



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

ALCEU MACHADO DE SOUSA

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES (μ e κ), MARCADOR DE
ANGIOGÊNESE, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO
CÂNCER DE MAMA**

FORTALEZA

2017

ALCEU MACHADO DE SOUSA

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES (μ e κ), MARCADOR DE
ANGIOGÊNESE, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO
CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Morfofuncionais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Renata Ferreira de
Carvalho Leitão

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Karuza Maria Alves
Pereira

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S1e SOUSA, ALCEU MACHADO DE.
EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES (μ e κ), MARCADOR DE ANGIOGÊNESE,
PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO CÂNCER DE MAMA / ALCEU MACHADO DE SOUSA. –
2017.
66 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.
Coorientação: Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira.
1. Analgésicos Opióides. 2. Neoplasias da Mama. 3. Neovascularização Patológica. I. Título.
- CDD 611
-

ALCEU MACHADO DE SOUSA

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES (μ e κ), MARCADOR DE
ANGIOGÊNESE, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO
CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Morfofuncionais.

Aprovado em: _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio Barros da Silva
(Unichristus)

RESUMO

O câncer de mama representa uma doença de grande preocupação, devido sua alta incidência e elevada mortalidade sendo, atualmente, considerado como a segunda maior causa de morte no mundo. Sabe-se que o prognóstico deste tumor está diretamente relacionado ao seu estadiamento, sendo estágios mais avançados responsáveis pela menor sobrevida e prejuízo na qualidade de vida da paciente, devido principalmente a dor. Os opióides são bastante utilizados para minimizar a dor na clínica oncológica. Contudo, na literatura observam-se resultados conflitantes em relação a utilização de fármacos opióides e sua ação nas células tumorais e no processo de angiogênese no microambiente tumoral, ainda há muitas controvérsias. Portanto, esse estudo propôs avaliar a expressão dos receptores opióides Mu (μ), Kappa (κ), correlacionando com fatores prognósticos tais como os marcadores de angiogênese (VEGF), de proliferação celular (Ki-67) e morte celular (TUNEL) em biópsias de tumores mamários com estadiamento T4, com ou sem processo metastático, estratificados quanto ao subtipo molecular Luminal A e Luminal B, diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará) no período de 2011 a 2016. Um total de 39 amostras de biópsias de pacientes com câncer de mama padrões Luminal A e Luminal B, com tamanho do tumor T4, com e sem processo metastático, diagnosticados, tratados e operados no Hospital supracitado foram inseridos no estudo. Dados demográficos e características tumorais, incluindo o uso de opióides e a presença de recidiva de doença, foram também motivo de avaliação e de comparação. Além disso, no presente estudo, foi avaliada a expressão, através de imunohistoquímica, dos marcadores μ e κ opióides, VEGF, Ki-67 e TUNEL nas amostras de biópsia de mama através da técnica de *Tissue Microarray* (TMA). Nossos resultados demonstraram que: 1. verificou-se que há um predomínio significativo de imunomarcações de ki67 nos linfonodos em pacientes que utilizaram opióides quando comparados às pacientes que não utilizaram opióides no seguimento clínico ($p=0,011$); 2. foi evidenciado que pacientes do subtipo molecular Luminal A apresentam um aumento significativo de chances de apresentar 51-75% de marcação de morte celular tecidual (TUNEL) no tumor quando comparadas as pacientes definidas como subtipo Luminal B ($p=0.020$; OR=21.000; IC=1.613-273.340); 3. foi possível evidenciar que as pacientes com estadiamento do tipo T4 que apresentaram recidiva ($7,2\pm 3,7$) demonstraram uma diminuição de expressão do *histoscore* do κ Opióide, na localização linfonodal, quando relacionado às pacientes que não apresentaram evolução clínica associada à recidiva ($10,8\pm 2,2$) ($p=0.033$) e 4. as análises de correlação entre os marcadores μ e κ opióides, VEGF, Ki-67 e TUNEL demonstram que estes achados, provavelmente, atuam em uma mesma cascata de eventos no CA de mama com estadiamento T4. O presente estudo demonstrou que o uso de opioides está diretamente associado ao aumento da expressão de Ki-67 e da prevalência de não recidivar, as quais mostraram menor expressão para o receptor kappa opióide. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre os tumores luminal A e luminal B e a imunexpressão dos receptores opioides foram independentes dos receptores de angiogênese. Em síntese, nos tumores luminal A e luminal B o uso de opioides está diretamente associado a um pior prognóstico, por redução da expressão do receptor kappa opióide.

Palavras-chave: Opióides; Câncer de mama; Luminal A e Luminal B; Angiogênese.

ABSTRACT

Breast cancer represents a disease of great concern due to its high incidence and high mortality and is currently considered the second largest cause of death in the world. It is known that the prognosis of this tumor is directly related to its staging, with more advanced stages responsible for lower survival and impairment in the patient's quality of life, mainly due to pain complaints. Opioids are widely used to minimize pain at the oncology clinic. In the literature there are conflicting results regarding the use of opioid drugs and their action on tumor cells and the process of angiogenesis in the tumor micro-environment. Therefore, this study aimed to evaluate the expression of mu (μ), Kappa (κ) opioid receptors, correlating with prognostic factors such as markers of angiogenesis (VEGF), cell proliferation (Ki-67) and cell death (TUNEL) in Biopsies of tumors with T4 staging, with or without metastatic process, stratified for the Luminal A and Luminal B molecular subtype, diagnosed and operated at Haroldo Juaçaba Hospital (Ceará Cancer Institute) from 2011 to 2016. A total of 38 biopsy specimens from Luminal A and Luminal B breast cancer patients with T4 tumor size, with and without metastatic process, diagnosed, treated and operated at the abovementioned Hospital were included in the study. Demographic data and tumor characteristics, including the use of opioids and the presence of disease recurrence, were also a reason for evaluation and comparison. In addition, in the present study, the expression, by immunohistochemistry, of the μ and κ opioid markers, VEGF, Ki-67 and TUNEL in the breast biopsy samples by the Tissue Microarray (TMA) technique was evaluated. Our results demonstrated that: 1. It was found that there is a significant predominance of ki67 immunoblotting in lymph nodes in patients who used opioids when compared to patients who did not use opioids in the clinical follow-up ($p = 0.011$); 2. It was evidenced that patients of the Luminal A molecular subtype present a significant increase in the chances of presenting a 51-75% T cell count in the tumor when compared to patients defined as Luminal B subtype ($p = 0.020$, OR = 21.000; CI = 1,613-273,340); 3. It was possible to show that patients with T4 staging who presented recurrence (7.2 ± 3.7) demonstrated a decrease in the histoscore expression of the Opioid κ in the lymph node location when related to the patients who did not present clinical evolution associated with relapse (10.8 ± 2.2) ($p = 0.033$) and 4. The correlation analyzes between the opioid μ and κ markers, VEGF, Ki-67 and TUNEL demonstrate that these findings probably act on the same cascade of events in the CA of T4 stage breast. Our study demonstrated that the use of opioids is directly associated with the increase in ki-67 expression and the prevalence of relapses, which showed lower expression for the opioid kappa receptor. In addition, there was no significant difference in the biological behavior of luminal A and luminal B tumors and the immunoexpression of opioid receptors were independent of angiogenesis receptors. In summary, in luminal A and luminal B tumors the use of opioids is directly associated with a worse prognosis, due to reduction of opioid kappa receptor expression.

Keywords: Opioids; Breast cancer; Luminal A and Luminal B; Angiogenesis.

LISTAS DE TABELAS

1	Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama	14
2	Anticorpos utilizados para reação de imunohistoquímica	25
3	Caracterização descritiva das variáveis clínico e sócio-demográficas das pacientes	29
4	Imunomarcção para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides	32
5	Imunomarcção para os opióides Mu (μ) e Kappa (k), para o VEGF em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides	33
6	Imunomarcção para os opióides Mu (μ) e Kappa (k), para o VEGF, em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com subtipo molecular Luminal A e Luminal B	34
7	Imunomarcção para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao subtipo molecular Luminal A e Luminal B	35
8	Imunomarcção para os opióides Mu (μ) e Kappa (k), para o VEGF em relação a presença de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama	36
9	Imunomarcção para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em relação a presença de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama	37
10	Análise de correlação de <i>Spearman's</i> entre os marcadores das pacientes com CA de mama	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Painel histológico com HE e as imunomarcações, perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com localizações tumorais, peritumorais e de metástase linfonodal 38
- Figura 2** Painel histológico com as imunomarcações dos receptores opióides Mu (μ), Kappa (k) e VEGF em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com localizações tumorais, peritumorais e de metástase linfonodal 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TMA	Tissue Microarray
CA	Câncer
(μ)	Receptor Mu opióide
(k)	Receptor Kappa opióide
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ki67	Proteína de proliferação celular
<i>in situ</i>	No local
INCA	Instituto Nacional de Câncer
EUA	Estados Unidos da América
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
HER-2	Oncoproteína
CDI	Carcinoma ductal infiltrante ou invasor
MAPK/ERK	Mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases
Akt	Quinase Atividade Kit
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
NK	Células Natural Killer
SUS	Sistema Único de Saúde
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
OMS	Organização Mundial de Saúde
TNM	Estadiamento do tumor
DAB	Diaminobenzidine
PBS	Tampão solução salina
H ₂ O ₂	Água oxigenada
NEMPI	Núcleo de estudos em microscopia e processamento de imagem

HE	Hematoxilina eosina
RH	Receptor hormonais
RT	Radioterapia
QT	Quimioterapia
T4	Tamanho do tumor
OR	Odds ratio
SPSS	Software do windows

SUMÁRIO

1	Introdução	10
1.1	Câncer de mama	10
1.2	Subtipos moleculares do câncer de mama	13
1.3	Opióide	15
1.3.1	Efeito dos opióides na progressão tumoral	16
2	Justificativa	20
3	Objetivos	21
3.1	Objetivo Geral	21
3.2	Objetivo Específicos	21
4	Material e método	22
4.1	Aspectos éticos	22
4.2	Delineamento do estudo	22
4.3	Seleção da amostra	22
4.4	Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA) e Processamento imunohistoquímico	24
4.5	Análise de Imunohistoquímica	26
4.6	Ensaio de TUNEL	27
4.7	Análise estatística	27
5	Resultados	28
5.1	Caracterização clínica e sócio-demográficas das pacientes com de CA de mama	28
5.2	Imunomarcção para os opióides Mu (μ) e Kappa (κ), para o VEGF, para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides	31
5.3	Imunomarcção para os opióides Mu e Kappa, para o VEGF, para o perfil de proliferação tumoral e de morte celular em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com subtipo molecular Luminal A e Luminal B	33
5.4	Imunomarcção para os opióides Mu e Kappa, para o VEGF, para o perfil de proliferação tumoral e de morte celular em relação a presença ou ausência de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama	35
5.5	Análises de correlação entre os níveis de expressão das imunomarcações para os opióides Mu e Kappa, para o VEGF, para o perfil de proliferação tumoral e de morte celular no CA de Mama	40

6	Discussão	42
7	Conclusão	48
8	Referências	49
	Anexo A - Parecer Consubstanciado - Instituto do Câncer do Ceará	57
	Anexo B - Parecer Consubstanciado - Universidade Federal do Ceará	62

1. Introdução

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo. Cerca de 1,67 milhões de novos casos dessa neoplasia ocorreram no ano de 2012, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres. Neste mesmo ano, o câncer de mama foi responsável por aproximadamente 502 mil mortes, sendo a maior causa de mortalidade por câncer em mulheres (TORRE et al., 2015).

Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, e em 2012, as maiores taxas foram observadas na Europa Ocidental (96/100 mil) e as menores na África Central e na Ásia Oriental (27/100 mil) (INCA, 2014). De acordo com dados epidemiológicos de países em desenvolvimento ou desenvolvidos, o câncer de mama destaca-se como o mais incidente tipo de câncer entre mulheres (TORRE et al., 2015).

Nos Estados Unidos (EUA), a Sociedade Americana de Câncer estima que em 2014 foram diagnosticados 1.658.370 novos casos de câncer, dos quais, 231.840 foram de câncer de mama invasivo (13,98%) e 60.290 casos de carcinoma *in situ* da mama. No mesmo período ocorreram cerca de 589.430 mortes por câncer, sendo 40.290 (6,8%) decorrentes de câncer de mama, em mulheres. Homens tem estimativa de 1% de casos de câncer de mama (SIGEL et al., 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer, no ano de 2016, no Brasil, foram diagnosticados 57.960 novos casos de câncer de mama, o que equivale a 28,01% de todos os diagnósticos de câncer no país (INCA, 2016). Foram estimados 57.120 casos novos de câncer de mama (9,92%), com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) e dos tumores de próstata (69 mil) (INCA, 2014). Já as taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil continuam em patamares elevados, não havendo registro de queda nos últimos dez anos, o que tem contrastado com o observado em países como Reino Unido, Estados Unidos e França (INCA, 2014).

Provavelmente, esta alta taxa de mortalidade observada no Brasil estaria relacionada ao diagnóstico da doença já em estádios avançados.

Esses números expressivos nos fazem perceber que, esforços no sentido de desenvolver novos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer de mama são imperativos, bem como definir critérios adequados para se determinar o prognóstico e assim, a agressividade do tratamento a ser proposto ao paciente. Sabe-se que alguns fatores associados ao câncer de mama já foram estudados e até hoje ainda são utilizados na predição da agressividade da doença. Características como o tamanho do tumor, o número de linfonodos axilares comprometidos, o tipo e o grau histológico, a presença de invasão angiolímfática e perineural, além da expressão de receptores hormonais (RE-Receptor de Estrógeno, PR – Receptor de Progesterona) e do C-erbB2 (HER2) são alguns dos mais usuais determinantes de prognóstico e por vezes também do tratamento utilizados na prática clínica diária.

