

Análise imunoistoquímica do Ki-67 em 140 pacientes com câncer de mama – Correlação com fatores clínico-patológicos e sobrevida

Immunohistochemical analysis of Ki-67 in 140 patients with breast cancer – Correlation with clinicopathological factors and survival

Wilmar José Manoel¹, Diego Franciel Marques Mühlbeier², Leonardo Barcelos de Paula³, Willana Caparelli Cimino de Araújo⁴, Fábio Marques de Almeida⁵, Gustavo Nogueira Caixeta⁶, Élbio Cândido de Paula⁷, Deidimar Cássia Batista Abreu⁸, Lorena Gonçalves Leal⁹, Vera Aparecida Saddi¹⁰

Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

¹ Mastologista e cirurgião oncológico do Hospital Araújo Jorge (HAJ) e do Centro Brasileiro de Radioterapia, Oncologia e Mastologia (Cebrom), mestre em Genética pela Universidade Católica de Goiás (UCG), doutorando em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

² Acadêmico de Biomedicina da UCG.

³ Biólogo, mestrando em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

⁴ Biomédica pela UCG.

⁵ Biomédico, mestrando em Ciências da Saúde pela UFG.

⁶ Biomédico, citopatologista, imunoistoquímico do HAJ, mestre em Biologia pela UFG.

⁷ Médico patologista e professor adjunto do Departamento de Imagenologia e Patologia da UFG, chefe do Setor de Anatomia Patológica do HAJ.

⁸ Mastologista e cirurgiã oncológica do HAJ, mestre em Genética pela UCG.

⁹ Enfermeira da Seção de Quimioterapia do Cebrom.

¹⁰ Biomédica, mestre em Biologia Molecular, doutora em Fisiologia Humana pela USP, coordenadora do Programa de Mestrado em Genética da UCG, pesquisadora do Setor de Anatomia Patológica do HAJ.

Endereço para correspondência: Wilmar José Manoel, Rua S-6, 664, Ed. Araras, ap. 201, St. Bela Vista, 74823-470, Goiânia, GO. Telefone: (62) 3255-1482, Fax: (62) 3265-0400, e-mail: wilmarmanoel@brturbo.com.br

Recebido em: 27/4/2009. Aceito após modificações em: 23/7/2009

Palavras-chaves

Câncer de mama; Ki-67;
Imunodeteção; Fator
prognóstico; Sobrevida.

Keywords

Breast cancer; Ki-67;
Immunodetection;
Prognostic factor; Survival.

RESUMO

O antígeno Ki-67 é utilizado para avaliar a atividade proliferativa em vários tumores. No entanto, o papel do Ki-67 como fator prognóstico em câncer de mama é ainda indefinido. O objetivo do trabalho foi analisar a expressão do antígeno Ki-67 correlacionando com fatores clínico-patológicos e sobrevida em pacientes com câncer de mama. Realizou-se a análise imunoistoquímica utilizando anticorpos monoclonais MIB-1 em 140 amostras de câncer de mama de mulheres com idade entre 27 e 90 anos, atendidas no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer de Goiás. O ponto de corte para a análise foi de 25%. A sobrevida global em cinco anos foi de 77,1%. Houve sobrevida significativamente pior nos casos com linfonodos positivos ($p < 0,0001$), tumores maiores ($p < 0,0001$), estádios mais avançados ($p < 0,0001$) e pacientes com receptores hormonais negativos ($p = 0,019$). Pacientes com imunodeteção de Ki-67 em mais de 25% das células tiveram pior sobrevida quando comparadas àquelas que expressaram Ki-67 em menos de 25% das células examinadas (70,8% x 82,7%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,094$). A hiperexpressão do Ki-67 não se correlacionou com pior sobrevida no grupo de pacientes analisadas.

ABSTRACT

The Ki-67 antigen is used to evaluate proliferative activity in several tumors. However the role of the Ki-67 as a prognostic factor in breast cancer is still undefined. The aim of present study was to analyze the expression of Ki-67 antigen correlating with clinicopathological factors and survival in patients with breast cancer. We carried out an immunohistochemical analysis using MIB-1 monoclonal antibody in 140 specimen of breast cancer of women with age between 27 and 90 years. The cut-off point was 25%.

