UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Sidnei Iensen Felicidade

Avaliação Imuno-histoquímica de *PIK3CA* e *PTEN* no Câncer de Mama *HER2*-Positivo.

Porto Alegre
2020

Sidnei Iensen Felicidade

Avaliação Imuno-histoquímica de *PIK3CA* e *PTEN* no Câncer de Mama *HER2*-Positivo.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vial Roehe
Co-orientadora: Dra. Emily Ferreira Salles Pilar

Porto Alegre
2020

Catalogação na Publicação

Iensen Felicidade, Sidnei
Avaliação Imuno-histoquímica de PIK3CA e PTEN no Câncer de Mama HER2-Positivo. / Sidnei Iensen Felicidade. -- 2020.
49 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2020.

Orientador(a): Adriana Vial Roehe ; coorientador(a): Emily Ferreira Salles Pilar.

1. câncer de mama. 2. imuno-histoquímica. 3. HER2. 4. PIK3CA. 5. PTEN. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À Deus por me proporcionar viver com luz e me guiar a consolidar o propósito da conclusão deste projeto e principalmente colocar no caminho pessoas boas de bom coração que ajudaram mentalmente e braçalmente a construção deste trabalho.

Dentro essas pessoas estão, a Dra. Emily Pilar que contribuiu com sua ideia de projeto inicial e toda a estrutura analítica para concretização deste estudo, juntamente com ela a Dra. Franciele que ajudou com a técnica de IHQ em equipamento automatizado e Dra. Joara Presdesbon que dedicou horas de seu tempo para consultar prontuários dos pacientes.

Juntamente, a Dra. Adriana Vial Roehe que desde o primeiro contato que aceitou minha ideia de realizar o mestrado, aceitando ser minha orientadora, e assim abrindo as portas para acesso a mais conhecimento, bem como, contribuindo de modo imensurável com seu conhecimento e experiência na edição do trabalho.

Resumo

Introdução: o carcinoma invasivo de mama *HER2*-positivo ocorre entre 15 a 20% entre os carcinomas de mama e as ferramentas laboratoriais mais utilizadas para seu diagnóstico e classificação para o tratamento com anti-*HER2* são a imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização *in situ*. Porém, pode ocorrer falha neste tratamento, através de mecanismos associados à rota mTOR, pelos quais os genes *PTEN* e *PIK3CA* estão envolvidos. Com isso, o conhecimento sobre os níveis de expressão destes genes, pode contribuir para uma melhor estratificação e tratamento personalizado destes pacientes. **Objetivos:** avaliar a expressão de *PIK3CA* e *PTEN* por IHQ em carcinomas de mama *HER2* positivos e correlacionando os resultados com parâmetros clínico-patológicos. **Materiais e Métodos:** foram estudadas, retrospectivamente, 50 amostras (biópsias virgens de tratamento) de pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama *HER2*-positivo. As amostras foram submetidas a IHQ para *PTEN* (Abcam-ab31392) e *PIK3CA* (Abcam-ab152155), em plataforma automatizada. A análise dos resultados foi realizada por dois observadores independentes, de modo semiquantitativo, sendo avaliadas percentagem de células positivas (0 a 100%) e intensidade de marcação (0 a 3), com posterior criação de um escore (0-300 pontos). Os dados foram submetidos a análise estatística, sendo considerados estatisticamente significativos valores de p< a 0,05. **Resultados:** A expressão imuno-histoquímica do anticorpo *PIK3CA* foi positiva em 86% das amostras. A perda de expressão de *PTEN* foi observada em 46% dos casos. A expressão dos marcadores não apresentou correlação significativa entre si e nem com os parâmetros clínico-patológicos estudados: grau tumoral, estadiamento, *RE*, *RP*, *Ki67*, recidiva. A expressão positiva de *PIK3CA* esteve associada com diminuição da mortalidade na amostra estudada (P= 0.016) e maior tempo de sobrevida das pacientes (p=0.001). O marcador *PTEN* não mostrou efeito significativo na análise de sobrevida. **Conclusões:** A expressão de *PIK3CA* mostrou efeito protetor em relação ao tempo de sobrevida das pacientes com Câncer de Mama *HER*-positivo.

Palavras-chave: câncer de mama, imuno-histoquímica, *HER2*, *PIK3CA*, *PTEN*

Abstract

Introduction: Invasive *HER2*-positive breast carcinoma occurs between 15 and 20% among breast carcinomas and the most widely used laboratory tools for its diagnosis and classification for anti-*HER2* immunotherapy are immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization. However, failures in this treatment may occur through mechanisms associated with the mTOR route by which the *PTEN* and *PIK3CA* genes are involved. Thus, knowledge about the expression levels of these genes can contribute to better stratification and personalized treatment of these patients. **Objectives:** To evaluate the expression of *PIK3CA* and *PTEN* by IHQ in *HER2* positive breast carcinomas, correlating the results with clinical and pathological parameters. **Materials and Methods:** Fifty samples (virgin treatment biopsies) from patients diagnosed with *HER2*-positive breast carcinoma were retrospectively studied. The samples were submitted to IHC for *PTEN* (Abcam-ab31392) and *PIK3CA* (Abcam-ab152155) in automated platform. The analysis of the results was performed by two independent observers, semi-quantitatively, and the percentage of positive cells (0 to 100%) and the intensity of labeling (0 to 3) were evaluated, with subsequent creation of a score (0-300 points). Data were subjected to statistical analysis, and p values less than 0.05 were considered statistically significant. **Results:** The immunohistochemical expression of the *PIK3CA* antibody was positive in 86% of the samples. Loss of *PTEN* expression was seen in 46% of cases. The expression of the markers did not show any significant correlation between each other nor with the studied clinicopathological parameters: tumor grade, staging, *ER, RP, Ki67,* recurrence. The positive expression of *PIK3CA* was associated with decreased mortality in the studied sample (P= 0.016) and longer survival time of the patients (p=0.001). The *PTEN* marker did not show a significant effect on survival analysis. **Conclusions:** *PIK3CA* expression showed a protective effect in relation to the survival time of patients with *HER*-positive Breast Cancer.

Keywords: breast cancer, immunohistochemistry, *HER2, PIK3CA, PTEN*

Lista de abreviaturas

CM – Carcinoma de Mama

SUS - Sistema Único de Saúde

RE - Receptores Hormonais de Estrógeno

RP - Receptor de Progesterona

HER2- Human Epidermal Growth Factor Receptor- Type 2

IHQ - Imuno-Histoquímica

PEG - Perfil de Expressão Gênica

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

PIK3CA - fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma de testes moleculares para diagnóstico de câncer de mama *HER2* positivo. _____ Pág. 15
Figura 2. Terapia alvo anti-*HER2*._____ Pág. 16
Figura 3. Esquema da via *PI3K*/*AKT*/mTOR e *PTEN*__ _____Pág. 19

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clinico-patológicas dos casos._____ Pág. 31

Tabela 2. Resultados da associação entre *PIK3CA* e *PTEN* entre as variáveis estudadas.._____Pág. 32

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Associação entre expressão de *PIK3CA* com a sobrevida global._____ Pág 33

Gráfico 2. Associação entre expressão de *PTEN* com a sobrevida global._____ Pág 33

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação dos subtipos de CM. _____Pág. 13

Quadro 2. Alterações genéticas mais observadas em CM._____ Pág. 17

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO 12
1.1 O Câncer de Mama 12
1.2 O Gene *HER2* 14
1.3 O Gene *PTEN* 18
1.4 O Gene *PIK3CA* 19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 21
3. OBJETIVOS 25
3.1 Objetivo geral 25
3.2 Objetivos específicos 25
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS 26
5. CONCLUSÕES 35
6. APÊNDICE 40
6.1 Imagens das reações imuno-histoquímicas dos marcadores 40
6.1.1 Reação imuno-histoquímica positiva (1+) para *PIK3CA* (40x) 40
6.1.2 Reação imuno-histoquímica positiva (2+) para *PIK3CA* (40x) 40
6.1.3 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para *PIK3CA* (40x) 40
6.1.4 Reação imuno-histoquímica positiva (1+) para *PTEN* (40x) 41
6.1.5 Reação imuno-histoquímica positiva (2+) para *PTEN* (40x) 41
6.1.6 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para *PTEN* (40x) 41
6.1.7 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para Controle Positivo para *PIK3CA* (40x) 42
6.1.8 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para Controle Positivo para *PTEN* (40x) 42
7. ANEXOS 43
7.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA 43

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 O Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer com maior prevalência sobre as mulheres no mundo, com índice de 24,2% do total de casos e aproximadamente 2,1 milhão de casos novos em 2018 (IARC). No Brasil, a última estimativa é de 59.700 novos casos em 2018 (INCA). O Sistema Único de Saúde (SUS) enfrenta desafios em relação a garantir de maneira uniforme o acesso ao diagnóstico precoce do carcinoma de mama (CM) e as terapias modernas como a terapia alvo para *CM HER2* positivos (CECILIO *et al*., 2015).

Fatores como diversidades econômicas, sociais, geográficas, associados ao atraso no diagnóstico e acesso às terapias, podem justificar a alta taxa de mortalidade pela doença no Brasil, que chega a 16.927 em 2017 (LEE *et al*., 2012; INCA).

Além dos fatores citados, os perfis biológicos destes tumores possuem diferenças específicas que também influenciam o índice de mortalidade. Isso se deve ao fato de o CM ser uma doença heterogênea, de alta complexidade molecular e diversidade biológica com variabilidade nos padrões de expressão gênica associados com o comportamento biológico da doença (DE BARROS e LEITE, 2015).

