

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA (IL-8,
CCL2, CCL5, CCL18 E CXCL12), SEUS RECEPTORES
E PROTEÍNAS PRESENTES NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-
NEGATIVO**

DANIEL CORDEIRO GURGEL

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional (DINTER) em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente em
Parceria com Escola Cearense de Oncologia,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Roberto César Pereira Lima
Junior e Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque
Ribeiro (*in memoriam*)**

**São Paulo
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Gurgel, Daniel Cordeiro

Avaliação da expressão da quimiocina (IL-8, CCL2, CCL5, CCL18 e CXCL12), seus receptores e proteínas presentes nas vias de sinalização em câncer de mama triplo-negativo / Daniel Cordeiro

Gurgel – São Paulo, 2017.

101p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER)

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Roberto César Pereira Lima Júnior

Descritores: 1. Neoplasias da Mama Triplo Negativas /Triple Negative Breast Neoplasms. 2. Quimiocinas/Chemokines. 3. Mamoplastia/Mammaplasty. 4. Prognóstico/Prognosis

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida e pelas graças a mim destinadas, tão essenciais em minha caminhada.

Aos meus pais, Francisco Machado Gurgel e Maria Solange Cordeiro Gurgel, sempre munidos de bons estímulos e bastante amor que me motivam diariamente e dão forças para o alcance de meus objetivos. A minha irmã Raquel Cordeiro Gurgel que, com humildade e paciência, muito me ensina. A minha avó Alexandrina Maia Cordeiro, mulher de grande fé.

Aos pacientes que cedem partes de seus corpos para contribuir com o avanço científico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), que me conduziu pelos caminhos da aprendizagem na pós-graduação, e que sempre trouxe em sua admirável história muito respeito e dedicação ilimitada à formação de pessoas e à contribuição constante para com o meio científico.

Ao Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior, estimado orientador, educador, grande ser humano e exemplo de líder nato que contagia todos à sua volta com sua imensa simpatia, admirável capacidade técnica e que me encorajou e direcionou nessa longa jornada.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, sempre paciente, atencioso e um formador exemplar que sempre ensina com grande conhecimento e tranquiliza com notório dom artístico.

À FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro durante parte do período de realização deste Doutorado.

Aos alunos da Faculdade de Medicina da UFC, Jedson Vieira e Carolina Mozart, que prestaram grande e fundamental auxílio na longa seleção de material para a pesquisa.

Aos amigos pós-graduandos do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) que compartilharam os anseios e as expectativas tão comuns na rotina de quem opta pelo caminho do aperfeiçoamento do saber.

Aos colaboradores do Instituto do Câncer do Ceará (ICC) que contribuíram diretamente para a construção desta Tese, prestando auxílio desde as fases de coleta de dados até a formatação.

RESUMO

Gurgel DC. **Avaliação da expressão da quimiocina (Il-8, CCL2, CCL5, CCL18 e CXCL12), seus receptores e proteínas presentes nas vias de sinalização em câncer de mama triplo-negativo.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

INTRODUÇÃO: O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é um subtipo bastante heterogêneo, com biologia agressiva e curso clínico de pior prognóstico, que frequentemente se associa à metástase, maior recidiva e menor sobrevida. As quimiocinas, seus receptores e as vias de sinalização reguladas por estes desempenham importante papel na progressão tumoral em vários tipos de câncer, logo a identificação de biomarcadores preditivos pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

OBJETIVO: Avaliar a expressão da quimiocina CXCL12, dos receptores CXCR1, CXCR4, CCR7 e da proteína mTOR no CMTN, associando-os com o prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS: Pacientes diagnosticadas com CMTN tratadas no Hospital Haroldo Juaçaba entre 2011 a 2015, tiveram seus dados clínico patológicos coletados. As peças cirúrgicas de CMTN em blocos de parafina, bem como o grupo controle composto por casos de mamoplastia redutora, foram avaliadas por imuno-histoquímica, após a confecção do *Tissue Microarray*, para avaliação dos marcadores.

RESULTADOS: O estudo contou com 133 pacientes, com idade média de 55 anos ao diagnóstico inicial e que apresentavam tumores ductais, sendo a expressão de CXCR1c (citoplasmático) mais frequente naqueles que não apresentaram resposta patológica completa (RCp). Adicionalmente, a imunoexpressão de CXCR1c, CCR7c e mTOR se associou com maior recidiva. Além disso, a expressão citoplasmática de CCR7 e mTOR associou-se com menor sobrevida, fazendo com que o risco de óbito fosse

2,5 vezes maior. Ainda, houve predomínio na região intratumoral de células CD68⁺ que também são negativas para CXCR4, além de se verificar um maior acúmulo de células CD3⁺ que são negativas para CXCL12m.

CONCLUSÕES: A elevada expressão de CXCR1c, CCR7c e mTOR se associa diretamente à recidiva, contribuindo para uma menor sobrevida global. Na área tumoral, há mononucleares (CD68 e CD3) que apresentam expressão negativa para os receptores e quimiocinas estudados.

SUMMARY

Gurgel DC. [Evaluation of chemokine expression (IL-8, CCL2, CCL5, CCL18 and CXCL12), its receptors and proteins present in signaling pathways in triple-negative breast cancer]. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

INTRODUCTION: The triple negative breast cancer (TNBC) is an heterogeneous subtype, with an aggressive biology and a bad prognosis, that is often associated with metastasis, a greater risk of relapse and lower survival rate. The chemokines, their receptors and the signaling pathways regulated by them play an important role in the tumor progression of many types of cancer, therefore the identification of predictive biomarkers may assist the development of new therapeutic strategies. **OBJECTIVES:** Evaluate the expression of the CXCL12 chemokine, CXCR1, CXCR4 and CCR7 receptors, mTOR protein and CD3 and CD68 mononuclear cells in the TNBC, associating them with prognosis. **MATERIAL AND METHODS:** Patients diagnosed with TNBC under treatment at Haroldo Juaçaba Hospital from 2011 to 2015 had their clinical data collected. The paraffin blocks with TNBC surgical pieces, as well as the control group composed by cases of reductive mammoplasty, were evaluated by immunohistochemistry after the Tissue Microarray, to evaluate the markers. **RESULTS:** The study consisted of 133 patients, with a mean age of 55 years at initial diagnosis and with ductal tumors, with CXCR1c (cytoplasmic) expression being more frequent in those who did not present a complete pathological response (CPR). In addition, the immunoexpression of the CXCR1c, CCR7c and mTOR was associated with a greater relapse rate. Furthermore, the cytoplasmic expression of CCR7 and mTOR was associated with lower survival, making the risk of death 2.5 times greater. There was also a predominance in the

intratumoral region of CD68 cells that were also negative for CXCR4, besides a greater accumulation of CD3 cells that are negative for CXCL12m.

CONCLUSIONS: The high expression of CXCR1c, CCR7c and mTOR is directly associated with relapse, contributing to a lower overall survival. In the tumor area, there are mononuclear cells (CD68 and CD3) that present negative expression for the receptors and chemokines studied.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Associação entre os diferentes subtipos de Câncer de Mama Triplo-negativo.....	11
Figura 2	Papel das quimiocinas e seus receptores no microambiente tumoral.....	14
Figura 3	Efeitos pró-tumorais das quimiocinas.....	16
Figura 4	Sequência de eventos utilizada para a construção de TMAs dos casos e dos controles.....	29
Figura 5	Sobrevida global das pacientes com câncer de mama triplo-negativo.....	39
Figura 6	Expressão membranar e citoplasmática de CXCR1 em células tumorais da mama e na tonsila palatina (200x).....	43
Figura 7	Expressão membranar e citoplasmática de CCR7 em células de carcinoma mamário e na tonsila palatina (200x).....	45
Figura 8	Sobrevida global de acordo com a expressão de CCR7c.....	46
Figura 9	Expressão membranar e citoplasmática de mTOR em próstata normal e células cancerosas mamárias (200x).....	48
Figura 10	Sobrevida global de acordo com a expressão de mTOR.....	49
Figura 11	Modelo hipotético da possível interferência no prognóstico mediada pela maior localização citoplasmática dos receptores CXCR1 e CCR7, na célula tumoral.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Subtipos moleculares e padrões de imunomarcação.....	8
Tabela 2	Relação entre anticorpos e clones utilizados, titulação e fabricante.....	30
Tabela 3	Dados clínico-patológicos das pacientes do estudo.....	36
Tabela 4	Padrão de expressão dos marcadores nos casos de CMTN e de mamoplastia redutora.....	38
Tabela 5	Associação entre os marcadores avaliados em amostras de câncer de mama triplo-negativo com os perfis basaloide e não-basaloide.....	40
Tabela 6	Correlação entre a expressão de CXCR1 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.....	42
Tabela 7	Correlação entre a expressão de CCR7 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.....	44
Tabela 8	Sobrevida global em três anos de acordo com o padrão de expressão de CCR7c.....	46
Tabela 9	Correlação entre a expressão de mTOR e as variáveis clinico patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.....	47

Tabela 10	Sobrevida global em três anos de acordo com o padrão de expressão de mTOR.....	49
Tabela 11	Associação entre o perfil de expressão de mTOR, quimiocina, receptores e células CD68+ em tumores de mama triplo-negativo.....	50
Tabela 12	Correlação entre a expressão de CXCR4 e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.....	51
Tabela 13	Correlação entre a expressão de CXCL12 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.....	52
Tabela 14	Frequência de casos com infiltração de células CD68 e CD3 positivas.....	53
Tabela 15	Associação entre a expressão de marcadores de células inflamatórias e CXCR1, CCR7, mTOR, CXCR4 e CXCL12 em tumores de mama triplo-negativo.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer (Comitê Americano sobre o Câncer)
ARGOS	Laboratório de Patologia
BL	Basal-like
BRCA	Breast Cancer (Gene Humano do Câncer de Mama)
C	Quimiocinas do grupo gama
CC	Quimiocinas do grupo beta
CCR7	C-C chemokine receptor type 7 (Receptor tipo 7 da quimiocina CXCL12)
CD	Cluster of Differentiation (Grupamento de Diferenciação)
CISH	Chromogenic in situ hybridization (Hibridização cromogênica <i>in situ</i>)
CK	Cytokeratin (Citoqueratina)
c-Kit	Tyrosin-protein kinase (Tirosina Proteína Quinase)
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracil
CMTN	Câncer de Mama Triplo-negativo
COX-2	Cicloxigenase-2
CSC	Cancer Stem Cells (Célula Tronco Tumoral)
CX3C	Quimiocinas do grupo delta
CXC	Quimiocinas do grupo alfa
CXCL	Ligante de Quimiocina
CXCR1	C-X-C chemokine receptor type 1 (Receptor Tipo 1 da Quimiocina CXC / Receptor da Quimiocina CXCL8)
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4 (Receptor Tipo 4 da Quimiocina CXC / Receptor da Quimiocina CXCL12)
DAB	Diaminobenzidine (Diaminobenzidina)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)

eIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (Fator de Iniciação e Translação Eucariótico)
ELR	Glutamic acid-leucine-arginine (Sequência de aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina)
ERBB2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor do fator de crescimento epidérmico 2)
ERE	Estrogen Response Elements (Elementos de resposta ao estrógeno)
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Fluorescence in situ Hybridization (Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
GBECAM	Grupo Brasileiro de Estudos em Câncer de Mama
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos)
GPCR	G-Protein-Coupled Receptors (Receptores transmembrana acoplados a proteína G)
HER2	Protein tyrosine kinases transmembranes that bind Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)
HR	Hazard Ratio (Proporção de Risco)
ICC	Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará)
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-8	Interleukin 8 (Interleucina-8)
ILV	Invasão Linfovascular
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JAK	Janus Kinase
kDa	Quilodáltons
Microarray	Micro-arranjo de DNA
MMP	Metalloproteinase (Metaloproteinase)
MR	Mamoplastia Redutora
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin (Alvo da Rapamicina em Mamíferos)

mTORC	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 (Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em Mamíferos)
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
NF-κB	Nuclear transcription Factor Kappa B (Fator Nuclear Kappa B)
NK	Natural Killer
NOS	Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidilinositol-3-quinase)
PI3K/mTOR	Pathway Phosphoinositide 3-kinase / Mammalian Target Of Rapamycin (Via do Fosfatidilinositol-3-quinase/ Alvo da Rapamicina em Mamíferos)
QT	Quimioterapia
RCp	Resposta Patológica Completa
RE	Receptor de Estrógeno
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos)
RP	Receptor de Progesterona
RTKs	Receptor tyrosine kinases (Receptor Tirocino Quinase)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase – transcriptase reversa)
S6K	Ribosomal protein S6 kinase (Proteína Ribossomal S6 Quinase)
SDF-1	The stromal cell-derived factor 1 (Fator Derivado da Célula Estromal 1)
SNS	Sympathetic Nervous System (Sistema Nervoso Simpático)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição)
TAM	Tumor-Associated Macrophage (Macrófago associado ao Tumor)

TGF	Transforming Growth Factor (Fator de Crescimento Transformante)
TMA	Tissue MicroArray (Microarranjos de tecidos)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
TNM	Internatioal Classification of Malignant Tumours (Classificação Internacional de Tumores Malignos)
TP53	Tumor Protein P53 (Gene Supressor de Tumor)
Treg	Regulatory T lymphocyte (Linfócito T Regulador)
TU	Tumor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama: Epidemiologia, Marcadores Moleculares e Classificação	1
1.2	Câncer de Mama Triplo-negativo (CMTN).....	8
1.3	Quimiocinas, Vias de Sinalização e Câncer	12
1.3.1	CXCL8 / CXCR1 / CXCR2.....	17
1.3.2	CCR7.....	19
1.3.3	CXCR4 / CXCL12.....	20
1.3.4	mTOR.....	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Desenho do Estudo	26
3.2	Casuística.....	26
3.3	CrITÉRIOS de Inclusão	27
3.4	CrITÉRIOS de Exclusão.....	27
3.5	Coleta de Dados	27
3.6	Montagem do <i>Tissue Microarray</i>	28
3.7	Análise da Imunoexpressão de Quimiocina, Receptores e mTOR ...	30
3.8	Escores.....	31
3.9	Controles	32
3.10	Avaliação Intra e Inter-observador.....	32
3.11	Análise Estatística	32
3.12	Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos ..	34

4	RESULTADOS	35
4.1	CXCR1	41
4.2	CCR7	43
4.3	mTOR	47
4.4	CXCR4 / CXCL12	51
4.5	CD68 / CD3	53
5	DISCUSSÃO	56
5.1	CXCR1	61
5.2	CCR7	65
5.3	mTOR	69
5.4	CXCR4 / CXCL12	72
5.5	CD68 / CD3	77
6	CONCLUSÕES	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha utilizada para coleta de dados

ANEXO

Anexo 1 Estadiamento clínico do câncer de mama e seu agrupamento por estádios

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA, MARCADORES MOLECULARES E CLASSIFICAÇÃO

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública, sendo o mais frequente em mulheres após o câncer de pele não melanoma, tanto em países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento, respondendo por aproximadamente 25% da incidência anual (Ministério da Saúde 2017). Para o ano 2016, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) relatou uma incidência de 246.660 casos (14,6% entre todos os cânceres) e uma mortalidade de 40.450 casos (6,8% de todas as mortes) (National Cancer Institute-NCI 2016). Os dados brasileiros de 2017 estimam em 57.960 os casos novos da doença (risco aproximado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres).

Em nosso país, o câncer de mama ocupa a primeira posição no gênero feminino, sendo o mais incidente em todas as regiões do país, com exceção do Norte, onde ocupa a segunda posição, imediatamente atrás do carcinoma de colo uterino. Os números chamam a atenção, pois o câncer de mama é considerado a principal causa de morte (324.000 óbitos) nas regiões economicamente menos favorecidas do Brasil e ocupa a segunda posição nas regiões mais desenvolvidas (198.000 óbitos) sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. Para o Estado do Ceará foram estimados

2.160 novos casos, sendo 860 casos somente em Fortaleza (Ministério da Saúde 2017). Entretanto, as taxas de mortalidade por câncer de mama estão declinando em alguns países da Europa (FERLAY et al. 2013) e América do Norte (DESANTIS et al. 2016), apesar do aumento em incidência. Em nosso país, estas taxas continuam apresentando curva crescente (CECILIO et al. 2015).

Quase todas as neoplasias malignas da mama são adenocarcinomas, isto é, neoplasias de linhagem epitelial com histogênese derivada de células epiteliais glandulares. São divididas inicialmente em dois grupos: *in situ*, isto é, carcinomas em que o crescimento não ultrapassa a membrana basal; e carcinomas invasivos, que infiltram o estroma e que podem também gerar metástases para linfonodos regionais ou para órgãos distantes. Os carcinomas também podem se dividir, com base em sua morfologia, nos tipos ductal e lobular, embora se originem da mesma unidade terminal do lóbulo, e os mais frequentes são os carcinomas ductais invasivos sem especificação. Também são encontrados outros tipos de neoplasia de mama como: carcinoma lobular invasivo, carcinoma medular, carcinoma colóide, carcinoma tubular, carcinoma papilar invasivo e carcinoma metaplástico (WEIGELT et al. 2010).

O tamanho tumoral (T) e o *status* axilar (N) permanecem como importantes fatores prognósticos do câncer de mama (CIANFROCCA e GOLDSTEIN 2004). Contudo, hoje se torna imprescindível o conhecimento do padrão de expressão dos receptores hormonais de estrógeno (RE), progesterona (RP) e Her2 para se tratar o câncer de mama. Além destes,

deve-se considerar a análise da amplificação do oncogene *ERBB2* ou a imunexpressão da proteína *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) codificada por este oncogene, bem como fatores já incorporados à prática clínica como idade, invasão linfovascular e grau histológico (LEONG e ZHUANG 2011; CHENG et al. 2016).

Várias potenciais aplicações clínicas têm sido propostas para a determinação da expressão de *ERBB2*, incluindo: determinação de prognóstico em pacientes não tratadas, predição de benefícios com a terapia anti-HER2, em particular Trastuzumabe e Lapatinibe, predição de resistência a terapias hormonais ou predição de resistência relativa a certos esquemas de quimioterapia, como CMF (Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluorouracil) e, ainda, predição de resposta a Antraciclinas e Paclitaxel (WOLFF et al. 2013; IQBAL e IQBAL 2014).

A expressão de receptores específicos para os hormônios sexuais esteróides (estrógeno e progesterona) pelas células tumorais dos carcinomas mamários representa um importante fator prognóstico e preditivo no câncer de mama (HIGA e FELL 2013). Nesse contexto, o RE e o RP são expressos em aproximadamente 60% a 70% das células de câncer de mama (YIP e RHODES 2014).

A determinação dos RP foi incorporada à prática clínica porque sua expressão se relaciona à funcionalidade do RE. Quando ambos os receptores são conjuntamente analisados, aumenta-se o poder preditivo sobre uma possível resposta à terapia hormonal. É interessante observar que tumores que expressam apenas o receptor de progesterona apresentam

melhor resposta terapêutica quando comparados àqueles que expressam apenas o RE (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ et al. 2015).

O *HER2* é uma proteína transmembranar de 185 kDa pertencente à família *ErbB* de receptores tirosina quinase e que regulam uma série de processos celulares tais como proliferação, diferenciação e sobrevivência. Esta proteína é superexpressa em aproximadamente 20 a 25% de todos os tumores de mama invasivos, além de se verificarem mutações no gene *HER2* em aproximadamente 1 a 2% dos cânceres de mama (BOSE et al. 2013).

Além da heterogeneidade clínica e histopatológica, os carcinomas invasivos de mama também se apresentam de forma heterogênea quando classificados molecularmente. Atualmente são conhecidos cinco perfis genéticos para o câncer invasivo de mama, conforme detalhado nos próximos parágrafos (VAN'T VEER et al. 2002; SØRLIE et al. 2003; CIRQUEIRA et al. 2011).

As assinaturas moleculares favorecem o uso de opções terapêuticas personalizadas, inclusive com terapias apresentando receptores como alvos. Por exemplo, os subtipos luminal A e B de câncer de mama invasivo, quando comparados ao CMTN, mostram melhor prognóstico bem como melhor resposta a terapia com alvo em receptores hormonais. Por outro lado, os CMTN apresentam melhor resposta à quimioterapia do que os tumores luminais (TROP et al. 2014).

Algumas características moleculares auxiliam na diferenciação clínica entre os subtipos tumorais de mama, com o melhor prognóstico atribuído

aos tumores Luminal A, frente ao Luminal B, e a presença de vimentina e CK17, além das CK5/6, como possíveis marcadores para os tumores basaloídes (PEROU et al. 2000; VAN DE RIJN et al. 2002; NIELSEN et al. 2004; SØRLIE et al. 2003; REIS-FILHO e TUTT 2008).

Adicionalmente, são nos tumores basaloídes que se encontram a maioria dos cânceres com mutação do gene humano “*breast cancer 1*” (*BRCA1*) e os carcinomas metaplásicos. O carcinoma medular é o tipo dentre estes mais enigmático, pois aproximadamente 95% destes apresentam o perfil basalóide acompanhado de uma morfologia agressiva, porém com prognóstico favorável (BADVE et al. 2011).

PEROU em 2010, publicou o artigo intitulado *Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers*, no qual apresenta as características de mais um subtipo molecular de câncer mamário caracterizado por baixa expressão da molécula de adesão claudina, sendo este subtipo conhecido por *claudin low*. Este é um subgrupo de tumores triplo-negativos, que também apresentam baixa expressão de E-caderina, alto grau tumoral e baixa diferenciação, além de intensa reação inflamatória. Com a baixa diferenciação, este *cluster* tumoral está relacionado com as células iniciadoras, denominadas *cancer stem cell* (CSC), da mesma forma que os tumores basais apresentam um pior prognóstico e carecem de terapia alvo específica.

LEHMANN et al. (2011) ao estudarem a expressão gênica de 587 casos de câncer de mama triplo-negativo (CMTN), analisaram o perfil de 21 genes e classificaram de forma inovadora, este tipo de câncer em sete

subtipos: dois tipos denominados Basal *Like* (*BL1* e *BL2*), imunomodulador (*IM*), mesenquimal (*M*), mesenquimal *stem-like* (*MSL*) e luminal com receptor de andrógeno (*LAR*). Os tumores *BL1* e *BL2* apresentam maior expressão de genes de resposta ao dano do DNA e do ciclo celular, portanto com boa resposta a cisplatina. Os subtipos *M* e *MSL* são ricos em genes envolvidos com a transição epitelial-mesenquimal, com vias de sinalização de fatores de crescimento e, em modelos celulares, responderam a inibidores da via da PI3K/mTOR e ao Dasatinibe. Já o último subtipo (*LAR*), como o nome sugere, sinaliza o receptor de andrógeno sendo, portanto, sensível ao antagonista deste receptor, Bicalutamida. Esta nova classificação mostra a heterogeneidade do CMTN e chama a atenção para a individualização de terapêuticas baseadas nos subtipos.