The five year overall survival was 77.1%. There was a significant worse survival of patients with node positive ($p < 0.0001$), larger tumors ($p < 0.0001$), more advanced stages ($p < 0.0001$) and with negative hormonal receptors ($p = 0.019$). Patients with Ki-67 immunodetection in more than 25% of the tumors cells showed a poorer outcome when compared with those that express Ki-67 in less than 25% of the cells examined (70.8% x 82.7%), however this difference was not statistically significative ($p = 0,094$). The overexpression of Ki-67 did not correlate with a worse survival in the group of patients analyzed.

Introdução

O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas entre as mulheres no mundo ocidental. O tamanho do tumor, o tipo histológico, as características celulares e nucleares, o índice mitótico, a invasão vascular, os receptores hormonais e o *status* dos linfonodos axilares são biomarcadores de prognóstico rotineiramente utilizados¹.

Nas últimas décadas, os marcadores de proliferação celular vêm sendo avaliados extensivamente como ferramentas prognósticas no câncer de mama. Entretanto, os únicos fatores prognósticos que são utilizados na tomada de decisão clínica se baseiam em algumas características histopatológicas, como o tamanho do tumor, o *status* nodal e dos receptores hormonais, a presença de metástases a distância, o tipo histológico, a invasão linfovascular, a amplificação do c-erbB-2 e a idade².

Entre os diversos marcadores de proliferação celular, a proteína Ki-67 é a mais frequentemente avaliada no câncer de mama³. Ela foi identificada por Gerdes e colaboradores em 1991 como uma proteína nuclear não histônica, após o anticorpo correspondente ter sido descrito pelo mesmo grupo em 1983^{4,5}.

A proteína Ki-67 está presente em todas as células em proliferação e há grande interesse no seu papel como marcador de proliferação celular^{4,5}. O fato de a proteína Ki-67 estar atuando durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), exceto na fase de intérfase (G0)⁶, a caracteriza como um excelente marcador para determinar a fração proliferativa.

A imunodeteção da proteína Ki-67, quando em hiperexpressão, tem sido utilizada em muitos estudos como um fator prognóstico e como marcador preditivo no câncer de mama precoce. Existem poucos trabalhos analisando o valor preditivo de resposta à quimioterapia primária. A maior parte dos estudos é retrospectiva com esquemas terapêuticos e metodologias diversas, produzindo resultados conflitantes².

A análise da proteína Ki-67 como parâmetro independente revela que pacientes com hiperexpressão dessa proteína apresentam sobrevida global e intervalo livre de

doença significativamente menor, tanto em pacientes com linfonodos negativos quanto positivos⁷.

O objetivo deste trabalho é avaliar as possíveis associações entre a imunodeteção da proteína Ki-67 e as características clínico-patológicas e sobrevida de 140 pacientes com câncer de mama tratadas no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

Métodos

Neste estudo retrospectivo foram incluídas 140 pacientes do sexo feminino portadoras de câncer de mama nos diversos estádios clínicos, com idade variando de 27 a 90 anos, atendidas no Hospital Araújo Jorge (HAJ), em Goiânia – GO, entre os anos de 1997 e 2000, cujos espécimes de biópsias ou de peças cirúrgicas fixadas em formalina e incluídas em parafina foram submetidas à análise imunoistoquímica para avaliação da imunodeteção da proteína Ki-67. As características clínico-patológicas, tais como tamanho do tumor, *status* nodal e dos receptores hormonais e metástases a distância, foram também analisadas.

Para os casos em que se constatou perda de seguimento antes de cinco anos, foram feitas buscas por meio de contato telefônico e pesquisa no Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia, resultando após as buscas em uma perda de seguimento de 12 pacientes (8,6%). Utilizou-se para esses casos a data de censura como sendo a da última consulta contida no prontuário.

A análise imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do HAJ, empregando o método da estreptoavina-biotina-imunoperoxidase (Super ABC *Kit* universal, Novocastra). Para detecção do antígeno Ki-67, utilizaram-se anticorpos MIB-1 (Dako). Os cortes montados em lâminas silanizadas foram desparafinizados com o uso de xilol e hidratados em uma bateria de etanol com concentrações decrescentes até 50% e água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio a 3%, durante 30 minutos, e depois as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7,4 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação

antigênica, utilizando-se de tampão citrato 10 mM pH 6,0 (Merck) em panela de pressão por 5 minutos. Depois foram lavados com tampão PBS por 5 minutos. As lâminas foram, então, incubadas a 4 °C, *overnight*, com o anticorpo monoclonal MIB-1 (1:400), diluído em solução de PBS com albumina bovina a 1%. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos, e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário biotilado (Super ABC Kit universal, Novocastra). Novamente foram lavados com PBS e incubados com o complexo biotina-avidina-peroxidase (Super ABC Kit universal, Novocastra) por 40 minutos. Após nova lavagem com PBS, por 5 minutos, as reações foram reveladas com tetra-hidroclorato de 3-3' diaminobenzidina (Sigma), por 5 minutos, e levemente contraincoradas com hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula. Pelo menos dois profissionais avaliaram de forma independente a expressão do antígeno Ki-67 em, no mínimo, 200 células tumorais. Nos casos conflitantes, o resultado final foi concluído pela análise conjunta da equipe. Adicionalmente, era desconhecida a história clínica individual das pacientes durante a análise microscópica. O padrão para marcação positiva foi a coloração específica do núcleo celular. A imunomarcação do Ki-67 foi pontuada quanto à proporção de células marcadas em relação ao total de células tumorais, obtendo-se um índice de proliferação celular expresso em porcentagem. O *cut-off* utilizado foi de 25% (Figuras 1 e 2), baseado em Spyrtos *et al.*⁸.

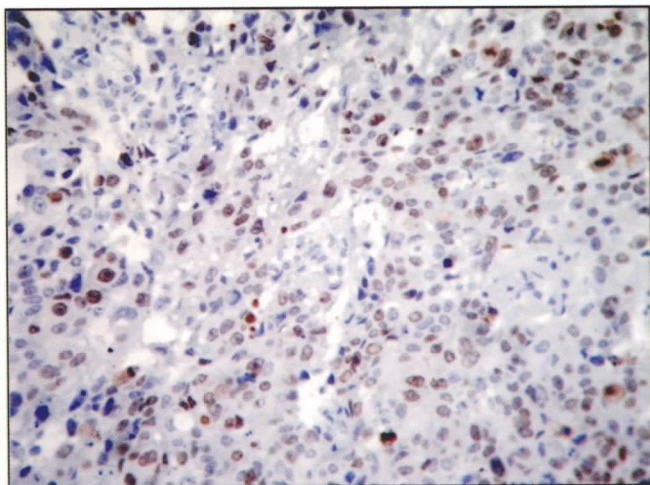


Figura 1. Fotomicrografia mostrando carcinoma de mama com expressão do Ki-67 em mais de 25% das células tumorais examinadas.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para testar a associação entre as variáveis qualitativas. As curvas de sobrevida, estimadas pelo método de Kaplan-Meier, foram utilizadas para descrever as proporções acumuladas de óbitos

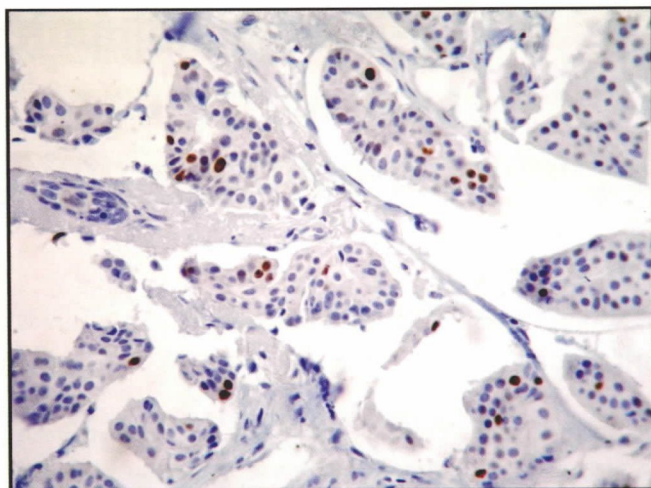


Figura 2. Fotomicrografia mostrando carcinoma de mama com expressão do Ki-67 em menos de 25% das células tumorais examinadas.

(sobrevida global) conforme o tempo de acompanhamento das pacientes e da variável selecionada. O teste Log-rank foi empregado para comparação das funções de sobrevida para cada variável. As análises foram realizadas com o programa estatístico MedCalc versão 10.0 (Mariakerke, Bélgica).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

Resultados

A média de idade das pacientes estudadas foi de 49,5 anos, e a mediana foi de 48 anos. Das 140 pacientes, 79 (56,4%) foram diagnosticadas na pré-menopausa.