Desde 2010, é utilizada uma padronização de marcadores imuno-histoquímicos para classificação fenotípica do CM que auxilia na definição terapêutica e prognóstica do CM. São eles: Receptores Hormonais de Estrógeno (RE) e de Progesterona (RP), *HER2* e *Ki67*. Este modelo de classificação é derivado do estudo de análise de expressão gênica por microarranjos de DNA de Perou *et al*. (2010) e Goldhirsch *et al*. (2011), que contribuiu para a identificação de distintos subtipos moleculares de CM: Basal-like, *HER2* +, Luminal A e Luminal B.

No brasil, o custo para o uso rotineiro de técnicas moleculares na prática clínica é muito elevado, com isso a utilização de técnicas de IHQ se tornou uma ferramenta útil e de custo mais acessível para subclassificação desses tumores (MALHOTRA *et al*., 2010, VIALE, 2012). Os subtipos de câncer de mama, segundo a expressão dos marcadores de imuno-histoquímicas podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação dos subtipos de CM.

Subtipo Intrínseco	**Acordo de classificação IHC (Goldhirsch A., *et al*. 2011)**
Luminal A	"Luminal A" *RE* e ou *RP* positivo *HER2* negativo *Ki67* <14%
Luminal B	"Luminal B (*HER2* negativo)" *RE* e/ou *RP* positivo *HER2* negativo *Ki67* ≥14% 73% a 100% "Luminal B (*HER2* positivo)" *RE* e / ou RP positivo Qualquer *Ki67* *HER2* sobre expresso ou Amplificado
HER2-positivo	'*HER2* positivo (não luminal)' *HER2* sobre expresso ou amplificado *RE* e *RP* ausentes
Basal-like	"Triplo negativo" *RE* e *RP* ausentes *HER2* negativo

Fonte: adaptado de Guiu *et al*. (2012).

O subtipo de CM Luminal A tem origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares, é positivo para receptores hormonais *RP* e *RE*, porém negativo para *HER2*, possui baixos níveis de expressão de *Ki67* (inferior a

14%) e tem incidência de aproximadamente 30 a 40% dos CM. São de baixo grau, tendem a crescer lentamente e têm o melhor prognóstico.

O subtipo luminal B, também se originam em células epiteliais, é positivo para receptores hormonais *RE* e *RP*, porém positivo ou negativo para *HER2* com altos níveis de *Ki67* (acima de 14%). Possui crescimento mais acelerado e prognóstico pouco pior que o subtipo Luminal A com incidência de aproximadamente 20 a 30% dos CM. (Breastcancer.org, 2019; DE BARROS e LEITE, 2015).

Os quimioterápicos atualmente utilizados nos protocolos de tratamento de subtipos luminais são: Adriamicina, Ciclofosfamida, Paclitaxel, Docetaxel, Filgrastim e terapia neoadjuvante hormonal, em pacientes pós menopausa, com Tamoxifeno e, pacientes com *HER2* positivo é adicionado terapia neoadjuvante com Pertuzumabe e Transtuzumabe (SBO, 2017).

O subtipo triplo-negativo ou basal-like, com origem em células mioepiteliais, é negativo para receptores hormonais RE e RP e negativo para *HER2*. Este tipo de câncer está intimamente associado com mutação no gene BRCA1, alto índice de formação de metástase. Geralmente ocorre em idade mais jovem e apresenta maior taxa de metástases viscerais do que os outros subtipos. Tem incidência de 15 a 20% dos CM. O tratamento ocorre com quimioterapia com mesmos quimioterápicos já citados, porém existe a associação de radioterapia, tendo em vista que este subtipo não expressa receptores específicos para tratamento, o que torna um mau prognóstico (Breastcancer.org, 2019; SBO, 2017; DE BARROS e LEITE, 2015).

O subtipo *HER2* positivo é negativo para receptores hormonais RE e RP e positivo para *HER2*. Possui mau prognóstico para o paciente, pois tende a crescer mais rapidamente que os cânceres luminais com incidência de 15 a 20% dos CM. O tratamento atualmente utilizado é associação dos quimioterápicos já citados, associados ao Pertuzumabe e Trastuzumabe, anticorpos monoclonais específicos e os químicos Neratinib e Ado-Trastuzumabe Emtansina (ATE) (Breastcancer.org, 2019; SBO, 2017; DE BARROS e LEITE, 2015).

1.2 O Gene *HER2*

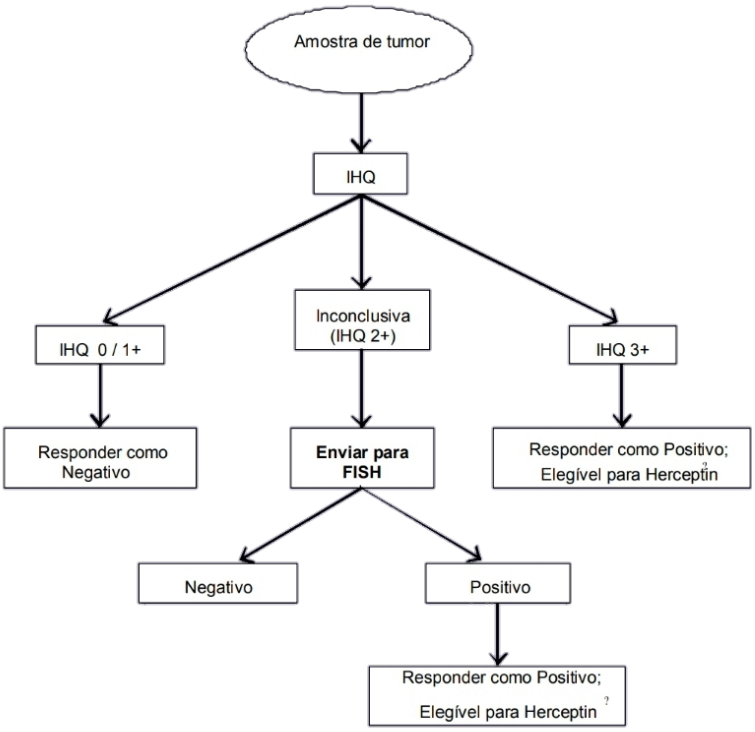
O gene *HER2*, é um oncogene, também conhecido como ERBB2, *HER2*/neu codifica um receptor transmembrana com atividade de tirosina-cinase

da família ERBB (ErbB1-Egfr, ErbB2 ErbB3 e ErbB4). O potencial oncogênico destes genes se deve à sua superexpressão que proporciona um aumento na proliferação e modificação do perfil molecular das células tumorais (SLAMON *et al*., 1987 e 1989; LEREBOURS e LIDEREAU, 2002; DAWOOD *et al*., 2010).

A amplificação ou superexpressão de *HER2* está associada a um mau prognóstico sendo um fator preditor de resposta às terapias com anticorpos humanizados dirigidos contra o gene *HER2* (ROSS e FLECHTER, 1998).

A técnica mais utilizada para avaliar a expressão da proteína *HER2* é a IHQ. Outra metodologia empregada, quando a IHQ tem resultado intermediário (2+), é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) que avalia a amplificação do gene *HER2*(Figura 1) (SAUDADE e FONSECA., 2005).

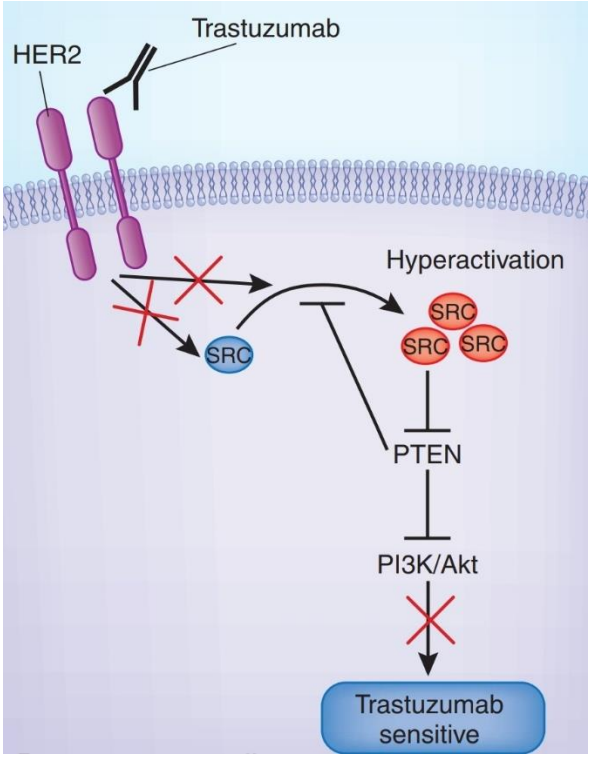
Figura 1. Fluxograma de testes moleculares para diagnóstico de câncer de mama *HER2* positivo.



Fonte: adaptado de Saudade e Fonseca (2005).

O Brasil tem avançado no que diz respeito aos procedimentos cirúrgicos mais conservadores, quando somente parte da mama é removida, e na busca da individualização do tratamento, tratando cada paciente e tumor de acordo com seu perfil molecular, dentre estes tratamentos está à terapia-alvo anti-*HER2* que é um tratamento de terapia alvo (Figura 2) (INCA, 2016).

Figura 2. Terapia alvo anti-*HER2*.



Fonte: adaptado de Muthuswamy (2011).

Na Figura 2 demonstra a ligação de anticorpo monoclonal específico ao epítopo da proteína *HER2* na superfície da célula, causando a inibição de *PI3K*/*Akt,* consecutivamente bloqueando a rota mTOR através da inibição dos sinais de crescimento e proliferação celular (MUTHUSWAMY, 2011).