Existe uma ampla variedade de padrões morfológicos de câncer de mama e estes diferentes tipos histológicos, por si só, fornecem importantes informações prognósticas. Vários testes têm sido propostos para subestratificar as neoplasias mamárias em grupos moleculares e identificar pacientes com câncer de mama de forma personalizada, identificando melhor os tumores de grau intermediário (de baixo ou alto risco) e os tumores com maior possibilidade de recorrência (PEROU *et al.*, 2000; SOTIRIOU *et al.*, 2006).

Para a subestratificação da neoplasia mamária, vê-se que a imunohistoquímica é o método mais acessível, já existindo atualmente alguns testes disponíveis comercialmente, como o teste preditor de subtipos tumorais de 50 genes (PAM50) (CHIA *et al.*, 2012; PRAT *et al.*, 2012.), para estratificação de tumores em bom ou mau prognóstico (teste de 70 genes) MAMMAPRINT (VAN DE VIJVER *et al.*, 2002; VAN'T VEER *et al.*, 2003) e para definir o alto ou o baixo risco de recorrência (escore de recorrência de 21 genes) Oncotype DX (PAIK, 2004), entre outros. Esses testes são altamente promissores e já são indicados por oncologistas para seleção de pacientes para quimioterapia adjuvante.

Neste contexto, os tumores malignos de mama são classificados conforme as características de suas células e relação com os tecidos ao seu redor. Nas fases iniciais, ainda sem a presença de nódulos, as alterações do tecido provocam um acúmulo de cálcio e podem ser identificadas pela mamografia como grupamentos de

calcificações. As chamadas microcalcificações agrupadas podem indicar o câncer em fase muito precoce, com lesões menores ou iguais a um centímetro de diâmetro (SENISKI, 2008).

Quando as células estão anormais e não existe ruptura das suas membranas basais, ou seja, não existe invasão de tecidos, o carcinoma é chamado de *in situ*. Se as células são provenientes dos ductos o carcinoma é dito ductal e se oriundas em lóbulos mamários chama-se de carcinoma lobular, havendo quebra da barreira entre as células do epitélio e conjuntivo acrescenta-se a denominação invasor (LISBOA, 2009).

O carcinoma ductal infiltrante ou invasor (CDI) é o mais prevalente nas mulheres, classificado de acordo com as variações morfológicas, que são inumeráveis, e o padrão de disseminação. Os CDI são tumores sólidos, firmes, pouco circunscritos, com bordos infiltrativos e de consistência arenosa. A superfície de corte é amarelada ou cinza-amarelada, com trabéculas irradiando na gordura adjacente, conferindo ao tumor um aspecto estrelado ou espiculado. Algumas vezes estes tumores podem ser delimitados, redondos, lobulados ou multinodulares (SENISKI, 2008).

O Carcinoma Inflamatório de mama é um câncer mais raro e normalmente se apresenta de forma agressiva, comprometendo toda a pele, deixando-a edemaciada e hiperemiada (GODINHO, KOCH, 2004; LISBOA, 2009). A sintomatologia inicial é um pequeno nódulo no seio, geralmente indolor e que pode crescer lenta ou rapidamente dependendo de sua carcinogênese (BRITO et al, 2007; BARROS et al, 2001).

Contudo, apesar dos evidentes avanços, alguns subtipos de câncer de mama ainda persistem como sinônimos de evolução desfavorável e prognóstico ruim. Desta forma, a avaliação do perfil de expressão de determinados mediadores da resposta inflamatória, como citocinas, fatores de transcrição e expressão de genes específicos no câncer de mama, poderiam auxiliar na identificação de possíveis marcadores prognósticos ou potenciais alvos terapêuticos, além de oferecer subsídios para melhor caracterizar a patogênese dos diferentes subtipos de câncer de mama.

1.2. Subtipos moleculares do câncer de mama

Os subtipos luminais têm denominação advinda da semelhança que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais. (SOTIRIOU et al, 2003).

O subtipo molecular luminal A, que representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau histológico. Os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase, são as terapias alvo-específicas utilizadas para o seu tratamento sistêmico (WEIGEL; DOWSETT, 2010).

Classificam-se como luminais A os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (PEROU et al, 2000; SØRLIE et al 2001; SOTIRIOU et al 2003; SØRLIE et al 2003). Estudos recentes trazem que esse subtipo deve ainda apresentar um índice de Ki-67, avaliado por imunohistoquímica, inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (Tabela 1) (CHEANG et al, 2009; KENNECKE et al, 2010; VODUC et al 2010).

Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e comumente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SØRLIE et al 2001; SØRLIE et al 2003). A expressão de RE, RP, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (CHEANG et al, 2009).

Uma nova estratificação foi proposta para esse subgrupo em: luminal B e luminal HER2. O subtipo luminal B, mais recentemente, tem sido caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo (luminal HER2), e quando o HER2 é negativo, por ter um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (CHEANG et al; 2009, VODUC et al

2010). Essa nova subclassificação, com a utilização do índice de Ki-67, tem alterado significativamente os valores de prevalência até então encontrados para os subtipos luminais, uma vez que tumores com alto índice proliferativo, até então classificados como luminais A, segundo os novos parâmetros, são classificados como luminais B (CHEANG et al, 2009; KENNECKE et al, 2010).

O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CHEANG et al, 2009). e, ainda, associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (KENNECKE et al, 2010).

Superexpressão de HER2 O subtipo superexpressão de HER2, como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém exibe negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA et al, 2004). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SØRLIE T et al, 2003).

O subtipo basaloide, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, evidencia padrão prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida. Morfologicamente, é caracterizado por elevado grau histológico, por alto índice mitótico, pela presença de áreas de necrose e pelo infiltrado linfocitário. Apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2 (CHEANG et al, 2009).

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

Subtipo molecular	Classificação com o índice de Ki-67 de 14% Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

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

1.3. Opióides

A nomenclatura dos derivados do ópio tem sido alterada com o decorrer dos anos, eles já foram denominados narcóticos, hipnoanalgésicos, e narcoanalgésicos, termos considerados impróprios por incluírem outras substâncias que provocam o sono (GOZZANI, 1994). Também já foram denominados opiáceos, de início uma designação genérica, e depois restrita aos derivados naturais do ópio, como a morfina, codeína e tebaina (GOZZANI, 1994). O termo opióide foi proposto para designar as drogas com ação semelhante à morfina, porém com estrutura química diferente (MARTIN, 1983). Contudo, o conceito evoluiu e passou a incluir todas as substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores opióides, quer como agonista quer como antagonista (MARTIN, 1983).

Os opióides são a base do tratamento para a dor severa em cânceres avançados, incluindo o câncer de mama metastático (Mantyh, 2006). Embora os opióides atuem diretamente no sistema nervoso central para aliviar a dor, suas atividades nos tecidos periféricos são responsáveis por muitas das complicações secundárias associadas ao tratamento. Um efeito periférico recentemente reconhecido dos opióides e dos seus receptores é a promoção do crescimento do tumor dependente da angiogênese (Farooqui *et al.*, 2007).

Os opióides agem em pelo menos cinco tipos de receptores específicos, os quais exercem suas funções tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. O subtipo 1 do receptor Mu (μ) é responsável pelos sintomas da analgesia, euforia e depressão respiratória enquanto o subtipo 2 medeia efeitos gastrintestinais; o receptor Kappa (κ) relaciona-se a analgesia, sedação, miose, disforia e sintomas psicotomínicos, como despersonalização e desrealização; o Delta (ζ) interfere na analgesia e pode estar associado à mudanças do humor; o Epsilon (ϵ) associa-se à sedação; o Sigma (δ) está associado à mudanças do humor e, talvez, alucinações (BALTIERI *et al.*, 2008).

A ação das substâncias com propriedade analgésica opióide (peptídeos opióides endógenos e analgésicos opióides) resulta de duas ações inibitórias sobre o sistema nociceptivo desencadeadas pela interação com os receptores opióides: 1) Inibição pós-sináptica através do aumento da condutância ao K⁺, promovendo a

hiperpolarização neuronal e 2) inibição da liberação de neurotransmissores relacionados às vias nociceptivas (principalmente glutamato e substância P) (KANDEL et al., 2000).

As células endoteliais expressam receptores opióide (Grupta *et al.*, 2002) e respondem aos opiáceos aumentando a concentração de cálcio intracelular e a produção de óxido nítrico (Hsiao *et al.*, 2009). Além da permeabilidade vascular, o óxido nítrico regula a proliferação das células endoteliais, a migração e a liberação de protease, todas importantes para a angiogênese. As concentrações clinicamente relevantes de morfina resultam na ativação de MAPK/ERK de proteína quinase ativada por mitogénio/MAPK/ERK regulada por sinal extracelular e Akt de pro-sobrevivência em células endoteliais cultivadas. *In vitro*, foi mostrado que a morfina induz a proliferação de células endoteliais e migração através da transativação dos receptores do fator de crescimento que desempenham um papel fundamental na migração e sobrevivência destas células, incluindo o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e receptor beta do fator de crescimento (PDGF) (Chen *et al.*, 2009). Num sistema de células não endoteliais, a morfina mostrou ainda transativar o receptor (FGFR1) de outro fator de crescimento que desempenha um papel chave na angiogênese, nomeadamente o Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF) (Singleton *et al.*, 2006).

1.3.1 Efeito dos opióides na progressão tumoral

Os opióides são os medicamentos mais eficazes atualmente disponíveis para o controle da dor oncológica (GACH et al., 2011). Nos Estados Unidos, de 30 a 40% dos doentes com câncer recentemente diagnosticados e 90% dos pacientes com câncer avançado relatam dor moderada e severa, que progride em relação ao tamanho do tumor, o grau de metástases, o tipo de tumor e sua localização (KODIE et al., 2010).

A farmacologia e função analgésica dos opióides no sistema nervoso central são bem descritos (HASANI; BRUCHAS, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre os seus efeitos nas células tumorais. Por esse motivo, o interesse em investigar as possíveis ações dos opióides, especialmente da morfina, na progressão tumoral tem aumentado na última década (GACH *et al.*, 2011). Os resultados obtidos até o momento são conflitantes. As discrepâncias de resultados devem-se, provavelmente, às diferentes

linhagens celulares investigadas, às variadas concentrações de morfina e/ou ao modo de administração utilizado.

O uso crônico de grandes concentrações de morfina tem sido associado à inibição do crescimento de tumores em alguns trabalhos descritos na literatura (YEAGER & COLACCHIO 1991; TEGEDER et al. 2003; KOODIE et al, 2010, 2014). Por outro lado, estudos experimentais e análises clínicas retrospectivas sugerem que os opióides podem promover a progressão do câncer, reduzindo a sobrevida dos pacientes, por meio de mecanismos diversos (ZAGON et al, 1983; GUPTA et al. 2002; CHEN et al, 2006; SINGLETON et al, 2006; FAROOQUI et al, 2006; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN et al.2007; FAROOQUI et al, 2007; APOLONE et al, 2009; BARBERA et al, 2011; FUJIOTA et al. 2011; MATHEW et al, 2011; LENNON et al, 2012; NGUYEN et al, 2014; ZYLLA et al, 2013).

Alguns estudos em modelos animais demonstram que esse efeito estimulatório dos opióides na progressão do câncer envolve a ativação dos receptores opióides (MOSS & ROSOW 2008; WANG et al. 2009; SINGLETON & MOSS 2010), resultando: 1. na estimulação da via MAPK/Erk e consequente progressão do ciclo celular (GUPTA et al, 2002); 2. na ativação da via PI3K/Akt, mediando efeitos anti-apoptóticos (IGLESIAS et al, 2003); 3. no aumento da liberação do fator ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), promovendo a degradação da matriz extra celular e facilitando metástases (GACH et al 2008) e 4. na ativação dos receptores de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando na formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, processo denominado angiogênese (SINGLETON & MOSS 2010), assim como influenciando a persistência do processo inflamatório, ativando vias de sinalizações comuns (AFSHARIMANI, 2011).

Os opióides agem ligando-se a receptores opióides do tipo μ (ROM) localizados na medula espinhal e no diencéfalo, impedindo o processamento do estímulo (sinal da dor) no córtex cerebral (Hasani e Bruchas 2013).

Tem-se mostrado na literatura resultados conflitantes sobre a relação da morfina com processo de progressão tumoral, porém estudos observam que esse fármaco influencia a resposta inflamatória presente no microambiente tumoral por interagir nas vias de sinalização comuns, tanto por meio de respostas anti-inflamatórias como pró-inflamatórias. Tem-se sugerido que os receptores μ e κ mostram papéis

opostos, o primeiro relacionado com uma indução de atividade pró-inflamatória, e o segundo, anti-inflamatória. (FINLEY, et al., 2008).

Por exemplo, observa-se que a morfina, inibe expressão de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), bloqueia Fator Nuclear Kappa B (NF κ B), além de agir de maneira imunossupressora, inibindo componentes da imunidade celular e humoral como produção de anticorpos, atividade de células Natural Killer (NK) e expressão de citocinas (AFSHARIMANI, 2011). Por outro lado, por exemplo, observa-se que uma das vias utilizadas por esse fármaco para estimular o processo de angiogênese seria por meio da ativação de COX-2, mediador importante no processo pró-inflamatório (GACH, et al., 2011).

Em cultura de células de câncer de mama, a morfina aumentou a proliferação e a migração de células. Além disso, estimulou o crescimento do tumor e angiogênese em modelos experimentais de câncer de mama em camundongos (BIMONTE et al., 2015). A morfina se liga ao receptor opióide μ regulando a progressão do ciclo celular por estimular a ativação da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK)/fator de crescimento extracelular (ERK) (GUPTA *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado também que morfina pode mediar apoptose por ativar a via quinase-3- fosfatidilinositol (PI3K)/ proteína quinase B (Akt) (IGLESIAS *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi mostrado que morfina induz a formação de metástase por suprarregular o ativador de plasminogênio uroquinase (PAu) (GACH et al., 2009). Enquanto que a angiogênese é induzida por transativação do receptor de VEGF (SINGLETON; MOSS, 2010).