Quanto ao tipo histológico, 115 (82,1%) tumores eram do tipo carcinoma ductal infiltrante, 5 (3,6%) eram medulares, 3 (2,1%) eram lobulares, 3 (2,1%) eram carcinomas *in situ* e outros 8 (5,7%) se dividiram entre doença de Paget e associação de dois ou mais tipos histológicos. Em 6 (4,3%) casos o tipo histológico do tumor não foi informado. A tabela 1 apresenta a descrição das frequências das variáveis relativas às características clínico-patológicas analisadas.

A sobrevida global em cinco anos foi de 77,1% (Figura 3), sendo de 62,9% para as pacientes com metástases linfonodais e 91,4% para aquelas sem metástases (Figura 4) ($p < 0,0001$). As pacientes com tumores menores do que 2 centímetros apresentaram sobrevida de 100%, as com tumores entre 2 e 5 centímetros, de 81,7%, enquanto para aquelas com tumores maiores do que 5 centímetros a sobrevida foi de 55,3% (Figura 5) ($p < 0,0001$). Em relação ao estadiamento clínico na admissão, constatou-se elevada diferença na função da sobrevida, variando de 100% para pacientes no estágio 0 até 0%, no estágio IV. As pacientes no estágio I tiveram sobrevida de 94,4%, as do está-

Tabela 1. Características tumorais das pacientes estudadas

Variável	N	%
Tamanho do tumor (cm)		
Até 2,0	24	17,1
2,0-5,0	71	50,7
5,0 ou mais	38	27,1
Sem informação	7	5,0
Grau de anaplasia		
I	8	5,7
II	77	55,0
III	27	19,3
Não avaliado	28	20,0
Linfonodo comprometido		
Sim	70	50,0
Não	70	50,0
Receptor de estrogênio		
Negativo	76	54,3
Positivo	64	45,7
Receptor de progesterona		
Negativo	95	67,9
Positivo	44	31,4
Não avaliado	1	0,7
Ki-67		
≥ 25%	75	53,6
< 25%	65	46,4

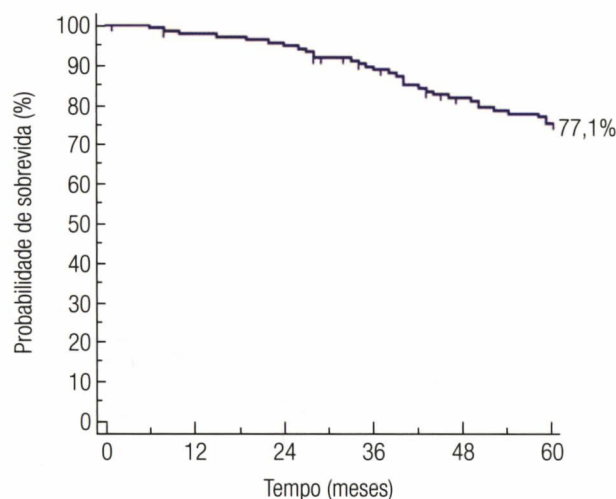


Figura 3. Sobrevida global.

dio II, de 81,8% e as do estágio III, de 68,6% (Figura 6) ($p < 0,0001$). Considerando os receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), a sobrevida foi de 94,7% para as pacientes que apresentavam ambos os receptores positivos, de 74,3% para ambos negativos, de 66,7% para receptores de estrogênio negativos e de progesterona positivos e de 60% para as pacientes com receptores de estrogênio positivos e de progesterona negativos (Figura 7) ($p = 0,019$).

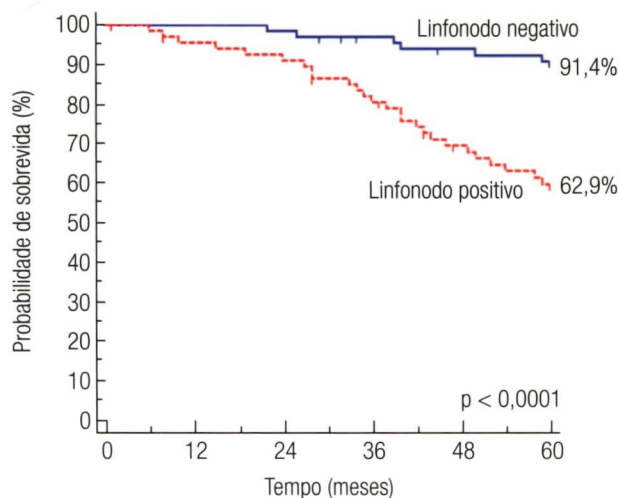


Figura 4. Sobrevida e status nodal.