Outro marcador molecular de importância clínica é o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1), o qual faz parte da família dos receptores HER, composta por mais três receptores, o HER2, o HER3 e o HER4. O EGFR encontra-se imunoexpresso em mais de 60% dos tumores basaloides (REIS-FILHO e TUTT 2008). Alguns autores consideram a expressão do EGFR como um dos pré-requisitos na identificação dos tumores basaloides, ao contrário de outros pesquisadores que não o consideram essencial, embora se reconheça que a expressão deste marcador está tão largamente presente nos cânceres de mama basaloides, que combinado com outros marcadores reforça este perfil (PEROU et al. 2000; VAN DE RIJN et al. 2002; NIELSEN et al. 2004; HICKS et al. 2006; REIS-FILHO e TUTT 2008).

Os tumores basaloides apresentam um padrão que se assemelha ao das células epiteliais basais da glândula mamária normal (OLIVEIRA e BERTOZZI 2008), expressando os genes presentes nestas células (REIS-FILHO e TUTT 2008). Há diversas definições na literatura quanto às reações necessárias para se caracterizar um tumor com perfil basaloide (PEROU et al. 2000; VAN DE RIJN et al. 2002; VAN'T VEER et al. 2002; SØRLIE et al. 2003; NIELSEN et al. 2004; CASSALI et al. 2008).

Em 2004, o estudo multi-institucional de NIELSEN et al. preconizou o uso de quatro marcadores para se classificar com acurácia o tumor basaloide: RE, EGFR, HER2 e citoqueratina 5/6 (CK5/6). Este painel apresenta sensibilidade de 76% e especificidade de 100% para a definição de tumor basaloide. VAN DE RIJN et al. (2002) publicaram um artigo em que correlacionam as citoqueratinas de alto peso molecular (CK5 e CK17) com um pior prognóstico, porém a CK17 mostrou-se difícil de avaliar por IHQ. HICKS et al. (2006), ao estudarem CK5/6, relacionaram a imunoexpressão desta citoqueratina ao desenvolvimento de metástases cerebrais, portanto com um pior prognóstico.

O consenso internacional de St Gallen, publicado em 2015, traz a classificação orientada para o tratamento dos subtipos moleculares de câncer de mama (Tabela 1).

Tabela 1 - Subtipos moleculares e padrões de imunomarcacão

Subtipo Molecular	Classificação com o índice Ki-67
	Padrão de Imunomarcacão
Luminal A	RE+ e RP+, HER2- e Ki-67 < 20%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥ 20% RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Triplo-negativo Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

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

Fonte: Adaptado de CIRQUEIRA et al. (2011)

1.2 CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO (CMTN)

O Grupo Brasileiro de Estudos em Câncer de Mama-GBECAM, realizou grande estudo demográfico e de caráter retrospectivo, denominado Projeto Amazonas, o qual incluiu 28 centros, sendo o Hospital Haroldo Juaçaba – ICC, participante deste estudo (SIMON 2017). Foi observada uma incidência de 19,1% de tumores triplo-negativos em nosso país (SIMON 2017; LEE et al. 2012).

Os tumores triplo-negativos são reconhecidos por apresentarem um perfil histológico de maior agressividade, maior potencial metastático, com limitação na resposta às terapias hormonais e no prognóstico, levando, conseqüentemente, a uma menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global (ANDERS e CAREY 2008; RAKHA et al. 2009; RAICA et al.

2009). Estudos clínicos mostraram um pior prognóstico para CMTN e HER2 positivo (VAN DE RIJN et al. 2002; SØRLIE et al. 2003; HICKS et al. 2006; OLIVEIRA e BERTOZZI 2008; REIS-FILHO e TUTT 2008).

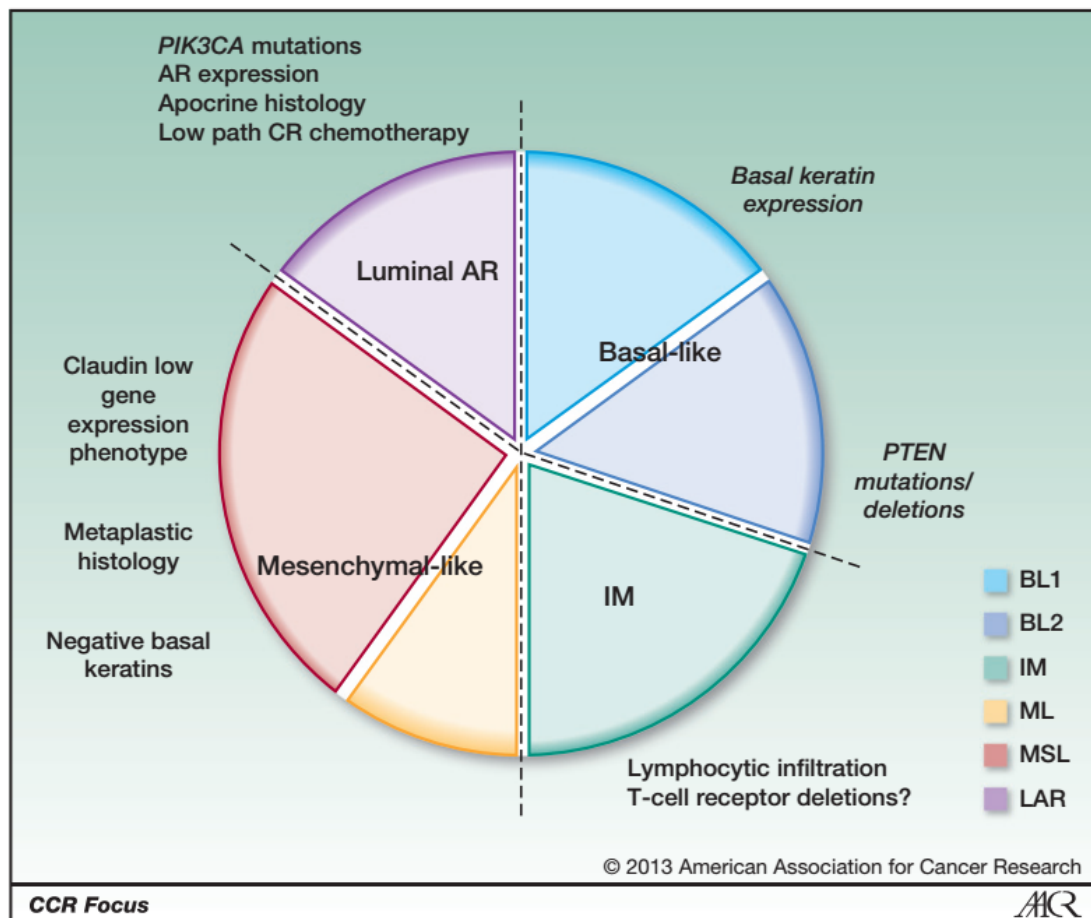
Além disso, estes tumores possuem uma alta prevalência em mulheres de ascendência hispânica e africana, uma idade de apresentação mais precoce, maior incidência em mulheres mais jovens e uma associação significativa com as mutações germinativas de *BRCA1*. O CMTN também se caracteriza por uma apresentação heterogênea com diferenças genéticas, transcricionais, histológicas e clínicas, sendo a maior parte de carcinomas ductais invasivos de alto grau, caracterizados por graus marcados de pleomorfismo nuclear, falta de formação de túbulos e altas taxas mitóticas (PAREJA et al. 2016).

O fenótipo do tumor triplo-negativo pode ser dividido em formas agressivas e de alto grau, e em outras menos invasivas. Também existem os carcinomas metaplásicos caracterizados pela presença de elementos neoplásicos que divergem daqueles esperados para serem encontrados em adenocarcinomas. Os tumores menos agressivos podem ser representados pelos carcinomas adenoides císticos e os carcinomas secretórios da mama que possuem curso clínico indolente e prolongado (TURNER e REIS-FILHO 2013). Além disso, estes autores descrevem os CMTN como sendo compostos de múltiplos subtipos moleculares representados em três subgrupos básicos de câncer: câncer de tipo basal, câncer de tipo mesenquimal e um subconjunto luminal de AR (Figura 1).

A complexidade genética do CMTN é ainda maior do que os outros

cânceres de mama. Os tumores exibem uma grande variação de mutações relacionadas a várias vias de sinalização, sendo os genes mais frequentemente mutados o *TP53* (82%) e *PIK3CA* (10%) (*Cancer Genome Atlas Network 2012*). Outros genes como *PTEN*, *RB1*, *NF1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ALK* também são encontrados, porém em menor porcentagem. Tal heterogeneidade está associada a uma variação genética de células cancerígenas gerada pela composição clonal do tumor e por diferentes evoluções clonais das mutações dos genes citados anteriormente (PAREJA et al. 2016).

O manejo clínico de CMTN é mais limitado quando comparado a outros subtipos de câncer da mama, o que resulta em uma terapêutica que inclui cirurgia combinada com quimioterapia adjuvante e radioterapia. Todavia, o resultado clínico é bastante limitado na maioria dos casos. Isso muito se deve à diversidade molecular do tumor triplo-negativo demonstrando a necessidade de um aperfeiçoamento das abordagens terapêuticas, já que a quimioterapia padrão é bastante eficaz somente em um subconjunto de pacientes. Nesse sentido, o conhecimento molecular desses tumores abre perspectiva para um melhor manuseio clínico (SHARMA 2016).



Fonte: TURNER e REIS-FILHO (2013).

Figura 1 – Associação entre os diferentes subtipos de Câncer de Mama Triplo-negativo. A expressão gênica dos subtipos de CMTN são associadas a características moleculares distintas. Os cânceres Luminal AR são os subtipos de CMTN mais distintos associados a mutações em PIK3CA e apresentam histologia apócrina. O subtipo imunomodulador é possivelmente composto de todos os outros subtipos, com a expressão gênica resultante da expressão manifesta pelos subtipos do infiltrado inflamatório dominante. Subtipos de TNBC: BL1, basal-like 1; BL2, basal-like 2; IM, Imunomodulador; ML, Mesenquimal; MSL, Mesenquimal tronco-like; LAR, Receptor de androgênio luminal; AR, receptor de andrógeno; path CR Pathologic complete response.

1.3 QUIMIOCINAS, VIAS DE SINALIZAÇÃO E CÂNCER

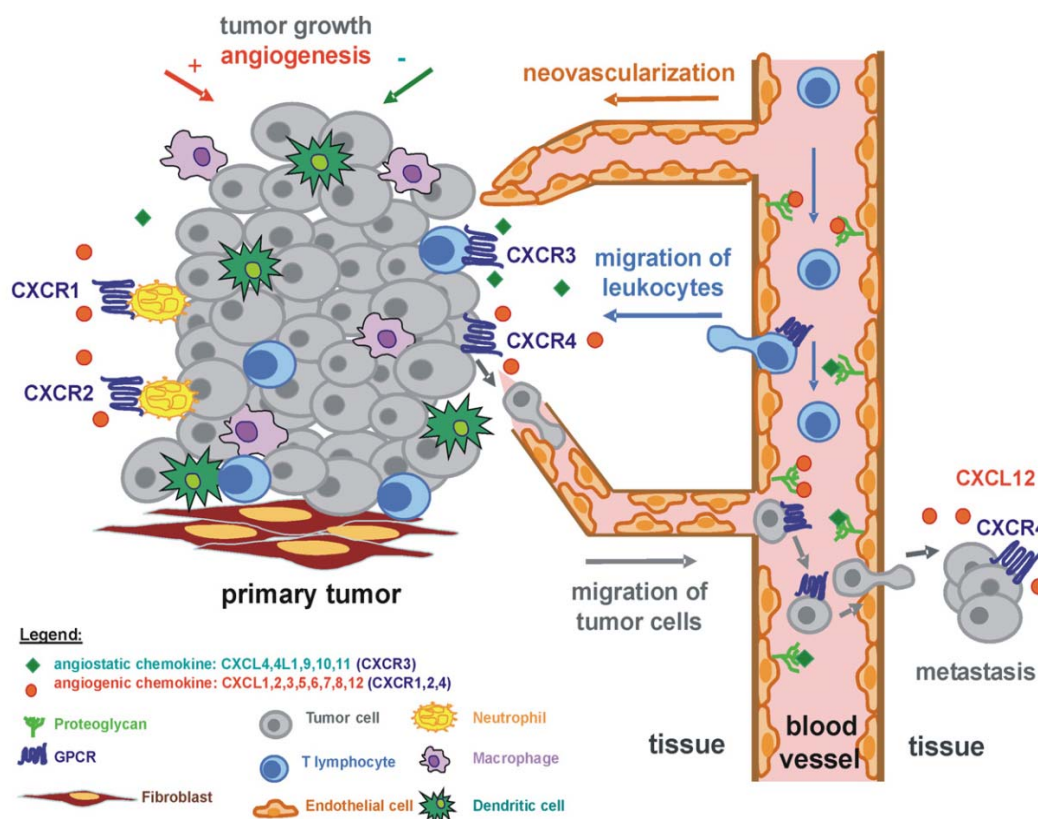
Tem sido grande o interesse de pesquisadores em associar a presença de mediadores inflamatórios com eventos relacionados ao crescimento e progressão tumoral. Nesse sentido, alguns mediadores têm sido mais estudados como Ciclooxigenase 2 (COX2), Óxido Nítrico sintase (NOS2), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-1 (IL-1) e, mais recentemente, as quimiocinas.

As quimiocinas são moléculas envolvidas nas respostas imunológica e inflamatória, e têm despertado interesse quanto à sua associação com diversos aspectos do desenvolvimento tumoral. Podem ser definidas como citocinas quimioatraentes e desempenham diversas funções nas células normais, bem como naquelas acometidas por processo inflamatório ou neoplásico. As quimiocinas e seus receptores têm ação na maturação da célula dendrítica, na resposta à inflamação, angiogênese, crescimento tumoral e metastatização (RAMAN et al. 2007), podendo ser divididas em quatro grupos, que se diferenciam quanto à posição das duas primeiras cisteínas, alfa (CXC), beta (CC), gama (C) ou delta (CX3C) (GRIFFITH et al. 2014). De uma forma geral, as quimiocinas interagem com receptores acoplados a proteína G (GPCRs), sendo que tais receptores são denominados, algumas vezes, com o nome da respectiva quimiocina acrescentado da letra "R", de forma que CXCL12R é o receptor da CXCL12. Após a ligação de diferentes quimiocinas ao mesmo receptor, pode haver uma variedade de efeitos biológicos, que também dependem do

microambiente celular (ZLOTNIK e YOSHIE 2000).

Vários estudos têm associado as quimiocinas ao câncer. Essas propriedades parecem ter implicações em sua biologia, desde que está descrito que as quimiocinas CXC-ELR⁺, ao se ligarem aos seus receptores, passam a apresentar atividade angiogênica. Em contraste, muitas das quimiocinas ELR⁻ ligam-se ao receptor CXCR3 e têm ação angiostática. Como exceção a esta regra pode-se citar a quimiocina SDF-1 (fator derivado da célula estromal), também conhecida como CXCL12, que se liga aos receptores CXCR4 e CXCR7 e está envolvida no processo de formação de metástases (VANDERCAPPELLEN et al. 2008). A Figura 2 é ilustrativa de tais mecanismos.

A agressividade tumoral, como vista nos CMTN, possivelmente pode estar relacionada não somente com as quimiocinas, mas também aos receptores destas moléculas. Corroborando essa hipótese, ZHANG et al. (2014) evidenciaram em uma metanálise que a alta expressão de CXCR4 (receptor de CXCL12) está relacionada com a maior taxa de recorrência, morte relacionada ao câncer, *status* linfonodal e metástase a distância. No mesmo trabalho, os autores associaram a elevada expressão desse marcador como um importante fator associado à progressão tumoral por modular negativamente o microambiente tumoral. Um potencial mecanismo envolve a regulação da acumulação de células imunológicas no microambiente tumoral, como macrófagos e linfócitos.



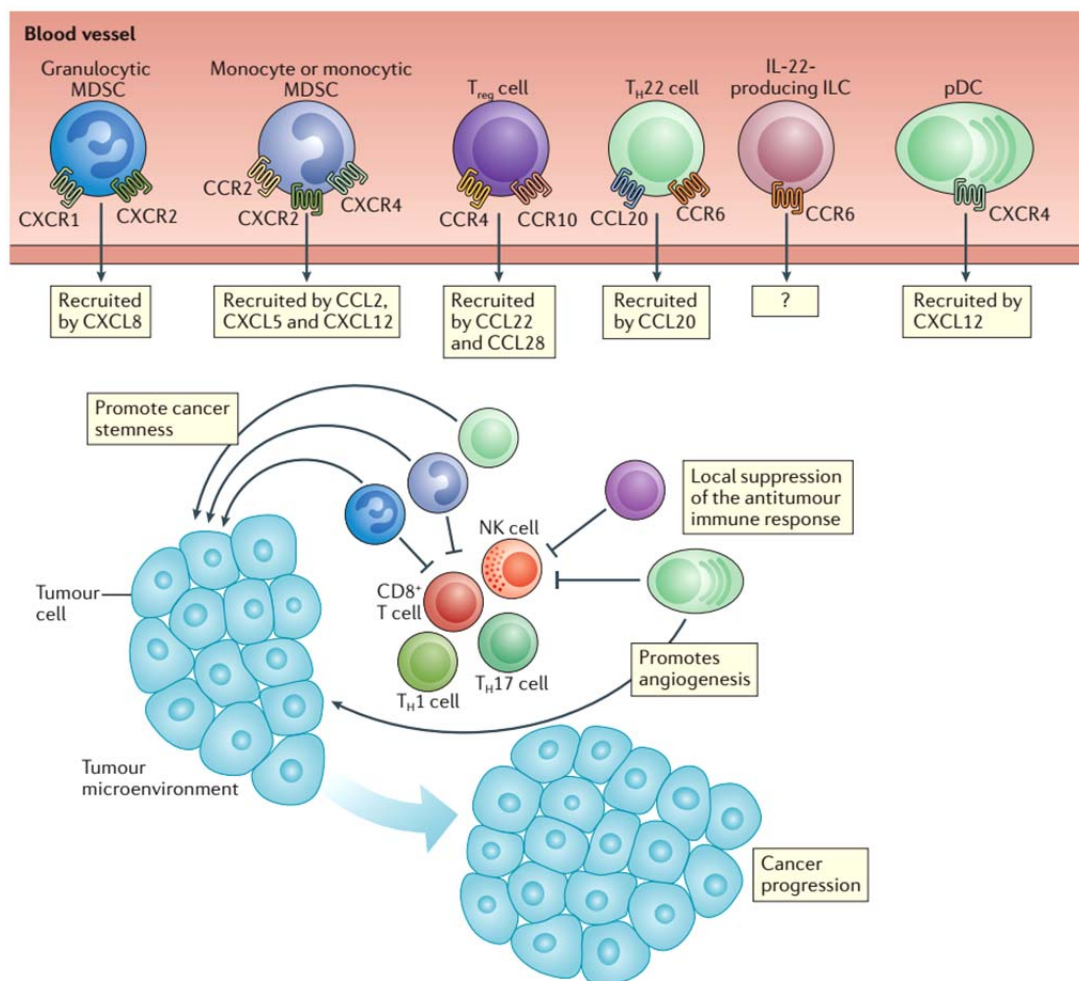
Fonte: VANDERCAPPELLEN et al. (2008)

Figura 2 - Papel das quimiocinas e seus receptores no microambiente tumoral. O estroma tumoral contém vários tipos de células estromais e estas células são boas produtoras de quimiocinas, regulando a migração de leucócitos. O tumor é infiltrado por células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. A produção de quimiocinas por células tumorais e estromais também afeta o processo de angiogênese pelas suas propriedades angiogênicas ou angiostáticas. Além disso, o eixo CXCR4-CXCL12 / SDF-1 está envolvido na migração dirigida de células tumorais para sítios metastáticos.

Os macrófagos desempenham importantes papéis no microambiente tumoral e, ao sofrerem ação de citocinas presentes neste meio, podem se transformar em TAMs (*Tumor Associated-Macrophages*) e, então, passarem a produzir fatores de crescimento e a estimular a angiogênese, podendo modular a resposta, por exemplo, dos linfócitos T reguladores (Treg). Por

sua vez, os Treg remodelam a matriz extracelular das células cancerígenas participando do processo de mobilidade e disseminação das células neoplásicas (CHANMEE et al. 2014). Além disso, estas células podem expressar quimiocinas capazes de mediar a supressão de células T e de promover inflamação no microambiente tumoral (Figura 3), contribuindo assim para a iniciação, progressão e metástase (NAGARSHETH et al. 2017).

Além dos macrófagos, o infiltrado leucocitário no nicho tumoral inclui linfócitos T, células dendríticas, células NK e outros granulócitos, que também influenciam o microambiente tumoral. Quimiocinas como a CCL19, CCL20 e CCL21 são descritas como reguladores do tráfego das células dendríticas, e sua superexpressão é capaz de gerar efeitos antitumorais em modelos experimentais (PALACIOS-ARREOLA et al. 2014).



Fonte: NAGARSHETH et al. (2017)

Figura 3 – Efeitos pró-tumorais das quimiocinas. Populações de células imunológicas como granulócitos e células supressoras derivadas de monócitos mielóides (MDSCs), células T reguladoras (Treg), células T helper IL-22+CD4⁺ (TH22), células linfóides inatas IL-22⁺ (ILCs) e células dendríticas plasmocitóides (pDCs) podem promover o crescimento do tumor. Estas células são recrutadas para o microambiente tumoral em resposta a diferentes quimiocinas que são expressas no microambiente do tumor (os receptores e ligantes relevantes são mostrados). As células imunológicas pró-tumorais podem inibir as respostas imunes antitumorais e também podem promover e manter a angiogênese, levando a progressão do câncer. CCL, ligante de quimiocina CC; CCR, receptor de quimiocina CC; CXCL, ligante de quimiocina CXC; CXCR, receptor de quimiocina CXC.

