignas e malignas.

A expressão de p16 não apresentou correlação com a idade, cor ou tipo de tumor (benigno e maligno) e diferentes tipos histológicos. Esse achado está de acordo com outros estudos realizados com amostras de tecido mamário, que não encontraram associações entre a expressão de p16 e características demográficas e clínicas (SALIH et al., 2022). Por outro lado, estudos realizados para avaliação da eficácia da expressão de p16 evidenciaram correlação entre a expressão e fatores clínico-patológicos em casos de câncer de mama (YANG et al., 2016). Entretanto, cabe ressaltar que correlação entre a expressão de p16 e a idade na neoplasia de mama não está bem descrita. De acordo com Kammire et al., (2022) a expressão

aumentada de p16 está diretamente relacionada à senescência celular e é um biomarcador robusto do envelhecimento em humanos.

O câncer de mama, assim como outras lesões neoplásicas é uma doença multifatorial, que surge da combinação de fatores genéticos e ambientais (CONSTANTINI et al., 2018). Dentre os fatores individuais, a idade superior a 50 anos, vida reprodutiva, idade da menarca, menopausa tardia, maternidade e lactação, história familiar positiva de câncer de ovário e mama são de grande relevância (INCA, 2019). Nesse contexto, o estilo de vida que inclui alimentação, sedentarismo, obesidade, consumo excessivo de álcool e tabagismo também são fatores relevantes na investigação da etiologia do carcinoma mamário (PETTAPIECE-PHILLIPS, et al, 2015).

A aplicação de métodos imuno-histoquímicos no estudo de carcinomas mamários tem sido explorada em várias pesquisas. No entanto, ainda há uma lacuna significativa em relação ao número de estudos que abordam especificamente a utilização da proteína p16 nesse contexto (SALIH et al., 2022). Atualmente, a avaliação de p16 é realizada para melhorar a precisão do diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial cervical grau 3. Além disso, estudos demonstraram que a expressão da proteína p16 apresenta uma boa concordância com a infecção pelo HPV de alto risco (HPV 16/18) em lesões intraepiteliais escamosas (THOMAS; PRIMEAUX, 2012), porém sua importância na carcinogênese da mama ainda é controversa,

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que o uso da expressão da p16 isoladamente não é fator prognóstico relevante para o câncer de mama nas condições avaliadas. Recomenda-se estudos adicionais para determinar um painel mais abrangente de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, provavelmente em combinação com a p16, a fim de aprimorar a avaliação prognóstica e a compreensão da progressão das lesões mamárias.

REFERÊNCIAS

ALLISON, K. H. et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology: Official**

Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 38, n. 12, p. 1346-1366, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02309>.

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

BELTJENS, F. et al. ON-. ER-/PR+ breast cancer: A distinct entity, which is morphologically and molecularly close to triple-negative breast cancer. **Molecular Cancer Biology**, v. 149, p. 200-213, 2021. Doi: 10.1002/ijc.33539

BERRINO, J. et al. Estimate of the penetrance of BRCA mutation and the COS software for the assessment of BRCA mutation probability. **Familial Cancer**, v. 14, p. 117-1128, 2015

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674-690, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, n.68, v.6, p.394-424, 2018.

BREASTCANCER.ORG. **There are five main intrinsic or molecular subtypes of breast cancer that are based on the genes a cancer expresses**. Disponível em: <<https://www.breastcancer.org/symptoms/types/molecular-subtypes>>. Acesso em: 21 dez 2020.

CIRQUEIRA, M.B. et al. Molecular subtypes of breast câncer. **Femina**, v. 39. n. 10, 2011.

COLLATUZZO, G.; BOFFETTA, P. Cancers Attributable to Modifiable Risk Factors: A Road Map for Prevention. **Annual Review of Public Health**, v. 44, p. 279-300, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-052220-124030>.

COSTANTINI, L. et al. Characterization of human breast tissue microbiota from core needle biopsies through the analysis of multi hypervariable 16S-rRNA gene regions. **Scientific Reports**, v. 8, n.16893, 2018. Doi:10.1038/s41598-018-35329-z

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 31-42, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21320>.

DESHANPDE, A.D. et al. Racial disparities in breast cancer survival: an analysis by age and stage. **The Journal of Surgical Research**, v. 153, n. 1, p. 105-113, mai. 2009. doi: 10.1016/j.jss.2008.05.020. PMID: 19084242; PMCID: PMC3240670.