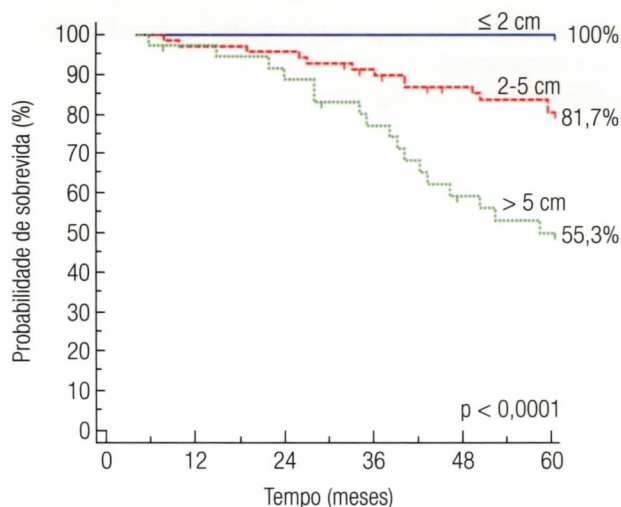


Figura 5. Sobrevida e tamanho tumoral.

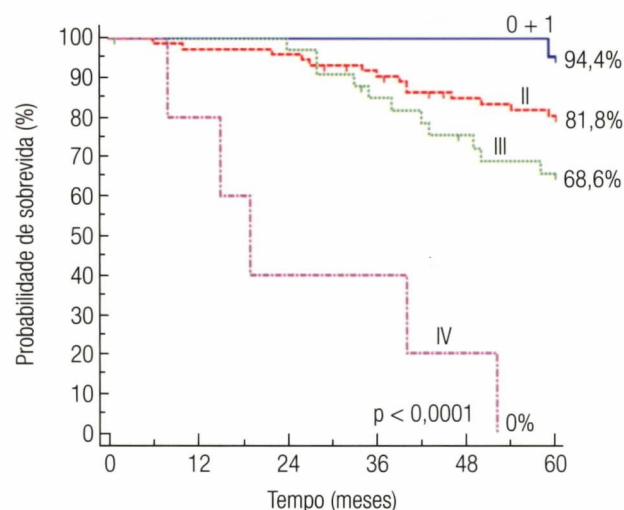


Figura 6. Sobrevida e estadiamento clínico.

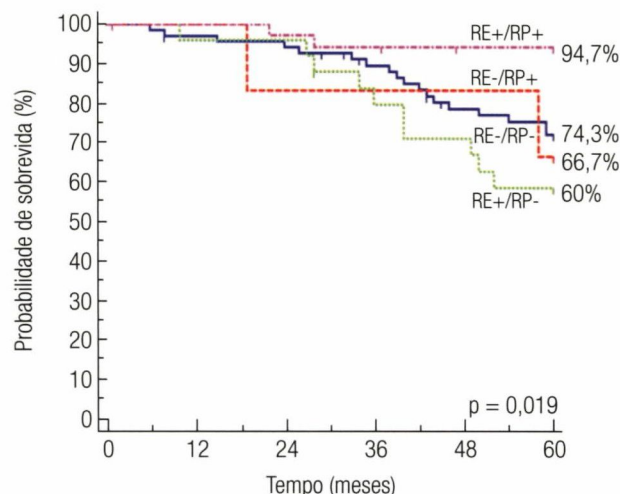


Figura 7. Sobrevida e status dos receptores hormonais.

Não houve diferença significativa na sobrevida das pacientes com relação a idade (maior ou menor de 40 anos), status menstrual (pré e pós-menopausa) e grau histológico (alto e baixo grau).

Na análise imunoistoquímica do Ki-67, as pacientes com expressão menor do que 25% apresentaram sobrevida maior (82,7%) em relação às pacientes com expressão do Ki-67 acima de 25% (70,8%). Apesar das diferenças observadas, estas não foram estatisticamente significativas (Figura 8) ($p = 0,094$).

Foi observada associação entre a expressão do Ki-67 com o tamanho do tumor ($\chi^2 = 7,43$; $p = 0,024$) e com a negatividade do receptor de estrogênio ($\chi^2 = 4,40$; $p = 0,036$).