Tem sido proposto que a morfina apresenta importante função na apoptose de células tumorais. A apoptose é uma forma de morte celular onde uma sequência de eventos programados leva a eliminação de células sem a liberação de substâncias danosas. Vale destacar que a apoptose é regulada por duas vias: a via intrínseca mediada por fatores liberados pela mitocôndria e a via extrínseca mediada por receptores de morte celular (ASHKENAZI; DIXIT, 1999; GREEN; REED, 1998). Geralmente, a apoptose das células cancerígenas ocorre de forma desregulada, levando à rápida proliferação, com conseqüente progressão do tumor (HANAHAN; WEINBER, 2000; HENGARTNER, 2000).

Em linhagem de células cancerígenas do cólon (HCT-8), agonistas do receptor opióide demonstraram estimular o perfil invasivo dessas células de forma

dependente do nível de expressão dos receptores opióides, tipo de opióide e concentração do opióide (DEBRUYNE *et al.*, 2010).

Estudo pré-clínicos com antagonista do receptor opióide μ , a metilnaltrexona que é usado para aliviar a constipação, em associação com a morfina mostrou aumentar a sobrevida de pacientes com câncer por inibir os efeitos periféricos da morfina sem afetar o seu efeito analgésico central (JANKU *et al.*, 2016; LENNON, MOSS, SINGLETON, 2012). Este estudo mostra ainda que o receptor μ dentre os receptores opióides desempenha uma importante função na progressão do tumor.

O receptor opióide μ aumenta a progressão tumoral por aumentar a ativação de Akt e mTOR, conforme já mostrado em células cancerígenas de pulmão (LENNON *et al.*, 2012). As vias de sinalização PI3K/Akt e o alvo de mamíferos de rapamicina (mTOR) são cruciais para o crescimento celular e sobrevivência, assim como tem demonstrado importante papel na progressão do tumor (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). Uma das formas de ativação dessas via é por meio da interação de agonistas opióides ao receptor opióide μ ou via VEGF (LENNON *et al.*, 2012).

Recentes estudos têm demonstrado que pacientes com câncer de mama tratados com opióides apresentam um risco de morte incrementado em 1,59 vezes independente dos demais fatores clínico-patológicos (TAN *et al.*, 2017) e como os tumores de mama Luminal A e Luminal B são dois importantes tipos histológicos que possuem comportamentos biológicos diferentes e graus de agressividades distintos. Normalmente o padrão luminal B apresenta maior marcação para Ki-67 e está fortemente envolvido com metástases linfonodais e a distância é provável que a expressão para esses receptores de opióides também mudem significativamente nesses dois tipos de tumores (INIC *et al.*, 2014).

Sabendo disso e que ambos os processos estão relacionados com a angiogênese nos tumores malignos (GACH, *et al.*, 2011; EIRÓ, *et al.*, 2012), vê-se a necessidade de se estudar a relação entre a ativação de receptores opióides, angiogênese e na progressão tumoral na patogênese no câncer de mama com ou sem processo metastático.

2. Justificativa

Os opióides são os medicamentos mais eficazes atualmente disponíveis para o manejo da dor moderada e severa associada ao câncer. A administração de morfina em pacientes oncológicos forneceu evidências de que além do seu efeito analgésico a morfina pode alterar o desenvolvimento do tumor, inibindo ou estimulando a progressão do câncer, por meio de diversos mecanismos, muitos dos quais associados à ativação dos receptores opióides. Vários estudos descrevem que a expressão desses receptores encontra-se aumentada em vários tipos de câncer, especialmente no câncer metastático, o que sugere que ligantes endógenos ou opióides utilizados para analgesia podem inadvertidamente promover a progressão do câncer.

Os resultados conflitantes acerca do efeito dos opióides na progressão tumoral, via ativação de receptores opióides, nos motivou a investigar a expressão desses receptores nestes tumores, correlacionando com marcadores de angiogênese, proliferação e morte celular. Essas informações poderão contribuir para o entendimento do efeito dos opióides no câncer, além de poderem ser úteis para o delineamento do tratamento e de estratégias para o controle da dor oncológica.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos receptores opióides Mu (μ) e Kappa (κ) correlacionando com fatores prognósticos, marcador de angiogênese e de proliferação e morte celular, no câncer de mama, de padrões moleculares Luminal A e Luminal B.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama padrões Luminal A e Luminal B a expressão de Receptores opióides Mu (μ) e Kappa (κ) associando com a angiogenese;
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama padrões Luminal A e Luminal B a expressão de marcadores de angiogênese (VEGF);
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama padrões Luminal A e Luminal B a expressão de marcadores de proliferação e morte celular (Ki67 e ensaio de TUNEL).
- Associar e correlacionar os dados coletados nas análises imunohistoquímicas entre si.

4. Materiais e métodos

4.1 Aspecto éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), sob número de protocolo #1.618.068, e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos PROPESQ da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo #1.572.019, ambos submetidos através do sistema da Plataforma Brasil.

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Os pareceres de aprovação ética do presente estudo encontram-se disponíveis na seção anexos deste manuscrito.

4.2. Delineamento do Estudo

Estudo observacional, quantitativo de caráter retrospectivo e de corte transversal no período de 01 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2016 no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará)

4.3. Seleção da amostra

Como critério de inclusão foram selecionadas amostras de biópsias excisionais de 39 pacientes com câncer de mama padrões Luminal A e Luminal B, com tamanho do tumor T4, com e sem processo metastático, diagnosticados, tratados e operados no Hospital supracitado. Os dados sócio-demográficos como: idade, sexo, grau de instrução, raça/cor, capital/interior, convênio/particular ou SUS e clínico-patológicos como: característica histológica e perfil imunohistoquímico do tumor, assim como a conduta do tratamento realizado, foram coletados dos prontuários.

Pacientes do sexo masculino, material insuficiente para análise e prontuários incompletos foram excluídos do estudo.

O estadiamento do tumor foi definido conforme proposição do Instituto Nacional do Câncer INCA que determina TNM, sendo T referente ao tamanho do tumor, N a acometimento linfonodal e M relacionado a metástases a distância (OMS, 2005):

T: Tamanho do tumor

- TX O tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Sem evidência de tumor primário Tis Carcinoma *in situ*: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular *in situ* ou doença de Paget da papila sem tumor
- T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
- T1a - tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
- T1b - tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
- T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
- T2 Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
- T3 Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
- T4 Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele T4a - extensão para parede torácica
- T4b - edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados à mesma mama
- T4c - T4a e T4b associados
- T4d - carcinoma inflamatório

N: Acometimento de linfonodos regionais

- NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por ex. foram removidos previamente)
- N0 Ausência de metástases nos linfonodos regionais
- N1 Metástase em linfonodo(s) auxiliar(es) homolateral (is) móvel (is)
- N2 Metástase nos linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou a outras estruturas
- N3 Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral

M: Metástases a distância

- MX A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
- M0 Ausência de metástases à distância
- M1 Metástases à distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

Após levantamento dos laudos histopatológicos, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular (Nikon®, modelo Eclipse E100). A análise foi realizada por um patologista experiente de maneira independente, como descrito por HANS et al. (2004). Após revisão de lâminas, foram levantados os respectivos blocos para realização das técnicas de Tissue Microarray (TMA) e imunohistoquímica.

4.4. Técnica do *Tissue Microarray* (TMA) e Processamento imunohistoquímico

Após a seleção dos pacientes, um patologista experiente escolheu, de forma independente, as áreas das biópsias excisionais com microambiente tumoral adequado para a investigação imunohistoquímica. Uma área do linfonodo, uma área peritumoral e uma área intratumoral da peça cirúrgica foram utilizadas para retirada dos fragmentos e confecção do bloco de TMA.

Para técnica de TMA, uma agulha oca (Quick -Ray UNITMA®) foi utilizada para remover pequenos fragmentos de tecidos, de até 0,6 milímetros de diâmetro, de regiões em interesse de blocos parafinados. Estes fragmentos foram então inseridos em um bloco receptor de parafina, em um padrão de matriz precisamente esparçadas. Secções deste bloco foram feitas com um micrótomo para coloração por hematoxilina-eosina e técnica de imunohistoquímica. Cada bloco de microarray pode ser cortado até em 100 seções e ser submetido à testes independentes. Assim, cada bloco foi composto por 60 fragmentos de tecidos. O bloco receptor foi, então, submetido a cortes, em uma mesma sessão, sequenciais de 3 µm de espessura que foram depositados em lâminas de vidro silanizadas, para realização de coloração convencional por hematoxilina-eosina e reações de imunohistoquímica. Foram feitos seis cortes para análise de imunohistoquímica e o bloco receptor foi considerado esgotado quando mais de 20% das amostras não estiverem presentes como observado por Andrade et al., (2007).

A reação de imunohistoquímica foi realizada através da técnica da estreptavidina-biotinilada adaptado de HSU et al., (1981). Após desparafinização e reidratação foi realizada recuperação antigênica por meio de sistema Pmlink® (Dako®) a 97°C durante 20 minutos, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação *overnight* com os anticorpos primários.

Tabela 2: Anticorpos utilizados para reação de imunohistoquímica.

Anticorpo primário	Marca	Especificação	Diluição	Controle Positivo
Receptor opióide Mu	Abcam®	Rabbit monoclonal [UMB3] to Mu Opioid Receptor	1:100	Cérebro Animal
Receptor opióide Kappa	Abcam®	Rabbit polyclonal to Kappa Opioid Receptor	1:200	Placenta Humano
VEGF	Abcam®	Rabbit monoclonal [EP1176Y] to VEGF	1:200	Carcinoma Pulmão
Ki-67	Abcam®	Rabbit monoclonal [SP6] to Ki67	1:100	Tonsila/Lin fonodo

Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com solução de PBS e incubadas com pelo o complexo sistema Envision Flex/HRP (polímero) DAKO por 30 minutos. Posteriormente, foi seguida uma lavagem das lâminas com solução de PBS.

A revelação foi realizada pelo cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine-peróxido (DAB) (Dako®) e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (10"). Após coloração e contra-coloração as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá para avaliação.

4.5. Análise Imunohistoquímica

Foram avaliados os cortes histológicos em TMA da região tumoral, peritumoral e linfonodal para imunomarcação de receptores Opióides, VEGF e Ki67.

Para avaliação microscópica, foram fotografados cinco campos por corte histológico em um aumento de 400x por meio de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®). As amostras passaram tanto por uma avaliação qualitativa categórica como quantitativa (Zhang et al. 2015). Foi considerado marcação positiva coloração acastanhado em região de núcleo, citoplasma ou em ambos.

Na avaliação qualitativa, foram determinados escores para a intensidade de imunocoloração: 0 quando não havia imunocoloração; 1, para imunomarcação leve; 2, moderada; e 3, intensa. Na avaliação quantitativa, as imagens foram exportadas para o software ImageJ® e, por meio do comando cell counter, foi determinada a porcentagem de células tumorais marcadas e não marcadas em áreas representativas de tumor, peritumor e metástase linfonodal. Essa porcentagem foi categorizada de 1 a 4: 1, quando 0-25% das células eram positivas; 2, quando 26%-50% das células eram positivas; 3, quando 51%-75% das células eram positivas; e 4, quando 76%-100% das células eram positivas.

Para fins estatísticos, foram determinados histocores utilizando a multiplicação entre os escores de intensidade e a porcentagem de marcação. Obteve-se então: 0-4, marcação negativa ou leve; 5-8, marcação moderada; e 9-12, marcação intensa. Os marcadores avaliados por porcentagem foram o Ki67 e o TUNEL.

4.6. Ensaio de TUNEL

Secções de tecido (3,0 µm) foram submetidas a recuperação antigênica com Proteinase K (1:250) por 15 minutos e bloqueio de peroxidase com solução de H₂O₂ 3% diluída em PBS (solução tampão de fosfato) por 5 minutos. Após bloqueio da peroxidase, as lâminas foram incubadas por 10 segundos com tampão equilibrado (pronto para usar) e com Tdt (1:2.5) por 90 minutos em temperatura ambiente.

A solução de parada (strength stop) diluída em tampão de lavagem (1:15) foi adicionada por 10 minutos e, após lavagem, o conjugado de anti-digoxigenina (pronto para usar) foi adicionado. O sistema de revelação utilizado foi o DAB e a contra coloração foi realizada com *metil green* por 10 minutos seguidos de desidratação, diafanização e montagem com lamínulas.

4.7. Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio dos testes de Mann-Whitney e da correlação não-linear de Spearman. Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio dos testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

O nível de significância estatística utilizado foi $p < 0,05$ (*2-sided*) e todas as análises foram efetuadas com recurso ao software SPSS para Windows na versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. Resultados

5.1. Caracterização clínica e sócio-demográficas das pacientes com de CA de mama

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 39 pacientes com diagnóstico confirmado de CA de mama, sendo todos definidos com estadiamento de tamanho do tipo T4, dos subtipos moleculares Luminal A (n=10) e Luminal B (n=28) (Tabela 3). Quanto às variáveis sócio-demográficas, observou-se uma predominância de pacientes com CA de mama de etnia parda (n=31/79,5%), com idade inferior a 60 anos (n=20/51,3%), casada ou/e algum relacionamento afetivo (n=26/66,7%), com procedência do interior do estado do Ceará (n=21/53,8%) e com nível de escolaridade inferior ao primeiro grau (n=22/56,4%) (Tabela 3).