1.3.1 CXCL8 / CXCR1 / CXCR2

A CXCL8 é também conhecida como interleucina-8 (IL-8), e pertence à família das quimiocinas CXC-ELR. É produzida por macrófagos, células epiteliais, células da musculatura lisa das vias aéreas e células endoteliais (MATSUSHIMA et al. 1992). CXCL8 é inicialmente produzido como um proteína de 99 aminoácidos que sofre clivagem para formar as isoformas CXCL8, um peptídeo de 77 aminoácidos em células não-imunológicas e um peptídeo de 72 aminoácidos em monócitos e macrófagos (BRAT et al. 2005). A função de CXCL8 depende principalmente de sua interação com receptores acoplados à proteína G (GPCR), CXCR1 e CXCR2 (ARAKI et al. 2007).

O CXCR1 interage com CXCL6 e CXCL8, enquanto CXCR2 liga a CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8. Tanto o CXCR1, como o CXCR2, são expressos em granulócitos, monócitos, mastócitos e algumas células *Natural Killers* (PARK et al. 2012; LIU Q et al. 2016).

A CXCL8 pode afetar a habilidade imunorregulatória do organismo na defesa contra o câncer, assim como modifica o microambiente tumoral para favorecer a tumorigênese. No contexto do câncer de mama, a ação no microambiente apresenta maior relevância em comparação à regulação imunológica. A CXCL8 proveniente de células de tumores da mama coopera com o fator de crescimento do endotélio vascular para expandir a neovasculatura do tumor (CHELOUCHE-LEV et al. 2004). A regulação negativa de CXCL8 reduz significativamente a densidade de microvasos em

tumores com receptor de estrógeno negativo *in vivo*, sem, contudo, afetar a proliferação ou o ciclo celular no câncer (YAO et al. 2007).

Essa ação sobre a neovascularização também favorece as metástases dos tumores RE negativos. Níveis elevados de CXCL8 promovem angiogênese e atração de neutrófilos que liberam enzimas envolvidas no remodelamento e estabelecimento do tumor, possivelmente favorecendo as metástases (DE LARCO et al. 2001). Por exemplo, foi sugerido que a produção de CXCL8 contribuiria, em tumores RE negativos, para a formação de osteoclastos e para a reabsorção óssea apresentando assim possível participação na metástase óssea associada ao câncer de mama (WU et al. 2008).

O receptor CXCR1 tem como principal via de sinalização a da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), sendo responsável pela migração, sobrevivência celular e pela angiogênese. Também é responsável pela ativação da via MAP quinase (KNALL et al. 1997).

De forma interessante, a quimiocina CXCL8 está associada a receptores de crescimento expressos na superfície de células cancerígenas, principalmente do câncer triplo-negativo (LIU Q et al. 2016).

Outra vertente da ação pleiotrópica da IL-8 foi a elegante demonstração de seu envolvimento na aquisição de resistência adaptativa a inibidores da via PI3K-mTOR (BRITSCHGI et al. 2012). Para tanto os autores usaram modelos experimentais de linhagens celulares e de tumores primários mamários, triplo-negativos, e expuseram-nas a drogas reconhecidamente inibidoras da via PI3K/mTOR (ex. BEZ235) e que têm

atividade antitumoral neste particular tipo de tumor. Esta inibição, entretanto, desencadeia num segundo momento uma resposta adaptativa de resistência. Tal resposta envolve a ativação da via JAK2/STAT5. A consequência é que a STAT5 ao se translocar para o núcleo ativa a transcrição do gene codificador de IL-8 e de seu receptor. A secreção de IL-8 leva ao desencadeamento de uma alça de autoamplificação, autócrina e/ou parácrina, que ativa uma isoforma diferente de PI3K-gama e ainda propaga a ativação da via JAK2/STAT5 levando ao aumento de tumorigenicidade e invasividade. Por fim os autores sugerem que esses dados dão sustentação à proposição de se usar um duplo bloqueio das vias PI3K-mTOR e JAK2/STAT5 quando do tratamento dos cânceres mamários triplo-negativos. Neste mesmo trabalho também foi evidenciada a correlação entre a secreção de IL-8 e a hiperexpressão do seu receptor CXCR1 com invasividade tumoral quando linhagens de câncer mamário do subtipo triplo-negativo foram analisadas (BRITSCHGI et al. 2012).

1.3.2 CCR7

O receptor CCR7 é uma proteína transmembranar acoplada à proteína G, sendo expressa em células T e células dendríticas maduras. Este receptor interage com duas quimiocinas (CCL19 e CCL21) comumente secretadas em órgãos linfóides secundários. Adicionalmente, a quimiocina CCL21 e seu receptor CCR7 parecem estar envolvidos na disseminação de células tumorais e formação de metástases (MUKAIDA e BABA 2012).

A interação CCL21-CCR7 está relacionada à disseminação de células

de diversos tipos de câncer, inclusive os tumores de mama, para linfonodos sentinelas. A presença de grande quantidade de CCL21 nos linfonodos gera uma quimioatração de células do tumor com expressão de receptores CCR7, gerando migração dessas células. Assim, a intervenção terapêutica na relação CCR7-CCL21 pode reduzir as metástases para linfonodos, o que dependeria da detecção precoce do tumor primário (MÜLLER et al. 2001).

Além disso, KOCHETKOVA et al. (2009) observaram que ligantes de CCR7, como CCL2, inibem a morte de células metastáticas de câncer de mama, contribuindo com o aumento da sobrevivência e com a disseminação tumoral.

O receptor CCR7 também pode ser caracterizado como fator de mau prognóstico. CASSIER et al. (2011) observaram que os receptores CCR6 e CCR7 estavam expressos numa grande proporção de tumores, na maioria dos casos, associados a características de doença mais agressiva.

1.3.3 CXCR4 / CXCL12

A ligação da quimiocina CXCL12 ao seu receptor CXCR4 ativa uma variedade de vias de transdução de sinal intracelulares e têm papéis fundamentais no câncer da mama primário e metastático por estarem envolvidos na proliferação, angiogênese e metástase. Além da mama, esta quimiocina e seu receptor também já foram descritos na patogênese de tumores em outras localizações anatômicas, incluindo pulmão, cérebro e próstata (ARAVINDAN et al. 2015).

O receptor CXCR4 ativa sinais intracelulares responsáveis pela

quimiotaxia, invasão e adesão, além de aumentar a secreção de metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9 em linhagens de células de câncer da mama MD-MBA-231. Estudos correlacionam a ativação das MMPs diretamente com a reorganização da matriz extracelular e, conseqüentemente, com a criação de um microambiente permissivo para a progressão das células neoplásicas. Além disso, este receptor regula a angiogênese. Em trabalho realizado por LUKER e LUKER (2006), os autores descreveram a formação defeituosa de vasos sanguíneos no trato gastrointestinal de animais *knockout* para CXCR4 ou CXCL12, demonstrando sua importante função na vascularização. Este receptor e sua quimiocina estão envolvidos em vários passos importantes da tumorigênese, favorecendo principalmente angiogênese e metástase (LUKER e LUKER 2006; PAPATHEODOROU et al. 2014).

No microambiente tumoral, a expressão de CXCL12 no epitélio mamário, e suas interações com outras moléculas, podem ser determinantes na fisiopatologia deste tipo de câncer, pois sua expressão em células abundantes do estroma, como os fibroblastos, é um fator favorável à comunicação entre células do hospedeiro e neoplásicas que também expressam CXCR4 e CXCL12 podendo, desse modo, contribuir com a progressão tumoral (BURGER e KIPPS 2006).

A importância do CXCR4 como fator estimulador da oncogênese pode ser estimada quando do uso de antagonistas para este receptor, pois a utilização dessa ferramenta farmacológica demonstrou atividade antitumoral *in vitro* para várias linhagens celulares de câncer, inclusive de mama. Além

disso, tal bloqueio pode ser associado à diminuição significativa de nódulos metastáticos pulmonares e hepáticos, bem como a redução da angiogênese no tumor primário *in vivo* (LING et al. 2013).

VLAHAKIS et al. (2002) propuseram um modelo da via de sinalização da ligação da quimiocina CXCL12 com o receptor CXCR4. Os autores concluíram que a ativação do receptor CXCR4 leva a ativação das vias MAP quinase (p38) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A ativação de p38 e PI3K leva à inibição da apoptose com prolongamento da sobrevivência celular e à expressão de genes que promovem a proliferação celular

1.3.4 mTOR

A proteína-alvo da rapamicina em mamíferos, conhecida como mTOR (*mammalian target of rapamycin*), é uma serina/treonina quinase intracelular diretamente relacionada à PI3K e que determina uma importante e reconhecida função reguladora do crescimento, diferenciação, metabolismo e proliferação celular. Ao reconhecer e interagir com diversas proteínas adaptadoras intracelulares, o mTOR forma dois complexos proteicos independentes, associados a diferentes processos regulatórios e atividades celulares, denominados mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2) (GUERTIN e SABATINI 2007).

A iniciação da tradução é um processo diretamente relacionado à carcinogênese e, neste sentido, o mTOR dispara esse processo pela fosforilação das proteínas de ligação eIF4E (4E-BPs) e as quinases de proteína ribossomal S6 (S6K1 e S6K2) que, em conjunto, auxiliam na

regulação das taxas de iniciação da tradução (PETROULAKIS et al. 2007). O mTOR está relacionado ao equilíbrio energético e estresse oxidativo por ser o centro de vias de sinalização ativadas a partir de nutrientes e fatores de crescimento (BRACHO-VALDÉS et al. 2011). No câncer, esta proteína exerce um efeito crítico na sinalização celular que, comumente, encontra-se desregulada, pois funciona proporcionando a integração de hormônios e fatores de crescimento com o *status* de energia intracelular e a disponibilidade de aminoácidos necessários para controlar o crescimento celular e processos metabólicos adicionais (HAY e SONENBERG 2004).

A ativação da via PI3K/AKT/mTOR, pode ser considerada um fator de pior prognóstico em diversos tipos de câncer, inclusive o de mama (ZHOU et al. 2004; LOPICCOLO et al. 2008). A desregulação comum do mTOR e a ativação frequente de tais vias são encontradas no CMTN. Por este motivo, a inibição da sinalização da via mTOR é uma estratégia clínica atrativa para o tratamento desta doença e vem sendo explorada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* nos últimos anos com resultados promissores sobre o prognóstico quando da combinação com quimioterápicos convencionalmente utilizados no tratamento do câncer de mama (SINGH et al. 2014).

As características moleculares do CMTN sugerem um perfil clínico de maior agressividade e que pode cursar com importantes limitações prognósticas. Neste sentido, muitos marcadores biológicos tem sido sugeridos como possíveis candidatos capazes de contribuir com o maior entendimento e manejo clínico desta condição. Provavelmente, as relações exercidas entre algumas quimiocinas e seus receptores contribuam com a

modulação da inflamação relacionada ao câncer, bem como interfiram no seu curso clínico. Entretanto, há necessidade da melhor compreensão da interconexão entre a atuação das quimiocinas no microambiente tumoral e sua associação com a carcinogênese. Neste contexto, torna-se importante investigar a possível relação da expressão desses marcadores com parâmetros envolvidos no comportamento biológico e clínico do CMTN, com o intuito de identificar alvos terapêuticos úteis no manejo da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da quimiocina CXCL12, dos receptores CXCR1, CXCR4, CCR7 e da proteína mTOR em câncer de mama triplo-negativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão da quimiocina CXCL12, dos receptores CXCR1, CXCR4, CCR7 e da proteína mTOR em amostras de CMTN, comparando os subgrupos basal e não basal;
- Investigar a expressão da quimiocina CXCL12, dos receptores CXCR1, CXCR4, CCR7 e da proteína mTOR com parâmetros clínico-patológicos de agressividade tumoral como tamanho tumoral, presença de metástase linfonodal, metástase à distância e sobrevida global;
- Estudar a associação entre a expressão de mTOR, da quimiocina CXCL12 e dos receptores CXCR1, CXCR4, CCR7;
- Verificar a possível associação entre a expressão de marcadores de células inflamatórias CD68 e CD3, com a quimiocina CXCL12, os receptores CXCR1, CXCR4, CCR7 e a proteína mTOR em CMTN.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal do tipo coorte, retrospectivo.

3.2 CASUÍSTICA

Foram incluídos pacientes com diagnóstico de câncer invasivo de mama, triplo-negativos, ou seja, sem imunoexpressão de receptores de estrógeno e progesterona e sem hiper-expressão de *ERBB2* (escore 0 e 1, ou FISH negativo no caso de imunoexpressão com escore 2), registrados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba – Instituto do Câncer do Ceará (ICC), no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015.

A literatura existente apresenta grande variedade nos critérios de classificação imunoistoquímica de tumores basaloides. Neste estudo adotaremos a classificação utilizada por alguns pesquisadores, como NIELSEN et al. (2004), que consideram o tumor basalóide aquele que, além da ausência de expressão de RE e RP e ausência de hiper-expressão de *ERBB2*, apresenta positividade para citoqueratinas 5/6 (CK5/6) e de receptor de fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR). Os demais tumores triplo-

negativos que não apresentaram a imunomarcação para CK5/6 ou EGFR foram classificados como não basais (Tabela 1).

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo (CMTN):

- Com dados clínicos no prontuário com informações suficientes para o adequado preenchimento da ficha de coleta de dados;
- Com amostras satisfatórias, fixadas adequadamente e com dimensões adequadas para o estudo.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo (CMTN):

- Com amostras sem material suficiente, dimensões inadequadas e fixadas de modo inadequado;
- Sem estudo prévio imunoistoquímico de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. C-erbB2 (HER2/neu).

3.5 COLETA DE DADOS

Os prontuários das pacientes pertencentes à amostra foram avaliados quanto aos dados clínico-patológicos como idade, estadiamento, tipo de tratamento realizado (cirúrgico, radioterápico, quimioterápico) e sobrevida global.

Os dados coletados de cada um dos pacientes incluídos no estudo foram obtidos por meio de revisão dos laudos clínicos e exames anatomopatológicos disponibilizados pelo Instituto de Câncer do Ceará. Após selecionados os casos comprovadamente diagnosticados como triplo-negativos, os dados clínico-patológicos foram transcritos para uma ficha de coleta de dados elaborada pelos autores (Apêndice 1). Em seguida, foi solicitado ao Hospital supracitado a aquisição dos blocos e lâminas referentes aos casos selecionados para que, posteriormente, pudesse ser feita a marcação nas lâminas com maior percentual de células tumorais, e em duplicata, junto ao Patologista da pesquisa (PRCA).

3.6 MONTAGEM DO *TISSUE MICROARRAY*

Os blocos de parafina contendo amostras representativas de excisões cirúrgicas de câncer de mama triplo-negativo, devidamente registradas e armazenadas no Instituto do Câncer do Ceará, e suas respectivas lâminas, foram analisadas para marcação de duas áreas contendo os maiores percentuais de células tumorais. Uma agulha de 2 mm (Quick Ray,

UNITMA®) foi inserida na área previamente selecionada do bloco doador para retirada do tecido e sua imediata colocação no bloco receptor de 60 poços, que recebeu a seguinte sequência: 4 casos de controles positivos nos vértices, compostos por fígado, pulmão, placenta e pele; adicionados de 28 casos, em duplicata, de câncer de mama triplo-negativo. Isto gerou a confecção de 2 blocos de TMA contendo os casos da pesquisa e mais um bloco adicional composto por peças de ginecomastia, que representavam o controle negativo. O modelo utilizado pode ser verificado na Figura 4.

Os controles das reações foram fornecidos pelo Laboratório de Patologia da ARGOS (Fortaleza, Ceará, Brasil), sendo 40 amostras de mamoplastias redutoras utilizadas como controle negativo externo e tonsila palatina, baço, fígado e próstata como controles positivos internos da reação. Neste mesmo laboratório foram feitas as análises histopatológicas e imuno-histoquímicas a partir de técnicas padronizadas.

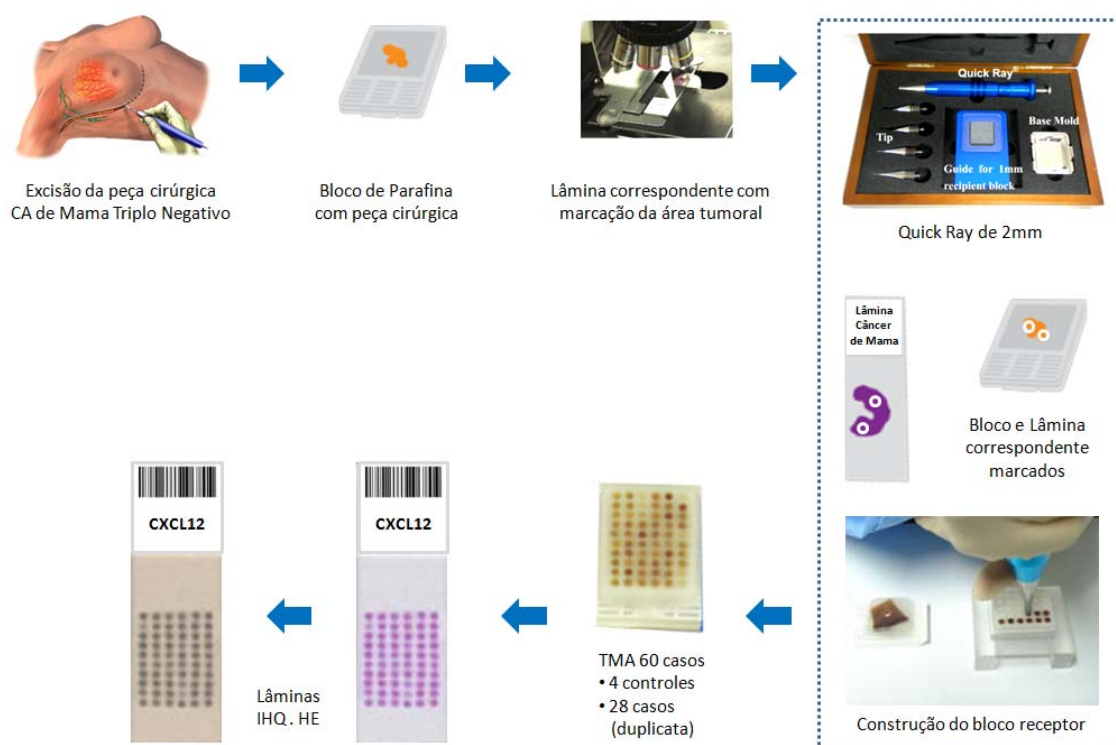


Figura 4 - Sequência de eventos utilizada para a construção de TMAs dos casos e dos controles.

3.7 ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE QUIMIOCINA, RECEPTORES E DA PROTEÍNA MTOR

Todos os espécimes ressecados foram fixados com formalina e corados com hematoxilina e eosina de modo rotineiro. Os casos foram revisados por dois patologistas independentes com experiência em patologia mamária e foram classificados de acordo com a classificação mais atual para câncer de mama (EDGE et al. 2010).

A análise imuno-histoquímica foi feita no bloco receptor de Tissue Microarray manual UNITMA®, com 60 poços, construído a partir de peças de câncer de mama triplo-negativo que apresentavam grande porcentagem de

células tumorais. Foram utilizados os anticorpos primários, obtidos comercialmente, para CXCR1, CCR7, mTOR, CXCR4, CXCL12, CD68, CD3, CK5, EGFR (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação entre anticorpos e clones utilizados, titulação e fabricante.

Anticorpo	Clone	Título	Localização	Fabricante e Número de Catálogo
CXCR1	Policlonal	1:500	Membrana	Abcam Anti-CXCR1 ab14936
CCR7	Monoclonal	1:1000	Membrana	Abcam Anti-CCR7 [Y59] ab32527
mTOR	Policlonal	1:500	Citoplasma	Phospho-mTOR (Ser2448)
CXCR4	Policlonal	1:500	Membrana	Abcam Anti-CXCR4 ab2074
CXCL12	Policlonal	1:150	Membrana	Anti-SDF1 ab9797
CD68	Monoclonal	1:400	Membrana	Anti-CD68 [KP1] ab955
CD3	Policlonal	1:800	Membrana	Anti-CD3 ab16044
CK5	Monoclonal	1:100	Citoplasma	Anti-CK5 [EP1601Y] ab52635
EGFR	Monoclonal	1:100	Membrana	Anti-EGFR [E114] ab32562

As diluições foram determinadas por métodos de titulação padrão para uma coloração final que resultasse em menos manchas de fundo. Foi utilizado o sistema de detecção universal de alta sensibilidade, incluindo bloqueador pré-diluído, anticorpo secundário além do tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

Resumidamente, as secções foram desparafinadas em xileno, hidratadas em etanol graduado, lavado em água destilada e colocados em tampão citrato, 10 mM, pH 6,0 com vapor para a recuperação antigênica. A imunocoloração foi feita com Novolink Max Polymer Detection System (Leica Biosystems, UK[®]) de acordo com a recomendação do fabricante.

3.8 ESCORES

Foram atribuídos os seguintes escores a cada imunomarcador, expresso ou não, baseados na intensidade da coloração, em cada amostra examinada, nas células neoplásicas ou no estroma: 0 = ausência de imunomarcacão ou raras células marcadas (< 5%); 1 = marcação discreta na maioria (> 50%) das células tumorais ou inflamatórias mononucleadas; marcação moderada em minoria de células (< 50%); 2 = marcação moderada na maioria (> 50%) das células tumorais ou inflamatórias mononucleadas; marcação intensa em minoria de células (< 50%); 3 = marcação intensa na maioria (> 50%) das células tumorais ou inflamatórias mononucleadas (mononucleares, identificados pelo CD68 [para macrófago] ou CD3 [para linfócito]. Os casos foram comparados e sempre considerados com expressão negativa quando do escore 0 ou 1 e expressão positiva para os escores 2 ou 3. Tais escores foram adaptados a partir da publicação de BUSKENS et al. (2003).

3.9 CONTROLES

Para CXCR1, CCR7, CXCR4, CXCL12 os *controles positivos* foram obtidos a partir de secções de baço ou tonsila palatina, que coram fortemente a enzima. Os *controles positivos* para mTOR foram obtidos através de secções de próstata, cujas glândulas coram fortemente a enzima. Os controles negativos foram obtidos a partir de mamoplastias redutoras.

3.10 AVALIAÇÃO INTRA- E INTER-OBSERVADOR

Os preparados histológicos de TMAs para CXCR1, CCR7, mTOR CXCR4 e CXCL12, foram estudados pelo autor deste trabalho e posteriormente analisados por um patologista, sempre em microscópio Olympus BX41TM, sem conhecimento prévio dos dados clínico-patológicos. Os casos discordantes foram resolvidos por consenso.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação estatística dos dados foi utilizado o programa SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). As análises partiram da verificação das possíveis associações entre a expressão dos marcadores utilizados e parâmetros clínicos de resposta, bem como sobrevida global a fim de investigar as correlações dos marcadores utilizados com as variáveis clínico-patológicas dos pacientes, sendo utilizados os testes de Fisher e Qui-quadrado.

