

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS
E DO PAPEL DA QUIMIOCINA CXCL12, DOS RECEPTORES
DE QUIMIOQUINAS CXCR1, CXCR4 E CCR7 E DAS
PROTEÍNAS PD-L1, FOSFO-mTOR e FOXP3 NO CARCINOMA
INFLAMATÓRIO DE MAMA, EM COMPARAÇÃO COM
CARCINOMAS AVANÇADOS
NÃO-INFLAMATÓRIOS**

DUÍLIO REIS DA ROCHA FILHO

**Tese apresentada ao Programa de Doutorado
Interinstitucional (DINTER) da Fundação
Antônio Prudente em Parceria com Escola
Cearense de Oncologia para a obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadores: Prof. Dr. Paulo Roberto
Carvalho de Almeida e Prof. Dr. Ronaldo
Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*)**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rocha Filho, Duílio Reis

Estudo das características clínico-patológicas e do papel da quimiocina CXCL12, dos receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR4 e CCR7 e das proteínas PD-L1, fosfo-mTOR e FOXP3 no carcinoma inflamatório de mama, em comparação com carcinomas avançados não-inflamatórios / Duílio Reis da Rocha Filho - São Paulo 2017.

156p.

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: Paulo Roberto Carvalho de Almeida

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Quimiocinas/Chemokines. 3. Receptores de Quimiocinas/Receptors,Chemokine. 4. Carcinoma/Carcinoma. 5. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry.

DEDICATÓRIA

A minha esposa Silvia, e a meus filhos Sara e Gabriel. Em sua presença nenhum esforço é grande, e toda inquietude é fugaz.

A meus pais, Sr. Duílio e Sra. Teresa Cristina. Uma felicidade e um orgulho imensuráveis crescer sob suas asas, tê-los como referência de indivíduos e de casal e contar com suas preciosas companhias.

Ao professor Ronaldo Ribeiro, mentor da iniciação científica, do mestrado, do doutorado, elaborador desta pesquisa, orientador nos caminhos da oncologia e amigo. Este trabalho só tem sentido à sombra de sua presença.

Aos pacientes com câncer e seus familiares, cujo esforço e resiliência inspiram cada dia do oncologista. Em respeito a eles, todo esforço em pesquisa nunca será o bastante.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Roberto Carvalho de Almeida, que alçado pelas circunstâncias à posição de orientador desta pesquisa, abraçou-a com enorme gentileza e disponibilidade. Este trabalho lhe deve sua realização.

À Escola Cearense de Oncologia e ao A.C. Camargo Cancer Center, que viabilizaram o projeto interinstitucional que formou tantos pesquisadores em câncer no Estado do Ceará.

Ao Instituto do Câncer do Ceará, local que me acolheu e onde me fiz oncologista, parceiro ao longo de toda a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, essencial na condução do DINTER e de ajuda fundamental neste trabalho.

Ao Serviço de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba, pela enorme contribuição com os estudos histológicos.

Ao Dr. Fábio Távora e ao Laboratório Argos, pela presteza e competência na confecção das reações imuno-histoquímicas.

Aos Drs. João Paulo Soares, Alarico Marques e Marco Antônio Nasser, pela contribuição com os estudos seminais que conduziram a este projeto.

Ao Doutorando Daniel Gurgel, companheiro de esforços e de intempéries ao longo da pesquisa.

Ao acadêmico Matheus Reis, pela colaboração com as revisões de prontuário.

À Sra. Adaíla, dócil e solícita companheira de cada biópsia efetuada.

À Sra. Suely Francisco, pela impecável revisão das referências bibliográficas e da formatação do texto.

Ao Dr. Giovanni Freitas, pela contribuição com as biópsias de mama.

RESUMO

Rocha Filho DR. **Estudo das características clínico-patológicas e do papel da quimiocina CXCL12, dos receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR4 e CCR7 e das proteínas PD-L1, fosfo-mTOR e FOXP3 no carcinoma inflamatório de mama, em comparação com carcinomas avançados não-inflamatórios.** 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 carcinoma inflamatório da mama (CIM) é a apresentação mais agressiva do câncer de mama. Apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevida em longo prazo permanece inferior a 40%. Evidências apontam que o CIM é uma condição biologicamente distinta dos tumores de mama não-inflamatórios. As quimiocinas são moléculas com propriedade de induzir migração leucocitária que têm mostrado importância na carcinogênese. As evidências sobre o papel de quimiocinas no CIM são frágeis. **OBJETIVO:** Estudar o papel de CXCR1, CXCR4, CXCL12, CCR7, PD-L1, FOXP3 e fosfo-mTOR (p-mTOR) no CIM. **MATERIAL E MÉTODOS:** Pacientes com diagnóstico de CIM acompanhadas no Hospital Haroldo Juaçaba entre 2004 e 2015 foram rastreadas, seus dados clínicos coletados e suas biópsias submetidas a estudo imuno-histoquímico da expressão dos marcadores. Pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama avançado não-inflamatório (CANI) constituíram o grupo controle. Outro grupo de mulheres foi acompanhado prospectivamente e submetida a biópsia de pele pré-tratamento, com plano de realização de PCR para pesquisar expressão de RNAm dos marcadores. **RESULTADOS:** Um total de 194 pacientes foram incluídas, das quais 99 tinham diagnóstico de CIM e 95 de CANI. As pacientes com CIM tiveram maior acometimento linfonodal, mais metástases à distância e menor sobrevida global e sobrevida livre de doença. Maior

extensão da doença nodal, fenótipo inflamatório e ausência de resposta à quimioterapia foram fatores independentemente associados a pior sobrevida. CXCR4 associou-se positivamente com CIM e com pior prognóstico. Quando analisadas todas as pacientes, CXCR4, CCR7 e CXCR1 foram fatores preditivos de resistência à quimioterapia, e tumores triplo-negativos tiveram menor expressão de CXCR4 e CCR7. CCR7 correlacionou-se positivamente com CXCR1 e p-mTOR. Apenas 4 das 28 biópsias de pele efetuadas no grupo prospectivo tinham material neoplásico.