Em relação ao perfil imunohistoquímico, com foco nos receptores hormonais, observou-se que as pacientes apresentaram achados de biópsia da mama compatíveis com positividade de RE+ (n=37/97,4%), RP+ (n=34/87,2%) e HER2+ (n=10/26,3%) (Tabela 3). Além disto, 51,4% (n=18) dos casos apresentaram previamente ao estudo positividade para Ki67 em mais que 25% dos campos analisados (Tabela 3).

Frente ao estadiamento TNM dos casos de CA de Mama avaliados nesta pesquisa, verificou-se que, predominantemente, em 30,8% (n=12) dos casos houve disseminação do tumor para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou linfonodos mamários internos (N1) ou o tumor disseminou-se para 10 ou mais linfonodos axilares, para os gânglios linfáticos claviculares ou para os linfonodos torácicos internos (N3) (Tabela 3). Quanto à presença de metástase à distância (M), foi possível observar que 94,7% (n=36) dos casos apresentaram ausência de metástases à distância, sendo classificados como subtipo de estadiamento M0 (Tabela 3).

Foi possível também verificar que houve um predomínio de casos oriundos do SUS (n=35/92,1%) e que foram submetidos aos três distintos protocolos de tratamento do CA de Mama, sendo proeminente o procedimento cirúrgico adicionada de QT e RT (n=31/79,5%) (Tabela 3). Destaca-se que, respectivamente, 94,9% (n=37) e 82,1% (n=32) dos casos apresentaram-se vivos e sem recidiva clínica até o momento da coleta dos dados (Tabela 3).

Quanto ao uso de opióides, os dados apresentados sugerem que os pacientes que fizeram uso de opióides apresentaram menores chances de ter recidiva ($p=0,045$; OR= 6,389; IC= 1,044 - 39,112) (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização descritiva das variáveis clínico e sócio-demográficas das pacientes, em relação a presença ou ausência de recidiva da doença.

Variáveis	n	%	Recidiva (n/%)		p	Regressão Logística Multinomial				
			Sem recidiva	Com recidiva		P	OR	Mínimo	Máximo	
Raça										
Parda	31	79,5	26(81,3)	5 (71,4)	0,617	-	-	-	-	
Branca	8	20,5	6 (18,8)	2 (28,6)		-	-	-	-	
Idade										
Até 60 anos	20	51,3	17(53,1)	3 (42,9)	0,695	-	-	-	-	
Mais de 60 anos	19	48,7	15(46,9)	4 (57,1)		-	-	-	-	
Estado civil										
Solteira	13	33,3	9 (28,1)	4 (57,1)	0,194	-	-	-	-	
Com vínculo	26	66,7	23(71,9)	3 (42,9)		-	-	-	-	
Procedência										
Capital	18	46,2	15(46,9)	3 (42,9)	1,000	-	-	-	-	
Interior	21	53,8	17(53,1)	4 (57,1)		-	-	-	-	
Grau instrução										
Até primeiro grau	22	56,4	19(59,4)	3 (42,9)	0,677	-	-	-	-	
Maior que primeiro grau	17	43,6	13(40,6)	4 (57,1)		-	-	-	-	
Convenio*										
SUS	35	92,1	30(93,8)	5 (83,3)	0,412	-	-	-	-	
Não SUS	3	7,9	2 (6,3)	1 (16,7)		-	-	-	-	
Tratamento*										
Cirurgia + RT	1	2,6	1 (3,1)	0 (0,0)	0,333	-	-	-	-	
Cirurgia + QT	7	17,9	7 (21,9)	0 (0,0)		-	-	-	-	
Cirurgia + RT + QT	31	79,5	24(75,0)	7(100,0)		-	-	-	-	
N										
N0	7	17,9	6 (18,8)	1 (14,3)	0,886	-	-	-	-	
N1	12	30,8	9 (28,1)	3 (42,9)		-	-	-	-	
N2	8	20,5	7 (21,9)	1 (14,3)		-	-	-	-	
N3	12	30,8	10(31,3)	2 (28,6)		-	-	-	-	

M*									
MX	36	94,7	30(96,8)	6 (85,7)	0,339	-	-	-	-
M1	2	5,3	1 (3,2)	1 (14,3)		-	-	-	-
ki 67*									
Até 25%	17	48,6	14 (48,3)	3 (50,0)	1,000	-	-	-	-
Mais de 25%	18	51,4	15 (51,7)	3 (50,0)		-	-	-	-
Perfil imuno-histoquímico									
RE +	37	97,4	-	-	-	-	-	-	-
RP +	34	87,2	-	-	-	-	-	-	-
HER2 +	10	26,3	-	-	-	-	-	-	-
Fenótipo*									
Luminal A	10	26,3	9 (29,0)	1 (14,3)	0,65	-	-	-	-
Luminal B	28	73,7	22 (71,0)	6 (85,7)		-	-	-	-
Status Sobrevida livre de doença									
Sem recidiva	32	82,1	-	-	-	-	-	-	-
Com recidiva	7	17,9	-	-	-	-	-	-	-
Status Sobrevida									
Vivo	37	94,9	-	-	-	-	-	-	-
Óbito	2	5,1	-	-	-	-	-	-	-
Uso de Opióide									
Sim	25	64,1	23 (71,9)	2 (28,6)	0,031 0,045	6,389	1,044	39,112	
Não	14	35,9	9 (28,1)	5 (71,4)		-	-	-	

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

p<0,05, teste qui-quadrado ou Exato de Fisher. *Presença de dados perdidos.

5.2. Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF, para o perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides

Conforme demonstrado na Tabela 4, quando os casos de CA de mama são estratificados de acordo com o uso ou não de opióides, verificou-se que há um predomínio significativo de imunomarcações de Ki67 nos linfonodos em pacientes que utilizaram opióides quando comparados às pacientes que não utilizaram opióides no seguimento clínico ($p=0,011$) (Tabela 4). Entretanto, embora não significativo ($p=0,083$), observa-se um maior percentual de imunomarcção de μ opióide no parênquima tumoral para as pacientes que utilizaram opióide no curso clínico da doença (Tabela 5).

As demais imunomarcações, podemos identificar que a relação entre as expressões do κ Opióide, VEGF e análise de morte celular (TUNEL), apresentaram perfis distintos de marcações nos casos estratificados quanto ao uso e não uso de opióides. Contudo, estas associações não foram significativas ($p>0.05$) (Tabela 5) (Figura 1 e 2).

Tabela 4: Imunomarcção para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides.

Marcadores	Uso de Opióide (n/%)		
	Sim	Não	p-Valor
Ki67 (escore)			
Tumor			
0%	5 (20,0)	2 (15,4)	0,752
1-25%	12 (48,0)	8 (61,5)	
25-50%	4 (16,0)	2 (15,4)	
51-75%	1 (4,0)	1 (7,7)	
76-100%	3 (12,0)	0 (0,0)	
Peritumor			
0%	3 (60,0)	1 (50,0)	1,000
1-25%	2 (40,0)	1 (50,0)	
25-50%	-	-	
51-75%	-	-	
76-100%	-	-	
Linfonodo			
0%	2 (12,5)	0 (0,0)	0,011*
1-25%	5 (31,2)	9 (100,0)*	
25-50%	6 (37,5)*	0 (0,0)	
51-75%	1 (6,2)	0 (0,0)	
76-100%	2 (12,5)	0 (0,0)	
TUNEL (escore)			
Tumor			
0%	2 (8,3)	0 (0,0)	0,842
25-50%	2 (8,3)	1 (7,7)	
51-75%	2 (8,3)	2 (15,4)	
76-100%	18 (75,1)	10 (76,9)	
Peritumor			
0%	2 (10,0)	0 (0,0)	0,68
25-50%	1 (5,0)	0 (0,0)	
51-75%	3 (15,0)	1 (9,1)	
76-100%	14 (70,0)	10 (90,9)	
Linfonodo			
0%	2 (10,0)	0 (0,0)	0,393
25-50%	1 (5,0)	0 (0,0)	
51-75%	5 (25,0)	1 (10,0)	
76-100%	12 (60,0)	9 (90,0)	

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

p<0,05, teste qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Tabela 5: Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao uso de opióides

Marcadores	Uso de Opióide		
	Sim	Não	p-Valor
μ Opióide (%)			
Tumor	19,8 \pm 44,7	54,3 \pm 44,8	0,952
Peritumor	1,1 \pm 37,8	0,0 \pm 0,0	0,083
Linfonodo	98,9 \pm 41,3	53,9 \pm 45,1	0,312
κ Opióide (histoescore)			
Tumor	12,0 \pm 1,0	12,0 \pm 3,0	0,247
Peritumor	12,0 \pm 1,0	12,0 \pm 4,0	0,964
Linfonodo	12,0 \pm 3,0	12,0 \pm 3,0	0,562
VEGF (histoescore)			
Tumor	8,0 \pm 4,0	3,0 \pm 3,0	0,377
Peritumor	3,0 \pm 3,0	6,0 \pm 5,0	0,277
Linfonodo	8,0 \pm 4,0	11,0 \pm 4,0	0,604

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.
 $p < 0,05$, teste Mann-Whitney.

5.3. Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF, para o perfil de proliferação tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com subtipo molecular Luminal A e Luminal B

No que diz respeito aos resultados de imunohistoquímica para TUNEL, foi evidenciada que pacientes do subtipo molecular Luminal A apresentam um aumento significativo de chances de apresentar 51-75% de marcação de morte celular tecidual no tumor quando comparadas as pacientes definidas como subtipo Luminal B ($p=0.020$; OR=21.000; IC=1.613-273.340) (Tabela 6).

Tabela 6: Imunomarcaco para o perfil de proliferao tumoral (ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama estratificados quanto ao subtipo molecular Luminal A e Luminal B.

Marcadores	Subtipo molecular				Regressão Logística Multinomial				
	Luminal A	Luminal B	p-Valor	P	OR	Mínimo	Máximo		
Ki-67									
Tumor									
0%	3	30,0%	4	14,3%	-	-	-	-	
1-25%	7	70,0%	13	46,4%	-	-	-	-	
25-50%	0	0,0%	6	21,4%	0,250	-	-	-	
51-75%	0	0,0%	2	7,1%	-	-	-	-	
76-100%	0	0,0%	3	10,7%	-	-	-	-	
Peritumor									
0%	0	0,0%	4	57,1%	-	-	-	-	
1-25%	0	0,0%	3	42,9%	-	-	-	-	
25-50%	0	0,0%	0	0,0%	1,000	-	-	-	
51-75%	0	0,0%	0	0,0%	-	-	-	-	
76-100%	0	0,0%	0	0,0%	-	-	-	-	
Linfonodo									
0%	0	0,0%	2	10,0%	-	-	-	-	
1-25%	4	80,0%	10	50,0%	-	-	-	-	
25-50%	0	0,0%	6	30,0%	0,484	-	-	-	
51-75%	0	0,0%	1	5,0%	-	-	-	-	
76-100%	1	20,0%	1	5,0%	-	-	-	-	
TUNEL									
Tumor									
0%	1	12,5%	1	3,4%	-	-	-	-	
25-50%	1	12,5%	2	6,9%	-	-	-	-	
51-75%	0	0,0%	4	13,8%	0,472	-	-	-	
76-100%	6	75,0%	22	75,9%	-	-	-	-	
Peritumor									
0%	1	12,5%	1	4,3%	-	-	-	-	
25-50%	1	12,5%	0	0,0%	-	-	-	-	
51-75%	3	37,5%	1	4,3%	0,007*	0.020	21.000	1.613	
76-100%	3	37,5%	21	91,3%	-	-	-	-	
Linfonodo									
0%	1	11,1%	1	4,8%	-	-	-	-	
1-25%	1	11,1%	0	0,0%	-	-	-	-	
51-75%	0	0,0%	6	28,6%	0,174	-	-	-	
76-100%	7	77,8%	14	66,7%	-	-	-	-	

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

p<0,05, teste qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Em relação as demais análises, podemos identificar que, a relação entre as expressões do μ Opióide, κ Opióide, VEGF e análise do Ki-67, demonstraram uma maior expressão destes marcadores nos casos de subtipos moleculares do tipo Luminal B quanto associados aos casos do tipo Luminal A. Contudo, estas associações não foram significativas ($p>0.05$) (Tabela 6 e 7) (Figura 1 e 2).

Tabela 7: Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF, em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com subtipo molecular Luminal A e Luminal B

Marcadores	Luminal A	Luminal B	p-Valor
μ Opióide (%)			
Tumor	29,26 \pm 39,01	52,66 \pm 45,24	0,636
Peritumor	12,10 \pm 17,40	21,30 \pm 40,06	0,823
Linfonodo	33,33 \pm 47,14	72,56 \pm 39,31	0,629
κ Opióide (histoescore)			
Tumor	10,67 \pm 2,65	11,08 \pm 1,75	0,987
Peritumor	9,50 \pm 5,00	11,42 \pm 1,38	0,721
Linfonodo	9,83 \pm 2,56	10,40 \pm 2,87	0,796
VEGF (histoescore)			
Tumor	8,78 \pm 3,60	7,24 \pm 3,73	0,348
Peritumor	4,80 \pm 4,55	4,44 \pm 3,92	0,971
Linfonodo	8,29 \pm 3,55	8,74 \pm 3,45	0,830

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão. * $p<0,05$, teste Many-Whitney.

5.4. Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF, para o perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL) em relação a presença ou ausência de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama

Em relação às associações entre às imunomarcções de Mu, Kappa, VEGF, quanto a estratificação das pacientes na presença de recidiva na evolução clínica, foi possível evidenciar que as pacientes com estadiamento do tipo T4 que apresentaram recidiva (7,2 \pm 3,7) demonstraram uma diminuição de expressão do *histoscore* do κ Opióide, na localização linfonodal, quando relacionado às pacientes que apresentaram evolução clínica associada à recidiva (10,8 \pm 2,2) ($p=0.033$) (Tabela 8).