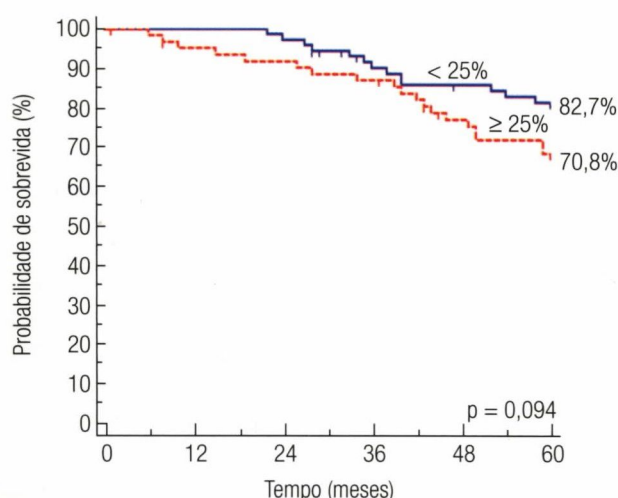


Figura 8. Sobrevida e expressão do Ki-67.

Discussão

O gene Ki-67, localizado no braço longo do cromossomo humano 10 (10q25)⁹, codifica duas formas de mRNA, resultado

de *splicing* alternativo. Com isso, há produção de duas isoformas da proteína – a isoforma “grande”, com uma massa molecular calculada de 359 kD, e a isoforma “pequena”, com massa de 320 kD. A presença ou a ausência da sequência codificada pelo éxon 7 do gene diferencia uma isoforma da outra¹⁰.

Durante a intérfase, a proteína Ki-67 está localizada principalmente no nucléolo, enquanto na mitose está presente em todos os cromossomos, formando uma estrutura reticular que circunda o cromossomo na metáfase¹¹. O seu papel é vital na proliferação celular, uma vez que a inibição de sua expressão, utilizando nucleotídeos antissenso, impede tal proliferação¹⁰.

Poucos estudos relatam a imunodeteção da proteína Ki-67 no tecido mamário normal. Nas amostras de mama normal ou no epitélio normal junto a fibroadenomas, a expressão da proteína Ki-67 é baixa (< 3% das células)¹², porém está hiperexpressa, com alta diferença estatística em relação ao tecido normal, na hiperplasia de tipo usual (HUT – *hyperplasia of usual type*), que é uma lesão comumente associada com o aumento de risco e subsequente desenvolvimento do câncer de mama¹³.

Há forte evidência na capacidade de Ki-67 em discriminar grupos de bom e mau prognósticos na população de pacientes com linfonodos negativos, quando considerado como variável independente¹⁴.

A imunodeteção da proteína Ki-67 foi considerada fator prognóstico relevante em 100% dos estudos analisados por Colozza *et al.*², em uma revisão de literatura com 5.137 pacientes.

Azambuja *et al.*¹⁵, em uma metanálise envolvendo 12.155 pacientes, concluiu que a expressão de Ki-67/MIB-1 confere pior sobrevida e maior risco de recidiva em pacientes com câncer de mama precoce, além de estar associada com maior risco de recidiva em pacientes com linfonodos positivos e negativos no câncer de mama.

Em outro artigo de revisão e metanálise, Stuart-Harris *et al.*¹⁶, avaliaram 43 estudos com um total de 15.790 pacientes e concluíram que, na grande maioria dos estudos, existe correlação entre a imunodeteção de Ki-67 e o pior prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Na presente casuística a média de idade foi de 49,5 anos, com 56,4% das pacientes na pré-menopausa. O tipo histológico mais comum foi o carcinoma ductal infiltrante (82,1%). Das 140 pacientes do sexo feminino, 33 (23,6% das pacientes estudadas) evoluíram para o óbito – 32 pacientes (22,9%) por neoplasia e apenas 1 (3% dos óbitos) por causa não relacionada à doença maligna, tendo o óbito sido causado por uma pneumonia associada a *diabetes mellitus*.

A maioria das pacientes foi diagnosticada no estágio clínico II (55,8%), com a maior parte dos tumores apresentando entre 2 e 5 centímetros e 50% delas apresentan-

do linfonodos comprometidos pela neoplasia, resultados semelhantes àqueles encontrados na literatura¹⁷.