CONCLUSÕES: CIM tem pior prognóstico e características biológicas distintas de CANI. CXCR4 confere valor prognóstico adverso e parece fazer parte da patogênese do CIM. A hiperexpressão dos receptores de quimiocinas pesquisados confere resistência à quimioterapia. Os receptores de quimiocinas, em especial CXCR4, podem ser explorados como alvos terapêuticos no manejo da doença.

SUMMARY

Rocha Filho DR. [Study of clinic-pathologic characteristics and role of chemokine CXCL12, chemokine receptors CXCR1, CXCR4 and CCR7 and proteins PD-L1, phospho-mTOR and FOXP3 in inflammatory breast cancer, compared to advanced non-inflammatory carcinomas]. Sao 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: Inflammatory breast carcinoma (CIM) is the most lethal presentation of breast cancer. Even though the outcomes have improved, prognosis remains poor. Evidences suggest CIM is a biologically distinct entity when compared to non-inflammatory breast cancer. Chemokines are molecules able to induce leukocitary migration which have been shown to have role in carcinogenesis. Little is known about chemokines importance in CIM. **OBJECTIVE:** To study the role of CXCR1, CXCR4, CXCL12, CCR7, PD-L1, FOXP3 and phospho-mTOR (p-mTOR) in CIM. **MATERIAL AND METHODS:** Patients diagnosed with CIM between 2004 and 2015 were screened, their clinical data retrospectively collected and their biopsies submitted to immunohistochemical study. Patients with advanced non-inflammatory breast cancer (CANI) were used as control group. Another group of women was prospectively followed and submitted to pre-treatment skin biopsy, which was planned to be used to investigate chemokines mRNA expression. **RESULTS:** One-hundred and ninety-four patients were studied, including 99 with CIM and 95 with CANI. Patients with CIM had higher nodal involvement, more distant metastasis and shorter overall survival and disease free survival. Nodal involvement, inflammatory tumor and lack of response to neoadjuvant therapy were independently associated to poorer survival. CXCR4 was positively associated with CIM and poorer prognosis. When all patients were analysed, CXCR4, CCR7 and CXCR1 were predictive of

resistance to chemotherapy, and triple-negative tumors had lower expression of CXCR4 and CCR7. CCR7 correlated positively with CXCR1 and p-mTOR. Only 4 out of 28 prospectively collected skin biopsies had tumor cells.

CONCLUSIONS: Compared to CANI, CIM has worse prognosis and different biologic characteristics. CXCR4 indicates worse prognosis and seems to be important in CIM pathogenesis. Chemokine receptors hyperexpression is associated to chemotherapy resistance. Chemokine receptors, mainly CXCR4, may be explored as therapeutic targets in CIM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinoma inflamatório primário da mama, à esquerda, e secundário, à direita.....	4
Figura 2	Algoritmo de investigação diagnóstica do carcinoma inflamatório da mama.....	6
Figura 3	Amostra de pele de paciente com carcinoma inflamatório da mama com invasão linfática por células tumorais (setas).....	9
Figura 4	Análise transcricional supervisionada entre carcinoma inflamatório (CIM) e carcinoma não-inflamatório da mama (não-CIM) aplicada à assinatura de ativação de vias.....	14
Figura 5	Algoritmo de tratamento neoadjuvante do carcinoma inflamatório de mama (CIM).....	19
Figura 6	Estrutura dos diferentes grupos de quimiocinas.....	24
Figura 7	Vias moleculares mediadas por CXCR4.....	35
Figura 8	Potencial papel de CXCR4 no câncer de mama.....	37
Figura 9	<i>Manual Tissue Microarrayer</i> , modelo MTA-1.....	52
Figura 10	Sobrevida global de acordo com o fenótipo da doença.....	60
Figura 11	Sobrevida livre de doença de acordo com o fenótipo da neoplasia.....	61
Figura 12	Exame físico de pacientes com carcinoma inflamatório da	61

	mama ao diagnóstico.....	
Figura 13	Fluxograma dos blocos de parafina rastreados.....	64
Figura 14	Escores de expressão de CXCR4 nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	65
Figura 15	Escores de expressão de CXCL12 nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	66
Figura 16	Escores de expressão de CCR7 nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	67
Figura 17	Escores de expressão de CXCR1 nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	68
Figura 18	Escores de expressão de fosfo-mTOR nas pacientes com câncer de mama analisadas nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	69
Figura 19	Escores de expressão de FOXP3 (A e B) e PD-L1 (C e D) nas pacientes com câncer de mama analisadas.....	70
Figura 20	Controles positivos das reações.....	71
Figura 21	Sobrevida global de acordo com a expressão de CXCR4.....	74

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1	Características basais das pacientes.....	59
Tabela 2	Distribuição dos pacientes por sítios de metástases, de acordo com o fenótipo da doença.....	60
Tabela 3	Associação da resposta patológica completa (RCp) e da taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante com as características clínico-patológicas basais.....	62
Tabela 4	Positividade da biópsia cutânea, de acordo com o fenótipo da doença.....	63
Tabela 5	Expressão de CXCR4 de acordo com as características clínico-patológicas.....	73
Tabela 6	Expressão de CXCL12 de acordo com as características clínico-patológicas.....	75
Tabela 7	Expressão de CXCR1 de acordo com as características clínico-patológicas.....	76
Tabela 8	Expressão de p-mTOR de acordo com as características clínico-patológicas.....	77
Tabela 9	Expressão de CCR7 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação celular.....	78
Tabela 10	Expressão de FOXP3 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação celular.....	79