Tabela 8: Imunomarcção para os opióides Mu (μ), Kappa (κ) e VEGF em relação a presença ou ausência de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama.

Marcadores	Sem recidiva	Com recidiva	p-Valor
μ Opióide (%)			
Tumor	46,3 \pm 43,6	33,5 \pm 49,7	0,519
Peritumor	19,7 \pm 35,0	0,0 \pm 0,0	0,262
Linfonodo	67,3 \pm 44,5	48,5 \pm 39,5	0,21
VEGF (histoescore)			
Tumor	8,0 \pm 3,7	8,7 \pm 3,8	0,629
Peritumor	3,9 \pm 3,6	6,4 \pm 4,3	0,227
Linfonodo	7,9 \pm 3,7	11,3 \pm 1,5	0,095
κ Opióide (histoescore)			
Tumor	11,1 \pm 1,8	10,5 \pm 2,5	0,653
Peritumor	10,8 \pm 2,8	12,0 \pm 0,1	0,574
Linfonodo	10,8 \pm 2,2	7,2 \pm 3,7	0,033*

Dados expressos em forma de mediana e desvio-padrão. * $p < 0,05$, teste Many-Whitney.

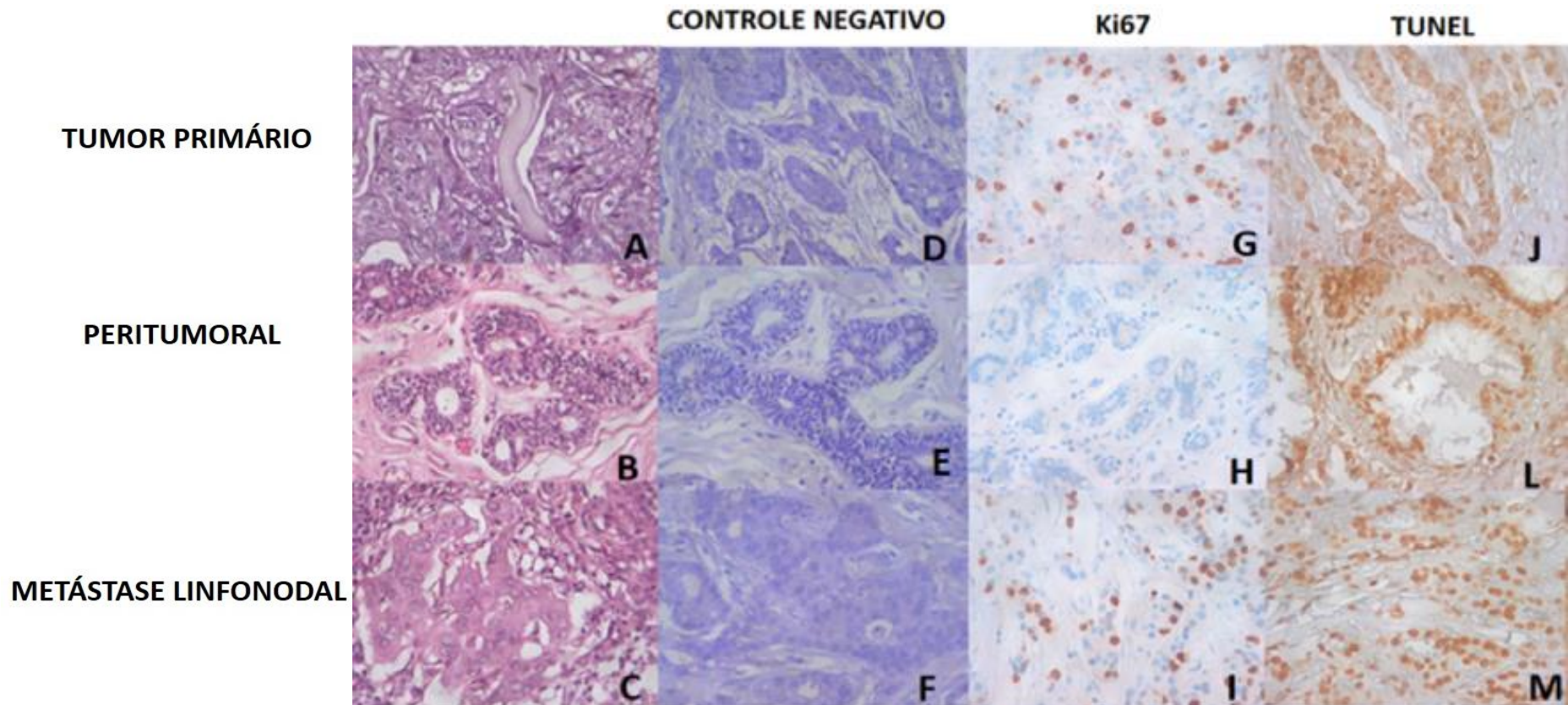
Quanto às demais análises, podemos identificar que, a relação entre as expressões do μ Opióide, Ki-67 e análise de TUNEL, houve uma menor expressão destes marcadores nos casos de pacientes que apresentaram recidiva clínica em comparação às pacientes que não recidivaram (Tabela 8 e 9). Além disto, na análise do VEGF, observou-se um aumento da expressão deste marcador em pacientes que tiveram recidiva clínica (Tabela 8). Contudo, estas associações não foram significativas ($p > 0,05$) (Figura 1 e 2).

Tabela 9: Imunomarcção para o perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL) em relação a presença de recidiva em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama.

Marcadores	Recidiva (n/%)		p-Valor
	Sim	Não	
Ki67 (escore)			
Tumor			
0%	7 (22,6)	0 (0,0)	
1-25%	15 (48,4)	5 (71,4)	
25-50%	4 (12,9)	2 (28,6)	0,38
51-75%	2 (6,5)	0 (0,0)	
76-100%	3 (9,7)	0 (0,0)	
Peritumor			
0%	2 (50,0)	2 (66,7)	
1-25%	2 (50,0)	1 (33,3)	
25-50%	-	-	1,000
51-75%	-	-	
76-100%	-	-	
Linfonodo			
0%	2 (9,5)	0 (0,0)	
1-25%	10 (47,6)	4 (100,0)	
25-50%	6 (28,6)	0 (0,0)	0,547
51-75%	1 (4,8)	0 (0,0)	
76-100%	2 (9,5)	0 (0,0)	
TUNEL (escore)			
Tumor			
0%	2 (6,7)	0 (0,0)	
25-50%	3 (10,0)	0 (0,0)	0,885
51-75%	3 (10,0)	1 (14,3)	
76-100%	22 (73,3)	6 (85,7)	
Peritumor			
0%	2 (7,7)	0 (0,0)	
25-50%	1 (3,8)	0 (0,0)	1,000
51-75%	3 (11,5)	1 (20,0)	
76-100%	20 (76,9)	4 (80,0)	
Linfonodo			
0%	2 (8,0)	0 (0,0)	
25-50%	1 (4,0)	0 (0,0)	1,000
51-75%	5 (20,0)	1 (20,0)	
76-100%	17 (68)	4 (80,0)	

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

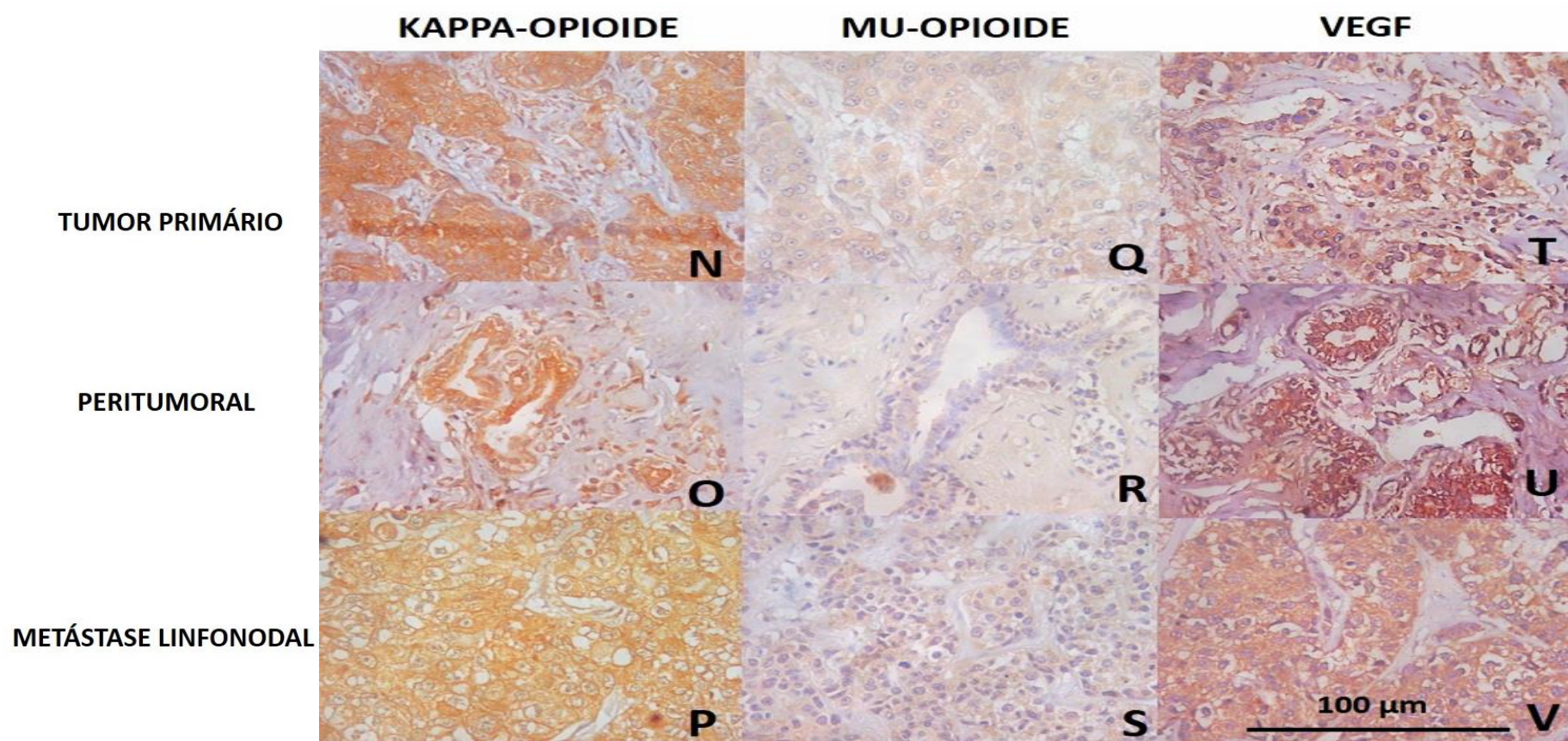
p<0,05, teste qui-quadrado ou Exato de Fisher.



Painel histológico com HE e as imunomarcações, perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL) em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com localizações tumorais, peritumorais e de metástase linfonodal

Figura 1: Foto micrografia de tumor primário HE (A) HE peritumor (B) e HE metástase linfonodal (C), controle negativo (D, E, F), e perfil imunohistoquímico para Ki67 (G, H e I), ensaio de TUNEL (J, L e M). aumento de 400X.

Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia e NEMPI.



Painel histológico com as imunomarcações dos receptores opióides Mu (μ), Kappa (k) e VEGF em amostras de biópsias de pacientes com CA de Mama com localizações tumorais, peritumorais e de metástase linfonodal

Figura 2: Aspectos microscópicos de tumor primário, peritumor, metástase linfonodal dos receptores kapa opióide (N, O e P), Mu opióide (Q, R, S) e o VEGF (T, U, V). aumento de 400X.

Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia e NEMPI

5.5. Análises de correlação entre os níveis de expressão das imunomarcações para os opióides Mu (μ), Kappa (k) e VEGF, para o perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL) no CA de Mama

Para as análises de correlação entre as proteínas estudadas, foi avaliada a influência da expressão de cada marcador opióides Mu (μ) e Kappa (k), o marcador de angiogênese (VEGF), para o perfil de proliferação tumoral (Ki67) e de morte celular (TUNEL)], e sua respectiva localização, sobre a expressão dos demais a partir da análise do teste de correlação de *Spearman* (R), a fim de definir a influência que um marcador tem sobre o outro, buscando-se caracterizar se tais alvos se comportam em uma mesma cascata de eventos no CA de Mama (Tabela 10).

Na análise de correlação de *Spearman's*, observou-se que há importantes correlações entre os seguintes marcadores: *Mu opioide (Tumor)* e *Mu opioide (Peritumor)* ($r=0.555$; $p=0.011$); *Mu opioide (Tumor)* e *Kappa opioide (Tumor)* ($r=0.414$; $p=0.010$); *Mu opioide (Tumor)* e *TUNEL peritumoral* ($r=0.363$; $p=0.045$); *Mu opioide (Linfonodo)* e *Kappa opioide (Linfonodo)* ($r=0.457$; $p=0.025$); *Mu opioide (Linfonodo)* e *Ki 67 (Linfonodo)* ($r=0.525$; $p=0.010$); *VEGF tumor* e *Ki 67 tumor* ($r=0.378$; $p=0.018$); *VEGF peritumoral* e *Kappa opioide (Tumor)* ($r=-0.535$; $p=0.009$); *VEGF linfonodo* e *TUNEL Linfonodo* ($r=-0.374$; $p=0.009$); *TUNEL tumor* e *TUNEL peritumoral* ($r=0.505$; $p=0.004$) (Tabela 10). Tais dados demonstram que estes marcadores, provavelmente, atuam em uma mesma cascata de eventos no CA de mama com estadiamento T4.