A seguir estão descritas definições de termos utilizados que podem auxiliar no melhor entendimento do trabalho. A Resposta Patológica Completa (RCp) foi definida como a ausência de neoplasia invasiva na mama e também na axila após o tratamento neoadjuvante. Conforme o estabelecido pelo critério RECIST 1.1, a resposta parcial à quimioterapia ocorreu quando da redução em pelo menos 30% na soma do maior diâmetro das lesões-alvo (SCHWARTZ et al. 2016). A diferença entre a data da

cirurgia e a data do óbito foi utilizada para o cálculo da sobrevida global. Os pacientes que não desenvolveram eventos ao final do período de seguimento foram censurados na data da última consulta. A estimativa da sobrevida global foi feita a partir do método de Kaplan-Meier, sendo o teste log-rank utilizado para testar a diferença entre os grupos. À análise univariada, as variáveis que mostraram correlação com sobrevida foram subsequentemente analisadas em um modelo de regressão de Cox para explorar os fatores com valor prognóstico independente. Foram considerados estatisticamente significativos resultados com valor de P menor que 0,05.

3.12 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

O plano de pesquisa deste estudo foi submetido à Plataforma Brasil (CAAE 18946313.3.0000.5528 / Número do Parecer 1.838.996) bem como ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará (registro 407.395). Foram tomados os devidos cuidados na preservação de condições de biossegurança, incluindo a prevenção de acidentes em laboratório, bem como o manejo e acondicionamento corretos dos materiais usados. A utilização das amostras do arquivo foi feita após a assinatura do Termo de Fiel Depositário das Amostras. Durante todo o estudo, os procedimentos empregados resguardaram a confidencialidade das informações bem como o cuidado ético com os dados.

4 RESULTADOS

Nesta amostra (Tabela 4), pode-se observar o predomínio de pacientes na faixa etária ≥ 50 anos, a presença majoritária de tumores do tipo ductal, de alto grau histológico, com invasão linfovascular (46,4%), que responderam de maneira variável à quimioterapia neoadjuvante e que apresentaram recidiva sistêmica (18,5%), principalmente pleuro-pulmonar (11,4%).

Analizou-se, também, a distribuição dos casos de acordo com as variáveis clínicas e histopatológicas: idade estratificada (< 50 anos e ≥ 50 anos); tipo histológico; grau histológico; estadiamento tumoral, linfonodal e metastático; invasão linfovascular (ILV); carcinoma basaloide ou não-basaloide; carcinoma inflamatório ou não-inflamatório; realização de quimioterapia neoadjuvante e resposta ao tratamento (progressão da doença, doença estável, resposta parcial, resposta patológica completa); bem como a presença de recidivas local e sistêmica (óssea, pleuro-pulmonar, hepática e SNC) (Tabela 4).

Tabela 3 - Dados clínico-patológicos das pacientes do estudo.

Variáveis Analisadas	Número de Pacientes (%)
Idade (anos)	
<50	45 (33,8)
≥50	88 (66,2)
Tipo Histológico	
Ductal	78 (91,8)
Outros	7 (8,4)
Grau Histológico	
Bem diferenciado	4 (3,6)
Moderadamente	39 (35,5)
Pouco diferenciado	67 (60,9)
T	
T0 – T2	85 (73,3)
T3 – T4	31 (26,8)
N	
N0 – N1	86 (74,8)
N2 – N3	29 (25,2)
M	
M0	107 (92,2)
M1	8 (6,9)
Invasão linfovascular (ILV)	
Ausente	52 (53,6)
Presente	45 (46,4)
Carcinoma Basaloide	
Não	20 (44,4)
Sim	25 (55,6)
Carcinoma Inflamatório	
Não	105 (78,9)
Sim	28 (21,1)
QT Neoadjuvante	
Não	63 (49,2)
Sim	60 (50,8)
Resposta QT Neoadjuvante	
Progressão da Doença	12 (19)
Doença Estável	4 (6,3)
Resposta Parcial	32 (50,8)
RCp	15 (23,8)
Recidiva Local	
Não	127 (96,9)
Sim	4 (3,1)
Recidiva Geral	
Não	97 (81,5)
Sim	22 (18,5)
Óssea	7 (5,3)
Pleuro-Pulmonar	15 (11,4)
Hepática	8 (6,1)
SNC	7 (5,3)

* Número de casos avaliáveis de um total de 133 pacientes

Na análise do padrão de expressão dos marcadores no CMTN e nas mamoplastias redutoras, o tumor esteve diretamente associado com a marcação de mTOR ($p=0,002$), CXCR4 ($p=0,034$) e CXCL12m ($p=0,001$) porém esteve inversamente associado à marcação para CXCR1c ($p=0,001$), CXCR1m ($p=0,001$), CCR7m ($p=0,032$) e CCR7c ($p=0,001$). Valores limítrofes foram encontrados na marcação para CXCL12c ($p=0,067$) (Tabela 3).

Tabela 4 - Padrão de expressão dos marcadores nos casos de CMTN e de mamoplastia redutora.

Amostra de Tecido	Marcador*		Significância p*
	(-)	(+)	
CXCR1m			
MR	0 (0%)	36 (100%)	0,001
TU	46 (68%)	22 (32%)	
CXCR1c			
MR	0 (0%)	36 (100%)	0,001
TU	23 (28%)	60 (72%)	
CCR7m			
MR	0 (0%)	36 (100%)	0,032
TU	10 (12%)	75 (88%)	
CCR7c			
MR	0 (0%)	36 (100%)	0,001
TU	49 (59%)	36 (41%)	
mTOR			
MR	31 (89%)	4 (11%)	0,002
TU	54 (60%)	36 (40%)	
CXCR4			
MR	25 (71%)	10 (29%)	0,034
TU	46 (51%)	45 (49%)	
CXCL12m			
MR	31 (100%)	0 (0%)	0,001
TU	25 (37%)	42 (63%)	
CXCL12c			
MR	30 (29,7%)	1 (6,7%)	0,067
TU	71 (70,3%)	14 (93,3%)	

p = Teste exato de Fisher. MR = Mamoplastia Redutora; TU = Tumor m (membranar); c (citoplasmática). * (-) Escores 0 ou 1; (+) Escores 2 ou 3.

Adicionalmente, avaliou-se a sobrevida global em dois, três e cinco anos, que foi de 92%, 81% e 72%, respectivamente. A Figura 5 mostra que a sobrevida global de todos os pacientes (n=133) não foi determinada, pois menos de 50% da amostra foi a óbito durante o seguimento avaliado.

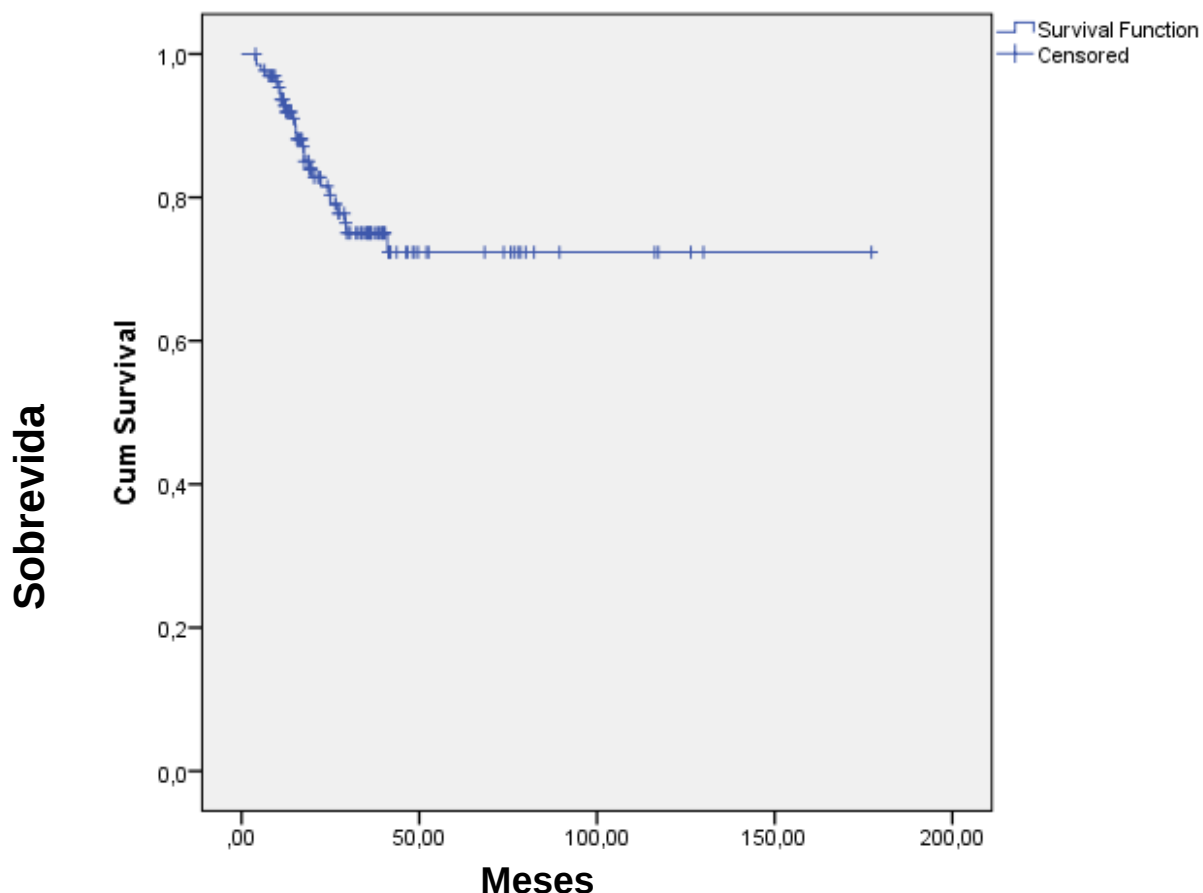


Figura 5 - Sobrevida global das pacientes com câncer de mama triplo-negativo.

Na comparação dos perfis basaloide e não-basaloide de CMTN com os marcadores avaliados (Tabela 5), a expressão de CXCL12m foi superior em ambos os perfis quando comparada a ausência de expressão, sendo maior nos tumores não-basaloides do que nos basaloides. A positividade (89,5%) da expressão desta quimiocina nos tumores não-basaloides foi

significativamente maior ($p=0,042$). Os demais marcadores avaliados não apresentaram diferença de expressão entre tumores basaloide e não-basaloide ($p>0,05$).

Tabela 5 - Associação entre os marcadores avaliados em amostras de câncer de mama triplo-negativo com os perfis basaloide e não-basaloide.

Marcador		Não-Basaloide	Basaloide	p
CXCR1m	(-)	14 (70%)	15 (60%)	0,544
	(+)	6 (30%)	10 (40%)	
CXCR1c	(-)	6 (30%)	9 (37,5%)	0,752
	(+)	14 (70%)	15 (62,5%)	
CCR7m	(-)	1 (5,3%)	3 (12%)	0,622
	(+)	18 (94,7%)	22 (88%)	
CCR7c	(-)	10 (52,6%)	18 (72%)	0,220
	(+)	9 (47,4%)	7 (28%)	
mTOR	(-)	17 (85%)	21 (84%)	1,000
	(+)	3 (15%)	4 (16%)	
CXCR4	(-)	10 (50%)	15 (60%)	0,557
	(+)	10 (50%)	10 (40%)	
CXCL12m	(-)	2 (10,5%)	10 (40%)	0,042*
	(+)	17 (89,5%)	15 (60%)	
CXCL12c	(-)	16 (84,2%)	22 (88%)	1,000
	(+)	3 (15,8%)	3 (12%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p \leq 0,05$. m (membranar); c (citoplasmática)

As Tabelas 6, 7, 9, 12 e 13 a seguir mostram, respectivamente, a associação entre a expressão de CXCR1, CCR7, mTOR, CXCR4 e CXCL12 em células neoplásicas e as variáveis clínico-patológicas de grau histológico,

invasão linfocascular, TNM (N e M), resposta à quimioterapia, resposta patológica completa e recidiva em cânceres de mama triplo-negativos.

4.1 CXCR1

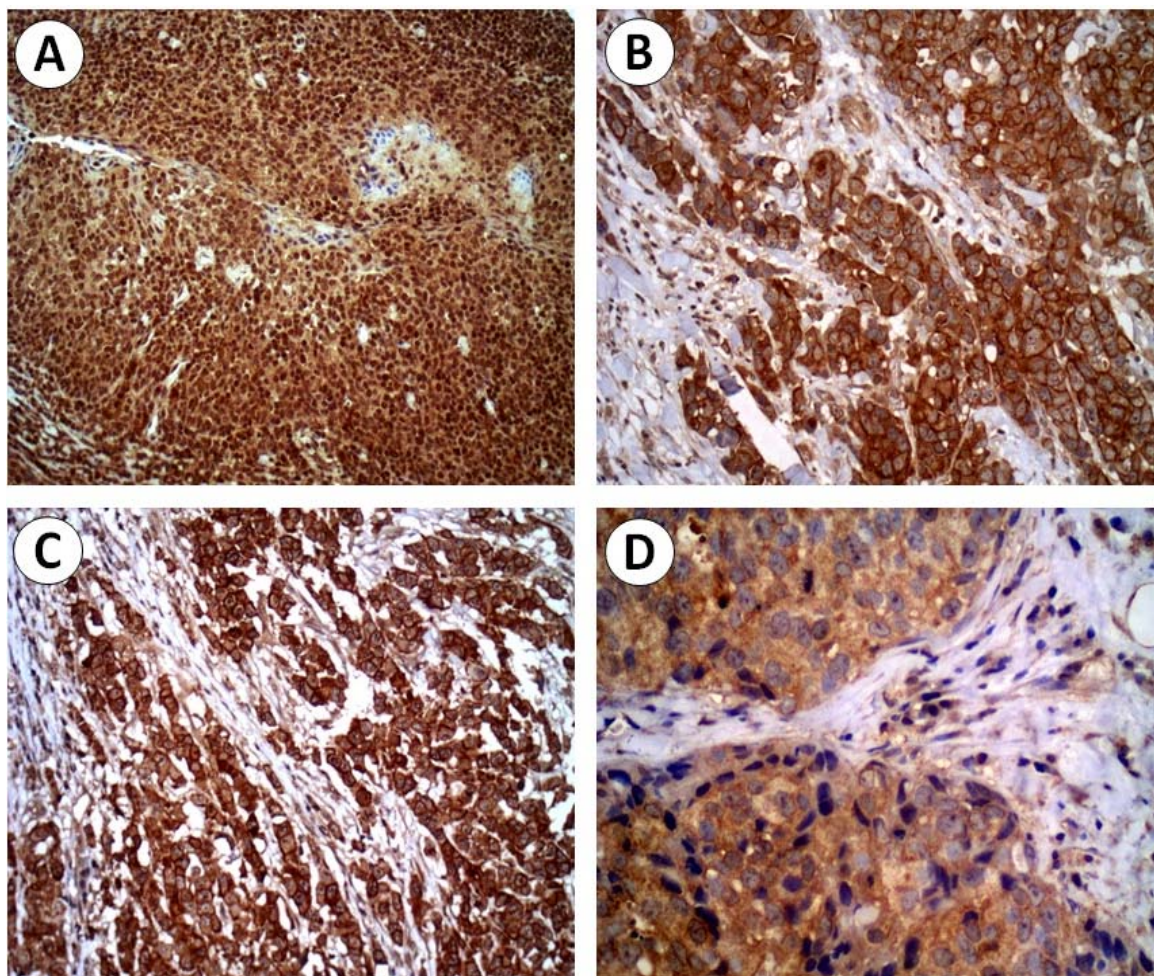
O padrão de expressão de CXCR1, tanto membranar quanto citoplasmático, foi constante nas associações com as variáveis clínico-patológicas. A imunoexpressão citoplasmática deste receptor (Tabela 6) foi mais frequente nos tumores que não apresentaram resposta patológica completa ($p=0,028$), bem como se associou com maior recidiva ($p=0,050$).

Tabela 6 - Correlação entre a expressão de CXCR1 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de CXCR1m		p	Expressão de CXCR1c		p
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Grau Histológico						
Bem diferenciado	2 (4,9%)	1 (4,5%)	0,743	2 (9,1%)	1 (2%)	0,122
Moderadamente	13 (31,7%)	5 (22,7%)		4 (18,2%)	19 (38,8%)	
Pouco Diferenciado	26 (63,4%)	16 (72,7%)		16 (72,7%)	29 (59,2%)	
ILV						
Ausente	22 (61,1%)	11 (52,4%)	0,585	7 (41,2%)	28 (60,9%)	0,253
Presente	14 (38,9%)	10 (47,6%)		10 (58,8%)	18 (39,1%)	
N						
N0 – N1	29 (78,4%)	13 (81,2%)	1,000	16 (78,9%)	34 (69,4%)	0,553
N2 – N3	8 (21,6%)	3 (18,8%)		4 (21,1%)	15 (30,6%)	
M						
M0	36 (94,6%)	16 (100%)	0,638	19 (100%)	43 (86%)	0,228
M1	1 (2,7%)	0 (0%)		0 (0%)	6 (12%)	
Resposta a QT						
Ausente	2 (16,7%)	2 (66,7%)	0,154	1 (16,7%)	5 (25%)	1,000
Presente	10 (83,3%)	1 (33,3%)		5 (83,3%)	15 (75%)	
RCp						
Não	9 (75%)	2 (66,7%)	1,000	3 (50%)	19 (95%)	0,028*
Sim	3 (25%)	1 (33,3%)		3 (50%)	1 (5%)	
Recidiva						
Não	42 (95,5%)	18 (85,7%)	0,318	23 (100%)	43 (82,7%)	0,050
Sim	2 (4,5%)	3 (14,3%)		0 (0%)	9 (17,3%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p < 0,05$. m (membranar); c (citoplasmática); ILV (Invasão Linfovacular); QT (Quimioterapia); RCp (Resposta Patológica Completa).

À análise imunoistoquímica, tanto o controle positivo (tonsila palatina) quanto as células tumorais apresentaram marcação de moderada a intensa, sendo esta visível no citoplasma bem como na membrana (Figura 6).



A - Controle positivo para CXCR1. Marcação positiva membranar e citoplasmática em linfócitos da tonsila palatina.

B - CXCR1. Marcação membranar intensa e citoplasmática discreta em células tumorais.

C - Neste caso a marcação de CXCR1 é intensa tanto no citoplasma quanto na membrana.

D - CXCR1. Observa-se em grande detalhe a marcação exclusiva citoplasmática e de moderada a intensa na ausência de expressão membranar.

Figura 6 - Expressão membranar e citoplasmática de CXCR1 em células tumorais da mama e na tonsila palatina (todos em aumento de 200x).

4.2 CCR7

De modo semelhante ao encontrado para CXCR1, a marcação citoplasmática de CCR7c também associou-se com maior incidência de recidiva ($p=0,033$) (Tabela 7). Todavia, não houve associação com as outras

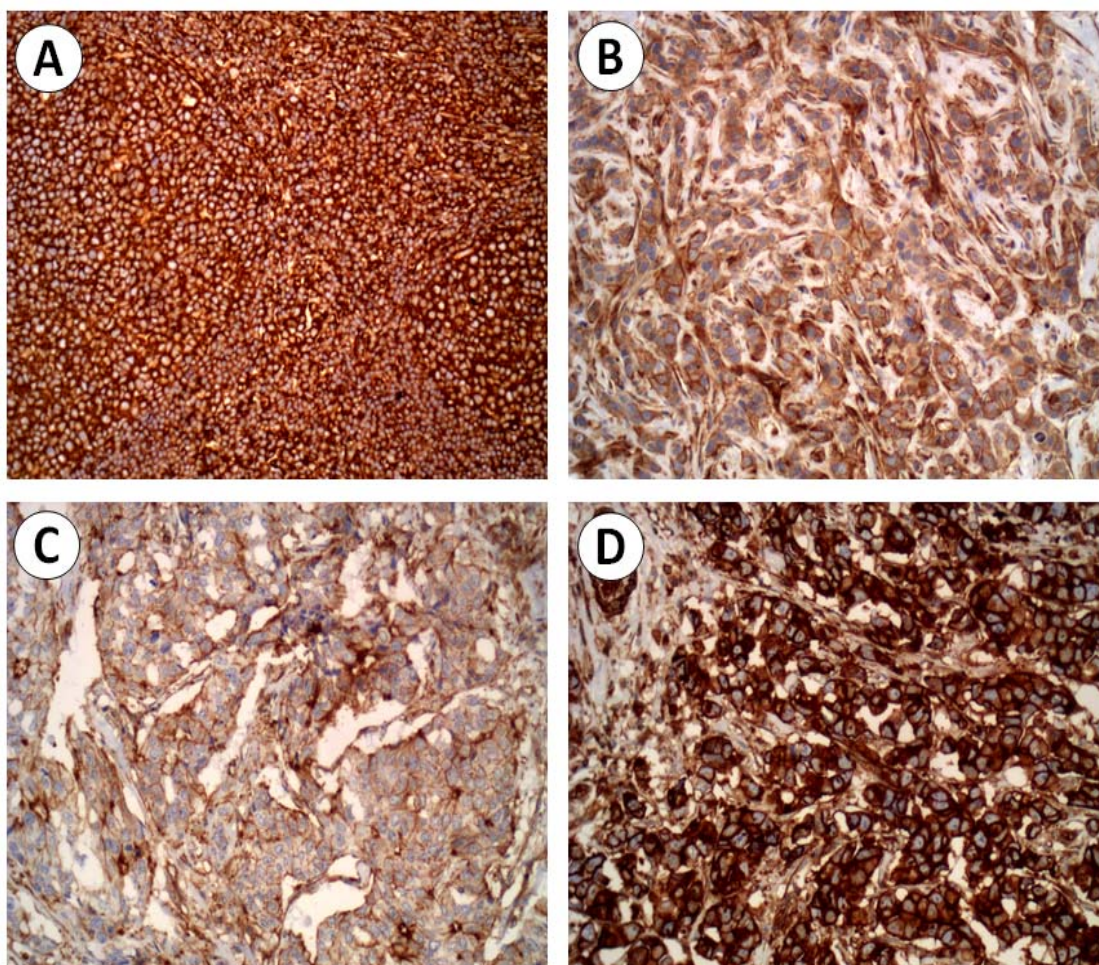
variáveis estudadas como, por exemplo, IVL ($p=0,620$) ou resposta à quimioterapia ($p=1,000$).