Tabela 11	Expressão de PD-L1 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação celular.....	80
Tabela 12	Análise univariada e multivariada da sobrevida global e sobrevida livre de doença.....	81
Tabela 13	Correlação entre os marcadores.....	82
Tabela 14	Correlações estatisticamente significativas entre os marcadores.....	82
Tabela 15	Características clínico-patológicas de pacientes com carcinoma inflamatório de mama em diferentes estudos.....	84
Tabela 16	Estudos sobre quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado, incluindo carcinoma inflamatório	91
Quadro 1	Quimiocinas.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	Proteína-quinase B
ANC	Alteração do número de cópias
CANI	Carcinoma avançado não-inflamatório
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupamento de diferenciação
CIM	Carcinoma inflamatório da mama
CMLA	Câncer de mama localmente avançado não-inflamatório
CXCR	Receptor da quimiocina CXC
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELR	Sequência de aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GLI	Homólogo do oncogene associado ao glioma
HE	Hematoxilina e eosina
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HHJ	Hospital Haroldo Juaçaba
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IGFBP-rP	Proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
miRNA	MicroRNA
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos

NF-κB	Fator nuclear-κB
NICD	Domínio intracelular notch
NK	<i>Natural killer</i>
OCT	Fator de transcrição ligante do octâmero
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante da proteína de morte celular programada 1
p-mTOR	Fosfo-mTOR
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína-quinase C
PLC	Fosfolipase C
QT	Quimioterapia
RCp	Resposta patológica completa
RE	Receptor de estrógeno
RNAm	RNA mensageiro
RH	Receptores hormonais
RR	Risco relativo
SDF	Fator derivado do estroma
siRNA	Pequeno RNA de interferência
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TAM	Macrófagos associados a tumores
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	<i>T helper</i>
TIL	Linfócito tumor-infiltrante
TMA	Microarranjo de tecido
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
Treg	T regulatório
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
WISP3	Proteína da via de sinalização induzida por <i>WNT1-3</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma Inflamatório da Mama.....	1
1.1.1	Introdução.....	1
1.1.2	Diagnóstico	3
1.1.3	Patologia.....	8
1.1.4	Características Moleculares	10
1.1.5	Tratamento	17
1.2	Quimiocinas.....	23
1.2.1	Introdução.....	23
1.2.2	Função Biológica	25
1.2.3	Quimiocinas no Câncer de Mama	33
1.2.4	CXCR4 e CXCL12	34
1.2.5	CCR7.....	38
1.2.6	CXCR1	39
1.2.7	Fosfo-mTOR.....	41
1.2.8	FOXP3.....	43
1.2.9	PD-L1	45
1.3	Justificativa e relevância da pesquisa	46
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral.....	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3	PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Pacientes.....	49
3.2	Imuno-histoquímica	51
3.3	Congelação	54
3.4	Análise Estatística	55
3.5	Aspectos Éticos	56

3.6	Financiamento	57
4	RESULTADOS.....	58
5	DISCUSSÃO	83
5.1	Características Clínico-Patológicas Gerais.....	83
5.2	Quimiocinas e demais Marcadores Experimentais.....	98
5.2.1	CXCR4 e CXCL12.....	98
5.2.2	CCR7.....	107
5.2.3	CXCR1	112
5.2.4	Fosfo-mTOR.....	115
5.2.5	FOXP3.....	117
5.2.5	PD-L1	123
5.3	Limitações e Contribuições da Pesquisa.....	125
6	CONCLUSÕES	127
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

ANEXOS

- Anexo 1** Estadiamento clínico do câncer de mama
- Anexo 2** Agrupamento por estádios no câncer de mama
- Anexo 3** Ficha clínica
- Anexo 4** Termo de consentimento livre e esclarecido
- Anexo 5** Escala de *Performance Status* (ECOG)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA INFLAMATÓRIO DE MAMA

1.1.1 Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais prevalente em mulheres em todo o mundo (à exceção dos tumores de pele não-melanoma), tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Acredita-se que uma em cada oito mulheres norte-americanas irá desenvolver câncer de mama em algum momento de suas vidas (DESANTIS et al. 2011). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer-INCA estimou 57.960 casos novos da doença no ano de 2016, o que faz do câncer de mama a neoplasia mais frequente em mulheres no país (Ministério da Saúde 2016). Após um aumento progressivo desde a década de 1970, a mortalidade pela doença tem sido reduzida nos últimos dez anos, graças a esforços na detecção precoce e a avanços no tratamento. Ainda assim, o câncer de mama segue sendo uma das principais causas de morte no sexo feminino (DESANTIS et al. 2011).

O carcinoma inflamatório da mama (CIM) é uma entidade clínico-patológica caracterizada pela progressão rápida e pelo comportamento agressivo. A condição foi descrita inicialmente em 1814 por Sir Charles Bell, mas foi apenas em 1924 que o termo carcinoma inflamatório de mama foi proposto por Lee e Tannebaum. Antes desta designação, costumava-se

referir ao CIM como síndrome de Volkmann (em mulheres gestantes), câncer da lactação, carcinoma mastitoides, mastite carcinomatosa, carcinoma mamário agudo ou carcinoma medular agudo, entre outros termos. As diferentes nomenclaturas buscavam traduzir o comportamento agressivo da neoplasia, comumente diagnosticada em mulheres jovens durante a gravidez ou o aleitamento (ANDERSON et al. 2005-2006).