A associação observada entre a expressão do Ki-67, o tamanho do tumor e a negatividade do receptor de estrógeno pode ser explicada pelo fato de representarem fatores de piora no prognóstico¹⁸.

A sobrevida global em cinco anos foi de 77,1% (Figura 3), variando de 62,9% entre as pacientes que apresentaram metástases para linfonodos, e 91,4% para as que não apresentaram (Figura 4) ($p < 0,0001$), resultados semelhantes foram encontrados por Mendonça *et al.*¹⁷, em 2004.

A sobrevida nos diversos estádios foi de 100% no estágio clínico 0, de 94,4% dos casos no estágio clínico I, de 81,8% dos casos no estágio clínico II e de 68,6% no estágio clínico III; nenhuma paciente encontrava-se viva no estágio clínico IV após cinco anos de seguimento (Figura 6) ($p < 0,0001$).

O grau histológico, a idade e o *status* menstrual não mostraram correlação com a sobrevida. Estudo de Mendonça *et al.*¹⁷ mostra que, quando os fatores prognósticos relativos ao tumor foram analisados, ajustando a idade e o nível de escolaridade, apenas o grau de comprometimento ganglionar se manteve como fator fortemente indicativo de pior prognóstico. Com relação à idade, o pequeno número de casos de pacientes abaixo de 40 anos pode ter sido o fator que influenciou a análise estatística conclusiva.

A presença de receptores esteroides hormonais (receptor de estrógeno e receptor de progesterona) representa características relativamente fracas como fator prognóstico para pacientes com câncer de mama, mas esses receptores são os mais fortes fatores preditivos para a resposta à terapia endócrina¹. Apesar de que neste estudo as pacientes que apresentaram RE+/RP+ tiveram melhor sobrevida que as demais pacientes (Figura 7) ($p = 0,019$).

Pacientes com imunodeteção da proteína Ki-67 maior do que 25% das células tumorais estudadas tiveram sobrevida pior (70,8%) em comparação com aquelas com imunodeteção menor do que 25%, que tiveram sobrevida de 82,7% (Figura 8) ($p = 0,095$). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, isso poderia ser explicado, como no caso da revisão de Mirza *et al.*¹⁴ que sugere que o número de casos ideal para atingir significância é de no mínimo 200 pacientes com um seguimento de cinco anos. Outro dado que poderia ser levado em consideração é que o *cut-off* utilizado na avaliação foi de 25%. O ponto de corte de 25% é mais adequado para identificação de tumores altamente proliferativos; com isso, excluem-se pacientes com tumores de baixo índice de proliferação, o que poderia evitar esquemas mais agressivos de quimioterapia. No entanto, o Ki-67 deve ser combinado com outros marcadores prognósticos utilizados na rotina para decisões acerca do tipo de terapia a ser utilizada⁸. Em vários ou-

tros estudos^{15,16}, ocorre uma grande variação nesse ponto de corte. Estudos sugerem 15% como limite ótimo para distinção entre baixa e alta taxa proliferativa em tumores metastáticos e 10% para tumores primários¹⁸.

Com base neste estudo, são necessárias novas investigações com maior número de casos e o estabelecimento de padronização para o ponto de corte de análise da proteína Ki-67 por meio da imunoistoquímica para estabelecer o Ki-67 como possível fator prognóstico, o que poderia servir de auxílio na adequação de esquemas terapêuticos de melhor resposta para esse grupo de pacientes.

Referências

1. Laguens G, Coronato S, Girolamo W. Biomarkers in breast cancer. *Cent Eur J Med*. 2006;1(4):330-47.
2. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*. 2005; 16:1723-39.
3. Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2005;7:1174-85.
4. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138:867-73.
5. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13-20.
6. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710-5.
7. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors – a surrogate marker? *Cancer*. 2003;97:1321-31.
8. Spyrtos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. 2002;94(8):2151-9.
9. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics*. 1991;11:476-7.
10. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad H-D, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123:513-22.
11. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*. 1996;109:1253-63.
12. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7212-20.

13. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor- α and Ki-67 expression. *Am J Pathol.* 2002;160:597-604.
14. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002;235:10-26.
15. Azambuja E, Cardoso F, De Castro Jr G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as a prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96:1504-13.
16. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008; 17(4):323-34.
17. Mendonça GAS, Silva AM, Caula WM. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2004;20(5):1232-9.
18. Park D, Kåresen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch.* 2007;451:11-8.