DIEHL. J.A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biology and Therapy**, v. 1, p. 226-23, 2002.

FENG, H. et al. Clonal integration of a polyoma virus in human Merkel Cell Carcinoma. **Science**, v. 319, p. 1096-1100, 2008.

FRANCESCONI, R.; HOU, V.; GRIVENNIKOV, S. I. Microbiome, inflammation, and cancer. **Cancer Journal**, v. 20, n. 3, p. 181-189, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000048>.

FU, L. et al. Association of human papillomavirus type 58 with breast cancer in Shaanxi province of China. **Journal of Medical Virology**, v. 87, p. 1034-1040, 2015.

GASCO, M.; SHAMI S.; CROOK, T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 70-76, 2002. <http://doi.org/10.1186/bcr426>.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.48, p. 463-74, 2012.

GUO, H. et al. Human Papillomavirus (HPV) Detection by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) and p16 Immunohistochemistry (IHC) in Breast Intraductal Papilloma and Breast Carcinoma. **Clinical Breast Cancer**, v. 21, n. 6, p. e638-e646, 2021. doi: 10.1016/j.clbc.2021.04.006.

HONDERMARCK, H. et al. Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1403-1411, 2008.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: https://www.iarc.who.int/cards_page/iarc-publications/ <. Acesso em: 09 set 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CANCER - Câncer de Mama: estatística. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama> Acesso em: 23 de março de 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CANCER - Câncer de Mama: estatística. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama> Acesso em: 23 de março de 2021.

_____. - Detecção precoce do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccao-precoce-do-cancer> Acesso em: 19 jul. 2021. 72 p. ISBN 978-65-88517-22-2

_____. - Câncer de mama: vamos falar sobre isso? 6. ed. rev. atual. - Rio de Janeiro: INCA, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/cartilhas/cancer-de-mama-vamos-falar-sobre-isso>. Acesso em: 10 out 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 85 p. ISBN 978-85-7318-377-1 (versão eletrônica). I

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.: il. ISBN 978-85-7318-187-6.

JOHN, E.M. et al. Reproductive history, breast-feeding and risk of triple negative breast cancer: The Breast Cancer Etiology in Minorities (BEM) study. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 11, p. 2273-2285, 2018. <https://doi.org/10.1002/ijc>.

KAMMIRE, M. S. et al. Does walking during chemotherapy impact p16INK4a levels in women with early breast cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, e24753, 2022.

KASTAN, M.B.; BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and câncer. **Nature**, v.432, n.7015, p. 316-323, 2004.

KATUWAL, S; JOUSILAHTI, P; PUKKALA, E. Causes of death among women with breast cancer: A follow-up study of 50 481 women with breast cancer in Finland. **International Journal of Cancer**, v. 149, p. 839-845, 2021.

KIM, K. Y. et al. Current status of clinical testing for human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 4, p. 213-226, 2018.

KNUDSEN, E. S. et al. Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy. **Trends in Cancer**, v. 5, n. 5, p. 308-324, 2019. ISSN 2405-8033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.03.005>.

KOBIERZYCKI, C. et al. Expression of p16 and SATB1 in Invasive Ductal Breast Cancer - A Preliminary Study. In vivo (Athens, Greece), v. 32, n. 4, p. 731-736, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/invivo.11301>.

KRISHNAMURTHY, J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. **Journal of Clinical Investigation**, v.11, n. 9, p.1299-1307, 2004. PMID: 15520862. DOI: 10.1172/JCI22475

LEAL-ESTEBAN, L. C.; FAJAS, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165715, 2020. ISSN 0925-4439. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165715>.

LEE, B.L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **The Lancet**, v. 13, n. 3, p.e95-e102, 2012. doi:10.1016/S1470-2045(11)70323-0

LEWIS. J.S. JR. et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: Guideline from the College of American Pathologists.

LI, J.; POI, M. J; TSAI, M. D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, p. 5566-5582, 2011.

LI, J; DING, J.; ZHAI, K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0136050, 2015.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, v. 140, n. 15, pp. 3079-3093, 2013. doi:10.1242/dev.091744.

LIMA, E.G. **Detecção e análise do Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil. 2016.** Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2016.

MAHAJAN, A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. *Human Pathology*, v. 51, p.64-74, 2016. PMID: 27067784. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.