O CIM corresponde, segundo dados norte-americanos, a 2,5% do total de casos de neoplasias mamárias malignas (HANCE et al. 2005). Sua incidência tem aumentado, especialmente em mulheres caucasianas (VAN UDEN et al. 2015). É mais comum no Norte da África e no Oriente Médio do que na Europa e América do Norte (YAMAUCHI et al. 2012). O Brasil carece de dados epidemiológicos robustos sobre a doença (Ministério da Saúde 2016).

Quando comparado com o câncer de mama avançado não inflamatório (CANI), é diagnosticado em idade mais precoce (mediana de 59 anos vs. 66 anos). É o subtipo de câncer de mama mais letal. Quando tratado exclusivamente com cirurgia ou radioterapia, menos de 5% dos pacientes estão vivos após cinco anos. Ainda que os avanços obtidos com a introdução das modalidades modernas de terapia adjuvante tenham melhorado a sobrevida, os desfechos clínicos da doença permanecem bem abaixo da média dos tumores não-inflamatórios (KLEER et al. 2010; YAMAUCHI et al. 2012; TAGHIAN et al. 2017).

São fatores mais frequentes no carcinoma inflamatório de mama, em comparação com carcinoma de mama não inflamatório: menarca e primeiro

parto precoces; nuliparidade; status pré-menopausa; cor negra; menor status sócio-econômico; maior índice de massa corpórea; consumo frequente de álcool; e uso de anticonceptivo oral (ROBERTSON et al. 2010; VAN UDEN et al. 2015; MOSLEHI et al. 2016). Por outro lado, história familiar positiva em parente de primeiro grau é mais comum em doentes com diagnóstico de carcinoma não-inflamatório (MOSLEHI et al. 2016).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do CIM exige observação rigorosa do aspecto clínico da lesão, uma história médica cuidadosa e os achados histológicos de uma biópsia de pele ou *core biopsy*. Devido à progressão rápida do CIM, o diagnóstico rápido e preciso é fundamental (TAGHIAN et al. 2017).

A alteração clínica mais comumente observada no CIM é o eritema, que pode ser associado a uma sensação de calor e a edema na mama (Figura 1). O edema é associado a depressões junto aos folículos pilosos, o que leva ao típico aspecto em casca de laranja da pele. A progressão rápida, em associação a um eritema ocupando mais de um terço da mama, distingue o CIM (estádio clínico T4d) de um câncer de mama localmente avançado negligenciado com envolvimento de pele (Anexo 1) (ROBERTSON et al. 2010).

O rápido aumento do volume da mama, associado às alterações na pele suprajacente, são normalmente as manifestações que levam a paciente a procurar auxílio médico. Raramente o diagnóstico é feito a partir de mamografia alterada (MATRO et al. 2015). Na maior parte das doentes, não

se consegue individualizar uma massa ao exame clínico. Pode ser identificada a presença de pápulas ou úlceras na pele, além de um endurecimento generalizado. Cerca de 70% dos casos de CIM acompanham-se de disseminação linfonodal em axila ou fossa supraclavicular ao diagnóstico, e um terço se apresenta com metástases à distância (MATRO et al. 2015). Alterações no mamilo podem estar presentes (TAGHIAN et al. 2017).



Figura 1 - Carcinoma inflamatório primário da mama, à esquerda, e secundário, à direita. À esquerda, detecta-se a hiperemia difusa, além de edema, alterações no mamilo e sinais de ulceração na pele. Identifica-se, ainda, o local de realização da biópsia diagnóstica. À direita, as alterações inflamatórias são observadas em mama previamente tratada por carcinoma não-inflamatório. Podem-se observar as marcações para a realização de radioterapia paliativa.

A apresentação clínica é comumente confundida com o da mastite bacteriana, o que pode levar a períodos prolongados de antibioticoterapia fútil e retardo no diagnóstico (VAN UDEN et al. 2015). Outras condições que podem mimetizar o diagnóstico de carcinoma inflamatório são: dermatite actínica, cuja área de eritema tem demarcação bem definida, ao contrário da hiperemia de distribuição difusa do CIM; insuficiência cardíaca congestiva,