Tabela 10: Análise de correlação de *Spearman's* entre os marcadores das pacientes com CA de mama.

p -value (2-tailed)

	<i>Mu Tu</i>	<i>Mu Pe</i>	<i>Mu Linf</i>	<i>VEGF Tu</i>	<i>VEGF Pe</i>	<i>VEGF Linf</i>	<i>K Tu</i>	<i>K Pe</i>	<i>K Linf</i>	<i>Ki67 Tu</i>	<i>Ki67 Pe</i>	<i>Ki67 Linf</i>	<i>TUNEL Tu</i>	<i>TUNEL Pe</i>	<i>TUNEL Linf</i>
<i>Mu Tu</i>		0,011	0,149	0,070	0,331	0,124	0,010	0,686	0,134	0,335	0,481	0,126	0,070	0,045	0,801
<i>Mu Pe</i>	0,555		0,097	0,623	0,082	0,977	0,125	0,571	0,214	0,753	0,374	0,167	0,366	0,706	0,941
<i>Mu Linf</i>	0,304	0,501		0,967	0,655	0,314	0,238	0,543	0,025	0,697	1,000	0,010	0,814	0,534	0,353
<i>VEGF Tu</i>	0,293	-0,117	0,009		0,273	0,277	0,211	0,883	0,084	0,018	0,638	0,648	0,627	0,758	0,241
<i>VEGF Pe</i>	-0,212	-0,434	0,121	-0,233		0,486	0,009	0,895	0,997	0,263	0,237	0,334	0,856	0,207	0,424
<i>VEGF Linf</i>	0,292	-0,008	0,210	0,205	-0,181		0,251	0,795	0,387	0,126	1,000	0,729	0,737	0,353	0,050
<i>K Tu</i>	0,414	0,364	0,245	0,205	-0,535	0,216		0,642	0,935	0,576	0,374	0,918	0,965	0,586	0,253
<i>K Pe</i>	-0,102	0,159	-0,206	0,037	-0,035	-0,084	0,122		0,405	0,452	1,000	0,924	0,869	0,649	0,524
<i>K Linf</i>	0,291	0,370	0,457	0,327	-0,001	0,170	0,016	0,265		0,521	1,000	0,787	0,812	0,874	0,228
<i>Ki67 Tu</i>	-0,161	0,075	-0,084	-0,378	0,238	0,291	-0,094	0,189	-0,127		0,317	0,099	0,843	0,314	0,983
<i>Ki67 Pe</i>	0,322	0,447	0,000	-0,218	-0,514	0,000	-0,447	0,000	0,000	0,445		1,000	0,846	1,000	1,000
<i>Ki67 Linf</i>	-0,314	-0,408	-0,525	0,094	-0,268	0,071	-0,021	0,031	-0,056	0,337	0,000		0,958	0,766	0,575
<i>TUNEL Tu</i>	0,301	0,214	-0,049	0,081	-0,039	0,064	-0,008	0,042	-0,046	-0,034	-0,091	0,011		0,004	0,102
<i>TUNEL Pe</i>	0,363	0,090	-0,144	0,057	0,280	-0,194	-0,102	0,119	0,035	0,184	0,000	-0,067	0,505		0,062
<i>TUNEL Linf</i>	0,048	0,021	-0,198	0,217	0,207	0,374	-0,212	0,205	0,240	0,004	0,000	0,120	0,305	0,379	

Spearman's τ *p<0,05, Correlação de *Spearman's*.

6. DISCUSSÃO

A prevalência e suscetibilidade de surgimento de neoplasias de mama são maiores nas mulheres de pele branca conforme demonstrado por BARROS et al. (2013) que encontrou a predominância de mulheres brancas (57,6%); porém o diagnóstico tardio é realizado mais frequentemente na população feminina afrodescendente. No campo da saúde, há evidências de vulnerabilidades que fragilizam mulheres negras em termos de diferenças de morbidade e acesso à saúde (GUIMARÃES, 2012; ROSA, 2003). Na análise das variáveis sócio demográficas no presente estudo, observou-se uma predominância de pacientes de etnia parda (n=31/79,5%), com idade superior a 60 anos (n=20/51,3%), o que corrobora com os dados apresentados pelo INCA (2016) que descreve o câncer de mama como sendo relativamente raro antes dos 35 anos e que acima desta idade sua incidência cresce progressivamente, principalmente após os 50 anos.

Outro dado demográfico que se encontra relatado na literatura e encontrado também na população em estudo é a maior incidência em mulheres casada ou/e algum relacionamento afetivo (n=26/66,7%), dados que corroboram com levantamento encontrado por GUIMARÃES et al. (2012) em que no seu estudo encontraram a predominância de mulheres casadas e LOTTI et al. (2008) (64,3%) em todas as faixas etárias, com maior concentração acima de 45 anos com procedência do interior do estado do Ceará (n=21/53,8%) e com nível de escolaridade inferior ao primeiro grau (n=22/56,4%). Alguns estudos mostraram um maior atraso de procura por tratamento associado ao baixo grau de instrução (SHARMA et al., 2012), à menor renda familiar (YAU et al., 2010) e à residência distante do local de tratamento (UKWENYA et al., 2008). Tais resultados permitiram inferir que, quanto maior a idade menor o nível de escolaridade e quanto mais jovem a paciente, maior o nível de escolaridade (GUIMARÃES, 2012). Percebe-se, ainda, uma percentagem baixa de pacientes com nível superior, mostrando que as pacientes atendidas nessa Instituição Pública de Saúde possuem baixo nível educacional. Deve - se considerar que a escolaridade representa um fator importante no planejamento e implementação de atividades educativas e de prevenção (GUIMARÃES, 2012; JANZ, 2005).

Verificou-se, neste estudo, que na procedência da maioria das pacientes foi de cidades do interior (53,8%), o que se alinha com as demais pesquisas sócio

demográficas (GUIMARÃES, 2012; PINHEIRO et al., 2013) realizadas no perfil populacional de pacientes com câncer de mama, por estas cidades do interior serem desprovidas de centros de atendimento de alta complexidade em suas cidades e por Fortaleza ser caracterizada como cidade referência de saúde para alta complexidade de cidades vizinhas. Encontramos também, o predomínio de casos oriundos do SUS (n=35/92,1%) e que foram submetidos aos três distintos protocolos de tratamento do CA de Mama, sendo eles o mais frequente o procedimento cirúrgico adicionada de QT e RT (n=31/79,5%), e que 94,9% (n=37) e 82,1% (n=32) dos casos, respectivamente, apresentaram-se vivos e sem recidiva clínica até o momento da coleta, mostrando que a opção de escolha do tratamento foi adequada.

Quando avaliamos o perfil imunohistoquímico, com foco nos receptores hormonais, observou-se que as pacientes apresentaram achados de biópsia da mama compatíveis com positividade de RE+ (n=37/97,4%), RP+ (n=34/87,2%) e HER2+ (n=10/26,3%), estes dados verificam que os RE e os RP estão altamente associados com a idade da paciente no diagnóstico, sendo significativamente mais positivos em tumores de mulheres pós-menopausa, e que a maioria dos tumores positivos para RP são também positivos para RE o que também foi encontrado por ROSEN (1997) e BRITO (2007). Em estudo realizado por EISENBERG (2001) foi verificado que cerca de dois terços dos carcinomas de mama são receptores hormonais (RH) positivos (RE e/ou RP) e esta positividade está altamente associada com a idade da paciente e existe uma relação inversa com o tamanho do tumor e o grau histológico. Os tumores RH positivos têm um bom prognóstico e respondem melhor à terapia hormonal. As pacientes com tumores positivos para RP mostram um maior intervalo de tempo livre da doença e maior sobrevida (SHIMIZU, 2000; BRITO, 2007), verificou-se também que 51,4% (n=18) dos casos apresentaram positividade para Ki67 em mais 25% dos campos analisados, corroborando com os estudos anteriores (QUINTÃO et al., 2016).

Frente ao estadiamento TNM dos casos de CA de Mama, admite-se que as células malignas disseminam-se inicialmente por via linfática para os linfonodos axilares e depois de alcançam a circulação sistêmica. Outra hipótese sugere que o carcinoma mamário é uma doença sistêmica desde o início; entretanto, o estadiamento axilar continua tendo importantes implicações prognósticas (TAVASSOLI, 2000). Nos achados observados neste estudo, confirma-se essa hipótese já que foi encontrado que em 30,8% (n=12) dos casos houve disseminação do tumor para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou linfonodos mamários internos (N1) ou o tumor disseminou-se para 10 ou

mais linfonodos axilares, para os gânglios linfáticos claviculares ou para os linfonodos torácicos internos (N3), já em relação à presença de metástase à distância (M), foi possível observar que 94,7% (n=36) dos casos apresentaram ausência de metástases à distância, sendo classificados como estadiamento M0.

Quanto ao uso de opióides, os dados apresentados sugerem que os pacientes que fizeram uso de opióides apresentaram menores chances de apresentarem recidiva. Um estudo realizado por Sjogren (2016) mostrou que pacientes com câncer avançado descobriu que aqueles que tiveram dor intratável em opióides sistêmicos e receberam morfina intratecal tiveram sobrevivência mais longa do que aqueles que receberam exclusivamente morfina sistêmica.

Quando os casos de CA de mama são estratificados de acordo com o uso ou não de opióides, verificou-se que há um predomínio significativo de imunomarcações de Ki67 nos linfonodos em pacientes que utilizaram opióides quando comparados às pacientes que não utilizaram opióides no seguimento clínico. A positividade para proteína Ki67 é um indicador de prognóstico adverso, e sua hiperexpressão se correlaciona com atividade mitótica elevada, indiferenciação celular e maior tendência a invasão (RICCI, 2008). A imunomarcação de ki67 marca a o perfil de proliferação celular, como tumores bem diferenciados tendem a ter baixo índice de proliferação quando comparados aos de alto grau (alto índice de proliferação) muitas vezes são mais sensíveis ao tratamento.

As drogas opióides, antagonista dos receptores μ em nível periférico demonstraram diminuir o crescimento de linhas tumorais *in vitro* (KUROSAWA, 2012) inibindo a angiogênese (MATHEW, 2011), entre outros efeitos (MAO, 2013) – o que parece confirmar a importância de tais receptores nos efeitos sobre o crescimento celular. Entretanto, embora não significativo, observou-se um maior percentual de imunomarcação de μ opióide no parênquima tumoral para as pacientes que utilizaram opióide no curso clínico da doença. Já para as demais imunomarcações estudadas, podemos identificar que a relação entre as expressões do κ Opióide, VEGF e análise de morte celular, apresentaram perfis distintos de marcações nos casos estratificados quanto ao uso e não uso de opióides, contudo estas associações não foram significativas.

Há evidências emergentes de que a expressão e sinalização de MOR (receptor opióide mu) desempenham plausivelmente um papel na progressão do câncer ao interagir com angiogênese, EMT (transição epitelialmesenquimal), mTOR (alvo mamífero de inibidores de rapamicina), Src (fosforilação de tirosina), e outras vias de

sinalização. A elevação da expressão de MPOR sugere piores resultados em pacientes com câncer que estão expostos a opióides sistêmicos ou aqueles com altos níveis de expressão de MOR (SINGLETON et al.,2015).

Os resultados da marcação para TUNEL evidenciou que pacientes do subtipo molecular Luminal A apresentam um aumento significativo de chances de apresentar elevada (51-75%) de marcação de morte celular tecidual no tumor quando comparadas as pacientes definidas como subtipo Luminal B. Estes achados são baseados na classificação dos tumores em que os subtipos luminais A são positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER (CHEANG, 1999) e os subtipos luminal B, mais recentemente, tem sido caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo (luminal HER2), e quando o HER2 é negativo, por ter um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (VODUC,2010; ; PRAT et. al., 2011; BARROS e LEITE, 2015). Estudos recentes trazem que o subtipo luminal A deve ainda apresentar um índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (KENNECKE e VODUK 2010; PRAT et. al., 2011; BARROS e LEITE, 2015). Isso sugere que os tumores Luminal A apresentam elevada taxa de apoptose.

Já os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SORLIE, 2003; PRAT et. al., 2011; BARROS e LEITE, 2015). O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CIRQUEIRA et. al., 2011).

Em relação às associações entre às imunomarcações de Mu, Kappa, VEGF, Ki67 e TUNEL, quanto a estratificação das pacientes na presença de recidiva na evolução clínica, foi possível evidenciar que as pacientes com estadiamento do tipo T4 que apresentaram recidiva ($7,2\pm 3,7$) demonstraram uma diminuição de expressão do *histoscore* do κ Opióide, na localização linfonodal, quando relacionado às pacientes que não apresentaram evolução clínica associada à recidiva ($10,8\pm 2,2$) ($p=0.033$), provavelmente devido ao fato que opióides suprimem a imunidade celular e humoral,

incluindo atividade de células NK, produção de citocinas imunoestimulantes, atividade fagocítica e produção de anticorpos. Em ratos, a morfina aumenta a angiogênese e promove crescimento de células tumorais (AFSHARIMANI et al., 2011). Tanto o fentanil como a morfina inibem a atividade de células NK em humanos já o tramadol estimula a ação das células NK em animais e humanos (KALIL FILHO,2011).

Quanto às demais análises, podemos identificar que, a relação entre as expressões do μ Opióide, Ki-67 e análise de TUNEL, houve uma menor expressão destes marcadores nos casos de pacientes que apresentaram recidiva clínica em comparação às pacientes que não recidivaram. Além disto, na análise do VEGF, observou-se um aumento da expressão deste marcador em pacientes que tiveram recidiva clínica, mas estatisticamente estas associações não foram significativas, provavelmente porque não são relevantes para este grupo de pacientes. Fato até então não descrito na literatura, assim é a primeira vez que estes marcadores são estudados neste novo cenário em câncer de mama.