Para esta terapia alvo é utilizado o quimioterápico Trastuzumabe, disponível comercialmente no Brasil na concentração de 440 mg. Seu uso está bem estabelecido e a posologia recomendada se baseia em uma dose por kg de peso corpóreo, ajustada por paciente (CONITEC, 2012).

O Trastuzumabe foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1998 e pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999, o que possibilitou o uso deste quimioterápico chegando numa redução de 33% (P

= 0.015) a 35% (p < 0.00001) no risco de morte de pacientes com CM *HER2* positivo (GUARNERI *et al*., 2010; PEREZ *et al., 2007;* ROMOND, *et al., 2005*).

Porém, vem sendo observado em alguns casos, tanto em doença inicial, quanto em doença avançada, resistência primária e secundária à terapia anti-*HER2*. Muitos mecanismos foram descritos como possíveis determinantes dessa falha terapêutica como o bloqueio incompleto do receptor HER2 que ativa mecanismos compensatórios dentro da família *HER*, a ativação de tirosinasinases receptoras alternativas, ou outros receptores de membrana como o fator de crescimento 1 tipo insulina (IGF-1R), hiperativação da via *PI3K*/AKT/mTOR, por níveis reduzidos de genes supressores do tumor (PTEN), ou pela ativação de mutações no PIK3CA (PERNAS E TOLANEY, 2019).

Além disso, novas estratégias anti-*HER2* estão sendo desenvolvidas como a associação de terapia com outros quimioterápicos: docetaxel, paclitaxel, vinorelbina, cisplatina, antraciclina, 5-fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida, etc... (PERNAS E TOLANEY, 2019; GUARNERI *et al*., 2010).

A resistência ao Trastuzumabe é um obstáculo importante no manejo clínico do paciente e ainda não há biomarcadores conclusivos e nem tratamento substitutivo do Trastuzumabe. (VU e CLARET, 2012).

Assim, é necessário o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da resistência a este fármaco e desenvolvimento de novos biomarcadores envolvidos na iniciação e progressão do CM *HER2*-positivo.

Neste contexto, surgiram dois potenciais biomarcadores para avaliação: os genes *PTEN* e *PIK3CA* (PARK e DAVIDSON, 2007; CGAN, 2012). O quadro 2 mostra a frequência de alterações nesses genes no CM.

Quadro 2. Alterações genéticas mais observadas em CM

Alterações genéticas	Luminal A	Luminal B	Basal-like	*HER2*
Mutação *PIK3CA*	49%	32%	7%	42%
Mutação/perda *PTEN*	13%	24%	35%	19%

Fonte: adaptado de CGAN (2012).

Além disso, alguns estudos acreditam que mutações, perda ou expressão reduzida de *PTEN* resultam em hiperativação da via *PI3K* causando a resistência Trastuzumabe, como demonstra LIN (2012) que identificou a perda ou redução da expressão de *PTEN* em 19,2% dos 104 casos estudados. O grupo de tumores sem perda de expressão de *PTEN* apresentou maior atividade proliferativa. Mutação em *PIK3CA* também pode estar contribuindo para esta resistência. Bai *et al*. (2014) identificaram mutações em *PIK3CA* em 35.2% dos 105 tumores de mama por eles pesquisados, a maior parte das mutações foi nos éxons hotspots 9 (42%) e 20 (55.3%) (BERNS *et al*., 2007; SAAL *et al*., 2005; PARK e DAVIDSON, 2007).

1.3 O Gene *PTEN*

Acredita-se que o *PTEN* é um gene supressor tumoral. Em CM possivelmente sua perda de função está relacionada com a superexpressão de *HER2*, promovendo pior resposta terapêutica à terapia alvo anti-*HER2*. Pois, observa-se que níveis baixos do produto do gene *PTEN* resultam em alta fosforilação de *PI3K/AKT* bloqueando o efeito antiproliferativo do Trastuzumabe (NAGATA *et al*., 2004). Por este fato conhecer a expressão de *PTEN* é um parâmetro importante do ponto de vista clínico em tumores com amplificação de *HER2* (NAGATA *et al*., 2004; KENIRY e PARSONS, 2008; LEITÃO, 2012).

Lin (2014) avaliou a frequência da expressão IHQ de *PTEN* em carcinomas de mama positivos para *HER2*, observando redução da expressão dessa proteína em 19,2% dos tumores avaliados. No estudo de Jensen *et al.* (2012), também houve diminuição da expressão de *PTEN* na IHQ em 24% dos tumores avaliados.

Em estudo de 100 pacientes com CM metastático *HER2*-positivo foi observado a perda de *PTEN* em 43% dos pacientes. Esses resultados foram associados a pior resposta ao tratamento com Trastuzumabe e menor sobrevida livre de progressão, mas não foi observado interferência na sobrevida global (TEKESIN, 2019).

1.4. O Gene *PIK3CA*

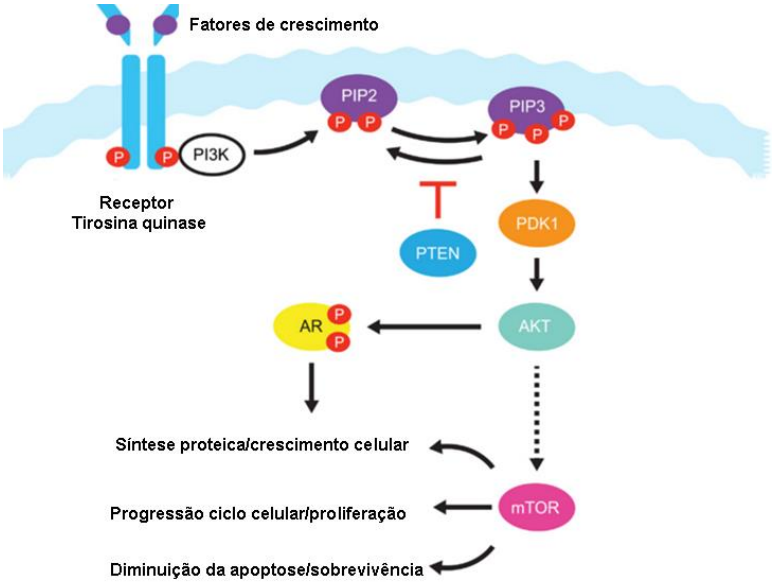
A fosfatidilinositol-3-quinase (*PI3K*) é uma enzima ativada por receptores de tirosina cinase que, quando sofrem fosforilação, levam à ativação de diversas vias de sinalização, implicando em proliferação e sobrevivência celular (ORCY *et al*, 2008).

Sabe-se que a via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (*PIK3/AKT*) está frequentemente ativada em canceres mamários. Acredita-se que essa ativação pode ocorrer por mutação de *PI3K* ou por inativação de um dos genes supressores da via *PI3K/AKT*, como o gene *PTEN* (PÉREZ *et al.,* 2007).

Isso se observa na Figura 3 que demonstra o receptor *HER2* sinalizando a ativação de *PI3K* aumentando de produtos da fosforilação 3-cinase, Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*PIP2)* e trifosfato de fosfatidilinositol (3,4,5) (PP3), regulada por PTEN que fornece ativação de Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (*PDK1*), *AKT* e mTOR levando ao aumento da proliferação celular, aumento da sobrevivência e crescimento celular.

Essas alterações tornam o gene *PIK3* um alvo em potencial para o estudo e desenvolvimento de agentes farmacológicos. Estudos em animais já estão em desenvolvimento para a avaliação da eficácia de agentes terapêuticos dirigidos contra vários componentes da via de sinalização de *PI3K* (DILLON *et al*., 2007).

Figura 3. Esquema da via *PI3K*/*AKT*/mTOR e *PTEN*.



Fonte: Adaptado de Phin *et al*. (2013).

As mutações em *PIK3CA*, subunidade catalítica alfa de *PI3K*, são identificadas por alguns estudos, pela técnica de PCR e sequenciamento, variaram entre 21 e 37% nos carcinomas mamários. Em estudo com 342 amostras de CM, 26% das amostras apresentaram expressão da proteína *PIK3CA* com frequência igual em todos os estágios do câncer de mama (I ao IV) indicando que as mutações são um evento precoce no desenvolvimento do CM. Houve associação significativa ($P < 0.05$) entre a perda da expressão de *PTEN* e a superexpressão de *HER2, RE e RP*, e metástase linfonodal (BACHMAN *et al*., 2004; SAAL *et al*., 2005; CIZKOVA *et al.,* 2012).

No estudo de Pérez *et al*. (2007), a presença de mutações em *PIK3CA* foi associada com diminuição de *PTEN* em 37% dos tumores avaliados. Bai *et al*. (2014) identificaram mutações em *PIK3CA* em 35.2% dos 105 tumores de mama por eles pesquisados. Também demonstraram que as mutações em *PIK3CA* conferiam resistência ao Trastuzumabe em cultura de células (BERNS *et al*., 2007).

Assim, vemos que mutações resultantes da superexpressão de *PIK3CA* e perda ou supressão de *PTEN* possivelmente implicam na desregulação da fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (*PIP 3*), ponto crítico de partida para a carcinogênese do CM, proporcionando a perda da homeostase da via *PIK3/AKT*. Isso se solidifica ao observar a correlação da mutação em *PIK3CA* com os tumores *ER* e *PR* positivos e a perda de *PTEN* com os tumores *ER* e *PR* negativos (SAAL *et al*., 2005).