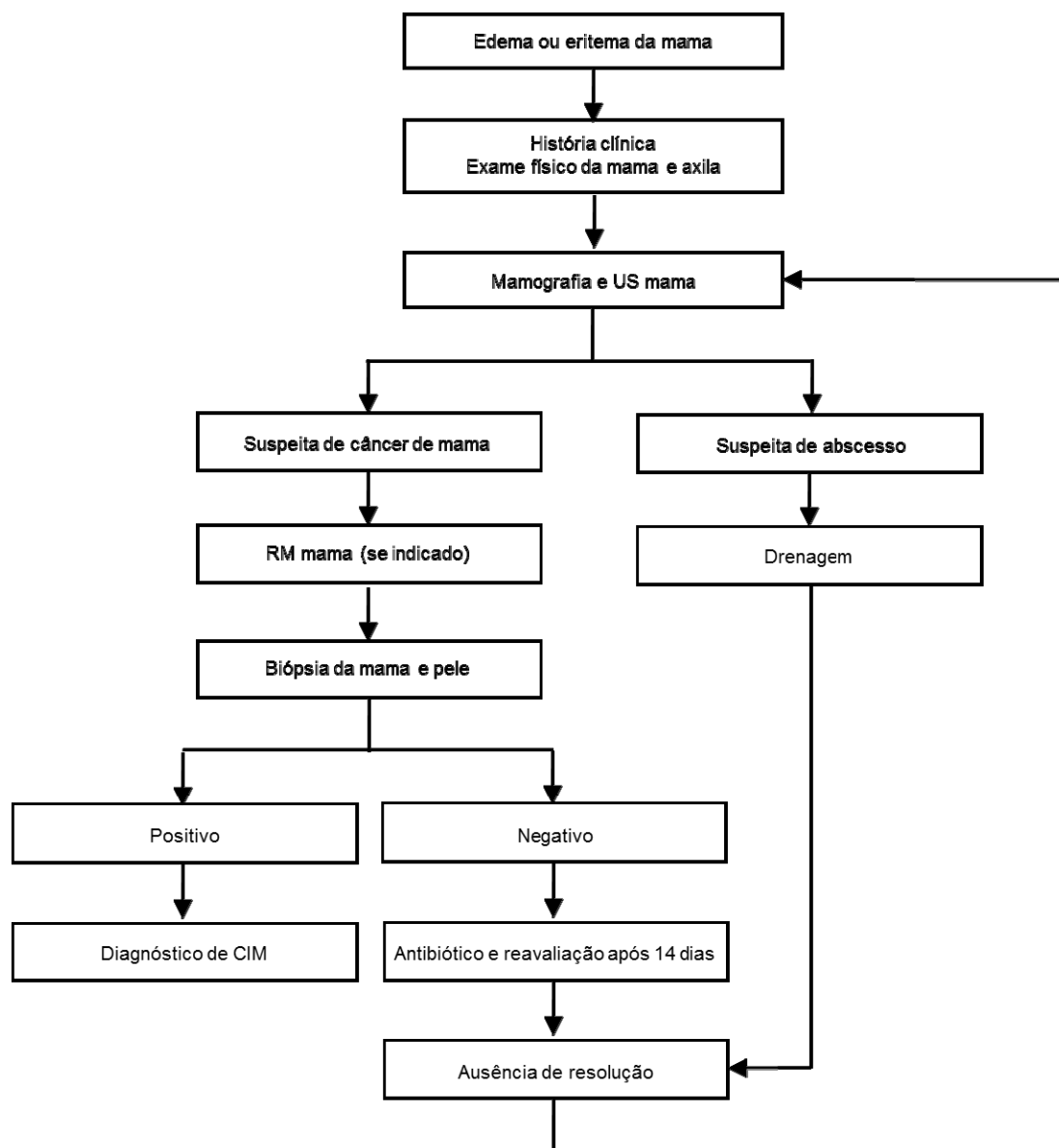
uma rara causa de edema mamário unilateral; linfomas primários da mama; e carcinomas de mama localmente avançados não-inflamatórios, que podem ser distinguidos do CIM pelo edema menos extenso na pele e pelo desenvolvimento mais indolente (ROBERTSON et al. 2010).

O CIM secundário é caracterizado pelo acometimento difuso da mama ou da parede torácica em paciente previamente tratada por um câncer de mama não-inflamatório (Figura 1). Pode se apresentar como um rash difuso da parede torácica ou como nódulos, que podem vir a ulcerar rapidamente (MERAJVER et al. 2017).

Um painel de especialistas em câncer de mama definiu que os critérios mínimos para o diagnóstico de CIM incluem: história de eritema, edema, calor local ou pele em casca de laranja, com ou sem massa palpável; possível história de alterações do mamilo; possível antecedente de diagnóstico de mastite, sem melhora após pelo menos uma semana de antibioticoterapia; evolução por período inferior a seis meses; eritema em pelo menos um terço da mama; e confirmação histológica de carcinoma invasivo por *core biopsy* da mama (DAWOOD et al. 2011a). A Figura 2 mostra um fluxograma de investigação diante da suspeita de carcinoma inflamatório.

Apesar de a presença de êmbolos tumorais linfáticos não ser um pré-requisito para o diagnóstico de CIM, membros do painel recomendam fortemente que todo paciente que preencha critérios clínicos da doença seja submetido a pelo menos duas biópsias de pele. A melhor área para ser

biopsiada é a região mais proeminente de mudança da cor da pele, com *punch* de 2 a 8 mm (DAWOOD et al. 2011a).



Fonte: Adaptado de YAMAUCHI et al. (2012).

Figura 2 - Algoritmo de investigação diagnóstica do carcinoma inflamatório da mama (CIM). RM, ressonância magnética; US, ultrassonografia.

O uso de exames complementares é fundamental para se avaliar a extensão locorregional da doença e a presença de metástases à distância. A mamografia é útil, embora a taxa de identificação de um tumor inflamatório primário seja baixa. O exame pode mostrar calcificações, distorção arquitetural ou uma massa. Espessamento cutâneo e distorção trabecular são descritos em 80% dos pacientes com CIM, mas são achados inespecíficos (YAMAUCHI et al. 2012).

A ultrassonografia pode identificar a lesão primária mais facilmente que a mamografia, além de ser útil como ferramenta auxiliar na realização de biópsia e na avaliação dos linfonodos axilares. À ultrassonografia, o CIM aparece mais comumente como uma área de infiltração heterogênea do parênquima mamário, ou como um conglomerado de massas com edema subcutâneo (ROBERTSON et al. 2010).

A ressonância magnética é um método complementar com alta sensibilidade na localização da lesão primária e na identificação de alterações cutâneas (VAN UDEN et al. 2015).

Devido à alta taxa de disseminação metastática ao diagnóstico, um estadiamento cuidadoso é fundamental para o planejamento terapêutico adequado (Anexo 2). Imagem do tórax e do abdome, assim como investigação óssea com cintilografia ou PET-CT, são recomendados na avaliação inicial dos doentes com CIM (VAN UDEN et al. 2015; National Comprehensive Cancer Network - NCCN 2016).