Nas análises de correlação entre os marcadores avaliados observamos que existem importantes correlações entre os seguintes marcadores: μ opióide (Tumor) e μ opióide (Peritumoral); μ opióide (Tumor) e κ opióide (Tumor); μ opióide (Tumor) e TUNEL peritumoral; μ opióide (Linfonodo) e κ opióide (Linfonodo); μ opióide (Linfonodo) e Ki 67 (Linfonodo); VEGF tumor e Ki 67 tumor; VEGF peritumoral e κ opióide (Tumor); VEGF linfonodo e TUNEL Linfonodo; TUNEL (Tumor) e TUNEL (Peritumoral). Tais dados demonstram que estes marcadores, provavelmente, atuam em uma mesma cascata de eventos no CA de mama com estadiamento T4.

Contudo verifica – se a necessidade de validação funcional desses marcadores, buscando, possivelmente, a realização de um estudo prospectivo que avalie as consequências do uso de opióide desde o diagnóstico da neoplasia mamária, nos diferentes subtipos moleculares Luminais, e até mesmo, em outros subtipos diagnósticos do câncer de mama, seguindo a avaliação por todo o curso da doença.

Em relação às demais análises, podemos identificar que, a relação entre as expressões do μ Opióide, κ Opióide, VEGF e análise do Ki-67, demonstraram uma maior expressão destes marcadores nos casos de subtipos moleculares do tipo Luminal B quanto aos casos do tipo Luminal A. apesar destas associações não terem sido significativas, talvez em uma amostra maior de pacientes esta associação possa ser demonstrada ou estes marcadores possam estar associados com mutações genéticas em fases mais avançadas e tardias da doença, o que não era contexto deste estudo.

Verificamos que uma limitação deste estudo está associada a necessidade de validação funcional das imunoexpressões de μ Opióide e κ Opióide em uma casuística mais ampla, buscando, possivelmente, a realização de um estudo prospectivo que avalie as consequências do uso de opióides desde o diagnóstico da neoplasia mamária, seja nos subtipos moleculares Luminais, e até mesmo, em outros subtipos diagnósticos do câncer de mama, sendo seguida por todo o curso da doença.

Nesse estudo entendemos que os opióide apresentam-se como um potencial marcador de resposta à terapêutica neoadjuvante em câncer de mama e consequentemente de sobrevida global e intervalo livre de doença. Salienta-se que a identificação de outras vias para origem e progressão do câncer é de relevância clínica para o desenvolvimento de tratamentos mais individualizados será provável que a predição de resposta terapêutica seja avaliada no futuro por meio da combinação de biomarcadores.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as recidivas dos tumores de mama T4 estão associadas ao não uso de opioides e baixa expressão do receptor kappa opioide e o uso de opioides é diretamente associado a imunoexpressão de ki-67. Adicionalmente, não houve diferença significativa no comportamento biológico dos tumores luminal A, luminal B e a imunoexpressão dos receptores de opioide não se associaram aos marcadores de angiogênese.

Em síntese, nos tumores luminal A e luminal B o não uso de opioides está diretamente associado a um pior prognóstico, por redução da expressão do receptor kappa opioide.

8. REFERÊNCIAS

- AFSHARIMANI, B.; CABOT, P.; PARAT, M.O. Morphine and tumor growth and metastasis. **Cancer metastasis reviews**. v. 30, n. 2 p. 225-38, 2011.
- AJCC, Staging System for Breast Cancer 7th Edition, 2010
- AMERICAN CANCER SOCIETY: Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2015. Disponível online. Acesso em 7/01/2015.
- ANDERSON W, SCHAIRER C, CHEN, B, et al. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). **Breast Dis**. v.22, p.9-23, 2005.
- APOLONE, G. et al. Pattern and quality of care of cancer pain management. Results from the Cancer Pain Outcome Research Study Group. **British Journal of Cancer**, v. 100. p. 1566-74, 2009.
- BALTIERI, D. et al. Abuso e Dependência dos Opiáceos. **Associação Brasileira de Psiquiatria**. 2008.
- BARBERA, L,C. et al. How often are opioids prescribed for cancer patients reporting pain? A population-based analysis. **Journal of Clinical Oncology and Research**. v. 29, 2011.
- BARROS, A. C. S. D; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H.; ANELLI, A.; FIQUEIRA FILHO, A.; DEL GIGLIO, A. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 1-13, 2001.
- BARROS, A.F., et al. Interval for access to treatment for breast cancer in the Federal District, Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2013; 35(10):458-63.
- BONNIER P, et al. Inflammatory cancers of the breast: a clinical, pathological, or clinical and pathological definition? **Int J Cancer**., v.62, p.382-385, 1995.
- BRITO, N. M. B.; SAMPAIO, P.C.M.; CASTRO, A. A. H.; OLIVEIRA, M. R. Características clínicas de mulheres com carcinoma ductal invasivo submetidas à quimioterapia neoadjuvante. *Rev Para Med*. 21(4):1-10, 2007.
- CABIOGLU N, et al. Expression of growth factor and chemokine receptors: new insights in the biology of inflammatory breast cancer. **Ann Oncol**., v.18, p.1021- 1029, 2007.
- CIANFROCCA M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.

- CIRQUEIRA, M.B. et al. Molecular subtypes of breast cancer. **FEMINA**. vol 39. nº 10. 2011.
- CHEANG MCU, CHIA SK, VODUC D, GAO D, LEUNG S, SNIDER J, et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
- CHEN, C.; FAROOQUI, M.; GUPTA, K. Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signaling in mouse retinal endothelial cells. **Current Neurovascular Research**. v. 3, p.171-80,2006.
- CHIA SK, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. **Clin Cancer Res**, v.18, n.16, p.4465-72, 2012.
- DAWOOD S. et al. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 515-523, 2011.
- EROĞLU A, AYDIN F. Management of non-inflammatory locally advanced breast cancer: focus on surgical approaches. **Experimental oncology**, v.35, n.4, p. 272-279, 2013.
- DE LA GARZA-SALAZAR JG, et al. (eds.), **Inflammatory Breast Cancer**. Springer-Verlag London, p.29-50, 2013.
- EIRÓ, N. et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. **Public Library of Science**, Spain, v. 7, n.11, p. e49047, 2012.
- FAROOQUI, M. et al. Naloxone acts as an antagonist of estrogen receptor activity in MCF-7 cells. **Molecular Cancer Therapeutics**. v.5, p.611-20, 2006.
- FINLEY, M. J. et al. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. **Cellular Immunology**, v. 252, n. (1-2), p.146-154, 2008.
- FUJIOKA, N. et al. Morphine-induced epidermal growth factor pathway activation in non-small cell lung cancer. **Anesthesia and analgesia**. v.113:1353-64, 2011.
- GACH K. et al. The role of morphine in regulation of cancer cell growth. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**. v. 384, n. 3:221-30, 2011.
- GODINHO, E. R.; KOCH, H. A. Rastreamento do CA de mama: aspectos relacionados ao médico. *Radiol Bras*. 37(2):91-9, 2004.

- GONZALEZ-ANGULO AM, et al. p53 expression as a prognostic marker in inflammatory breast cancer. **Clin Cancer Res.** v.10, p.6215-6221, 2004.
- GUPTA, K. et al. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. **Annals of Cancer Research.** v. 62, p.4491-8, 2002.
- GUÉRIN M, SHENG ZM, ANDRIEU N, et al. Strong association between c-myc and oestrogen-receptor expression in human breast cancer. **Oncogene.** v.5, p.131-13, 1990.
- GUIMARÃES ,A.G.C. et al. Sociodemographic Characterization and Evaluation of Quality of Life in Women with Breast Cancer Undergoing Adjuvant Chemotherapy. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 58(4): 581-592. 2012.
- HAAGGENSEN C. Inflammatory Carcinoma. **Disease of the Breast.** Philadelphia: W.B. Saunders, p.576-584, 1971.
- HANCE KW, et al. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the Surveillance, Epidemiology and End Results Program at the national Cancer Institute. **J Natl Cancer Inst,** v.97, p.966-975, 2005.
- IGLESIAS, M. et al. Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. **Neuropharmacology.** v. 44, n. 4, p.482–492, 2003.
- INIC et al.. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2014:8
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- KANDEL, E. R. et al. Principles of Neural Science. 4^aed. New York, USA: McGraw-Hill, Inc., 2000.
- KALIL FILHO, R et al . I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol., São Paulo* , v. 96, n. 2, supl. 1, p. 01-52, 2011 .
- KENNECKE H, YERUSHALMI R, WOODS R, CHEANG MCU, VODUC D, SPEERS CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3271-7.

- KLEER CG, et al. WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res.** v.6, p. 110- 115, 2004.
- KOODIE, L.; RAMAKRISHNAN, S.; ROY, S. [Morphine suppresses tumor angiogenesis through a HIF-1alpha/p38MAPK pathway.](#) **American journal of speech-language pathology / American Speech-Language-Hearing Association.** v. 177, n. 2, p. 984-97, 2010.
- KUERER HM, et al. Neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast carcinoma: conceptual basis and fundamental surgical issue. **J Am Coll Surg.**, v.190, p.350-63, 2000.
- LEE B, TANNENBAUM E. Inflammatory carcinoma of the breast. **Surg Gynecol Obstet.**, v.39, p.580-595, 1924.
- LEE MC, NEWMAN LA. Management of patients with locally advanced breast cancer. **Surg Clin N Am**, v.87, p.379-98, 2007.
- LENNON, F.E. et al. Overexpression of the mu-opioid receptor in human non-small cell lung cancer promotes Akt and mTOR activation, tumor growth, and metastasis. **Anesthesiology** v.116, p.857-67, 2012.
- LISBOA, L. F. Tendências da incidência e da mortalidade do CA de mama no município de São Paulo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.
- LOTTI, R.C.B. Impacto do câncer de mama na qualidade de vida. **Revista brasileira de cancerologia.**; 54(4): 367-71. 2008.
- MATHEW, B. et al. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation. **Anesthesia and Analgesia.** v.112:558-67, 2011.
- MARTIN, W.R. Pharmacology of opioids. **Pharmacol Ver.** v.35, p.283-303, 1983.
- MENARD JP, et al. Sentinel lymphadenectomy for the staging of clinical axillary node-negative breast cancer before neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Surg Oncol.** v.35, p.916-20, 2009.
- MERAJVER S, SABEL MS. **Inflammatory breast cancer.** In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, C.K. Diseases of the breast. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.

- MOLL UM, RIOU G, LEVINE AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc Natl Acad Sci**, v.89, n.15, p.7262-7266, 1992.
- MOSS, J.; ROSOW, C.E. Development of peripheral opioid antagonists' new insights into opioid effects. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 83, p.1116-1130, 2008.
- NGUYEN J. et al. Morphine stimulates cancer progression and mast cell activation and impairs survival in transgenic mice with breast cancer. **British journal of Anaesthesia**. v.113, n. 1, p. 4-13, 2014.
- OZMEN V, et al. Axillary sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy. **EJSO**, v.36, p.23-9, 2010.
- PAIK S, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v.351, n.27, p.2817-26, 2004.
- PEROU CM, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. v.17, n.406, p.747-752, Aug. 2000.
- PINHEIRO, A.B et al. Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Análise de 12.689 Casos. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2013; 59(3): 351-359
- PRAT A, et al. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.135, n.1, p.301-6, 2012.
- QUINTÃO, V.C., et al. Analysis of Ki67 Protein Expression in Actinic Keratosis Lesions, Basal Cell Carcinoma and Squamous Skin Cells Carcinoma. **Revista Bionorte**, v. 5, n. 2, jul. 2016.
- RICCI, Marcos Desidério; JUNQUEIRA, Paulo Augusto de Almeida. "Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares". **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo , v. 54, n. 3, p. 189, June 2008 .
- ROBERTSON FM, et al. Inflammatory Breast Cancer: The Disease, the Biology, the Treatment. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v.60, p.351-375, 2010.
- SENISKI, G. G. Análise do perfil de metilação do promotor do gene ADAM33 e sua correlação clínica com câncer de mama. Dissertação de mestrado. Departamento de Patologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2008.
- SHARMA, K. et al. A systematic review of barriers to breast cancer care in developing countries resulting in delayed patient presentation. **J Oncol**. 2012;2012:121873.

- SIEGEL RL, MA J, ZOU Z, et al. Cancer Statistics 2014. **Ca Cancer J Clin**, v.64, n. 1, p. 9-29, 2014.
- SINACHI M, et al. Pattern of care in locally advanced breast cancer: focus on local therapy. **The Breast**, v.20, p.145-50, 2011.
- SINGLETON, P.A. et al. Methylnaltrexone inhibits opiate and VEGF-induced angiogenesis: role of receptor transactivation. **Microvascular Research**. v.72, p.3-11, 2006.
- SINGLETON, P.A.; MOSS J. Effect of perioperative opioids on cancer recurrence: a hypothesis. **Future Oncology**. v. 6, p.1237–1242, 2010.
- SINGLETON, P.A. et al. The Mu Opioid Receptor: A New Target for Cancer Therapy? **Cancer**. 2015;121:2681-8.
- SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
- SØRLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
- SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-8.
- SUTHERLAND S. et al. Inflammatory breast cancer—The Royal Marsden Hospital experience. **Cancer**, v.116, n.S11, p.2815-2820, 2010.
- SOTIRIOU C, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **J Natl Cancer Inst**, v.98, n.4, p.262-72, 2006.
- VAN DE VIJVER MJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med**., v.347, p.1999-2009, 2012.
- VAN'T VEER LJ. et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v.5, n.1, p.57-8, 2003.
- WALSHE JM, SWAIN SM. Clinical aspects of inflammatory breast cancer. **Breast Dis.**, v.22, p.35-44, 2005.

- Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):245-62.
- TAN et al. Opioid use among female breast cancer patients using different adjuvant endocrine therapy regimens. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Jun 21.
- TEGEDER, I. et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. **Cancer Research**. v. 15, n. 63, p.1846-1852, 2003.
- TEWARI M, KRISHNAMURTHY A, SUKLA HS. Breast conservation in locally advanced breast cancer in developing countries: wise or waste. **Surg Oncol.**, v.18, p.3-13, 2009.
- TORRE L, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2012, **Ca Cancer J Clin.** v. 65, p. 87–108, 2015.
- TRYFONIDIS K, SENKUS E, CARDOSO MJ, et al. Management of locally advanced breast cancer-perspectives and future directions. **Nat Rev Clin Oncol.**12(3), 147-62. 2015
- UKWENYA, A.Y., et al. Delayed treatment of symptomatic breast cancer: the experience from Kaduna, Nigeria. *S Afr J Surg*. 2008;46(4):106-10.
- VAN GOLEN KL, et al. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. **Neoplasia**. v.2, 418-425, 2000.
- VAN GOLEN KL, et al. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. **Cancer Res.**, v.60, p.5832-5838, 2000.
- VERMEULEN PB, et al. Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern and tumor emboli in inflammatory breast cancer. **Cancer**, v.116, n.11, p.2748-2754, 2010.
- VODUC KD, CHEANG MCU, TYLDESLEY S, GELMON K, NIELSEN TO, KENNECKE H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684-91.
- YEAGER, M.P.;COLACCHIO T.A. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. **Arch Surgery**. V. 126, n. 4:454-456, 1991.
- WANG, CZ. et al. Methylnaltrexone, a peripherally acting opioid receptor antagonist, enhances tumoricidal effects of 5-Fu on human carcinoma cells. **Anticancer Research**. V. 29, p.2927–2932, 2009.

- WEIGEL MT, DOWSETT M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):245-62.
- YAMAUCHI H. et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. **The oncologist**, v.17, n.7, p.891-899, 2012.
- YAU, T.K. et al. Delayed presentation of symptomatic breast cancers in Hong Kong: experience in a public cancer centre. *Hong Kong Med J*. 2010;16(5):373-7.
- ZAGON, I.S.; MCLAUGHLIN P.J. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. **Science** v.221, p.671-3, 1083.
- ZELL JA, TSANG WY, TAYLOR TH et al. Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. **Breast Cancer Res**. v. 11, n. 1 p. 19, 2009.
- ZYLLA, D. et al. Opioid requirement, opioid receptor expression, and clinical outcomes in patients with advanced prostate cancer. **Cancer**. v.119, p.4103-10, 2013.

Anexo A - Parecer Consubstanciado - Instituto do Câncer do Ceará

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES E MARCADORES DE ANGIOGÊNESE E DE PROGRESSÃO TUMORAL NO CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: Alceu Machado de Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56452216.0.3001.5528

Instituição Proponente: DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.618.068

Apresentação do Projeto:

O projeto em questão visa avaliar a expressão de receptores opióides correlacionando com fatores prognósticos, marcadores de angiogênese e de proliferação celular no câncer de mama com ou sem processo metastático. O projeto enfoca a importante relação entre a ativação de receptores opióides e angiogênese na progressão tumoral na patogênese no câncer de mama. Os opióides são os medicamentos mais eficazes atualmente disponíveis para o manejo da dor moderada e severa associada ao câncer. A expressão desses receptores encontra-se aumentada em vários tipos de câncer, especialmente no câncer metastático, o que sugere que ligantes endógenos ou opióides utilizados para analgesia podem inadvertidamente promover a progressão do câncer. Os resultados conflitantes acerca do efeito dos opióides na progressão tumoral, via ativação de receptores opióides é objeto desse estudo. Nesse sentido, o presente projeto visa investigar a expressão desses receptores nestes tumores, correlacionando com angiogênese e marcadores de progressão tumoral. Essas informações poderão contribuir para o entendimento do efeito dos opióides no câncer, além de poderem ser úteis para o delineamento do tratamento e de estratégias para o controle da dor oncológica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar de forma retrospectiva a expressão dos receptores opióides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ)

Endereço: PAPI JUNIOR
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.068

correlacionando com fatores prognósticos, marcadores de angiogênese e de proliferação celular no câncer de mama com ou sem processo metastático de pacientes diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).

- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama com ou sem processo metastático a expressão de Receptores opióides Mu (μ);
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama com ou sem processo metastático a expressão de Receptores opióides Kappa (κ);
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama com ou sem processo metastático a expressão de Receptores opióides Delta (δ);
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama com ou sem processo metastático a expressão de Marcadores de angiogênese (CD31 e VEGF);
- Determinar em biópsias excisionais de câncer de mama com ou sem processo metastático a expressão de marcadores de proliferação e morte celular (ki67, ciclina D1 e ensaio de TUNEL).
- Correlacionar os dados coletados nas análises imuno-histoquímicas com fatores clínico-patológicos e prognósticos, incluindo sobrevida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos aos participantes, assegura-se que não haverá riscos aos pacientes, vistos que os mesmos não serão submetidos a nenhum procedimento clínico para esta pesquisa. No entanto, em pesquisas com o uso de dados secundários, tais como prontuários clínicos, o tipo de risco mais provável é a possibilidade de exposição de informações pessoais e/ou clínicas dos pacientes, tais como pontos relacionados à aspectos sociais, raciais e sexuais. Segundo o princípio da não maleficência, o pesquisador tem a obrigação de não infligir danos ou males intencionalmente aos participantes da pesquisa. Neste sentido, o presente projeto de pesquisa buscará não gerar nenhum tipo de risco físicos ou moral aos indivíduos avaliados. Assim, informa-se que em hipótese alguma serão divulgados, por quaisquer meios de divulgação, dados pessoais ou produtos das análises dos prontuários relacionados aos entrevistados.

Quanto aos benefícios da pesquisa, estima-se que a mesma beneficiará com a identificação da influência de medicações opioides, que são usualmente utilizadas por pacientes oncológicos, na progressão do tumor de mama.

Colaborando para uma melhor escolha destas medicações.

Endereço: PAPI JUNIOR
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3228-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

**INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC**



Continuação do Parecer: 1.618.068

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Após análise do apresentado, o presente projeto se justifica e evidencia o racional do estudo em pacientes com câncer de Mama, que tem como objetivo estudar a relação entre a ativação de receptores opióides, angiogênese e progressão tumoral na patogênese no câncer de mama com ou sem processo metastático.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão presentes conforme as exigências do CEP. No presente projeto, foi solicitado a dispensa da aplicação do Termo de consentimento livre e esclarecido por trata-se de pesquisa retrospectiva com uso de prontuários e blocos parafinados.

Recomendações:

Recomenda-se, na parte da metodologia, na seção "seleção da amostra" redefinir o período da coleta dos blocos. Sugerisse atualizar para os últimos 15 anos ao invés de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2014.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No projeto encaminhado, serão desenvolvidos dados importantes na relação entre a ativação de receptores opióides, angiogênese e progressão tumoral na patogênese no câncer de mama com ou sem processo metastático. O projeto apresenta um oneroso orçamento, entretanto fica claro na proposta a viabilidade da execução do projeto no laboratório NEMPI-UFC. Além disso, a equipe executora envolvida no projeto apresenta potencialidade técnico-científica. Portanto, devido ao exposto acima, consideramos positiva a proposta, a qual deferimos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP acompanha o parecer do relator, aprovando o projeto sem quaisquer restrições.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_668386.pdf	25/05/2016 15:51:38		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_patologistas.jpg	25/05/2016 15:51:22	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	25/05/2016 15:50:59	Alceu Machado de Sousa	Aceito

Endereço: PAPI JUNIOR
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.068

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Alceu.doc	24/05/2016 14:06:38	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	21/04/2016 19:58:36	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	cartaencaminhamento.doc	20/04/2016 20:18:54	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	lattes.pdf	20/04/2016 20:18:07	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	icc.jpg	20/04/2016 20:17:22	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	fieldepositariot.jpg	20/04/2016 20:16:23	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	fieldepositario.jpg	20/04/2016 20:14:20	Alceu Machado de Sousa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodedispensa.docx	20/04/2016 20:13:38	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	20/04/2016 20:13:01	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoconcordancia.doc	20/04/2016 20:12:26	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaonempi.doc	20/04/2016 20:10:13	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoicc.doc	20/04/2016 20:09:54	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	20/04/2016 20:09:31	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	Curriculo_Profa_Renata_Leitao.pdf	25/02/2016 14:02:55	Alceu Machado de Sousa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: PAPI JUNIOR
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospicancer-icc.org.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.068

FORTALEZA, 01 de Julho de 2016

Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Anexo B - Parecer Consubstanciado - Universidade Federal do Ceará

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPEAQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES E MARCADORES DE ANGIOGÊNESE E DE PROGRESSÃO TUMORAL NO CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: Alceu Machado de Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56452216.0.0000.5054

Instituição Proponente: DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.572.019

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa que visa avaliar se a maior expressão de receptores opióides em carcinoma inflamatório da mama primário e metastático está relacionada com a maior expressão de marcadores de angiogênese e de proliferação celular, sendo correlacionada com menor sobrevida dos pacientes, pois sabe-se que o uso de medicações analgésicas opióides é muito utilizadas no controle da dor oncológica e pouco se sabe da sua ação em células tumorais.

Objetivo da Pesquisa:

Primário:

Avaliar de forma retrospectiva a expressão dos receptores opióides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ) correlacionando com fatores prognósticos, marcadores de angiogênese e de proliferação celular nos carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático de pacientes diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).

Secundários:

- Determinar em biópsias excisionais de carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático a expressão de Receptores opióides Mu (μ);
- Determinar em biópsias excisionais de carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático a expressão de Receptores opióides Kappa (κ);

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.572.019

- Determinar em biópsias excisionais de carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático a expressão de Receptores opióides Delta (Δ);
- Determinar em biópsias excisionais de carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático a expressão de Marcadores de angiogênese (CD31 e VEGF);
- Determinar em biópsias excisionais de carcinomas inflamatórios de mama primário e metastático a expressão de marcadores de proliferação e morte celular (ki67, ciclina D1 e ensaio de TUNEL).
- Correlacionar os dados coletados nas análises imuno-histoquímicas com fatores clínico-patológicos e prognósticos, incluindo sobrevida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: risco mínimo, uso de dados secundários, tais como prontuários clínicos

Benefícios: Identificar a influência de medicações opióides, que são usualmente utilizadas por pacientes oncológicos, na progressão do tumor de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional, quantitativo de caráter retrospectivo e de corte transversal. Serão selecionadas amostras de biópsias excisionais de 51 pacientes com carcinoma inflamatório de mama, diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), no período de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2014. Os dados sócio-demográficos, como idade, sexo, grau de instrução, raça/cor e tipo de entrada no hospital (convênio/particular ou SUS) serão levados em consideração para seleção da amostra. Dados clínico-patológicos, como tipo histológico do tumor, estadiamento, acometimento linfonodal e tratamento realizado também serão avaliados. Após levantamento dos laudos histopatológicos, as lâminas serão analisadas em microscópio óptico binocular (Nikon®, modelo Eclipse E100) para confirmação da gradação histológica do tumor. A análise será realizada por dois patologistas experientes de maneira independente e caso haja discordância, uma análise conjunta em um só microscópio será feita até que haja concordância. Após revisão de lâminas, serão levantados os respectivos blocos para realização das técnicas de Tissue Microarray (TMA) e imuno-histoquímica para os anticorpos para receptor Mu opióides, Delta opióide, Kappa opióides, ciclina D1, Ki67, CD31 e VEGF. Também será avaliada a sobrevida, que será obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data do óbito (dia, mês e ano) utilizando para fins de análise estatística a quantidade de meses entre essas datas. Serão avaliados os cortes em TMA da parte

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.572.019

intratumoral para imunomarcção de receptores Opióides, Ciclina D1 e Ki67. Para avaliação microscópica serão fotografados 5 campos por corte histológico em um aumento de 400x. As amostras passarão por uma avaliação qualitativa categórica, onde será avaliada a intensidade de coloração. Esta mesma análise será feita para avaliação de densidade vascular utilizado os anticorpos anti-VEGF e anti-CD31. Será realizado ainda ensaio de TUNEL para avaliação de morte celular com o anticorpo anti-Ki67.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de forma adequada: carta de encaminhamento, folha de rosto, anuência da instituição, concordância dos pesquisadores, cronograma, orçamento, currículo do pesquisador, solicitação de dispensa do TCLE, termo do fiel depositário.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

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_BÁSICAS_DO_PROJETO_668386.pdf	25/05/2016 15:51:38		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_patologistas.jpg	25/05/2016 15:51:22	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	25/05/2016 15:50:59	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Alceu.doc	24/05/2016 14:06:38	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	21/04/2016 19:58:36	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	cartaencaminhamento.doc	20/04/2016 20:18:54	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	lattes.pdf	20/04/2016 20:18:07	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	ioc.jpg	20/04/2016 20:17:22	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	fieldepositariot.jpg	20/04/2016 20:18:23	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	fieldepositario.jpg	20/04/2016 20:14:20	Alceu Machado de Sousa	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.572.019

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodedispensa.docx	20/04/2016 20:13:38	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	20/04/2016 20:13:01	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoconcordancia.doc	20/04/2016 20:12:26	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaonempi.doc	20/04/2016 20:10:13	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoicc.doc	20/04/2016 20:09:54	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	20/04/2016 20:09:31	Alceu Machado de Sousa	Aceito
Outros	Curriculo_Profa_Renata_Leitao.pdf	25/02/2016 14:02:55	Alceu Machado de Sousa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 02 de Junho de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br