Dessa forma, admitimos que o estudo dos possíveis biomarcadores *PIK3CA* e *PTEN* possa contribuir para o conhecimento da evolução biológica do CM e para melhor estratificação das pacientes para as terapias antitumorais existentes.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHMAN, K. E. *et al.* **The *PIK3CA* gene is mutated with high frequency in human breast cancers.** Cancer Biol Ther, 2004 Aug;3(8):772-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254419>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

BAI Xusheng *et al*. ***PIK3CA* and TP53 Gene Mutations in Human Breast Cancer Tumors Frequently Detected by Ion Torrent DNA Sequencing.** Plos One, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053449/#__ffn_sectitle>. Acesso em: 23 de janeiro de 2020.

BERNS, Katrien. *et al*. **A functional genetic approach identifies the *PI3K* pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer.** Cancer Cell, 2007 Oct; 12(4):395-402. Disponível em: < http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(07)00262-0.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

BREASTCANCER.ORG. **There are five main intrinsic or molecular subtypes of breast cancer that are based on the genes a cancer expresses.** Disponível em: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/molecular-subtypes>. Acesso em: 21 de dezembro de 2019.

CECILIO, A. P. *et al*. **Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges.** Breast Cancer (Dove Med Press), 2015 Jan 29;7:43-9. doi: 10.2147/BCTT.S50361. eCollection 2015. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678813>. Acesso em: 23 de janeiro de 2020.

CGAN – The Cancer Genome Atlas Network. **Comprehensive molecular portraits of human breast tumors.** Nature, 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465532/pdf/nihms393293.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

CONITEC - Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Trastuzumabe para tratamento do câncer de mama inicial,** 2012. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2012/Trastuzumabe_cainicial_final.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

CIZKOVA, M. *et al.* ***PIK3CA* mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERα, PR and ERBB2-based subgroups.** Breast Cancer Res., 2012 Feb 13;14(1):R28. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330809 >. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

DAWOOD, Shaheenah *et al*. **Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by *HER2* Status and Trastuzumab Treatment:** An Institutional-Based Review. J Clin Oncol, 2010 Jan 1;28(1):92-8. doi: 10.1200/JCO.2008.19.9844.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933921>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

DE BARROS, Alfredo Carlos Simões Dornellas; LEITE, Kátia Ramos Moreira. **Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea.** Rev Bras Mastologia, 2015; v.25 (4):146-55. Disponível em: < https://pdfs.semanticschlar.org/47a9/83b9bf8e91d2be490cb9e4de487bbf19dbea.pdf >. Acesso em: 10 de outubro de 2015.

DILLON, R. L.; WHITE, D. E.; MULLER, W. J. **The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer.** Oncogene, 2007. vol. 26:1338–1345. Disponível em: < https://www.nature.com/onc/journal/v26/n9/pdf/1210202a.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

GOLDHIRSCH A., *et al*. **Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer:** highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer, 2011. Ann Oncol, 2011; 22: 1736–1747. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709140>. Acesso em: 25 de janeiro de 2020.

GUARNERI, V. *et al*. **Anti-*HER2* neoadjuvant and adjuvant therapies in *HER2* positive breast cancer.** Cancer Treatment Reviews, 2010. v.36S3: S62-S66. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129613>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

GUIU S., *et al.* **Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them?** The IMP*AKT* 2012 Working Group Statement. Ann Oncol., 2012 Dec;23(12):2997-3006. doi: 10.1093/annonc/mds586. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166150>. Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Globocan. Disponível em: < https://www.iarc.fr/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2018/). Acesso em: 25 de fevereiro de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). **Câncer de Mama**: estatística. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Controle do câncer de mama.** 2016. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

KENIRY, M.; PARSONS, R. **The role of *PTEN* signaling perturbations in cancer and in targeted therapy**. Oncogene, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/onc/journal/v27/n41/pdf/onc2008248a.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

LEE, Brittany L. *et al*. **Breast cancer in Brazil: present status and future goals.** The Lancet. 2012, v13. Disponível em: <http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(11)70323-0.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

LEITÃO, Dina Raquel Aguileira. **A expressão do *PTEN* como mecanismo de resistência ao Trastuzumab em carcinomas da mama com sobre-expressão do *HER2*.** Dissertação: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa. Mestrado. 2012. Disponível em: <http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/15742/1/DINA%20Leitao_CD_Tese_mestrado.pdf >. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

LEREBOURS, F.; LIDEREAU, R**. Molecular alterations in sporadic breast cancer.** Critical Reviews in Oncology/Hematology. Aug, 2002. v.44:121–141. Disponível em: <http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(01)00191-3/pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

LIN, Francini de Mattos Lima *et al*. **Loss of *PTEN* expression and *AKT* activation in *HER2*-positive breast carcinomas.** Rev Bras Ginecol Obstet, 2014; 36(8):340-6. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v36n8/0100-7203-rbgo-36-08-00340.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

MALHOTRA, Gautam K. *et al*. **Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.** Cancer Biology & Therapy. Nov, 2010 v10(10): 955-960. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047091/pdf/cbt1010_0955.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

MUTHUSWAMY, Senthil K. **Trastuzumab resistance**: all roads lead to SRC. Nature America: United Kingdom, 2011. Disponível em: < https://www.nature.com/articles/nm0411-416>. Acesso em: 01 de março de 2020.

NAGATA, Yoichi *et al.* ***PTEN* activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of *PTEN* predicts trastuzumab resistance in patients.** Cancer Cell, 2004, Aug. v.6, (2):117–127. Disponível em: <http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(04)00210-7.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

ORCY, Rafael Bueno. **Signalization of *AKT*/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients.** Gynecol Obstet Invest., 2008. v.66: 231-236. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645256>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

PARK, Ben Ho; DAVIDSON, Nancy E. **PI3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab Therapy:** What's neu with Herceptin Resistance? Cancer Cell 12, Oct 2007. Disponível em: <http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(07)00273-5.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

PEREZ, E. A *et al.* **Updated results of the combined analysis of NCCTG N9831 and NSABP B-31 adjuvant chemotherapy with/without trastuzumab in patients with HER-2 positive breast cancer**. J Clin Oncol, 2007.

PÉREZ, Tenorio Gizeh *et al.* ***PIK3CA* Mutations and *PTEN* Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are NotMutually Exclusive in Breast Cancer**. Clin Cancer Res, Jun 2007. Disponível em: <http://clincancerres.aacr-journals.org/content/clincanres/13/12/3577.full.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

PERNAS, Sonia E TOLANEY, Sara M. **HER2-positive breast cancer:** new therapeutic frontiers and overcoming resistance. Ther Adv Med Oncol: USA, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425535/#__ffn_sectitle>. Acesso em: 01 de março de 2020.

PEROU, Charles M*. et al.* **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature. Aug, 2000. v. 406:747-752. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

PHIN, Sopheap; MOORE, Mathew W.; COTTER, Philip D. **Genomic rearrangements of *PTEN* in prostate cancer**. Front. Oncol., 17 September 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00240>. Acessado em: 30 de dezembro de 2019.

ROMOND, E. H., *et al.* **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2 positive breast cancer**. N Engl J Med, 2005.

ROSS, Jeffrey S.; FLETCHER, Jonathan A. **The *HER2*/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy**. The Oncologist, 1998; v.3:237-252. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.160413/epdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

SAAL L H *et al*. ***PIK3CA* mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with *PTEN* loss in human breast carcinoma.** Cancer Res., 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805248>. Acesso em 25 de janeiro de 2020.

SAUDADE, André; TOMÁS, Ana Raquel; FONSECA, Ricardo. Carcinoma da mama: **Determinação da Amplificação do *HER2* por Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH).** Acta Med Port, 2005; v.18: 417-422. Disponível em: <http://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/1069/737>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

SLAMON, Dennis J*. et al.* **Human breast cancer:** correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2*/neu oncogene. Science, 1987. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3798106>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

SLAMON, Dennis J. *et al.* **Studies of the *HER2*/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** Science, 1989 May; v.244(4905):707-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Studies+of+the+HER-2%2Fneu+proto-oncogene+in+human+breast+and+ovarian+cancer>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA (SBO). **Diretrizes:** Câncer de mama. Versão final 2017. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/diretrizes-sboc-publico>. Acesso em: 21 de dezembro de 2019.

TEKESIN K *et al.* ***PTEN* loss is a predictive marker for *HER2*-positive metastatic breast zcancer patients treated with trastuzumab-based therapies.** 2019 Sep-Oct;24(5):1920-1926. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31786856>. Acesso em 25 de janeiro de 2020.

VIALE, G. **The current state of breast cancer classification. Annals of Oncology.** Ann Oncol., 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+current+state+of+breast+cancer+classification.+Annals+of+Oncology>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

VU, Thuy; CLARET, Francois X. **Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer.** Front Oncol., 2012; 2: 62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3376449/pdf/fonc-02-00062.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de *PIK3CA* e *PTEN* por imuno-histoquímica em Câncer de Mama *HER2* positivo.

3.2 Objetivos específicos

a) Verificar através de consulta aos prontuários dos pacientes, os seguintes dados clínico-patológicos: idade, grau, estadiamento, marcadores (*RE, RP, Ki67*), recidiva, óbito, sobrevida global;

b) Verificar se existe associação entre as expressões de *PTEN* e *PIK3CA*;

c) Verificar se existe associação entre as expressões de *PIK3CA* e *PTEN* e os dados clinico-patológicos estudados.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Study of the immunohistochemical expression of *PIK3CA* and *PTEN* in *HER2*-positive breast cancer.