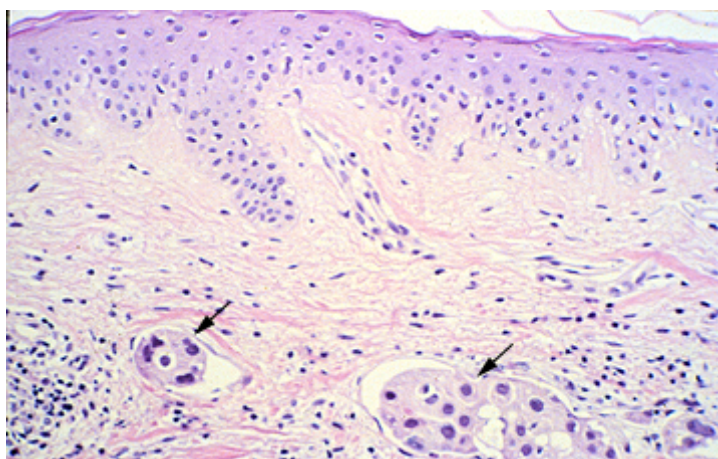
1.1.3 Patologia

O CIM não constitui um subtipo histológico específico de câncer de mama. A presença de achados histopatológicos pertinentes no parênquima mamário e na pele suprajacente, em conjunção com a história clínica característica, permitem ao patologista o diagnóstico da condição. A característica que comumente distingue o CIM do câncer de mama avançado não-inflamatório é a presença de numerosos êmbolos tumorais na derme papilar e reticular da pele que reveste a mama (Figura 3) (ROBERTSON et al. 2010). Êmbolos linfovasculares também podem ser identificados em pacientes com carcinomas não-inflamatórios, ainda que sejam geralmente maiores e mais numerosos em doentes com CIM. Portanto, a presença dos êmbolos não é suficiente para conferir o diagnóstico de carcinoma inflamatório (MERAJVER et al. 2017).

As células neoplásicas no CIM habitualmente têm fenótipo ductal, com alto grau nuclear, alta taxa de proliferação, aneuploidia e alta densidade microvascular intratumoral. Raramente se acompanham de componente *in situ*. O tumor frequentemente infiltra o estroma de forma difusa, o que dificulta sua delimitação de forma precisa. Costuma distribuir-se em vários focos de tamanhos diversos, em detrimento de uma infiltração contínua e uniforme. Seu padrão de crescimento, portanto, é mais disperso do que no câncer não-inflamatório, o que propicia mais espaço para migração das células neoplásicas (CABIOGLU et al. 2007).

Infiltração linfoplasmocítica leve a moderada pode ser observada em torno de espaços linfovasculares contendo êmbolos tumorais. O fenótipo

inflamatório observado no CIM, contudo, não se deve à infiltração de células inflamatórias, mas ao linfedema atribuído aos êmbolos neoplásicos nos linfáticos da derme (MERAJVER et al. 2017).



Fonte: TAGHIAN et al. (2017).

Figura 3 - Amostra de pele de paciente com carcinoma inflamatório da mama com invasão linfática por células tumorais (setas).

O aspecto histológico da pele de pacientes com CIM pode variar amplamente. Amostras da pele de dentro e de fora da área de eritema podem ter o mesmo aspecto microscópico, e êmbolos linfáticos podem ser detectados em áreas sem aspecto clínico suspeito. Não há correlação entre a presença, o número ou o tamanho dos êmbolos e o grau de hiperemia em pacientes com CIM (YAMAUCHI et al. 2012).

Tem-se proposto que o fenótipo de carcinoma inflamatório é resultante de uma combinação de anormalidades do tumor de mama e do parênquima mamário não-neoplásico (WOODWARD 2015). O habitual padrão de envolvimento difuso em toda a mama, mas não em estruturas adjacentes, apesar da inexistência de uma barreira anatômica evidente,

sugere que o parênquima mamário não-neoplásico participa ativamente da fisiopatogênese do CIM. Além disso, fatores de risco para o desenvolvimento do CIM estão associados a alterações do parênquima mamário normal. Um índice de massa corpóreo (IMC) elevado, por exemplo, está associado a inflamação crônica do parênquima mamário. Ademais, em mulheres com baixa idade ao primeiro parto, a involução inadequada das alterações mamárias próprias da lactação poderia manter a mama enriquecida em células-tronco, as quais teriam potencial de contribuir para o processo de carcinogênese. Por fim, diversas evidências apontam que células mamárias normais presentes no CIM promovem o crescimento das células do tumor inflamatório (WOODWARD 2015).

1.1.4 Características moleculares

Estudos moleculares têm trazido luz sobre os fatores patogênicos envolvidos no desenvolvimento do CIM. Em modelo experimental com implantação de tecido de CIM humano em ratos com imunodeficiência severa, observou-se crescimento tumoral em linfáticos e vasos sanguíneos, com eritema importante da pele adjacente. O achado contrasta com o obtido com o implante de células de neoplasia não-inflamatória, após o qual houve crescimento de nódulos subcutâneos isolados (MERAJVER et al. 2017). Os dados indicam que o fenótipo inflamatório pode ser definido por alterações intrínsecas das células neoplásicas do CIM.

Em um esforço para identificar genes e vias que podem contribuir para o fenótipo do carcinoma inflamatório, diversos estudos identificaram

que o CIM está associado à maior incidência de algumas características moleculares, como negatividade de expressão hormonal, hiperexpressão de HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2), EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) e caderina-e, além de altos níveis de marcadores de angiogênese (BERTUCCI et al. 2014). Alterações em genes envolvidos com ciclo celular e apoptose, como *TP53*, *MYC* e reguladores da ciclina, além de alterações na via PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3-quinase/proteína-quinase B), também são anormalidades comuns em pacientes com CIM (CRISTOFANILLI 2016).