MALHOTRA, G.K.; ZHAO, X.; BAND, H.; BAND, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, v. 10, n. 10, p. 955- 960. 2010. doi:10.4161/cbt.10.10.13879

MEHANNA, H.; SANZ, M.T.; TOUS, S. et al. Performance of dual p16 and HPV testing for determining prognosis in cancer of the oropharynx, the EPIC-OPC Study. *Annals of Oncology*, v.31, p.S599-628. 2020.

MEHTA, S.; ZHANG, J. Liquid-liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 22, n. 4, p. 239-52, 2022.

OMS - Organização Mundial de Saúde. Publicações disponíveis em: www.who.int. Acesso em: 05 out 2021.

PALAFIX, M.; MONSERRAT, L.; BELLET, M. et al. High p16 expression and serrbreast cancer. *Nature Communications*, v.13, n.5258, 2022. [https://doi-org.ez292.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41467-022-32828-6](https://doi.org/ez292.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41467-022-32828-6).

PAPADIMITRIOU, M. C. et al. Resistance to CDK4/6 inhibition: Mechanisms and strategies to overcome a therapeutic problem in the treatment of hormone receptor-positive metastatic breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v.1869, n. 12, 2022. 119346, ISSN 0167-4889, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119346>.

PETTAPIECE-PHILLIPS, R.; NAROD, S.A.; KOTSOPOULOS, J. The role of body size and physical activity on the risk of breast cancer in BRCA mutation carriers. *Cancer Causes & Control*, v. 26, p. 333-344, 2015.

PINTO, P. P.; ZANINE, R. M. Diagnostic value of p16 and Ki-67 expression in cervical glandular intraepithelial disease: A review. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 62, 2023, p. 152054. ISSN 1092-9134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152054>.

RANDY Y.C. POON, **Cell Cycle Control, Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2015, ISBN 9780128012383, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98748-8>.

REIS-FILHO, J.S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J.Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v.59, n.3, p. 225-31, 2006.

ROMAGOSA, C. et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, p. 2087-2097, 2011.

ROSENTHAL, D.I. et al. Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. **Journal of clinical oncology**, v. 34, n. 12, p. 1300-1308, 2016.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.5970>

RUNJHUN, M.; KUMAR, J. N.; GAURAV, S..Epigenetic factors in breast cancer therapy. **Frontiers in Genetics**, v.13, 2022 DOI=10.3389/fgene.2022.886487

SALIH, M. M.; HIGGO, A. A.; EED, E. M. Prognostic Significance of p16 Protein Expression in Breast Cancer. In vivo (Athens, Greece), v. 36, n. 1, p. 336-340, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/invivo.12707>.

SAXENA, K. et al. Cancer: More than a geneticist's Pandora's box. **Journal of Biosciences**, v. 47, p. 21, 2022. PMID: 36210746.

SCHILSKY, R. L. et al. Progress in cancer research, prevention, and care. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, p. 897-900, 2020.

SHARPLESS, N.; SHERR, C. Forging a signature of in vivo senescence. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, p. 397-408, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3960>.

SKALAND, I. et al. Prognostic differences of World Health Organization: assessed mitotic activity index and mitotic impression by quick scannin in invasive ductal cancer patients younger than 55 years. **Human Pathology**, v.39, n.4, p.584-90, 2008.

SLOSTAD, J. A. et al. Concordance of breast cancer biomarker testing in core needle biopsy and surgical specimens: A single institution experience. **Cancer Medicine**, v. 11, n. 24, p. 4954-4965, dez. 2022. doi: 10.1002/cam4.4843. PMID: 35733293; PMCID: PMC9761085.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M.; RANGARAJAN, A.; KULKARNI, P. Competing views on cancer. **Journal of Biosciences**, v. 39, n. 2, p. 281-302, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9403-y>.

SONNENSCHN; SOTO, 2015 SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. Cancer Metastases: So Close and So Far. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djv236>.

SOTO, A. M.; SONNENSCHN, C. The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 33, n. 5, p. 332-340, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bies.201100025>.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: Cancer Journal Clinica**, v.71, n.3 p. 209-249, 2021.doi: 10.3322/caac.21660

THOMAS, J.; PRIMEAUX, T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 2, p. 91-99, 2012. ISSN 1092-9134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2011.09.002>.

TOMAZELLI; S. Rastreamento do câncer de mama no Brasil: uma avaliação da oferta e utilização da rede assistencial do Sistema Único de Saúde no período 2010-2012. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 26, n. 4, 2017.