Tabela 7 - Correlação entre a expressão de CCR7 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de CCR7m		p	Expressão de CCR7c		p
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Grau Histológico						
Bem diferenciado	0 (0%)	3 (4,8%)	0,329	2 (4,9%)	1 (3,4%)	0,939
Moderadamente	4 (57,1%)	19 (30,2%)		13 (31,7%)	10 (34,5%)	
Pouco Diferenciado	3 (42,9%)	41 (65,1%)		26 (63,4%)	18 (62,1%)	
ILV						
Ausente	2 (28,6%)	33 (55,9%)	0,240	21 (56,8%)	14 (48,3%)	0,620
Presente	5 (71,4%)	26 (44,1%)		16 (43,2%)	15 (51,7%)	
N						
N0 – N1	6 (85,7%)	46 (73%)	0,668	29 (76,3%)	23 (71,9%)	0,786
N2 – N3	1 (14,3%)	17 (27%)		9 (23,7%)	9 (28,1%)	
M						
M0	6 (75%)	57 (90,5%)	0,299	32 (82,1%)	31 (96,9%)	0,140
M1	2 (25%)	5 (7,9%)		6 (15,4%)	1 (3,1%)	
Resposta a QT						
Ausente	1 (33,3%)	5 (21,7%)	1,000	2 (18,2%)	4 (26,7%)	1,000
Presente	2 (66,7%)	18 (78,3%)		9 (81,8%)	11 (73,3%)	
RCp						
Não	3 (100%)	19 (82,6%)	1,000	8 (72,7%)	14 (93,3%)	0,279
Sim	0 (0%)	4 (17,4%)		3 (27,3%)	1 (6,7%)	
Recidiva						
Não	7 (85,7%)	59 (88,1%)	1,000	41 (95,3%)	25 (78,1%)	0,033*
Sim	1 (12,5%)	8 (11,9%)		2 (4,7%)	7 (21,9%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p \leq 0,05$. m (membranar); c (citoplasmática). ILV (Invasão Linfovacular); QT (Quimioterapia); RCp (Resposta Patológica Completa)

Como é possível observar na Figura 7, a expressão de CCR7 variou de discreta à intensa na membrana e no citoplasma das células neoplásicas.



A - Controle positivo. Marcação membranar positiva em linfócitos da tonsila palatina histologicamente normal.

B - Expressão positiva membranar moderada e citoplasmática discreta para este receptor de membrana.

C - Intensa marcação membranar em células de carcinoma mamário; sem marcação citoplasmática.

D - No presente caso, a marcação pelo anticorpo foi acentuada tanto na membrana quanto no citoplasma.

Figura 7 - Expressão membranar e citoplasmática de CCR7 em células de carcinoma mamário e na tonsila palatina (todos em aumento de 200x).

Vale ressaltar que a sobrevida global foi definida como o intervalo em meses entre a data da cirurgia e a data da morte por qualquer causa. A mediana de seguimento entre os pacientes vivos foi de 29,4 meses, e a sobrevida global em três anos foi de 75% nas pacientes que expressavam CCR7c, contrastando significativamente com uma maior sobrevida quando

da ausência da expressão. Portanto, o risco de morte no grupo que expressava o receptor no citoplasma foi 2,5 maior ($p=0,047$). (Tabela 8; Figura 8).

Tabela 8 - Sobrevida global em três anos de acordo com o padrão de expressão de CCR7c.

Sobrevida	SG – 3A	HR	p
CCR7c			
(+)	75%	2,5	0,047
(-)	89%	(1,1 – 7,0)	

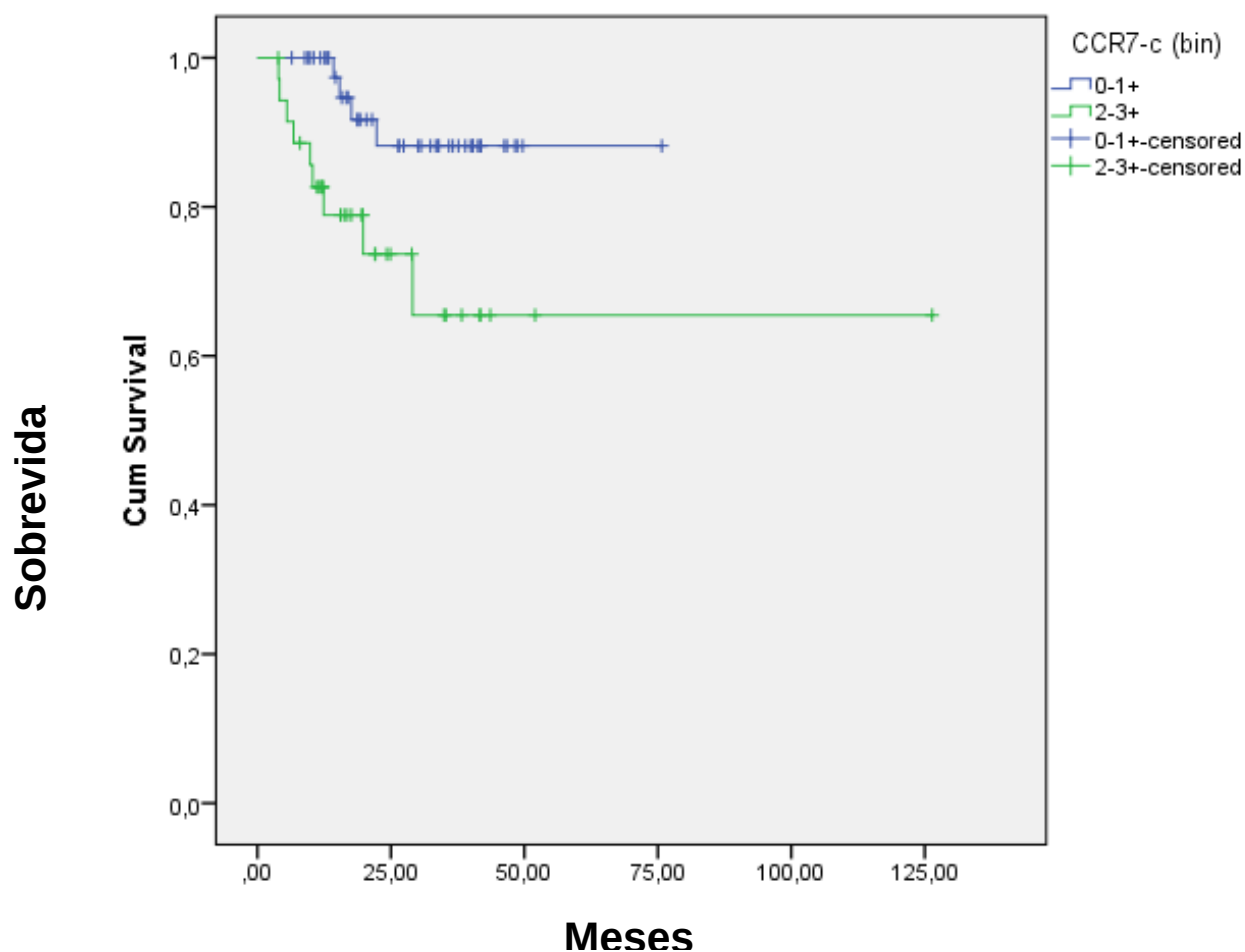


Figura 8 - Sobrevida global de acordo com a expressão de CCR7c.

4.3 mTOR

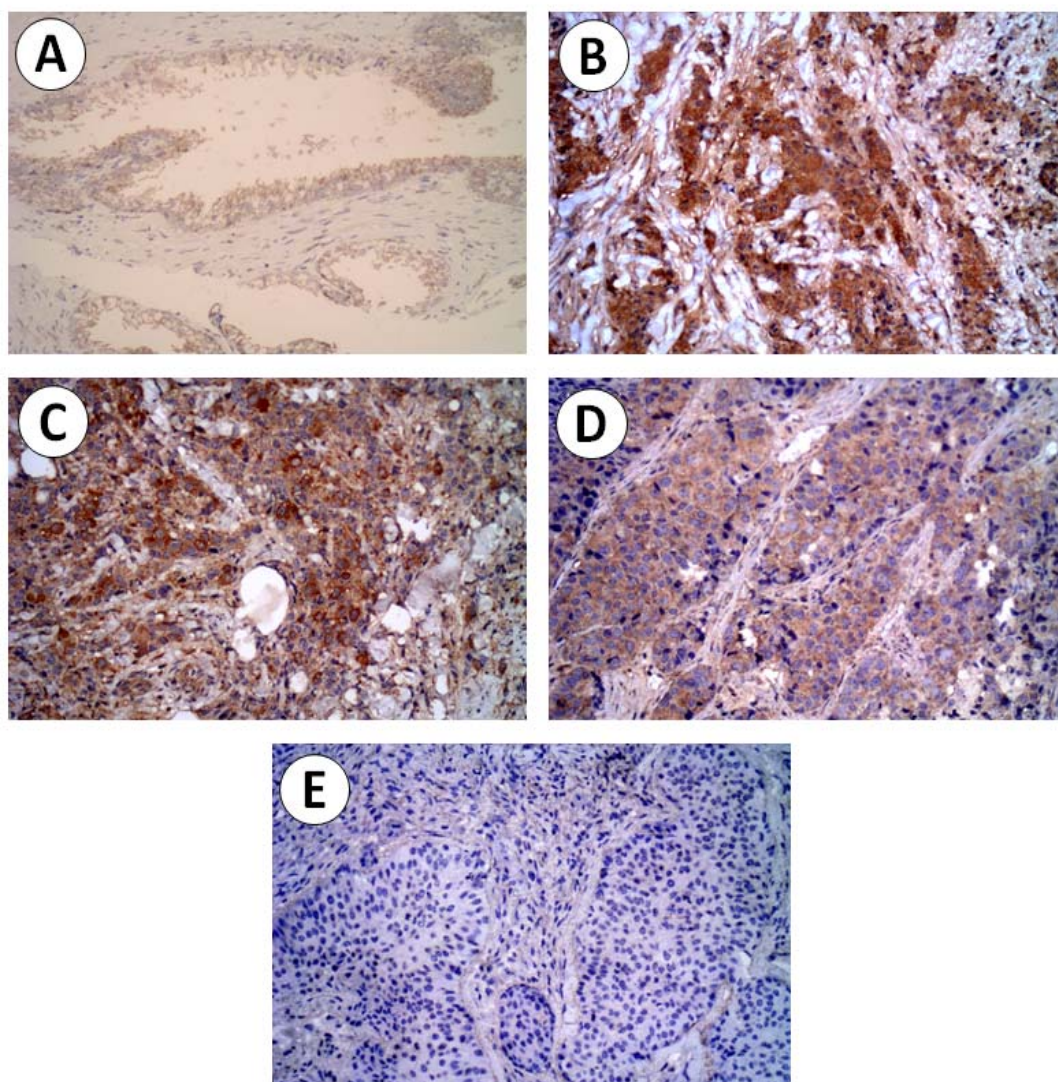
Assim como foi identificado para CXCR1c e CCR7c, a maior imunoeexpressão de mTOR mostrou-se associada com maior probabilidade de recidiva ($p=0,016$) (Tabela 9). Entretanto, não houve associação com as outras variáveis estudadas, como grau histológico ($p=0,345$) ou RCp ($p=0,372$), por exemplo.

Tabela 9 - Correlação entre a expressão de mTOR e as variáveis clínico patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de mTOR		p
	(-)	(+)	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	2 (4,3%)	1 (3,7%)	0,345
Moderadamente	18 (38,3%)	6 (22,2%)	
Pouco Diferenciado	27 (57,4%)	20 (74,1%)	
ILV			
Ausente	26 (60,5%)	11 (44%)	0,215
Presente	17 (39,5%)	14 (56%)	
N			
N0 – N1	32 (76,2%)	21 (65,5%)	0,436
N2 – N3	10 (23,8%)	11 (34,4%)	
M			
M0	39 (90,7%)	28 (87,5%)	0,505
M1	4 (9,3%)	3 (9,4%)	
Resposta a QT			
Ausente	2 (20%)	5 (25%)	1,000
Presente	8 (80%)	15 (75%)	
RCp			
Não	7 (70%)	17 (85%)	0,372
Sim	3 (30%)	3 (15%)	
Recidiva			
Não	47 (94%)	22 (73,3%)	0,016*
Sim	3 (6%)	8 (26,7%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p < 0,05$. ILV (Invasão Linfovacular); QT (Quimioterapia); RCp (Resposta Patológica Completa)

À análise imunoistoquímica, a expressão celular de mTOR nas células tumorais variou desde ausência de imunomarcacão, passando por expressão membranar discreta até a marcação citoplasmática intensa (Figura 9).



A - Marcação positiva membranar e citoplasmática em células epiteliais luminais de próstata normal.
 B - Marcação citoplasmática intensa em cordões de células cancerosas mamárias.
 C - Imunoexpressão citoplasmática intensa em < 50% das células tumorais (score 2 – expressão moderada).
 D - Expressão membranar discreta na ausência de expressão citoplasmática.
 E - Caso de carcinoma mamário em que não houve expressão para mTOR.

Figura 9 - Expressão membranar e citoplasmática de mTOR em próstata normal e células cancerosas mamárias (todos em aumento de 200x).

De modo similar ao descrito para CCR7c, a sobrevida global em três anos foi de 72% nos tumores que expressavam mTOR. Desse modo, o risco de morte no grupo com imunomarcacão para mTOR foi 2,5 vezes maior ($p=0,032$). (Tabela 10; Figura 10).

Tabela 10 - Sobrevida global em três anos de acordo com o padrão de expressão de mTOR

Sobrevida	SG – 3A	HR	p
mTOR			
(+)	72%	2,5	0,032
(-)	89%	(1,1 – 6,3)	

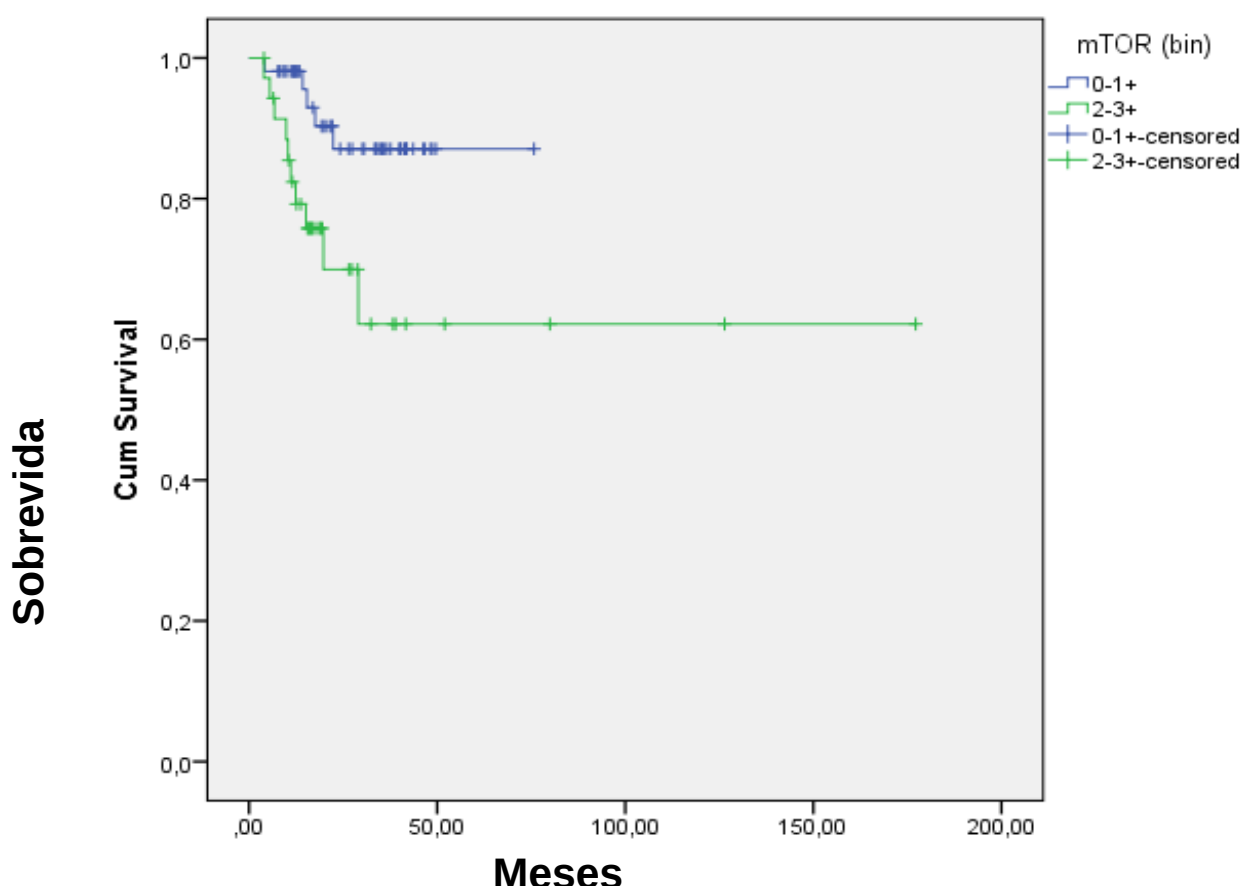


Figura 10 - Sobrevida global de acordo com a expressão de mTOR.

A tabela a seguir mostra a associação entre mTOR com a expressão de quimiocina, receptores e células CD68⁺ em tumores de mama triplo-negativo. Verificou-se uma associação positiva entre a expressão de CCR7c e mTOR (p=0,003). Valores limítrofes foram encontrados na associação do mTOR com CXCR1c (p=0,068) e a intensidade de células CD68⁺ (p=0,083).

Tabela 11 - Associação entre o perfil de expressão de mTOR, quimiocina, receptores e células CD68⁺ em tumores de mama triplo-negativo.

Marcador	mTOR		p
	(-)	(+)	
CXCR1m			
(-)	30 (66,7%)	15 (33,3%)	0,412
(+)	17 (77,3%)	5 (22,7%)	
CXCR1c			
(-)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	0,068
(+)	35 (58,3%)	25 (41,7%)	
CCR7m			
(-)	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0,477
(+)	46 (62,2%)	28 (37,8%)	
CCR7c			
(-)	37 (77,1%)	11 (22,9%)	0,003*
(+)	16 (45,7%)	19 (54,3%)	
CXCR4			
(-)	27 (61,4%)	17 (38,6%)	0,932
(+)	26 (60,5%)	17 (39,5%)	
CXCL12m			
(-)	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0,289
(+)	30 (75%)	10 (25%)	
CXCL12c			
(-)	45 (66,2%)	23 (33,8%)	0,252
(+)	7 (50%)	7 (50%)	
CD68 quantitativo			
(-)	21 (84%)	4 (16%)	0,684
(+)	17 (89,5%)	2 (10,5%)	
CD68 intensidade			
(-)	36 (90%)	4 (10%)	0,083
(+)	2 (50%)	2 (50%)	
CD68 localização			
Peritumoral	26 (89,7%)	3 (10,3%)	0,189
Intratumoral	3 (60%)	2 (40%)	
Peri + Intra	9 (90%)	1 (10%)	

p = Teste exato de Fisher.

4.4 CXCR4 / CXCL12

Na avaliação das associações entre o receptor CXCR4 e sua respectiva quimiocina ligante CXCL12 com as variáveis clínico patológicas não foram identificadas quaisquer associações significativas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Correlação entre a expressão de CXCR4 e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de CXCR4		p
	(-)	(+)	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	2 (5%)	1 (2,8%)	0,886
Moderadamente	13 (32,5%)	12 (33,3%)	
Pouco Diferenciado	25 (62,5%)	23 (63,9%)	
ILV			
Ausente	19 (51,4%)	20 (58,8%)	0,635
Presente	18 (48,6%)	14 (41,2%)	
N			
N0 – N1	27 (75%)	29 (74,4%)	1,000
N2 – N3	9 (25%)	10 (25,6%)	
M			
M0	32 (88,9%)	36 (90%)	0,557
M1	3 (8,3%)	4 (10%)	
Resposta a QT			
Ausente	2 (15,4%)	6 (31,6%)	0,420
Presente	11 (84,6%)	13 (68,4%)	
RCp			
Não	9 (62,9%)	16 (84,2%)	0,401
Sim	4 (30,8%)	3 (15,8%)	
Recidiva			
Não	38 (90,5%)	33 (84,6%)	0,510
Sim	4 (9,5%)	6 (15,4%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p \leq 0,05$. ILV (Invasão Linfovacular); QT (Quimioterapia); RCp (Resposta Patológica Completa)

Tabela 13 - Correlação entre a expressão de CXCL12 (membranar e citoplasmático) e as variáveis clínico-patológicas em células neoplásicas do câncer de mama triplo-negativo.

Variáveis clínico-patológicas	Expressão de CXCL12m		p	Expressão de CXCL12c		p
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Grau Histológico						
Bem diferenciado	0 (0%)	3 (7,5%)	0,204	2 (3,4%)	1 (8,3%)	0,458
Moderadamente	4 (18,2%)	12 (30%)		19 (32,2%)	2 (16,7%)	
Pouco Diferenciado	18 (81,8%)	25 (62,5%)		38 (64,4%)	9 (75%)	
ILV						
Ausente	12 (52,2%)	22 (61,1%)	0,592	30 (54,5%)	7 (53,8%)	1,000
Presente	11 (47,8%)	14 (38,9%)		25 (45,5%)	6 (46,2%)	
N						
N0 – N1	14 (70%)	28 (87,5%)	0,156	41 (70,7%)	9 (81,8%)	0,715
N2 – N3	6 (30%)	4 (12,5%)		17 (29,3%)	2 (18,2%)	
M						
M0	19 (95%)	31 (96,9%)	0,328	51 (86,4%)	11 (100%)	0,431
M1	1 (5%)	0 (0%)		7 (11,9%)	0 (0%)	
Resposta a QT						
Ausente	2 (28,6%)	1 (16,7%)	1,000	3 (15%)	2 (50%)	0,179
Presente	5 (71,4%)	5 (83,3%)		17 (85%)	2 (50%)	
RCp						
Não	6 (85,7%)	4 (66,7%)	0,559	17 (85%)	4 (100%)	1,000
Sim	1 (14,3%)	2 (33,3%)		3 (15%)	0 (0%)	
Recidiva						
Não	23 (95,8%)	37 (90,2%)	0,644	55 (88,7%)	12 (85,7%)	0,688
Sim	1 (4,2%)	4 (9,8%)		7 (11,3%)	2 (14,3%)	

p = Teste exato de Fisher. * $p \leq 0,05$. m (membranar); c (citoplasmática); ILV (Invasão Linfocelular); QT (Quimioterapia); RCp (Resposta Patológica Completa)

4.5 CD68 / CD3

Na análise da frequência de casos com infiltração de células CD68 e CD3 positivas (Tabela 14) não houve diferença entre negatividade e positividade na comparação dos biomarcadores, bem como não houve diferença significativa na comparação entre moderada *versus* pouca quantidade de células (escores 1 e 2). No entanto, ao compararmos os subgrupos positivos com numerosas células (escore 3) *versus* os subgrupos de pouca ou moderada quantidade de células (escores 1 + 2), o CD3 apresenta uma frequência muito superior de numerosas células em relação ao CD68.