Observou-se que o gene *RHOC*, que codifica a proteína RhoC GTPase, está mais comumente hiperexpresso (90% vs. 38%) no CIM, em comparação com tumores não-inflamatórios (MERAJVER et al. 2017). RhoC GTPase é um membro da superfamília RAS envolvido na reorganização do citoesqueleto, através da regulação de actina. A transfecção do gene *RHOC* em células epiteliais mamárias humanas leva a aumento da invasividade e motilidade e à liberação de citocinas angiogênicas, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), recapitulando pelo menos em parte o fenótipo do CIM (MERAJVER et al. 2017).

Por outro lado, o gene *WISP3* (proteína da via de sinalização induzida por *WNT1-3*) está frequentemente perdido (80% vs. 21%) no CIM, quando comparado com tumores não-inflamatórios. O produto de *WISP3* é uma proteína relacionada à proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile (IGFBP-rP). A perda de IGFBPrP-1 tem sido associada à progressão do câncer de mama e de próstata, enquanto a transfecção de *WISP3* em

células de câncer de mama inibe o crescimento tumoral, invasividade e angiogênese. Portanto, *WISP3* parece agir como um gene supressor tumoral (MERAJVER et al. 2017).

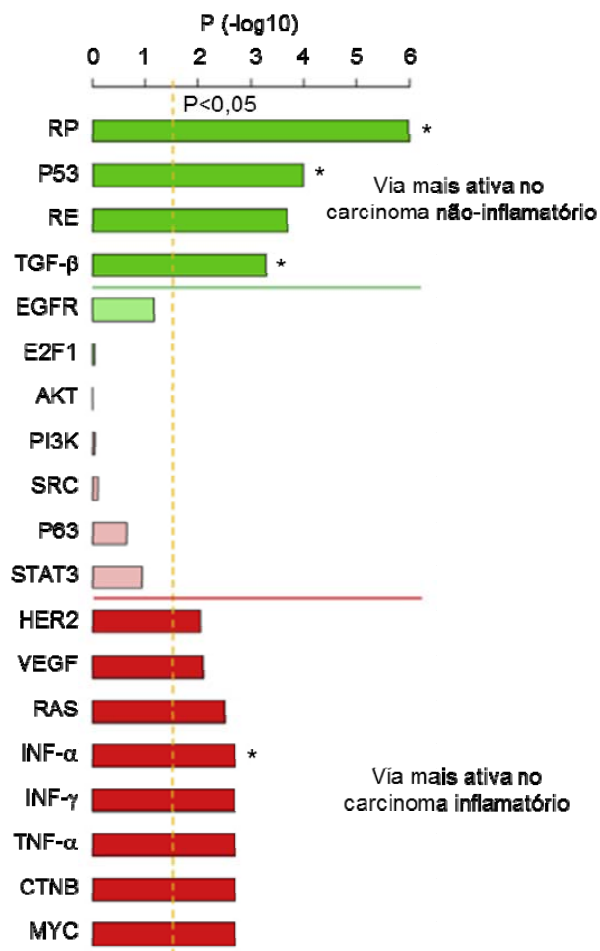
Tem-se sugerido que a mudança no padrão de expressão gênica entre CIM e carcinoma não-inflamatório é explicada principalmente pelo desequilíbrio dos subtipos moleculares entre os dois fenótipos (BERTUCCI et al. 2014). De fato, provou-se que o CIM compreende os mesmos subtipos moleculares que os outros tipos de câncer de mama, mas com frequências diferentes – por exemplo, com maior incidência de tumores HER2-enriquecidos e menor frequência de tumores luminais-A (DAWOOD e CRISTOFANILLI 2015). Contudo, após estratificação de acordo com os subtipos, algumas vias moleculares se mantiveram ativas de forma diferencial entre CIM e tumores não-inflamatórios. Observou-se, por exemplo, hiperexpressão de genes envolvidos na migração celular baseada em actina (*MARCKS*, *RAC1*, *RHOF* e *FNBP1*), além de atenuação da sinalização do Fator de Transformação do Crescimento (em inglês: *Transforming Growth Factor*, TGF)- β no CIM (Figura 4) (VAN LAERE et al. 2013).

A observação de que a via TGF- β é pouco ativa no CIM é um tanto inesperada. A sinalização de TGF- β reduz a coesão das células tumorais e promove a motilidade de células isoladas, um evento habitualmente associado com potencial de metástases à distância e agressividade tumoral. Apesar de terem reduzida a probabilidade de disseminação hematogênica, as células com a via TGF- β hipoativa manteriam a capacidade de migrar

coletivamente para vasos linfáticos, o que é compatível com o achado de êmbolos tumorais proeminentes e com a alta incidência de acometimento linfonodal característicos do CIM. Além disso, dada a importância da via TGF- β na inibição da proliferação de células RE-positivas, a baixa ativação da TGF- β no CIM pode contribuir para a maior frequência de tumores luminais-B na doença, em comparação com tumores luminais-A (BERTUCCI et al. 2014).

Nenhuma assinatura genética mostrou-se suficientemente sensível ou específica para ser empregada como ferramenta diagnóstica (WOODWARD 2015). Uma assinatura com 79 genes proposta por VAN LAERE et al. (2013) mostrou razoável acurácia para predizer o fenótipo inflamatório. Contudo, teste mostrou que cerca de 25% das 400 amostras de tumores não-inflamatórios apresentaram perfil genético sugestivo de CIM. Comparado com o restante do grupo de tumores não-inflamatórios, os tumores com perfil genético inflamatório tiveram pior prognóstico, sugerindo que as células com assinatura de CIM têm maior agressividade, ainda que não sejam capazes de desenvolver fenótipo de CIM (VAN LAERE et al. 2013).