Sidnei Iensen Felicidade[1], Emily Ferreira Salles Pilar[2], Joara Predebom Flores Texeira[1], Guilherme Watte[2], Gabriela Remonatto[3], Rita de Cássia Sant'Anna Alves[1], Adriana Vial Roehe[1]

1 Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
2 Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
3 Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Enviado para publicação na Revista "https://jbuon.com/"
Artigo modelo: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=*PTEN*+loss+is+a+predictive+marker+for+*HER2*-positive+metastatic+breast+cancer+patients+treated+with+trastuzumab-based+therapie>

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to investigate the expression of genes *PIK3CA* and *PTEN* in breast carcinoma (CM) *HER2*-positive and verify their associations with clinical and pathological variables. **Methods:** Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) biopsies from 50 patients with *HER2*-positive CM were analyzed using the immunohistochemistry (IHQ) technique for these two markers. Medical records were consulted for collection of clinical-pathological information, including overall survival. The immunohistochemical markers were analyzed semi-quantitatively by two blinded independent researchers. The relationship between the variables were evaluated using the Chi-square test and Kaplan-Meier curve. **Results:** The IHQ expression level of *PIK3CA* was 86%. The loss of *PTEN* expression was observed in 46% of the cases. The expression of the markers showed no significant correlation with each other or with the clinical and pathological parameters studied: tumor grade, staging, RE, RP, *Ki67* and recurrence. The higher expression of *PIK3CA* was associated with lower number of deaths (P=0.016) and longer survival time of patients (p=0.001). The *PTEN* marker showed no significant effect on survival analysis. **Conclusions:** The *PIK3CA* expression showed a protective effect in relation to the survival time of patients with *HER*-positive CM.

Keywords: breast cancer, immunohistochemistry, *HER2, PIK3CA, PTEN*

INTRODUCTION

Breast Cancer is the most common type of cancer among women in Brazil with an estimated rate of 59,700 new cases in 2018[1].

Tumors of *HER2*-positive subtype, generally negative for estrogen and progesterone hormone receptors (*RE* and *RP*) occurs in 15 to 20% of the CM, conferring poor prognosis to patients[2,3].

These tumors are designated for target therapy with the drug Trastuzumab. However, the therapeutic response is not effective due to mechanisms involving resistance. There are some hypotheses about the mechanisms of therapeutic failure and studies about new strategies for the treatment of *HER2*-positive CM. However, there are still no definitive biomarkers and no substitute treatment for Trastuzumab[4,5,6].

Some studies have shown increased *PIK3CA* gene expression and loss of *PTEN* associated with *HER2* overexpression and possibly *PI3K/AKT/*mTOR route overactivation promoting tumor proliferation. Nevertheless, little is known about the expression of these biomarkers in relation to the clinical and pathological conditions of patients with *HER2*-positive CM, making these genes possible research targets for these cases [7,8,9,10]

This study aimed to evaluate the expression of *PIK3CA* and *PTEN* by IHQ in *HER2*-positive CM and its relationship with clinical and pathological data, including global survival.

METHODS

PATIENTS

We retrospectively selected 100 samples of breast biopsies diagnosed with *HER2* positive breast carcinoma, virgin from chemotherapy treatment, from 2013 to 2015, belonging to the archive of the Pathology Sector of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Due to lack of data in the medical records, incomplete/inclusive immunohistochemical reports, there were 50 samples that were submitted to this study.

The study was approved by the Ethics Committee from the hospital (protocol number 1645336). Clinical and pathological data from the patients, including the follow up time were assessed from the medical records.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The samples were submitted to immunohistochemistry reaction for *PTEN* (Abcam, 1:100) and *PIK3CA* (Abcam, 1:100), at the Benchmark UL-TRA Ventana Medical System automation platform (Tucson, Arizona USA). The analysis of the results was performed by two independent blinded observers, in a semi-quantitative way. The percentage of positive cells (0 to 100%) and reaction intensity (0 to 3) were evaluated, with subsequent creation of a score (0-300 points)[11]. Low and high levels of the marker's expression were defined by the mean score of expression (score 20).

STATISTICS

The data were presented through absolute frequencies and percentage, mean ± standard deviation or mean and 95% confidence interval. Normality was assessed by the Shapiro-Wilk test and categorical variables were compared by the Chi-square and Kaplan-Meier tests for cumulative survival analysis in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 22.0;SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Only p values below 0.05 (bicaudal) were considered statistically significant.

RESULTS

The clinical and pathological data of the sample studied are presented in Table 1.

The mean age of the patients at the time of diagnosis was 54 (32-89) years. The predominant histological type was the non-special ductal invasive carcinoma. Most patients presented histological grade 3 and staging II (Table 1).

The total follow-up time was 80 months. Eleven patients had recurrence of the disease and 6 patients died during the study period.

The level of immunohistochemical expression detected in *PIK3CA* was 86%. Loss of *PTEN* expression was observed in 46% of the cases.

Considering the expression of the markers *PIK3CA* and *PTEN* among themselves and in relation to the variables histological grade, staging, RP, *Ki67* and relapse, no statistically significant correlations were observed (Table 2).

We found significant associations between the lowest expression of *PTEN* and the positivity of RE (P=0.006) and highest expression of *PIK3CA* and the lowest number of deaths (P=0.016) (Table 2).

The overall survival analysis showed that patients with higher expression of *PIK3CA* had longer survival (P=0.001) (Figure 1). The expression of *PTEN* had no impact on the lifetime of patients (Figure 2).

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the patients.

Age years-old (min-max)	
Mean	54 (32-89)
Histological Type n (%)	
Ductal Invasive	44 (88%)
Lobular invasive	6 (12%)
Tumor Grade n (%)	
1	2 (4%)
2	23 (46%)
3	25 (50%)
Stage n (%)	
I	12 (24%)
II	27 (54%)
III	11 (22%)
IV	0 (0%)
RE	
Positive	33 (66%)
Negative	17 (34%)
RP	
Positive	32 (64%)
Negative	18 (36%)
Ki67	
<13%	2 (4%)
14%>	48 (96%)
PIK3CA	
20>	43 (86%)
<19	7 (14%)
PTEN	
20>	27 (54%)
<19	23 (46%)
Disease Relapse	
Yes	11 (22%)
No	39 (78%)
Death	
Yes	6 (12%)
No	44 (88%)

Fonte: autor.

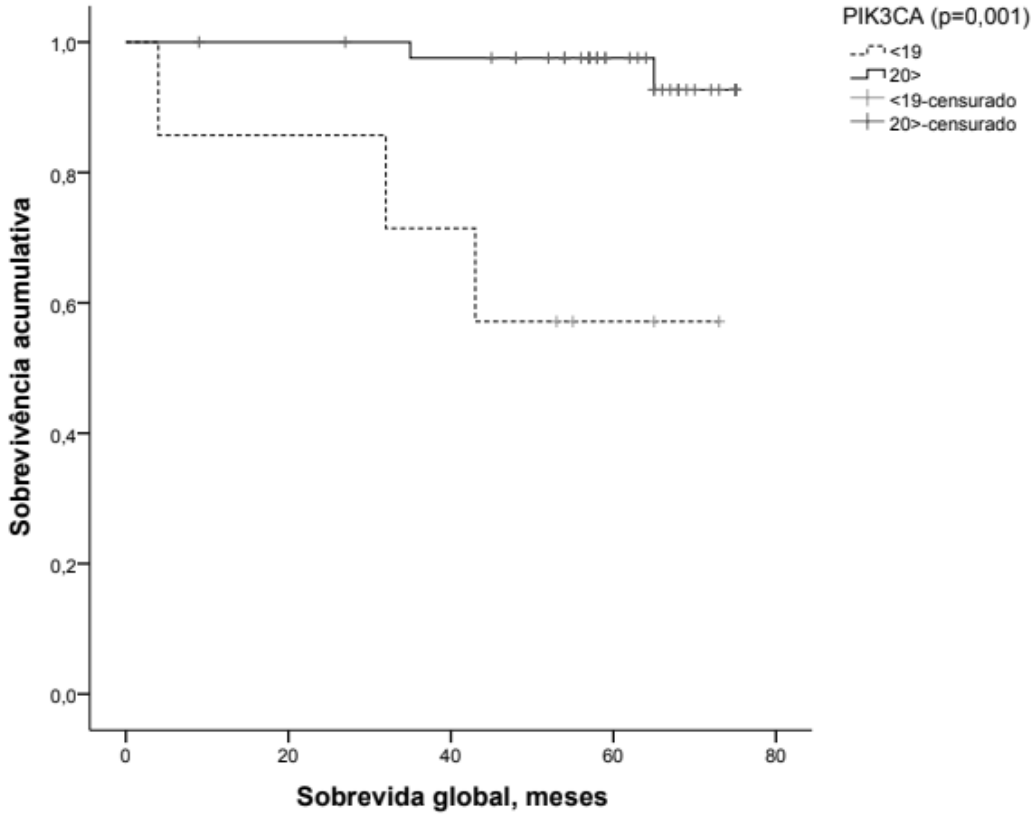
Table 2. Analyses of *PIK3CA* and *PTEN* IHQ expression and clinic and pathological variables.