Tabela 14 – Frequência de casos com infiltração de células CD68 e CD3 positivas.

Biomarcadores	CD68	CD3	P
Positivas	47 (54%)	48 (55%)	
1. Poucas	27 (57,4%)	17 (35,4%)	P<0,0001*
2. Moderadas	18 (38,3%)	9 (18,8%)	
3. Numerosas	2 (4,3%)	22 (45,8%)	
Negativas	40 (46%)	39 (45%)	

p = Teste exato de Fisher. *Diferença significativa nas comparações entre os subgrupos positivos: 3 vs 1+2; 3 vs 1; 2 vs 3. Não houve diferenças entre 2 vs 1 ($p=0,8006$).

Houve uma associação inversa entre o perfil de imunoexpressão para CXCR4 e CD68 ($p=0,003$), havendo assim um predomínio de células CD68(+) que também são CXCR4(-). A maior positividade de CXCL12m foi associada à maior expressão de CD3 na região peritumoral quando comparada à região intratumoral. Ao mesmo tempo células negativas para CXCL12, marcadas para CD3, são predominantes na região intratumoral comparadas à peritumoral (Tabela 15). Tais achados limitam o nosso entendimento do impacto clínico, pois não houve correlação com as variáveis clínico patológicas. Não houve, ainda, associação entre os dados clínico patológicos e a imunoexpressão para CD68 ou imunolocalização de CD3 (dados não mostrados).

Tabela 15 - Associação entre a expressão de marcadores de células inflamatórias e CXCR1, CCR7, mTOR, CXCR4 e CXCL12 em tumores de mama triplo-negativo.

Células Inflamatórias		(-)	(+)	p	(-)	(+)	p
CD68 quant	CXCR1m			0,268	CXCR1c		0,821
	(-)	15 (52%)	14 (48%)		11 (61%)	7 (39%)	
	(+)	11 (69%)	5 (31%)		15 (58%)	11 (42%)	
	CCR7m			0,306	CCR7c		1,000
	(-)	1 (25%)	3 (75%)		16 (55%)	13 (45%)	
	(+)	23 (59%)	16 (41%)		8 (57%)	6 (43%)	
	mTOR			0,684	-		-
	(-)	21 (55%)	17 (45%)		-	-	
	(+)	4 (67%)	2 (33%)		-	-	
	CXCR4			0,003*	-		-
	(-)	10 (38%)	16 (62%)		-	-	
	(+)	16 (84%)	3 (16%)		-	-	
CD3 local	CXCL12m			0,357	CXCL12c		0,680
	(-)	7 (47%)	8 (53%)		20 (54%)	17 (46%)	
	(+)	18 (62%)	11 (38%)		5 (71%)	2 (29%)	
	CXCR1m			0,735	CXCR1c		0,435
	Peri	16 (53%)	11 (65%)		8 (47%)	19 (65%)	
	Int	10 (33%)	4 (23%)		7 (41%)	7 (24%)	
	Peri+Int	4 (13%)	2 (12%)		2 (12%)	3 (10%)	
	CCR7m			0,665	CCR7c		0,722
	Peri	2 (40%)	25 (61%)		17 (59%)	10 (59%)	
	Int	2 (40%)	11 (27%)		9 (31%)	4 (23%)	
	Peri+Int	1 (20%)	5 (12%)		3 (10%)	3 (18%)	
	mTOR			0,432	-		-
	Peri	24 (60%)	3 (37%)		-	-	
	Int	11 (27%)	4 (50%)		-	-	
	Peri+Int	5 (12%)	1 (12%)		-	-	
	CXCR4			0,358	-		-
	Peri	14 (52%)	13 (62%)		-	-	
	Int	8 (30%)	7 (33%)		-	-	
	Peri+Int	5 (18%)	1 (5%)		-	-	
	CXCL12m			0,029*	CXCL12c		0,435
	Peri	4 (31%)	22 (69%)		22 (58%)	4 (57%)	
	Int	5 (38%)	8 (25%)		10 (26%)	3 (43%)	
	Peri+Int	4 (31%)	2 (6%)		6 (16%)	0 (0%)	

p = Teste exato de Fisher. Peri = Peritumoral; Int = Intratumoral; Quant = Quantitativo; Local = Localização. m (membranar); c (citoplasmática)

5 DISCUSSÃO

Um aspecto potencialmente relevante para a migração celular tumoral e não tumoral é a expressão de quimiocinas. Assim, no presente estudo, investigamos se quimiocinas, como CXCL12 e receptores CXCR1, CCR7 e CXCR4 contribuiriam para um pior desfecho clínico em pacientes com CMTN.

Adicionalmente, verificou-se associação da expressão de receptores de quimiocinas e/ou da proteína mTOR com modificação da resposta patológica completa ao tratamento, bem como com o desenvolvimento de recidiva tumoral. Estes achados impactaram diretamente na redução da sobrevida das pacientes.

Os CMTN podem ser definidos como um grupo heterogêneo de tumores que apresentam biologia agressiva, altas taxas de recidiva e menor sobrevida global com características clínicas comuns que os diferenciam dos demais tipos de tumores de mama (PALMA et al. 2015). Os CMTN permanecem a desafiar o tratamento clínico para os tumores de mama na medida em que há dificuldades em se estabelecer marcadores bioquímicos e imuno-histoquímicos capazes de identificar seus subtipos e de auxiliar no tratamento sistêmico, haja vista a limitação no arsenal quimioterápico atualmente disponível que seja específico no combate deste tipo de câncer de mama (BROUCKAERT et al. 2012; BIANCHINI et al. 2016).

Tais achados corroboram as informações da literatura, conforme relatado por TARIQ et al. (2014) que identificaram em mulheres com CMTN uma idade mediana ao diagnóstico de 59 anos e para aquelas não CMTN a idade foi de 60 anos. Resultados semelhantes foram identificados no estudo de BAUER et al. (2007) que em uma amostra de 6370 mulheres com tumores triplo-negativos a idade mediana ao diagnóstico foi de 54 anos. Além disso, aproximadamente 63% destas pacientes foram diagnosticadas antes dos 60 anos (BAUER et al. 2007). Já ONITILO et al. (2009) encontraram uma idade média de 62,7 anos ao avaliarem 1134 casos de carcinoma invasivo da mama, entretanto ao estratificarem para os casos triplo-negativos identificaram uma idade de 58,1 anos, semelhante aos nossos achados.

Alguns estudos definem a idade de até 35 anos como sendo o ponto de corte para classificar o câncer de mama em mulheres jovens (CANCELLO et al. 2010; HAN e KANG 2010). O diagnóstico nas primeiras décadas de vida é associado com um perfil mais agressivo e com menor sobrevida livre de doença (LIU et al. 2014).

Geralmente, os tumores mamários neste público são pouco diferenciados, possuem baixa expressão de receptores hormonais e mais invasão linfovascular, o que possivelmente confere a estes tumores um comportamento biológico de maior agressividade (IWASE et al. 2010). Em nossa amostra, 60,9% dos tumores apresentaram-se como pouco diferenciados e quase a metade (46,4%) dos mesmos tiveram invasão linfovascular.

Adicionalmente, no presente estudo a sobrevida mediana não foi atingida já que menos de 50% da amostra foi a óbito durante o seguimento avaliado. Uma das possíveis razões para tal fato possivelmente seja o tempo de seguimento das pacientes, havendo a necessidade de maior acompanhamento para também se alcançar maior significância estatística. Já a sobrevida global em dois, três e cinco anos foi de 92%, 81% e 72%, respectivamente. Na China, LIU et al. (2014) estudaram 216 casos de CMTN e verificaram que as pacientes com idade ≤ 35 anos tiveram pior sobrevida livre de doença quando comparadas ao grupo ≥ 35 anos (em cinco anos: 67.2% vs. 78.9%, $p=0,031$), todavia não houve diferença significativa na sobrevida geral (em cinco anos: 70.5% vs. 79.4%, $p=0,075$). Dados de sobrevida parecidos foram encontrados nos resultados das 251 pacientes com tumores triplo-negativos avaliadas no trabalho de CANCELO et al. (2010). Em conjunto, os autores sugeriram que o tamanho do tumor, o estadiamento clínico e a metástase linfonodal podem ser importantes preditores da sobrevida geral.

O aspecto clínico de maior agressividade associado aos tumores triplo-negativos pode estar correlacionado com suas características histológicas. Identificamos em nossa amostra tumores ductais em maior quantidade (91,8%), com grau histológico mais avançado. Achados similares também foram reportados por MONTAGNA et al. (2013) que encontraram 89% de tumores ductais mais avançados nos 781 casos de triplo-negativos avaliados e associaram estes fatores a piores desfechos clínicos.

Os carcinomas mamários invasivos permanecem como alvos de pesquisas que buscam compreender os mecanismos pelos quais estes tumores conseguem progredir e formar metástases. Frequentemente, apresentam alto grau histológico, elevada taxa mitótica, zonas geográficas de necrose e infiltrado linfocítico no estroma (VOLINIA et al. 2012), ou seja, um conjunto de características biológicas que convergem para o entendimento do seu perfil evolutivo. Adicionalmente, a capacidade das células dos cânceres ductais de sobreviverem em microambiente de elevado estresse oxidativo, bem como à hipóxia e à privação de nutrientes, talvez sejam passos fundamentais para a malignidade (ESPINA e LIOTTA 2011).

Ao avaliar a influência pró-invasiva da matriz extracelular e de células não tumorais, LYONS et al. (2011) sugeriram que a involução da glândula mamária após a gravidez poderia favorecer a formação de um fenótipo invasivo de carcinomas devido à deposição de colágeno intratumoral bem como pela maior expressão de ciclooxigenase-2. Além disso, já é sabido que a interação entre as células tumorais e estromais em um microambiente pró-inflamatório propicia maior síntese de citocinas e potencializa as interações entre as células. Neste sentido, as citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, G-CSF (CHAVEY et al. 2007) e o fator de crescimento TGF- β 2 (DAVE et al. 2011) já foram identificadas como superexpressos em tumores ductais, mas não no parênquima mamário normal.

Nossa amostra apresentou invasão linfovascular em 46,4% dos casos e recidiva sistêmica em 18,5%, especialmente pleuro-pulmonar. Estes fatores, principalmente se associados à pior resposta à quimioterapia,

podem conduzir a um pior prognóstico. Neste sentido, UGRAS et al. (2014) afirmaram que todos os subtipos de câncer de mama podem ser independentemente associados à invasão linfovascular, sendo os tumores triplo-negativos aqueles com menor associação com este parâmetro, o que poderia ser um fator que auxiliaria na explicação da menor incidência de positividade linfonodal encontrada em algumas coortes. Em contrapartida, outros estudos apontam que há uma maior taxa de recidiva local nos CMTN quando comparados a outros subtipos tumorais, sem diferenças com relação ao tipo de tratamento local da mama (ABDULKARIM et al. 2011; ZUMSTEG et al. 2013; GANGI et al. 2014).

Nossos achados diferem de outros autores na medida em que encontramos valores maiores de invasão linfovascular. No estudo de OVCARICEK et al. (2011), ao avaliarem 269 casos de CMTN, os autores encontraram 24,7% dos casos apresentando tal invasão, sendo estes achados semelhantes aos publicados por MOHAMMED et al. (2011) que identificaram uma frequência de invasão linfovascular mais alta em tumores triplo-negativos (26/99; 26%) do que entre os não triplo-negativos (73/334; 22%). Estes últimos autores destacam que a invasão linfovascular tem sido associada com tumores de grande potencial metastático, bem como é um fator de risco para o desenvolvimento de recidiva e também de morte. Em contrapartida, os mesmos autores encontraram taxas de recidiva que são praticamente o dobro da verificada em nosso estudo, sendo 38% para tumores basaloides (74/197) e 36% para os não-basaloides (71/200).

Na medida em que há mais invasões linfovasculares em uma amostra, espera-se que também haja mais recidivas, todavia identificamos uma relação inversa e atribuímos que tal achado se deve possivelmente à mediana de seguimento entre os pacientes vivos (29,4 meses). Ou seja, uma maior tempo de seguimento possivelmente revelaria maiores taxas de recidiva.

5.1 CXCR1

O receptor CXCR1 está envolvido em diversas etapas da carcinogênese, atuando diretamente na sobrevivência da célula neoplásica e na sua capacidade de invasão, angiogênese e até metástase (LIU et al. 2015). GINESTIER et al. (2010), ao bloquearem este receptor com anticorpo anti-CXCR1 ou repertaxina em duas linhagens de células de câncer de mama, identificaram perda de viabilidade celular e maior estímulo a apoptose, retardando assim o crescimento tumoral e reduzindo a metástase. A sua atividade, bem como a de várias outras quimiocinas e receptores presentes no microambiente tumoral, pode estar diretamente relacionada às variáveis clínico-patológicas como, por exemplo, a resposta patológica completa (RCp). Vários estudos têm demonstrado que os pacientes que alcançam este parâmetro clínico, após quimioterapia neoadjuvante, cursam com melhores desfechos clínicos a longo prazo (RASTOGI et al. 2008; PENNISI et al. 2016).

RCp pode ser definida como a ausência de câncer residual invasivo na avaliação por hematoxilina e eosina de amostra de mama ressecada bem como de todos os gânglios linfáticos regionais, após a conclusão da terapia sistêmica neoadjuvante (EDGE et al. 2010). Nosso estudo identificou que a expressão citoplasmática de CXCR1 foi mais frequente nas pacientes que não apresentaram RCp ($p=0,028$). Os resultados de MURPHY et al. (2005) mostraram que expressão citoplasmática de CXCL8 (IL-8) e seus receptores (CXCR1 e CXCR2) se correlacionou com proliferação celular e densidade de microvasos no câncer de próstata. No mesmo estudo, a expressão de CXCR1 foi predominantemente membranar na próstata normal e citoplasmática no câncer de próstata. Além disso, também foi possível mostrar correlações positivas independentes entre a expressão citoplasmática de IL-8 e seus receptores tanto para a proliferação celular quanto para a angiogênese.

A avaliação da imunomarcação na mama normal, comparada à do tecido tumoral, se faz necessária para verificar o significado e a validade de nossos achados nos casos de câncer de mama triplo-negativo. Em nossa amostra, o CXCR1 citoplasmático passou de uma expressão exclusivamente positiva nas mamoplastias redutoras para um padrão predominantemente negativo de sua expressão no CMTN. Adicionalmente, CXCR1 citoplasmático foi mais frequente nas pacientes que não apresentaram RCp, bem como se associou com maior recidiva. Tais achados nos conduzem a hipótese de que o fato do receptor estar sendo expresso no citoplasma, e não externalizado na membrana celular para que possa exercer o seu efeito

biológico sinalizatório, faz com que sua função protetora seja perdida quando comparamos com a localização membranar nas pacientes que passaram por mamoplastia redutora (Figura 11). O mesmo raciocínio para o estabelecimento desta hipótese também poderá ser verificado a seguir para o receptor CCR7 e para a proteína mTOR.

De modo interessante, o estudo de HATTERMANN et al. (2014), ao avaliarem os efeitos da quimiocina CXCL12 em células MCF-7 de câncer de mama, sugeriram que tanto o CXCR4 quanto CXCR7 poderiam ser co-internalizados e ainda assim realizar a transdução de sinais e induzir efeitos biológicos parciais, independentemente, de um estímulo seletivo ou de um antagonista. Tais argumentos mostram aspectos diferentes aos propostos pela nossa hipótese e reforçam o conhecimento da grande plasticidade e heterogeneidade da massa tumoral na tentativa de buscar mecanismos que lhe permitam continuar a progredir. Possivelmente, a internalização de receptores seja um mecanismo adaptativo de algumas linhagens celulares e de determinados cânceres que possam conferir maior capacidade adaptativa frente às novas mutações que surgem durante a carcinogênese bem como frente à quimioterapia utilizada para eliminar a massa tumoral.

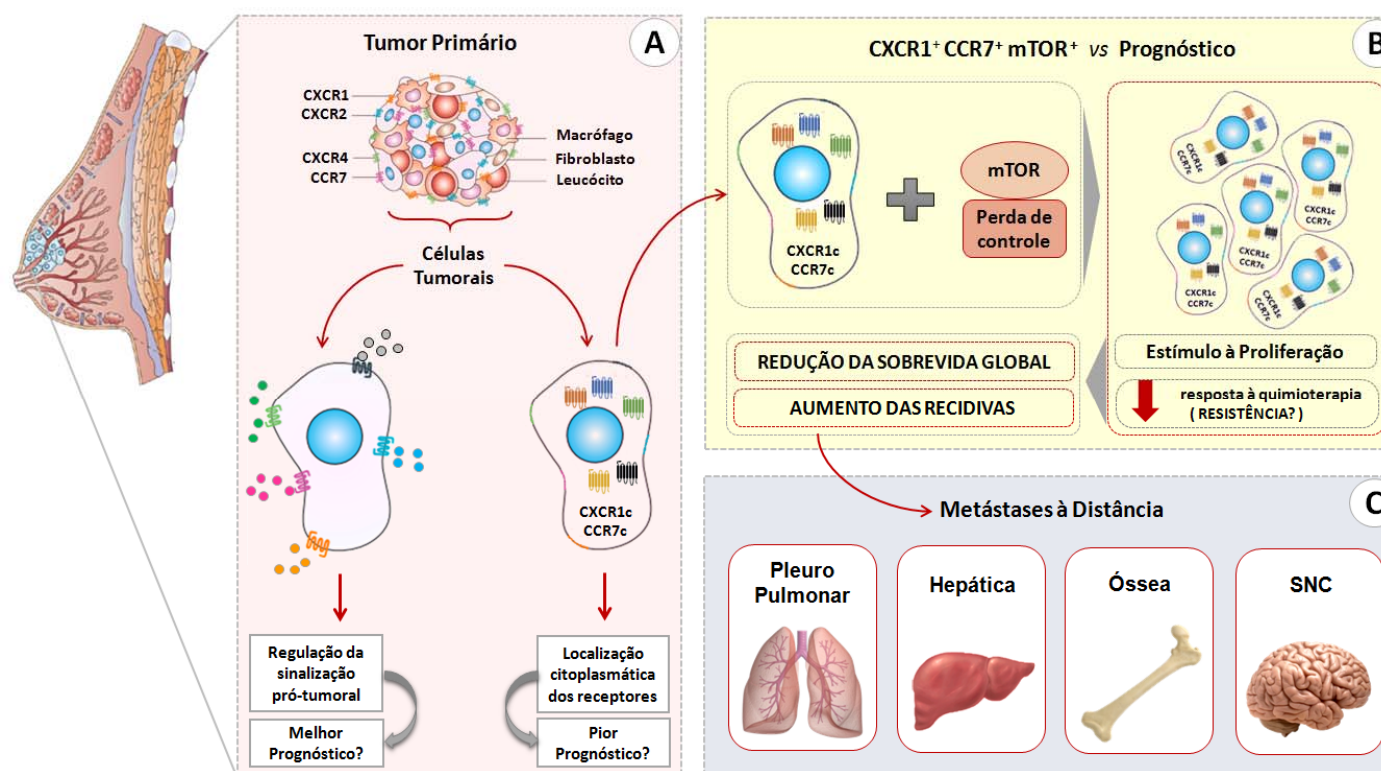


Figura 11 - Modelo hipotético da possível interferência no prognóstico mediada pela maior localização citoplasmática dos receptores CXCR1 e CCR7, na célula tumoral. A) No tumor primário, a expressão de CXCR1 e CCR7 pode conduzir a dois caminhos, dependendo da localização dos receptores: Presentes na membrana da célula tumoral podem contribuir negativamente com a regulação da sinalização pró-tumoral, favorecendo um melhor prognóstico ao paciente. Já a localização citoplasmática destes receptores poderia favorecer um pior prognóstico. B) A maior expressão de CXCR1c e CCR7c podem indicar uma perda do controle da função do mTOR com consequente maior proliferação celular tumoral e menor resposta à quimioterapia. Em conjunto, estas ações possivelmente contribuem para a redução da sobrevida global e aumento das recidivas. C) Tais achados conduzem a maior possibilidade de metástases à distância que, em nosso estudo, foram pleuro-pulmonar (15 casos), hepática (8 casos), óssea e de sistema nervoso central (7 casos cada uma).

5.2 CCR7

O receptor CCR7 está diretamente envolvido no desenvolvimento da resposta imunológica na medida em que medeia a migração de leucócitos para o foco inflamatório, ou microambiente tumoral, e interage com os seus ligantes (CCL19 e CCL21). Sua superexpressão já foi relatada em tumores primários de mama e pulmão, bem como em células metastáticas encontradas em gânglios linfáticos. Vários tipos de câncer podem apresentar o CCR7 e usá-lo para a proliferação e metástase (MATTERN et al. 1996; FÖRSTER et al. 2008). Além disso, a maior expressão deste receptor também já foi associada com limitação da sobrevida de pacientes com câncer de mama (TUTUNEA-FATAN et al. 2015).

De modo semelhante ao encontrado para CXCR1, a marcação citoplasmática de CCR7 em nossos achados também associou-se com maior incidência de recidiva ($p=0,033$). CZYSTOWSKA et al. (2012), ao avaliarem 67 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço quanto a presença de células T negativas ou positivas para o CCR7, encontraram após quatro anos de seguimento que a frequência de células T $CD8^+CCR7^+$ foi menor que 28% na amostra quando comparada ao controle normal, e isso gerou uma sobrevida livre de doença significativamente menor ($p=0,011$) além de ser preditor de recidiva da doença dentro de quatro anos. Mesmo com os avanços farmacológicos e clínicos incorporados nos últimos anos ao tratamento do câncer de mama, a recidiva e a resistência à terapia antineoplásica ainda permanecem como um

problema em busca de soluções, e este fato vem sendo cada vez mais atribuído às células-tronco tumorais. Tais células exibem características semelhantes às células-tronco, como a autorregeneração, quiescência e a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, o que lhes confere mais resistência e proporciona vantagens adaptativas frente às células cancerosas que já compõem a massa tumoral (VISVADER e LINDEMAN 2012).