TRIVEDI, D. D.; DALAI, S. K.; BAKSHI, S. R. The Mystery of Cancer Resistance: A Revelation Within Nature. **Journal of Molecular Evolution**, 91(2), 133-155, 2023. DOI: 10.1007/s00239-023-10092-6.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81,p.323-330. 1995.

YANG, J. et al. p16INK4a protein is a specific molecular biomarker of breast cancer. **Journal of Southern Medical University**, v.36, n.6, p.51- 755, 2016. PMID: 27320873

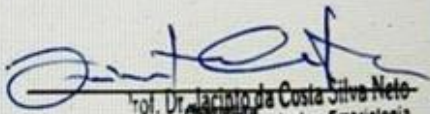
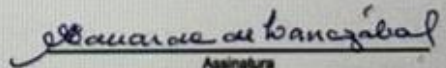
YEDJOU, C. G. et al. Health and Racial Disparity in Breast Cancer. In: MIELE, L. (Ed.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1152. 1. ed. [s.l.]: Springer International Publishing, 2019. p. 31-49. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_3.

ZHU, Y. et al. BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 70113-70127, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12158>.

ANEXO A - FOLHA DE ROSTO DA AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: ESTUDO DA PATOGÊNESE MAMÁRIA, SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS POTENCIAIS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS LESÕES		2. Número de Participantes da Pesquisa: 500	
3. Área Temática: ANEXO D - TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE ESCLARECIDO			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4, Ciências da Saúde TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Jacinto da Costa Silva Neto			
6. CPF: 660.286.474-20		7. Endereço (Rua, n.º): GENERAL AMERICANO FREIRE, 562 BOA VIAGEM Apt. 1402 RECIFE PERNAMBUCO 51021120	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (81) 3326-9517	10. Outro Telefone:	11. Email: jacintocosta@hotmail.com
12. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo. Data: <u>06, 03, 2014</u>  Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto Departamento de Histologia e Emarcologia Universidade Federal de Pernambuco SIAPE: 1721037			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE		14. CNPJ: 24.134.488/0001-08	15. Unidade/Órgão: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
16. Telefone: (81) 2126-8568	17. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Responsável: <u>Maria Eduarda de Larrázabal</u> <u>141833744-72</u> Cargo/Função: <u>Diretora do Centro</u> Data: <u>06, 03, 2014</u>  Assinatura			
PATROCINADOR PRINCIPAL		 Prof.ª Dr.ª Maria Eduarda de Larrázabal Diretora - CCB/UFPE SIAPE: 1133628	
Não se aplica.			
 Prof. José Angelo Rizzo Diretor de Extensão e Pesquisa Extensão UFPE SIAPE 1133060			

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“Estudo da patogênese mamária, sua associação com o HPV e identificação de novos potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico das lesões”**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Jacinto da Costa Silva Neto (residente na Rua General Americano Freire, 562 Boa Viagem, Apart 1402, cep: 51021-120, telefone: 081 3326-9516, e-mail: jacintocosta@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Ana Karina Brizeno (Telefone: 081 991663853) e Ana Paula Fernandes (Telefone: 081 991436590).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo dessa pesquisa é estudar fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama, para isso vamos utilizar os resultados dos seus exames bem como parte das amostras coletadas para realizar os estudos laboratoriais. Sua participação nesta pesquisa consistirá em autorizar o uso das amostras coletadas durante seus exames de rotina e responder a um questionário sobre seu histórico de saúde e estilo de vida. Como as amostras utilizadas no projeto serão resgatadas após a realização dos seus exames, não há nenhum tipo de risco. Caso se sinta constrangida com alguma pergunta do questionário pode ficar a vontade para não responder, ressaltamos que este será aplicado de forma discreta e individual e as respostas são sigilosas. A sua colaboração é voluntária, ou seja, não é obrigatória. Os benefícios em cooperar com a pesquisa consistem em: exames complementares e orientação do curso da doença caso confirmada (prognóstico do câncer), além de contribuir para o entendimento dos mecanismos do desenvolvimento do câncer e de novas formas de tratamento da doença.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (informações dos questionários e resultados dos seus exames) ficarão armazenados em pastas de arquivo e no computador pessoal, sob a responsabilidade dos pesquisadores acima citados, pelo período mínimo de 4 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 - e-mail: cepccs@ufpe.br.

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____

_____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo: “Estudo da patogênese mamária, sua associação com o HPV e identificação de novos potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico das lesões” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____/_____/_____.

Assinatura do participante:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar (2 testemunhas não ligadas a equipe).

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____