	***PIK3CA* n (%)**			***PTEN* n (%)**		
Variables	**<19**	**20>**	***p***	**<19**	**20>**	***p***
Tumor Grade						
I	0 (0%)	2 (4,7%)		2 (8,7%)	0 (0%)	
II	4 (57,1%)	19 (44,2%)	0,877	12 (52,2%)	11 (40,7%)	
III	3 (42,9%)	22 (51,2%)		9 (39,1%)	16 (59,3%)	0,079
Stage						
I	0 (0%)	11 (25,6%)		6 (26,1%)	5 (19,2%)	
II	5 (83,3%)	22 (51,2%)		10 (43,5%)	17 (65,4%)	
III	1 (16,7%)	10 (23,3%)		7 (30,4%)	4 (15,4%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0,52	0 (0%)	0 (0%)	0,672
RE						
Positive	3 (42,9%)	30 (69,8%)		20 (87,0%)	13 (48,1%)	
Negative	4 (57,1%)	13 (30,2%)	0,692	3 (13,0%)	14 (51,9%)	0,006*
RP						
Positive	4 (57,1%)	28 (65,1%)		18 (78,3%)	14 (51,9%)	
Negative	3 (42,9%)	15 (34,9%)	0,692	5 (21,7%)	13 (48,1%)	0,077
Ki67						
<13%	0 (0%)	2 (4,7%)		0 (0%)	2 (7,4%)	
14%>	7 (100%)	41 (95,3%)	1	23 (100,0%)	25 (92,6%)	0,493
Disease Relapse						
Yes	2 (28,6%)	9 (20,9%)		3 (13,0%)	8 (29,6%)	
No	5 (71,4%)	34 (79,1%)	0,641	20 (87,0%)	19 (70,4%)	0,189
Death						
Yes	3 (42,9%)	2 (4,7%)		2 (8,7%)	3 (11,1%)	
No	4 (57,1%)	41 (95,3%)	0,016*	21 (91,3%)	24 (88,9%)	1

*Statistically significant (p>0.05).

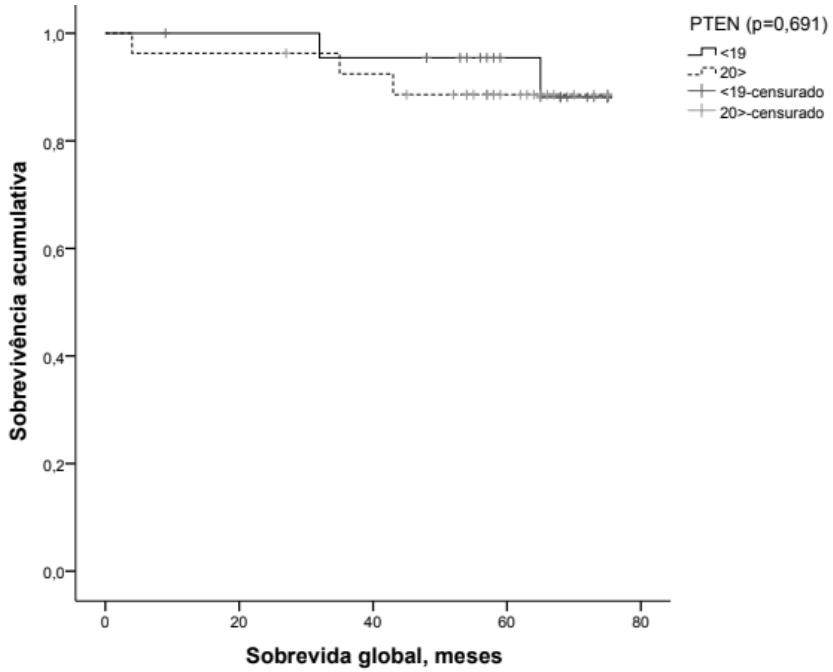
Fonte: autor.

Figure 1. Association between *PIK3CA* expression and overall survival.



Fonte: autor.

Figure 2. Association between *PTEN* expression and overall survival.



Fonte: autor.

DISCUSSION

Breast cancer is a very heterogeneous pathology of high biological complexity and variability in molecular and clinical patterns[3]. Currently there are four major groups, or molecular phenotypes in which we can classify the CM: luminal A, luminal B, *HER2*-positive, basal-like. Each one of these classes comprises its own treatments and prognoses[12].

This research aimed to study patients with *HER2*-positive CM. These cases are indicated for treatment with the target drug trastuzumab, which has been presenting progressive therapeutic failures, for which there is still no substitute treatment or conclusive markers[5]. Some authors believe that *PTEN* deficiency and increased expression of *PIK3CA* may predict resistance to therapy for *HER2*-positive CM, by increasing the phosphorylation of *PI3K*/*AKT* which blocks the antiproliferative effect of trastuzumab[7, 13, 14].

In this study, a lower expression of *PTEN* was observed in 46% of the cases. Loss of *PTEN* results observed in previous studies ranges from 19.2 to 43%[15, 16, 17, 18, 19]. However, there is much disparity between the methodology adopted in relation to the definition of lesser expression, or loss of IHQ expression of *PTEN*, making direct comparison of results difficult. In relation to *PIK3CA*, we found an increase in expression in 86% of cases. Previous molecular studies reports mutation frequencies in the gene ranging from 12 to 40%[16, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. In addition, several studies comprise specific subgroups of CM, such as CM-metastatic, or triple negative[17, 18]. Few authors have examined the expression of *PIK3CA* in CM by the IHQ technique[11]. And some have analyzed the marker expression in other types of neoplasms, such as: esophageal and gastric cancer and lymphoma[25, 26, 27].

Lindberg *et al.* (2011) and Fu *et al*. (2014) observed that *PTEN* expression reduction is associated with *PIK/AKT* signaling activation and *ER* expression reduction in CM[28]. In our study most patients with decreased *PTEN* expression were positive for ER. However, the parameters used to define loss of IHQ expression were not the same. Moreover, according to Lazaridis *et al*. (2019), who studied 1265 patients with *HER2*-positive CM at an early stage, the investigation of *PTEN* expression loss has predictive power in CM when analyzed by molecular methods. The authors also say that IHQ does not completely translate the gene

expression status and suggest that this could not be the best method for this analysis[19].

Regarding *PIK3CA*, our study showed a correlation between higher IHQ expression and longer survival time of patients. The molecular study by Kandarpa *et al.* (2018), found longer survival time in patients with mutated *PIK3CA* treated with traztuzumab and *RE*-positive[20]. Unlike Jensen *et al.* (2012), who found an inverse association between survival time and the presence of mutations in *PIK3CA*. In both studies, no associations were observed between the molecular status of the gene and clinical pathological characteristics of the patients[16].

Papaxoinis *et al.* (2015), Karakas *et al.* (2013) and Saal *et al.* (2005) found no significant association between *PIK3CA* mutational status and patient survival[8, 22, 23].

No immunohistochemical analysis of *PIK3CA* and survival time were found in samples similar to those studied.

CONCLUSIONS

The present study demonstrated a relationship between IHQ overexpression of *PIK3CA* and the survival time of patients with *HER2*-positive CM. Controversies in accessing the expression and function of *PTEN* and *PIK3CA*, as well as in the sample size, point to the need for methodological standardization and greater reproducibility in future research.

REFERENCES

1. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). **Câncer de Mama:** estatística. Disponível em: https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

2. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA (SBO). **Diretrizes: Câncer de mama.** Versão final 2017. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/diretrizes-sboc-publico>. Acessado em: Acessado em: 21 de dezembro de 2019.

3. DE BARROS, Alfredo Carlos Simões Dornellas; LEITE, Kátia Ramos Moreira. **Classificação molecular dos carcinomas de mama:** uma visão contemporânea. Revista Brasileira Mastologia, São Paulo, Brasil, 2015. Disponível em: < https://pdfs.semanticscholar.org/47a9/83b9bf8e91d2be490cb9e4de487bbf19dbea.pdf>. Acesso em 24 de janeiro de 2020.

4. GUARNERI, V. *et al*. **Anti-*HER2* neoadjuvant and adjuvant therapies in *HER2* positive breast cancer.** Cancer Treatment Reviews, Italy, 2010. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129613>. Acesso em 24 de janeiro de 2020.

5. VU, Thuy; CLARET, Francois X. **Trastuzumab:** Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. Frontiers in Oncology, USA, 2012. Disponível em: < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2012.00062/full>. Acesso em 24 de janeiro de 2020.

6. RAZIS, E. *et al.* **Evaluation of the association of *PIK3CA* mutations and *PTEN* loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer**. Breast Cancer Research and Treatment, Geece, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Evaluation+of+the+association+of+*PIK3CA*+mutations+and+*PTEN*+loss+with+efficacy+of+trastuzumab+therapy+in+metastatic+breast>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

7. NAGATA, Yoichi *et al.* ***PTEN* activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of *PTEN* predicts trastuzumab resistance in patients.** Cancer Cell, USA, 2004. Disponível em: <http://www.cell.com/cancercell/pdf/S1535-6108(04)00210-7.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

8. SAAL L H *et al*. ***PIK3CA* mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with *PTEN* loss in human breast carcinoma.** Cancer Research, USA, 2005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=*PIK3CA*+mutations+correlate+with+hormone+receptors%2C+node+metastasis%2C+and+ERBB2%2C+and+are+mutually+exclusive+with+*PTEN*+loss+in+human+breast+carcinoma.>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

9. PARK, Ben Ho; DAVIDSON, Nancy E. **PI3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab Therapy:** what's neu with Herceptin resistance?. Cancer Cell, USA, 2007. Disponível em: <http://www.cell.com/cancer- Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

10. BERNS, Katrien*. et al*. **A functional genetic approach identifies the *PI3K* pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer.** Cancer Cell, Amsterdam, 2007. Disponível em: <http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(07)00262-0.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

11. ALESKANDARANY, Mohammed A. *et al*. **Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: an immunohistochemical and reverse phase protein array study**. Breast Cancer Research and Treatment, Green, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Epithelial+mesenchymal+transition+in+early+invasive+breast+cancer%3A+an+immunohistochemical+and+reverse+phase+protein+array+study>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

12. GUIU S., *et al*. **Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them?** The IMP*AKT* 2012 Working Group Statement. Annals of Oncology, France, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166150>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

13. KENIRY, M.; PARSONS, R. **The role of *PTEN* signaling perturbations in cancer and in targeted therapy**. Oncogene, USA, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/onc/journal/v27/n41/pdf/onc2008248a.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