Os tratamentos adjuvantes sistêmicos podem reduzir o risco de recidiva em aproximadamente 50%. Logo, a falha na terapêutica sistêmica pode contribuir com a recidiva e esta, provavelmente, se deve à persistência de células ou colônias destas contribuindo para doença residual mínima (CABIOGLU et al. 2009). Sendo assim, a possibilidade da realização de um painel imuno-histoquímico para algumas quimiocinas e receptores no câncer de mama quando do diagnóstico, bem como a possibilidade da modulação farmacológica de quimiocinas e receptores específicos no microambiente em que o tumor está instalado, poderiam contribuir com a escolha de esquemas terapêuticos mais direcionados e gerar melhores desfechos clínicos.

Mais recentemente, em um elegante trabalho, surgiu a primeira descrição na literatura de como o CCR7 participa na via de sinalização do Notch1 e, conseqüentemente, na ativação das células-tronco tumorais, colocando este receptor como um forte candidato alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antagonistas de CCR7 (BOYLE et al. 2017).

É relevante ressaltar que, em nossos estudo, a sobrevida global foi definida como o intervalo em meses entre a data da cirurgia e a data do óbito por qualquer causa ou a data da última consulta. A mediana de seguimento entre os pacientes vivos foi de 29,4 meses e o risco de óbito no grupo que expressava CCR7c foi 2,5 vezes maior ($p=0,047$) do que o grupo que não expressou CCR7c. A sobrevida global em três anos foi de 75% nas pacientes que expressavam CCR7 no citoplasma, contrastando significativamente com os pacientes cujos tumores tinham ausência da expressão (89%).

De modo semelhante aos nossos achados, o estudo de LIU et al. (2010), ao avaliarem a sobrevida global em 200 pacientes com câncer de mama, mostraram que a elevada expressão citoplasmática de CCR7 foi diretamente associada à pior sobrevida quando comparada a baixa expressão no citoplasma deste marcador ($p=0,044$). Os autores destacam ainda que a avaliação da curva nos cinco primeiros anos mostra que a taxa de sobrevivência diminuiu acentuadamente nas pacientes com alta expressão de CCR7c, enquanto praticamente nenhuma paciente no grupo de baixa expressão veio a óbito neste mesmo período. Desse modo, os eixos CXCL12/CXCR4 e CXCL21/CCR7 são bastante expressos em células tumorais e metástases linfonodais, bem como podem servir como fatores prognósticos em pacientes com câncer de mama.

Em mastologia, a sobrevida sofre variações dependendo também das características moleculares e clínicas do tumor. O estudo de AGUIAR (2015) avaliou em 75 pacientes com câncer de mama inflamatório e 60

diagnosticadas com tumores localmente avançados sobre o prognóstico e a expressão de NF-kB e IL-18. Ainda no estudo de AGUIAR (2015), as pacientes com o subtipo inflamatório apresentaram menor sobrevida global quando comparadas àquelas com tumores localmente avançados. Os carcinomas triplo-negativos também apresentaram o mesmo perfil de redução da sobrevida, sendo de 2 anos para os tumores inflamatórios e de 3,4 anos para o subtipo localmente avançado ($p=0,049$).

Além dos aspectos moleculares relacionados ao tumor, o prognóstico também pode ser diretamente influenciado pelo acesso aos cuidados primários de saúde bem como pelo tempo até o diagnóstico, haja vista que no Brasil comumente o câncer se encontra em estágios mais avançados quando de sua descoberta, independente da localização anatômica.

Em nossa amostra, nas células tumorais o CCR7c passa de um perfil de expressão predominantemente negativo (95,3%) para um perfil de positividade (21,9%), se associando diretamente à maior recidiva ($p=0,033$). Quando este receptor está no citoplasma há maior sinalização do mTOR ($p=0,003$). Ao que parece, a maior disponibilidade na membrana destes receptores de quimiocinas, ao invés de se localizarem no citoplasma, pode ser um fator relacionado à regulação inibitória da sinalização pró-tumoral.

Tais achados reforçam nossa hipótese da relação entre a localização do receptor e o desfecho clínico pós-tratamento. Este raciocínio talvez nos permita ainda avançar um pouco mais nas perspectivas da interação destas quimiocinas e receptores no microambiente tumoral e até sugerir que tal associação também possa estar acontecendo durante o período de

tratamento. Isto nos remete à possibilidade da modulação farmacológica destes fatores na esperança de contribuir para um melhor prognóstico na medida em que poderia interferir na resposta patológica completa e possivelmente no tempo de sobrevida global.

5.3 mTOR

A variável que mais se associou com os marcadores avaliados foi a recidiva à distância, inclusive com risco relativo bem próximo ao do estudo supracitado. A maior imunoexpressão de mTOR mostrou-se associada com maior recidiva ($p=0,016$), assim como foi identificado para CXCR1c e CCR7c, já que as pacientes que apresentaram maior expressão de mTOR foram as que sobreviveram menos. Semelhante ao descrito para CCR7c, a sobrevida global em três anos nas pacientes que expressavam mTOR foi de 72% com risco de morte 2,5 vezes maior ($p=0,032$), contrastando de maneira significativa quando da ausência de imunomarcacão (89%).

No estudo de DENT et al. (2007), conduzido no Canadá com 1601 pacientes com câncer de mama e seguimento mediano de 8,1 anos, os autores encontraram que o tempo de sobrevida mediana da recidiva até o óbito foi de 9 meses, diferente dos 20 meses encontrados para os outros tipos de tumor ($p=0,02$). Em nosso estudo, a sobrevida global foi de 72% em cinco anos e a sobrevida mediana não foi atingida porque menos de 50% das pacientes foi a óbito durante o seguimento avaliado. Tais dados reforçam o caráter potencialmente mais agressivo dos CMTN bem como

estratificam os cinco anos após o diagnóstico como o tempo que apresenta as taxas mais elevadas de mortalidade.

Uma recente revisão sistemática e metanálise publicada incluiu 9 coortes com 3051 pacientes para avaliar a relação entre a expressão de mTOR e o prognóstico em câncer de mama. Curiosamente, os achados sugerem que a superexpressão de mTOR não se relacionou de maneira significativa com o prognóstico do câncer de mama em relação à sobrevida geral e recorrência da doença (DING et al. 2017). Todavia, ao se avaliar especificamente o subtipo triplo-negativo, UENG et al. (2012) reportaram que a expressão de mTOR pode ser considerado um indicador clínico de prognóstico adverso em estágios iniciais (estádios I e II) do CMTN, embora não tenha havido associação significativa em pacientes que se encontravam nos estádios III e IV. Os autores ainda identificaram que a maioria (72,1%) dos CMTN são mTOR positivo e que a expressão dessa proteína não foi correlacionada com o estadiamento tumoral e nem com a metástase linfonodal. Desse modo, a ativação da via de sinalização do mTOR é associada com um fenótipo mais agressivo, independente da paciente apresentar CMTN ou outro subtipo de câncer de mama. Já outros autores mostraram que a elevada expressão de mTOR se associa a um risco três vezes maior de recorrência do câncer de mama (BOSE et al. 2006).

Estes marcadores parecem interagir entre si quanto à definição de respostas biológicas no microambiente tumoral e na determinação de desfechos clínicos, pois além das relações encontradas entre mTOR e CCR7c quanto à sobrevida, quando localizado no citoplasma, somente este

receptor se associa positivamente ($p=0,003$) ao mTOR frente a todos os marcadores. Adicionalmente, a localização citoplasmática do CXCR1 foi um fator que possivelmente aumentou a sensibilidade para a sinalização por mTOR, o que sugeriria talvez que a localização membranar deste receptor possa ser um fator de controle da proliferação celular. Dessa maneira, a presença de CXCR1c, bem como a de CCR7c, poderiam estar associadas a uma perda do controle sobre o mTOR fazendo com que a célula possa proliferar mais, proporcionando possivelmente menor resposta à quimioterapia e, conseqüentemente, gerando maior recidiva (Figura 11).

A importância das associações entre as ações conjuntas de CCR7 e mTOR extrapola a explicação da patogênese do CMTN e alcança outras doenças como, por exemplo, a micose fungóide. Neste contexto, a ativação de CCR7 promove a migração de células via mTOR e este receptor é mais expresso em lesões de pele com envolvimento subcutâneo, sugerindo assim importante papel na fisiopatologia da doença (HU et al. 2014).

A regulação da função imunológica é de fundamental importância para o adequado combate não somente às células com transformação iniciada isoladamente como também à massa tumoral, auxiliando diretamente na manutenção da homeostase do organismo (DISIS 2010; QUAIL e JOYCE 2013). Tanto o CCR7 quanto mTOR desempenham importantes e reconhecidas funções reguladoras do sistema imunológico como, por exemplo, a maturação de células T naïve e o desenvolvimento de células T de memória associado ao CCR7, bem como a apresentação de antígenos pelas células dendríticas e a ativação de células T CD8⁺ mediadas

pelo mTOR (POWELL et al. 2012). Neste sentido, nossa hipótese ganha força na medida em que a maior expressão citoplasmática de CCR7 associada à expressão aumentada de mTOR podem limitar o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada e específica, gerando estímulos para a proliferação celular e, possivelmente relacionado a outros fatores não descritos neste trabalho, reduzindo a sobrevida global, aumentando a possibilidade de recidivas e o aparecimento de metástases à distância. Em nosso estudo encontramos 18,5% (22/133) de metástases, sendo os sítios mais acometidos a pleura, o pulmão, o fígado, o osso e o sistema nervoso central.

5.4 CXCR4 / CXCL12

Outros marcadores avaliados no presente estudo foram CXCL12 e seu receptor CXCR4. A metanálise publicada por ZHAO et al. (2015), após avaliar 85 estudos com um total de 11.032 pacientes, identificou que 5.971 (54%) apresentavam super-expressão de CXCR4, um marcador significativo e independente que foi estatisticamente associado com pior sobrevida global para cânceres de diversas localizações anatômicas, inclusive de mama. Os autores fazem uma análise crítica dos resultados da metanálise argumentando que existe uma heterogeneidade significativa nos estudos avaliados sobre a associação entre a expressão de CXCR4 e o valor prognóstico dos achados, pois há variação, por exemplo, nas publicações quanto ao tempo de seguimento. Mesmo assim, os dados apontam para

uma redução da sobrevida global quando da super-expressão desse receptor para cânceres de mama, hematológico, colorretal, esofágico, gástrico, cabeça e pescoço, renal, pulmonar, melanoma, ginecológico, pancreático, prostático, hepático, sarcomas e de vesícula biliar.

O CXCR4 tem sido considerado o receptor de quimiocina mais largamente expresso no câncer e sua presença como fator relacionado ao prognóstico de diversos tumores ocorre porque está diretamente envolvido em múltiplas atividades celulares que desempenham um papel relevante para a progressão do câncer como quimiotaxia, invasão, angiogênese, metástase e proliferação. No microambiente tumoral, mais especificamente dentro de áreas de hipóxia, a expressão de CXCL12 por fibroblastos e a de CXCR4 pelas células cancerosas desencadeia o crescimento celular e aumenta a motilidade e a capacidade invasiva das células tumorais. O eixo CXCR4/CXCL12 é bastante importante na sinalização do microambiente tumoral por influenciar adesão, migração e invasão, refletindo diretamente a possibilidade de metástases (DOMANSKA et al. 2013). Este raciocínio se torna mais consistente quando verificamos os achados de SUN et al. (2014) que identificaram o eixo CXCR4/CXCL12 como o promotor da seleção natural de células com a habilidade metastática no câncer de mama.

Entretanto, a nossa avaliação das associações entre o receptor CXCR4, e sua respectiva quimiocina ligante CXCL12, com as variáveis clínico-patológicas, não identificou quaisquer relações significativas. Somente na comparação dos perfis basaloide e não-basaloide de CMTN com os marcadores avaliados (Tabela 5), a expressão positiva de CXCL12m

foi superior em ambos os perfis quando comparada com a expressão negativa, sendo mais evidente nos tumores não-basaloides do que nos basaloides. A positividade (89,5%) da expressão desta quimiocina nos tumores não-basaloides foi significativamente maior ($p=0,042$) que sua expressão negativa (10,5%). Apesar do CMTN ser reconhecido como um grupo heterogêneo de tumores, a definição de seu perfil basaloide ocorre quando da expressão de citoqueratinas 5, 6, 14 e 17 (SASA et al. 2008), EGFR (LIVASY et al. 2006) e c-Kit (NIELSEN et al. 2004). Geralmente, as pacientes com CMTN do tipo basaloide apresentam elevado índice de mitoses no tumor (UMEMURA et al. 2005) e cursam com pior prognóstico quando comparadas aos pacientes com CMTN não-basaloide (RAKHA et al. 2009).

Como descrito anteriormente, o eixo CXCR4/CXCL12 está relacionado às diversas fases da carcinogênese e é considerado importante fator relacionados a pior desfecho clínico, como por exemplo maior recidiva. Todavia, houve dificuldade em identificar na literatura trabalhos que tenham verificado a associação entre CXCL12m e o perfil basaloide ou não dos CMTN. Isto dificulta a extrapolação de associações sobre a importância da localização membranar desta quimiocina com o perfil não-basaloide. Para o CXCL12m saímos de um padrão predominantemente negativo na mamoplastia redutora (100%) e, no momento em que a malignidade se estabelece muda-se o perfil de expressão de negativo para positivo (37% para 63%), ou seja, a positividade está associada com a malignidade, existindo uma relação direta neste aspecto ($p=0,001$).

A quimiocina CXCL12 pode atuar sobre os receptores CXCR4 e CXCR7. O CXCR7 membranar é expresso em múltiplos tumores, como o de mama, e sua ativação está relacionada a vantagens no crescimento e na sobrevivência de células tumorais, independentemente da expressão de CXCR4 que exerce funções semelhantes em tais células (MEIJER et al. 2008). Curiosamente, no recente trabalho publicado por YU et al. (2017), a secreção de CXCL12 por células estromais mesenquimais reduziu a expressão de CXCR7 na superfície das células tumorais e isto foi diretamente associado à redução da habilidade metastática para o pulmão. Estes achados mostram o perfil de interação no microambiente tumoral em que uma quimiocina pode se ligar a mais de um receptor e exercer seus efeitos pró-carcinogênicos mesmo quando da internalização de outros receptores. Todavia, a redução da expressão destes receptores pode se associar a melhor desfecho clínico na medida em que limita a possibilidade da ocorrência de eventos metastáticos. Adicionalmente, o estudo de BALABANIAN et al. (2005) sobre células T demonstrou que CXCL12 pode reduzir a expressão de CXCR7 de maneira concentração-dependente, possivelmente envolvendo mecanismos de taquifilaxia. Estes raciocínios nos fazem considerar a possibilidade da modulação antagônica de receptores de células tumorais como uma possibilidade terapêutica para redução de metástases e, conseqüentemente, de melhora do tempo de sobrevida.

Os importantes efeitos relatados na literatura sobre a atuação do eixo CXCR4/CXCL12 no microambiente tumoral e sua associação com piores desfechos clínicos nos remetem a possibilidade da modulação farmacológica

desses alvos. Neste contexto, XIANG et al. (2015) estudaram, em cultura células do câncer de mama e em modelo ortotópico de CMTN, um antagonista que mimetiza o epítipo proteico da proteína CXCR4 (POL1551), ou seja, uma molécula que impede a ligação de CXCL12 ao CXCR4. Os autores não encontraram efeitos diretos sobre o crescimento dos tumores primários, porém houve redução significativa das metástases à distância. Adicionalmente, quando compararam o grupo que recebeu eribulina (quimioterápico inibidor de microtúbulos) associado ao POL1551 *versus* o grupo que recebeu eribulina isoladamente, foi identificada uma maior redução da metástase bem como maior sobrevida após a ressecção do tumor primário. Os autores concluem que este antagonista seria capaz de mobilizar as células tumorais do seu microambiente e, então, torná-las mais sensíveis à quimioterapia. Este estudo, apesar de não ter ocorrido em humanos, nos traz a perspectiva da modulação do microambiente tumoral na medida em que a intervenção farmacológica de inibição da atividade deste receptor interfere diretamente na melhora da resposta ao tratamento.

O uso da imuno-histoquímica tem contribuição significativa e reconhecida para o diagnóstico e para a estratificação de muitos tipos de câncer, especialmente o de mama, pois influencia fortemente na conduta terapêutica e pode auxiliar a prever desfechos clínicos, como a sobrevida. Entretanto, esta metodologia não está isenta de falhas que podem afetar a sua eficiência e reprodutibilidade em fases importantes do processo, como a fixação do tecido, a escolha do anticorpo e o limiar para a interpretação da imunomarcagem positiva. Estes fatos poderiam explicar, pelo menos em

parte, a existência de dados distintos quanto à expressão de marcadores utilizados para pesquisa, diagnóstico e escolha terapêutica. Neste sentido é importante a avaliação cautelosa dos achados publicados das expressões de marcadores no microambiente tumoral (GOWN 2008; KISHIMA et al. 2015).

5.5 CD68 / CD3

Em oncologia, as células cancerígenas são apenas um dos fatores decisivos no curso da doença, pois outros fatores sistêmicos e inclusive adjuntos à massa tumoral podem limitar ou promover o crescimento de células cancerosas, bem como sua capacidade de infiltração e metástase à distância (PALACIOS-ARREOLA et al. 2014). Dentre estes fatores estão os macrófagos, células reconhecidas por regularem desde o microambiente durante o desenvolvimento da glândula mamária até o câncer de mama (BRADY et al. 2016). Uma vez recrutados para o microambiente tumoral, e ao interagirem com quimiocinas e fatores de crescimento, os macrófagos podem adquirir um fenótipo pró-tumoral, passando a serem denominados como macrófagos M2. Este subtipo é capaz de produzir fatores angiogênicos e imunomoduladores que modificam o perfil de atuação conhecido na fisiologia de diversos tipos celulares, como células dendríticas e linfócitos T reguladores, facilitando a remodelação da matriz extracelular e, conseqüentemente, favorecendo a maior motilidade de nichos tumorais metastáticos (PALACIOS-ARREOLA et al. 2014).

A interação das células do microambiente tumoral com as diversas quimiocinas e receptores pode favorecer o recrutamento de células para a metástase. WYLER et al. (2014) avaliaram as autópsias de 246 pacientes com metástase cerebral de câncer renal quanto à expressão de quimiocinas, receptores e células da inflamação e identificaram expressão mais elevada de CXCR4, CCR2 e CCL7 nas metástases quando comparadas aos tumores primários, bem como uma quantidade semelhante de células CD68⁺ nos sítios primário (50,6%) e metastático (56,3%). De modo interessante, os autores encontraram ainda que os TAMs CD68⁺ foram significativamente mais frequentes no infiltrado CCR2⁺ das metástases cerebrais quando comparadas ao tumor primário (13,9% vs 43,7%; $p < 0.001$). Em nosso estudo, encontramos uma associação inversa entre o perfil de imunexpressão para CXCR4 e CD68 ($p = 0,003$), havendo assim um predomínio de células CD68⁺ que são CXCR4⁻.

Isto faz parecer que alguns receptores, como o CXCR4, possuem um papel mais relevante no tumor primário quando comparado à metástase, sendo necessário na comunicação do microambiente que favorece a carcinogênese, porém possivelmente se tornam mais silenciados no sítio disseminado à distância. De maneira contrária, células da resposta inflamatória, como os macrófagos, parecem interagir bastante na instalação do tumor e, sobremaneira, quando de sua disseminação.

Associada à importância já descrita das quimiocinas e seus receptores na carcinogênese, estes achados nos conduzem ainda a refletir acerca da grande importância das interações entre as células, e também da

comunicação entre elas, no estabelecimento da massa tumoral no sítio metastático. Neste sentido, os macrófagos assumem grande relevância pelo seu papel na síntese de mediadores para o microambiente tumoral na medida em que orquestram muitas interações que conduzem ao estabelecimento de diversas vantagens adaptativas relacionadas ao câncer.

Talvez nenhum outro tipo celular se associa mais fortemente à progressão tumoral do que os macrófagos, possivelmente porque representam uma porção significativa da massa tumoral global, sendo sua presença fortemente relacionada com pior prognóstico clínico. Tanto que MAHMOUD et al. (2012) examinaram 1322 cânceres de mama e encontraram um elevado número de células CD68⁺ significativamente associadas com pior sobrevida.

Em 1949, MOORE e FROOTE fizeram a primeira descrição na literatura da associação entre os linfócitos infiltrantes tumorais e o prognóstico em carcinoma medular da mama. Em tumores sólidos, como o de mama, o componente predominante dos linfócitos infiltrantes tumorais são células T CD3⁺, uma população subclassificada em células T citotóxicas CD8⁺, células T auxiliares CD4⁺ e células T regulatórias CD4⁺ (Tregs) (YU e FU 2006).

Na recente revisão sistemática e metanálise publicada por MAO et al. (2016) foi avaliado o valor prognóstico de linfócitos infiltrantes de tumor no câncer de mama a partir de 25 estudos que totalizavam 22.964 pacientes. Os resultados das análises combinadas mostraram que estes linfócitos não são marcadores prognósticos para a sobrevida livre de doença e para a

sobrevida global na população geral. Entretanto, nas pacientes que apresentaram CMTN tais linfócitos foram diretamente associados à melhor sobrevida global (HR, 0.79; 95% CI, 0.71– 0.87) e livre de doença (HR, 0.82; 95% CI, 0.76–0.88). Em outra metanálise feita exclusivamente para o subtipo triplo-negativo, IBRAHIM et al. (2014) avaliaram 8 estudos abrangendo 2.987 pacientes com seguimento mediano de 113 meses. Os autores encontraram que os linfócitos infiltrantes de tumor foram associados com 30%, 22% e 34% de redução no risco de recidiva global, recidiva à distância e morte, respectivamente. Além disto, estes linfócitos foram considerados preditores de melhor sobrevida global independentemente do fenótipo da doença (basaloide ou não-basaloide), da localização (intratumoral ou estromal) e também dos subtipos citotóxicos (CD8⁺) ou auxiliares/reguladores (CD4⁺). A conclusão revela que os linfócitos infiltrantes de tumor foram associados a melhores resultados na sobrevida do CMTN e poderiam inclusive ser considerados como um forte fator prognóstico para esse subtipo de câncer de mama.

Em nossa amostra, a quantidade de células CD3⁺ que expressam CXCL12m é muito maior na região peritumoral quando comparada a região intratumoral. Desse modo, quando as células CD3⁺ são negativas para o CXCL12m elas conseguem penetrar mais no tumor. Além disso, em nossa busca à literatura, não identificamos trabalhos que tenham feito correlações especificamente entre CXCL12 e CD3. Todavia, o estudo de DENKERT et al. (2010) investigou linfócitos intratumorais e estromais em biópsias de 1.058 amostras de câncer de mama submetidos a neoadjuvância com

antraciclina/taxanos e encontrou uma associação significativa entre o percentual de linfócitos intratumorais e a resposta patológica completa ($p=0,012$), bem como entre a expressão de $CD3^+$ e CXCL9 com esta mesma variável clínico patológica. Os autores consideram tais linfócitos como preditores independentes de resposta à quimioterapia neoadjuvante com antraciclina/taxanos e que tal informação pode servir como instrumento de auxílio na escolha do esquema de quimioterapia no câncer de mama.

A despeito das associações encontradas entre os linfócitos infiltrantes de tumor e desfechos clínicos positivos, a heterogeneidade da massa tumoral e do perfil de expressão de quimiocinas e receptores nos remetem a possibilidade da atuação de outras células e quimiocinas que não foram contempladas em nosso estudo. É possível que as células imunológicas que estamos avaliando não sejam as mais relevantes no contexto da patogênese do CMTN, ou ainda haveria a necessidade de se avaliar subtipos celulares que marcam $CD3^+$ para se verificar a real contribuição dessas células na patogênese deste subtipo de câncer de mama. A exemplo da quimiocina CXCL16 que, uma vez secretada por fibroblastos associados ao câncer, é capaz de atrair monócitos para promover a ativação do estroma em CMTN (ALLAOUI et al. 2016).

6 CONCLUSÕES

- 1 A CXCL12m foi o único marcador associado a maior expressão nos CMTN não-basalóides
- 2 A imunoexpressão de CXCR1c, CCR7c e mTOR se relacionaram com maior recidiva de CMTN, critério sugestivo de pior prognóstico.
- 3 No CMTN, a expressão da proteína mTOR se interrelacionou diretamente com a imunomarcagem de CCR7c
- 4 As associações inversa e direta entre as expressões de CXCR4/CD68, e CXCL12/CD3, respectivamente, refletem a interrelação do eixo CXCR4/CXCL12 com importantes células (linfócitos e macrófagos) do microambiente tumoral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, Deschenes J, Lesniak D, Sabri S. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. **J Clin Oncol** 2011; 29:2852-8.

Aguiar MAN. **Expressão de Fator Nuclear Kappa b (NF-kB) e de interleucina 18 (IL-18) no carcinoma inflamatório e carcinoma localmente avançado não inflamatório da mama.** Ceará; 2015. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará].

Allaoui R, Bergenfelz B, Mohlin S, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. **Nat Commun** 2016; 7:13050.

Araki S, Omori Y, Lyn D, et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. **Cancer Res** 2007; 67:6854-62.

Aravindan BK, Prabhakar J, Somanathan T, Subhadra L. The role of chemokine receptor 4 and its ligand stromal cell derived factor 1 in breast cancer. **Ann Transl Med** 2015; 3:23.

Badowska-Kozakiewicz AM, Patera J, Sobol M, Przybylski J. The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer-immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. **Contemp Oncol (Pozn)**. 2015; 19: 220-5.

Badve S, Dabbs DJ, Schnitt ST, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Mod Pathol** 2011; 24:157-67.

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. **J Biol Chem** 2005; 280:35760-6.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer** 2007; 109:1721-8.

Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat Rev Clin Oncol** 2016; 13:674-90.

Bodai BI, Tusso P. Breast Cancer Survivorship: A Comprehensive Review of Long-Term Medical Issues and Lifestyle Recommendations. **Perm J** 2015; 19:48-79.

Bognar CLFB, Simon SD, Gansl RC, et al. The impact of erlotinib use in non-small-cell lung cancer patients treated in a private reference general hospital and in a private cancer clinic from 2005 to 2011. **Einstein** 2015; 13:215-20.

Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. **Cancer Discov** 2013; 3:224-37.

Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-arraybased analysis. **Mod Pathol** 2006; 19:238-45.

Boyle ST, Gieniec KA, Gregor CE, Faulkner JW, McColl SR, Kochetkova M. Interplay between CCR7 and Notch1 axes promotes stemness in MMTV-PyMT mammary cancer cells. **Mol Cancer** 2017; 16:19.

Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, Vázquez-Prado J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. **Life** 2011; 63: 896-914.

Brady NJ, Chuntova P, Schwertfeger KL. Macrophages: regulators of the inflammatory microenvironment during mammary gland development and breast cancer. **Mediators Inflamm** 2016; 2016:4549676.

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. **Neuro Oncol** 2005; 7:122-33.

Britschgi A, Andraos R, Brinhaus H, et al. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. **Cancer Cell** 2012; 22:796-811.

Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. **Int J Womens Health** 2012; 4:511-20.

Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood** 2006; 107:1761-7.

Buskens CJ, Sivula A, Van Rees BP, et al. Comparison of cyclooxygenase 2 expression in adenocarcinomas of the gastric cardia and distal oesophagus. **Gut** 2003; 52:1678-83.

Cabioglu N, Sahin AA, Morandi P, et al. Chemokine receptors in advanced breast cancer: differential expression in metastatic disease sites with diagnostic and therapeutic implications. **Ann Oncol** 2009; 20:1013-9.

Cancello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Ann Oncol** 2010; 21:1974-81.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2012; 490:61-70.

Cassali GD, Ferreira E, Lima AES, Bertagnolli AC, Souza CM. Genética aplicada ao câncer de mama. **Prática Hospitalar** 2008; 10:15-7.

Cassier PA, Treilleux I, Bachelot T, et al. Prognostic value of the expression of C-Chemokine Receptor 6 and 7 and their ligands in non-metastatic breast cancer. **BMC Cancer** 2011; 11:213.

Cecilio AP, Takakura ET, Jumes JJ, et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer (Dove Med Press)** 2015; 7:43-9.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. **Cancers (Basel)** 2014; 6:1670-90.

Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R15.

Chelouche-Lev D, Miller CP, Tellez C, Ruiz M, Bar-Eli M, Price JE. Different signalling pathways regulate VEGF and IL-8 expression in breast cancer: implications for therapy. **Eur J Cancer** 2004; 40:2509-18.

Cheng SHC, Yu BL, Horng CF, et al. Long-term survival and stage I breast cancer subtypes. **J Cancer Res Pract** 2016; 3:1-8.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist** 2004; 9:606-16.

Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina** 2011; 39:499-503.

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology** 2015; 26:1533-1546.

Czystowska M, Gooding W, Szczepanski MJ, et al. The immune signature of CD8+CCR7+ T cells in the peripheral circulation associates with disease recurrence in patients with HNSCC. **Clin Cancer Res** 2012; 19:889-99.

Dave H, Trivedi S, Shah M, Shukla S. Transforming growth factor beta 2: a predictive marker for breast cancer. **Indian J Exp Biol** 2011; 49:879-87.

De Larco JE, Wuertz BR, Rosner KA, et al. A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. **Am J Pathol** 2001; 158:639-46.

Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:105-13.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4429-34.

DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics 2015: convergence of incidence rates between black and white women. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:31-42.

Ding XF, Li LF, Zhou XL, et al. P-mTOR expression and implication in breast carcinoma: a systematic review and metaAnalysis. **PLoS ONE** 2017; 12:e0170302.

Disis ML. Immune regulation of cancer. **J Clin Oncol**. 2010; 28:4531-38.

Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur J Cancer** 2013; 49:219-230.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Breast; p.347-69.

Espina V, Liotta LA. What is the malignant nature of human ductal carcinoma *in situ*? **Nat Rev Cancer** 2011; 11:68-75.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer** 2013; 49:1374-403.

Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:362-71.

Gangi A, Chung A, Mirocha J, Liou DZ, Leong T, Giuliano AE. Breast-conserving therapy for triple-negative breast. **JAMA Surg** 2014; 149:252-258.

Ginestier C, Liu S, Diebel ME, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. **J Clin Invest** 2010; 120:485-97.

Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Mod Pathol** 2008; 21 Suppl 2:S8-S15.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol** 2014; 32:659-702.

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell** 2007; 12:9-22.

Han W, Kang SY. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:193-200.

Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. **Cell Tissue Res** 2014; 357:253-66.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev** 2004; 18:1926-45.

Hicks DG, Short SM, Prescott NL, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:1097-104.

Higa GM, Fell RG. Sex hormone receptor repertoire in breast cancer. **Int J Breast Cancer** 2013; 2013:284036.

Hu SC, Lin CL, Hong CH, Yu HS, Chen GS, Lee CH. CCR7 expression correlates with subcutaneous involvement in mycosis fungoides skin lesions and promotes migration of mycosis fungoides cells (MyLa) through mTOR activation. **J Dermatol Sci** 2014; 74:31-8.

Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 148:467-76.

Iqbal N, Iqbal N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. **Mol Biol Int** 2014; 2014:852748.

Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. **Breast Cancer** 2010; 17:118-24.

Kishima MO, Oliveira CEC, Banin-Hirata BK, et al. Immunohistochemical expression of CXCR4 on breast cancer and its clinical significance. **Anal Cell Pathol (Amst)** 2015; 2015:891020.

Knall C, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:3052-7.

Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. **Cell Death Differ** 2009; 16:664-73.

Lee BL, Liedke PER, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol** 2012; 13:e95-e102.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

Leong A, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. **Pathobiology** 2011; 78:99-114.

Ling X, Spaeth E, Chen Y, et al. The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness in vitro and prevents breast cancer growth and metastasis in vivo. **PLoS One** 2013; 8:1-9.

Liu Q, Li A, Tian Y, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev** 2016; 31:61-71.

Liu Y, Ji R, Li J, et al. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. **J Exp Clin Cancer Res** 2010; 29:16.

Liu Y, Xin T, Huang D, et al. Prognosis in very young women with triple-negative breast cancer: retrospective study of 216 cases. **Med Oncol** 2014; 31:222.

Liu Y, Wu BQ, Geng H, Xu ML, Zhong HH. Association of chemokine and chemokine receptor expression with the invasion and metastasis of lung carcinoma. **Oncol Lett** 2015; 10:1315-22.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol** 2006; 19:264-71.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resist Updat** 2008; 11:32-50.

Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. **Cancer Lett** 2006; 238:30-41.

Lyons TR, O'Brien J, Borges V, et al. Postpartum mammary gland involution drives DCIS progression through collagen and COX-2. **Nat Med** 2011; 17:1109-15.

Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. **J Clin Pathol** 2012; 65:159-63.

Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The prognostic value of tumorinfiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2016; 11:e0152500.

Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. **Chem Immunol** 1992; 51:236-65.

Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. **Br J Cancer** 1996; 73:931-4.

Meijer J, Ogink J, Roos E. Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells in vitro and in vivo. **Br J Cancer** 2008; 99:1493-501.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016/2017: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017.

Mohammed RA, Ellis IO, Mahmmod AM, et al. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: characteristics and prognostic significance. **Mod Pathol** 2011; 24:774-85.

Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Heterogeneity of triplenegative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. **Clin Breast Cancer** 2013; 13:31-9.

Moore OS, Foote FW. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. **Cancer** 1949; 2:635-42.

Mukaida N, Baba T. Chemokines in tumor development and progression. **Exp Cell Res** 2012; 318:95-102.

Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** 2001; 410:50-6.

Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4117-27.

Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nat Rev Immunol** 2017; 17: 559-72.

[NCI] National Cancer Institute. U.S.A: U.S. National Institutes of Health. **SEER stat fact sheets: breast.** Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>>. [2016 dez 13]

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5367-74.

Oliveira CT, Bertozzi APAP. O Conhecimento biológico do tumor de mama e as dúvidas na prática clínica. **Prática Hospitalar** 2008; 57:38-40.

Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. **Clin Med Res** 2009; 7:4-13.

Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival. **Radiol Oncol** 2011; 45:46-52.

Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, García-Zepeda E, Carrero JC, Morales-Montor J. The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets. **J Immunol Res** 2014; 2014:849720.

Palma G, Frasci G, Chirico A, et al. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget** 2015; 6:26560-74.

Papatheodorou H, Papanastasiou AD, Sirinian C, et al. Expression patterns of SDF1/CXCR4 in human invasive breast carcinoma and adjacent normal stroma: Correlation with tumor clinicopathological parameters and patient survival. **Pathol Res Pract** 2014; 210:662-7.

Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. **npj Breast Cancer** [serial on line] 2016; 2(16036). Available form: <URL><http://www.nature.com/articles/npjbcancer201636> [2017 jan 12]

Park SH, Das BB, Casagrande F, et al. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. **Nature** 2012; 491:779-83.

Pennisi A, Kieber-Emmons T, Makhoul I, Hutchins L. Relevance of pathological complete response after neoadjuvant therapy for breast cancer. **Breast Cancer (Auckl)** 2016; 10:103-6.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist** 2010; 15 Suppl 5:39-48.

Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. **Br J Cancer** 2007; 96 Suppl:R11-5.

Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. **Annu Rev Immunol** 2012; 30:39-68.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med** 2013; 19:1423-37.

Raica M, Jung I, Cîmpean AM, Suciuc C, Muresan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? **Rom J Morphol Embryol** 2009; 50:5-13.

Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, et al. Triple negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. **Clin Cancer Res** 2009; 15:2302-10.

Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. **Cancer Lett** 2007; 256:137-65.

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. **J Clin Oncol** 2008; 26:778-85.

Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumors: a critical review. **Histopathology** 2008; 52:108-18.

Roozendaal LM, Smit LHM, Duijsens GHNM, et al. Risk of regional recurrence in triple-negative breast cancer patients: a Dutch cohort study. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 156:465-72.

Sasa M, Bando Y, Takahashi M, Hirose T, Nagao T. Screening for basal marker expression is necessary for decision of therapeutic strategy for triplenegative breast cancer. **J Surg Oncol** 2008; 97:30-4.

Schwartz LH, Seymour L, Litière S, et al. RECIST 1.1 - Standardisation and disease-specific adaptations: perspectives from the RECIST Working Group. **Eur J Cancer** 2016; 62:138-45.

Sharma P. Biology and management of patients with triple-negative breast cancer. **Oncologist** 2016; 21:1050-62.

Simon SD. **Projeto Amazonas: dados preliminares de câncer de mama no Brasil**. Disponível em: <URL:http://www.gbecam.org.br/downloads/Projeto_Amazona.pdf> [2017 fev 24].

Singh JC, Novik Y, Stein S, et al. Phase 2 trial of everolimus and carboplatin combination in patients with triple negative metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res** 2014; 16:R32.

Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:8418-23.

Sun Y, Mao X, Fan C, et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. **Tumour Biol** 2014; 35:7765-73.

Tariq K, Farhangi A, Rana F. TNBC vs non-TNBC: A retrospective review of differences in mean age, family history, smoking history, and stage at diagnosis. **Clin Adv Hematol Oncol** 2014; 12:377-81.

Trop I, LeBlanc SM, David J, Lalonde L, Tran-Thanh D, Labelle M, El Khoury MM. Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. **Radiographics** 2014;34(5):1178-95.

Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2013; 19:6380-8.

Tutunea-Fatan E, Majumder M, Xin X, Lala PK. The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. **Mol Cancer** 2015; 14:35.

Ueng SH, Chen SC, Chang YS, et al. Phosphorylated mTOR expression correlates with poor outcome in early-stage triple negative breast carcinomas. **Int J Clin Exp Pathol** 2012; 5:806-13.

Ugras S, Stempel M, Patil S, Morrow M. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status predict lymphovascular invasion and lymph node involvement. **Ann Surg Oncol** 2014; 21:3780-6.

Umemura S, Takekoshi S, Suzuki Y, Saitoh Y, Tokuda Y, Osamura RY. Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression. **Oncol Rep** 2005; 14:337-43.

Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **Am J Pathol** 2002; 161:1991-96.

Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [letter]. **Nature** 2002; 415:530-36.

Vandercappellen J, Damme JV, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Lett** 2008; 267:226-44.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. **Cell Stem Cell** 2012; 10:717-28.

Vlahakis S, Villasis-Keever A, Gomez T, Vanegas M, Vlahakis N, Paya C. G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. **J Immunol** 2002; 169:5546-54.

Volinia S, Galasso M, Sana ME, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proc Natl Acad Sci** 2012; 109:3024-9.

Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? **Mol Oncol** 2010; 4:192-208.

Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Wu K, Katiyar S, Li A, et al. Dachshund inhibits oncogene-induced breast cancer cellular migration and invasion through suppression of interleukin-8. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:6924-9.

Wyler L, Napoli CU, Ingold B, et al. Brain metastasis in renal cancer patients: metastatic pattern, tumour-associated macrophages and chemokine/chemoreceptor expression. **Br J Cancer** 2014; 110:686-94.

Xiang J, Hurchla MA, Fontana F, et al. CXCR4 protein epitope mimetic antagonist, POL5551, disrupts metastasis and enhances chemotherapy effect in triple negative breast cancer. **Mol Cancer Ther** 2015; 14:2473–85.

Yao C, Lin Y, Chua MS, et al. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. **Int J Cancer** 2007; 121:1949-57.

Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Fut Oncol** 2014; 10:2293-2301.

Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? **Lab Invest** 2006; 86:231-45.

Yu PF, Huang Y, Xu CL, et al. Downregulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGF β promotes breast cancer metastasis. **Oncogene** 2017; 36:840-9.

Zhang Z, Ni C, Chen W, et al. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer** 2014; 14:49.

Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. **Oncotarget** 2015; 6:5022-40.

Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6779-88.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity** 2000; 12:121-7.

Zumsteg ZS, Morrow M, Arnold B, et al. Breast-conserving therapy achieves locoregional outcomes comparable to mastectomy in women with T1-2N0 triple-negative breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:3469-76.

Apêndice 1 - Ficha Utilizada para Coleta de Dados



PROJETO DE PESQUISA – QUIMIOTECINAS, RECEPTORES E PROTEÍNA ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

Co-orientador: Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

Aluno: Daniel Cordeiro Gurgel

1. Ficha nº: _____ Prontuário: _____ Iniciais: _____
2. Idade: _____ 3. Raça: Branca (1) negra (2) amarela (3) NA (99)
4. Data do diagnóstico: ____/____/____
5. Perfil: Basalóide (1) Normal *like* (2)
6. Tipo histológico ductal (1) lobular (2) medular (3) colóide (4)
mucinoso metaplásico (6) outro (99)
7. Grau histológico (1) (2) (3)
8. Bem diferenciado (1) Moderadamente (2) Indiferenciado (3)
9. Invasão linfática presente (1) ausente (2) 10. Invasão vascular presente (1) ausente (2)
11. Estadiamento clínico: I (1) IIA (2) IIB (3) IIIA (4) IIIB (5) IIIC (6) IV (7) NA
12. T: 1 (1) 2 (2) 3 (3) 4 (4) 13. N: 0 (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 14. M: 0 (1) 1 (2)
15. pT: 1 (1) 2 (2) 3 (3) 4 (4)
16. pN: 0 (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) X (5)
17. Cirurgia: Sim (1) Não (2) NA (99)
18. Mastectomia radical (1) Segmentectomia (2) Quadrantectomia (3) Nodulectomia (4)
Mastectomia subcutânea (5) NA (99)
19. Linfadenectomia: Sim (1) Não (2) NA (99)

20. Linfadectomia axilar radical (1) Linfadenectomia axilar NI e II (2) Linfadenectomia axilar NI (3) NA (99)

21. Pesquisa de linfonodo sentinela positivo (1) bls negativo (2) NA (99)

22. QT Neo: Sim (1) Não (2) NA (99)

23. Protocolo: AC (1) AC-T (2) FAC (3) AC-D (4) FEC (5) FAC-T (6) Outro (7) NA (99)

24. Resposta ao tratamento quimioterápico R .o. p. (1) R. o. c. (2) D. e. (3) Progressão (4) R. p. c. (5) NA (99)

25. QT adjuvante sim (1) não (2) NA (99)

26. Protocolo _____

27. Radioterapia sim (1) não (2) NA (99)

28. Último *follow-up* data: ____/____/____

29. Sem evidência de doença (1) Recidiva loco-regional (2) Recidiva sistêmica (3) NA (99)

30. Data da recidiva: _____

31. Sítio da recidiva: Cérebro (1) Pleuro-pulmonar (2) Hepática (3) Óssea (4) Linfonodo (5) Pele (6) Peritônio (7) Outra (8) Sítio: _____

32. Status final: Vivo sem doença (1) Vivo com doença (2) Morte por câncer (3) Morte por outras causas (4) Perdido de vista (5)

Anexo 1 – Estadiamento Clínico do Câncer de Mama e seu Agrupamento por Estádios

Sítio	Característica
Tumor primário (T)	
Tis	Tumor in situ
T1	Tumor ≤20 mm em sua maior dimensão
T1mi	Tumor ≤1 mm em sua maior dimensão
T1a	Tumor >1 mm mas ≤5 mm em sua maior dimensão
T1b	Tumor >5 mm mas ≤10 mm em sua maior dimensão
T1c	Tumor >10 mm mas ≤20 mm em sua maior dimensão
T2	Tumor >20 mm mas ≤50 mm em sua maior dimensão
T3	Tumor >50 mm em sua maior dimensão
T4	Tumor com extensão direta à parede torácica ou pele
T4a	Extensão à parede torácica, mas não à pele
T4b	Ulceração, satelitose ou edema da pele
T4c	T4a e T4b simultaneamente
T4d	Carcinoma inflamatório
Linfonodos (N)	
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodos axilares móveis
N2	Metástase em linfonodos axilares fixos ou em linfonodo em cadeia mamária interna clinicamente detectado, na ausência de metástase axilar
N3	Metástase em linfonodo da cadeia mamária interna com metástase em linfonodo axilar concomitante, ou metástase em linfonodo supraclavicular ou infraclavicular
Metástases (M)	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Fonte: Adaptado de EDGE et al. (2010).

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0-1	N1mi	M0
IIA	T0-1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
IIIB	T4	N0-2	M0
IIIC	T1-4	N3	M0
IV	T1-4	N1-3	M1

Fonte: Adaptado de EDGE et al. (2010).