14. LEITÃO, Dina Raquel Aguileira. **A expressão do *PTEN* como mecanismo de resistência ao Trastuzumab em carcinomas da mama com sobre-expressão do *HER2*.** Dissertação: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa. Mestrado, 2012. Disponível em: < http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/15742/1/DINA%20Leitao_CD_Tese_mestrado.pdf >. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

15. LIN, Francini de Mattos Lima *et al.* **Loss of *PTEN* expression and *AKT* activation in *HER2*-positive breast carcinomas.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia, Brasil, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184346>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

16. JENSEN, J. D. ***PIK3CA* mutations, *PTEN,* and *HER2* expression and impact on outcome in *HER2*-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab.** Annals of Oncology, Denmark, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=*PIK3CA*+mutations%2C+*PTEN*%2C+and+p*HER2*+expression+and+impact+on+outcome+in+*HER2*-positive+early-stage+breast+cancer+patients+treated+with+adjuvant+chemotherapy+and+trastuzumab>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

17. TEKESIN Kemal *et al*. ***PTEN* loss is a predictive marker for *HER2*-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies.** Journal B.U.ON, Turkey, 2019. Disponível em: <https://www.jbuon.com/archive/24-5-1920.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

18. WANG, Leiping *et al*. ***PI3K* pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib.** BMC Câncer, Shanghai, 2011. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141770/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

19. LAZARIDIS, Georgios *et al.* **Opposite Prognostic Impact of Single *PTEN*-loss and *PIK3CA* Mutations in Early High-risk Breast Cancer.** Câncer Genomics & Proteomics: Greece, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6542648/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

20. SAIKIA, Kandarpa Kumar *et al*. **Clínico-pathological Features of *PIK3CA* Mutation in *HER2*-Positive Breast Cancer of Indian Population.** Indian Journal of Surgical Oncology, Índia, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6154351//>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

21. MOYNAHAN, Mary Ellen *et al.* **Correlation between *PIK3CA* mutations in cell-free DNA and everolimus efficacy in HRþ, *HER2*- advanced breast cancer:** results from BOLERO-2. British Journal of Câncer, USA, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355930/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

22. KARAKAS, Bedri *et al.* **Prevalence of *PIK3CA* mutations and the SNP rs17849079 in Arab breast cancer patients.** Câncer Biology & Therapy, Saudi Arabia, 2013. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926885/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

23. PAPAXOINIS, George *et al.* **Significance of *PIK3CA* Mutations in Patients with Early Breast Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy:** A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Study. Plos one, Greece, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0140293>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

24. JOUALI F *et al*. **Detection of PIK3/*AKT* pathway in Moroccan population with triple negative breast cancer.** BMC Cancer, Morocco, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30227836>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

25. ESSAKLY, Ahlem *et al*. ***PIK3CA* and KRAS Amplification in Esophageal Adenocarcinoma and their Impact on the Inflammatory Tumor Microenvironment and Prognosis**. Translational Oncology, Germany, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6931191/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

26. ZHOU, Huan *et al*. **Expression and significance of EBV, ARID1A and *PIK3CA* in gastric carcinoma.** Molecular medicine reports, China, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6390055/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

27. CUI, Wenli *et al*. ***PIK3CA* expression in diffuse large B cell lymphoma tissue and the effect of its knockdown in vitro.** OncoTargets and Therapy, Shanghai, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5404804/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

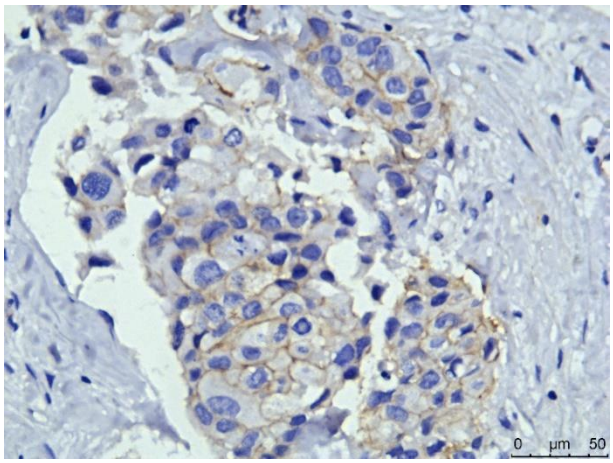
28. FU, Xiaoyong *et al.* **Overcoming endocrine resistance due to reduced *PTEN* levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase.** Breast Cancer Research, USA, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4303114/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

29. LINDBERG, K. *et al.* **Estrogen receptor β represses *AKT* signaling in breast cancer cells via downregulation of *HER2*/HER3 and upregulation of *PTEN*: implications for tamoxifen sensitivity.** Breast Cancer Research, Sweden, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492444>. Acesso em: 24 de janeiro de 2020.

6. APÊNDICE

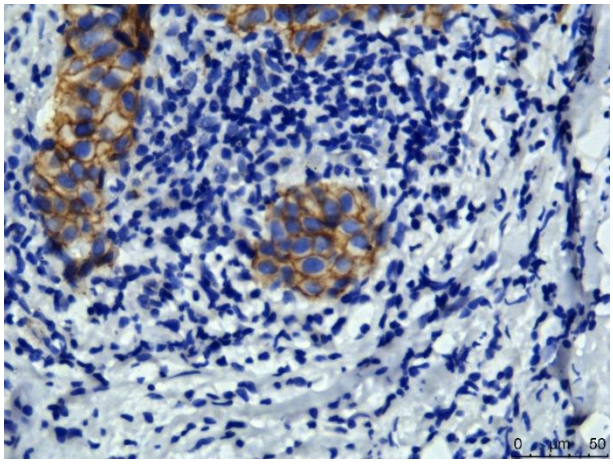
6.1 Imagens das reações imuno-histoquímicas dos marcadores.

6.1.1 Reação imuno-histoquímica positiva (1+) para *PIK3CA* (40x).



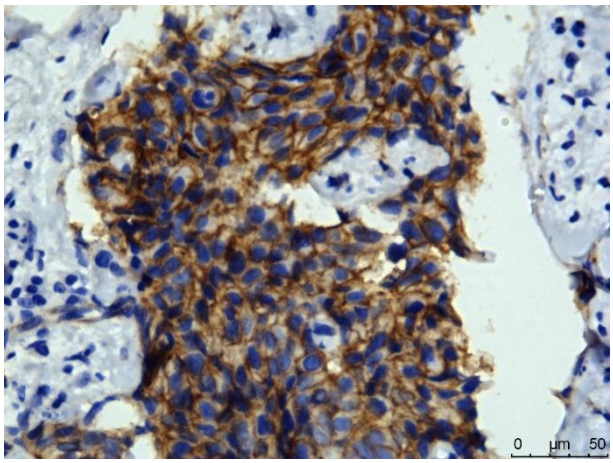
Fonte: autor.

6.1.2 Reação imuno-histoquímica positiva (2+) para *PIK3CA* (40x).



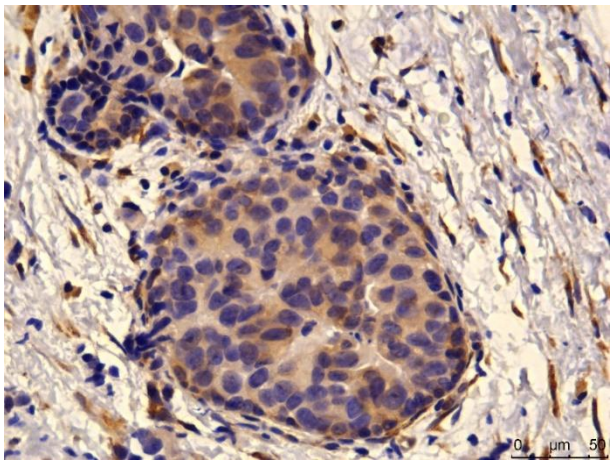
Fonte: autor.

6.1.3 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para *PIK3CA* (40x).



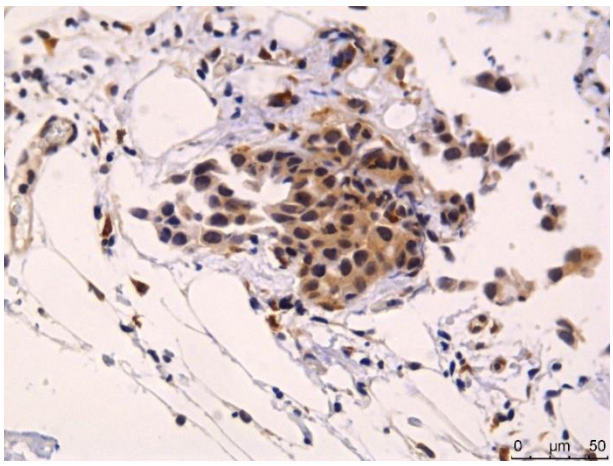
Fonte: autor.

6.1.4 Reação imuno-histoquímica positiva (1+) para *PTEN* (40x).



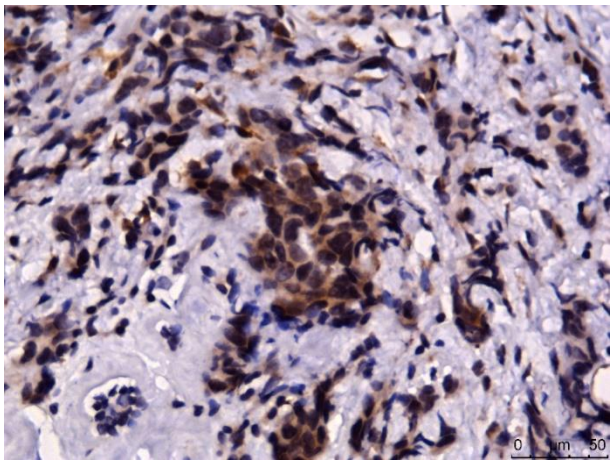
Fonte: autor.

6.1.5 Reação imuno-histoquímica positiva (2+) para *PTEN* (40x).



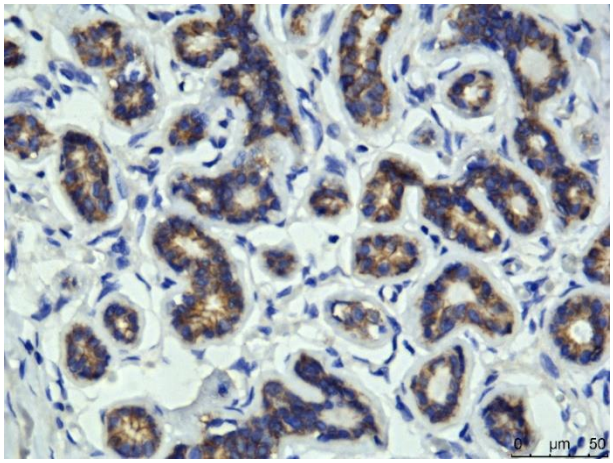
Fonte: autor.

6.1.6 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para *PTEN* (40x).



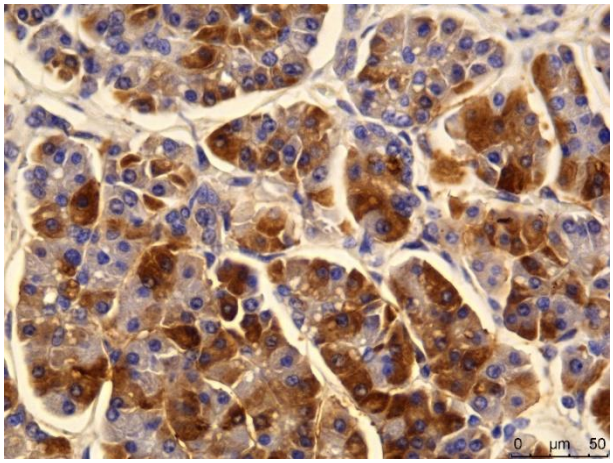
Fonte: autor.

6.1.7 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para Controle Positivo para *PIK3CA* (40x).



Fonte: autor.

6.1.8 Reação imuno-histoquímica positiva (3+) para Controle Positivo para *PTEN* (40x).



Fonte: autor.

7. ANEXOS

7.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA / UFRGS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação imuno-histoquímica de PIK3CA e PTEN em carcinomas invasivos de mama que superexpressam HER2

Pesquisador: Emily Ferreira Salles Pilar

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57627916.8.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: FIPE/HCPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.645.336

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação imunohistoquímica de PIK3CA e PTEN em carcinomas invasivos de mama que superexpressam HER2" é um estudo observacional, transversal e retrospectivo que pretende avaliar a expressão de PIK3CA e PTEN por imuno-histoquímica em carcinomas de mama que superexpressam HER2, com o intuito de contribuir para o conhecimento sobre a biologia dessa neoplasia. Serão obtidas retrospectivamente 112 amostras de carcinoma de mama HER2+ de pacientes do HCPA. As amostras serão submetidas a reação imuno-histoquímica para PTEN (Abcam-ab31392) e PIK3CA (Abcam-ab152155), na plataforma de automação Benchmark ULTRA Ventana Medical System (Tucson, Arizona USA). A análise das lâminas de imuno-histoquímica será realizada por um patologista e também através do programa ImageJ.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a expressão de PIK3CA e PTEN por imunohistoquímica em carcinomas de mama que superexpressam HER2, com o intuito de contribuir com o conhecimento sobre a biologia dessa neoplasia.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

Objetivos específicos

1) Verificar se existe correlação entre as expressões de PTEN e PIK3CA.

2) Verificar se existe heterogeneidade na marcação imunohistoquímica de PIK3CA e PTEN.

3) Verificar através de consulta aos prontuários dos pacientes, dados clínicos, sobrevida global, resistência a medicação, informação sobre o sistema de estadiamento tumoral TNM, linhas de tratamento e desfechos no momento da pesquisa.

4) Verificar se existe associação entre as expressões de PIK3CA e PTEN e prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco em potencial identificado é o de quebra de confidencialidade, e este será manejado através da assinatura do termo de compromisso de uso de material biológico por parte dos pesquisadores envolvidos.

Benefícios:

o conhecimento em nossas pacientes a respeito da expressão de duas proteínas que conforme a literatura tem importante papel prognóstico. Além disso, este estudo deve servir como base para outras investigações subsequentes nesta instituição. Outro projeto com esta mesma amostra tem como objetivo avaliar a concordância entre a imuno-histoquímica e técnicas moleculares para a avaliação dos genes PIK3CA e PTEN. Ainda entre os benefícios esperados está a avaliação microscópica da heterogeneidade de intensidade de marcação imuno-histoquímica que pode estar refletindo heterogeneidade tumoral, característica que também será estudada pelos pesquisadores envolvidos neste projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A justificativa para a realização deste estudo é de que o medicamento Trastuzumab é a terapia alvo estabelecida para indivíduos com carcinoma de mama que superexpressam HER2, e sua prescrição para este subgrupo de pacientes contribui substancialmente na melhora da sobrevida. No entanto, uma parcela de pacientes pode desenvolver resistência ao medicamento. Existem evidências científicas de que a ativação da via PI3K, seja por perda de PTEN ou estimulação oncogênica de PIK3CA , pode mediar a resistência ao Trastuzumab. Admitindo que alterações em PIK3CA e PTEN podem contribuir para a resistência as terapias antiHER2, os pesquisadores acreditam que além da avaliação da superexpressão de HER2 por imunohistoquímica, PIK3CA e

Objetivos especificos

1) Verificar se existe correlação entre as expressões de PTEN e PIK3CA.

2) Verificar se existe heterogeneidade na marcação imunohistoquimica de PIK3CA e PTEN.

3) Verificar através de consulta aos prontuarios dos pacientes, dados clinicos, sobrevida global, resistência a medicação, informação sobre o sistema de estadiamento tumoral TNM, linhas de tratamento e desfechos no momento da pesquisa.

4) Verificar se existe associação entre as expressões de PIK3CA e PTEN e prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Beneficios:

Riscos:

O risco em potencial identificado é o de quebra de confidencialidade, e este será manejado através da assinatura do termo de compromisso de uso de material biológico por parte dos pesquisadores envolvidos.

Beneficios:

o conhecimento em nossas pacientes a respeito da expressão de duas proteinas que conforme a literatura tem importante papel prognóstico. Além disso, este estudo deve servir como base para outras investigações subsequentes nesta instituição. Outro projeto com esta mesma amostra tem como objetivo avaliar a concordância entre a imuno-histoquimica e técnicas moleculares para a avaliação dos genes PIK3CA e PTEN. Ainda entre os beneficios esperados está a avaliação microscópica da heterogeneidade de intensidade de marcação imuno-histoquimica que pode estar refletindo heterogeneidade tumoral, caracteristica que também será estudada pelos pesquisadores envolvidos neste projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A justificativa para a realização deste estudo é de que o medicamento Trastuzumab é a terapia alvo estabelecida para individuos com carcinoma de mama que superexpressam HER2, e sua prescrição para este subgrupo de pacientes contribui substancialmente na melhora da sobrevida. No entanto, uma parcela de pacientes pode desenvolver resistência ao medicamento. Existem evidências cientificas de que a ativação da via PI3K, seja por perda de PTEN ou estimulação oncogênica de PIK3CA , pode mediar a resistência ao Trastuzumab. Admitindo que alterações em PIK3CA e PTEN podem contribuir para a resistência as terapias antiHER2, os pesquisadores acreditam que além da avaliação da superexpressão de HER2 por imunohistoquimica, PIK3CA e

PTEN também devem ser avaliados por este método no intuito de informar sobre os níveis dessas proteínas e contribuir com a estratificação das pacientes para a terapia.

O projeto inclui: referencial teórico, justificativa, hipótese, objetivos, descrição da metodologia e do cálculo do tamanho amostral, descrição da análise estatística, dos riscos e benefícios, e dos critérios de inclusão e exclusão, referências bibliográficas, cronograma de atividades e orçamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta Formulário de Delegação de Funções

Apresenta Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas.

Os pesquisadores solicitam a dispensa porque: O único risco em potencial identificado é o de quebra de confidencialidade e será manejado através da assinatura do termo de compromisso de uso de material biológico por parte dos pesquisadores envolvidos.

Recomendações:

- Revisar as regras de acentuação no projeto.
- Incluir o ano de publicação da 5ª referência bibliográfica listada no item 7 Bibliografia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 27/06/2016 e demais documentos submetidos até a presente data, que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada. A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na Intranet do HCPA.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - HCPA / UFRGS

Continuação do Parecer: 1.646.336

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_704837.pdf	05/07/2016 12:24:16		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Formulariodelegacao.pdf	05/07/2016 12:23:52	Emily Ferreira Salles Pilar	Aceito
Declaração de Pesquisadores	folharostopg2.pdf	27/06/2016 12:18:10	Emily Ferreira Salles Pilar	Aceito
Folha de Rosto	folharostopg1.pdf	27/06/2016 12:17:50	Emily Ferreira Salles Pilar	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_compromisso.pdf	27/06/2016 12:05:36	Emily Ferreira Salles Pilar	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	27/06/2016 12:04:14	Emily Ferreira Salles Pilar	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 22 de Julho de 2016

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-003
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br