Esses dados reforçam a impressão de que o microambiente tumoral tem papel determinante para o surgimento da apresentação clínica do carcinoma inflamatório. De fato, alterações do microambiente têm sido reportadas com maior frequência no CIM, incluindo infiltração de células imunes e vasculogênese, em especial linfangiogênese (ver seção “Quimiocinas”) (CRISTOFANILLI 2016).



Fonte: Adaptado de BERTUCCI et al. (2014).

Figura 4 - Análise transcricional supervisionada entre carcinoma inflamatório (CIM) e carcinoma não-inflamatório da mama (não-CIM) aplicada à assinatura de ativação de vias. O gráfico mostra o valor P obtido comparando os escores da ativação de 19 vias no CIM versus não-CIM. As barras verde e vermelha indicam que a via está mais ativa no CIM e no não-CIM, respectivamente. O símbolo * identifica as vias cuja associação permanece estatisticamente significativa após estratificação baseada nos subtipos moleculares.

Os perfis do genoma integral no CIM são parecidos com os dos tumores não-inflamatórios, com muitas regiões alteradas similares entre si, a maior parte das quais em frequências semelhantes. Contudo, algumas alterações são mais comuns no CIM. Os genomas tumorais mostraram com

maior frequência ganhos de 1q, 8q e 17q e padrões de rearranjo complexo em pacientes com tumores inflamatórios (BERTUCCI et al. 2014).

Observou-se também maior percentagem de genes com alterações do número de cópias (ANCs) por amostra no CIM, o que sugere que o genoma do carcinoma inflamatório é mais instável. Foram identificados 24 genes relacionados a ANCs com padrão de expressão anormalmente mais alto no CIM em comparação com carcinomas não-inflamatórios, a maior parte dos quais situada nas regiões 8q ou 17q, incluindo *RAD21*, *ATAD2*, *MTSS1*, *ST3GAL1*, *ABC33* e *PTPN2*. São genes envolvidos com diversos processos associados à carcinogênese, como translação proteica, processamento e transcrição de RNA, ciclo celular, migração celular e reparo do DNA. Apesar desses achados, entende-se que as ANCs tumorais não são os principais responsáveis pelo comportamento biológico do carcinoma inflamatório (BERTUCCI et al. 2014).

A comparação entre CIM e carcinomas não-inflamatórios de mama também foi realizada através de estudos de metilação do DNA. Van der AUWERA et al. (2010a) mostraram que o grupo de câncer de mama de alta metilação é enriquecido de pacientes com CIM, e que quatro genes diferencialmente metilados, *TJP3*, *MOGAT2*, *NTSR2* e *AGT*, são responsáveis pela distinção entre os dois grupos. Apesar das diferenças, não parece que a metilação do DNA seja a principal força a determinar as características fenotípicas do CIM (BERTUCCI et al. 2014).

A expressão de microRNAs (miRNAs), uma classe de pequenos RNAs não-codificadores que exercem papel importante na expressão

gênica, foi pesquisada em tumores inflamatórios de mama. Dois estudos detectaram miRNAs diferencialmente expressos em amostras de CIM e de carcinomas não-inflamatórios (VAN DER AUWERA et al. 2010b; LEREBOURS et al. 2013). Identificou-se uma assinatura de 5 miRNAs (miR-421, miR-486, miR-503, miR-720 e miR-1303) capaz de predizer o fenótipo CIM com acurácia de 89% (LEREBOURS et al. 2013).

Como descrito anteriormente, os sinais clínicos de inflamação no CIM se devem à invasão celular dos linfáticos da derme, e não à infiltração de células inflamatórias. De fato, CIM expressa baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ , interleucina (IL)-1 e IL-12.

Por outro lado, outras citocinas podem ter papel importante. Linhagens celulares de CIM liberam quantidade aumentada de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, também denominado FGF-2), IL-6 e IL-8; o aumento da liberação dessas citocinas também ocorre em células epiteliais mamárias humanas transfectadas com o gene *RHOC*. A expressão de fatores angiogênicos e linfoangiogênicos, como VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D, mostrou-se aumentada em pacientes com CIM, em comparação com doentes com carcinomas não-inflamatórios. Quimiocinas também se mostraram diferencialmente expressas em tumores inflamatórios de mama (ver seção “Quimiocinas”, abaixo) (ALPAUGH et al. 1999; TOMLINSON et al. 2001; COLPAERT et al. 2003; VAN DER AUWERA et al. 2004; VAN LAERE et al. 2005; GONG et al. 2006; BERTUCCI et al. 2014).

Pode-se concluir, portanto, que diversos dados experimentais corroboram a impressão de que o CIM apresenta um perfil de expressão

molecular particular e constitui uma entidade biológica distinta dos demais tipos de câncer de mama. Por outro lado, até o momento as diferenças genômicas observadas entre CIM e carcinomas não-inflamatórios parecem sutis, e não conduziram a recomendações clínicas específicas para pacientes com tumores inflamatórios.

1.1.5 Tratamento

Historicamente, pacientes com CIM tratados com cirurgia isolada tinham perspectiva de sobrevida em longo prazo muito baixa. A abordagem multimodal melhorou de forma significativa os desfechos oncológicos dos pacientes com CIM. Apesar disso, o prognóstico permanece pobre, com sobrevida livre de doença mediana inferior a 2,5 anos, sobrevida mediana em torno de 4 anos e sobrevida global de 30% a 40% em 5 anos (KLEER et al. 2010; TAGHIAN et al. 2017).

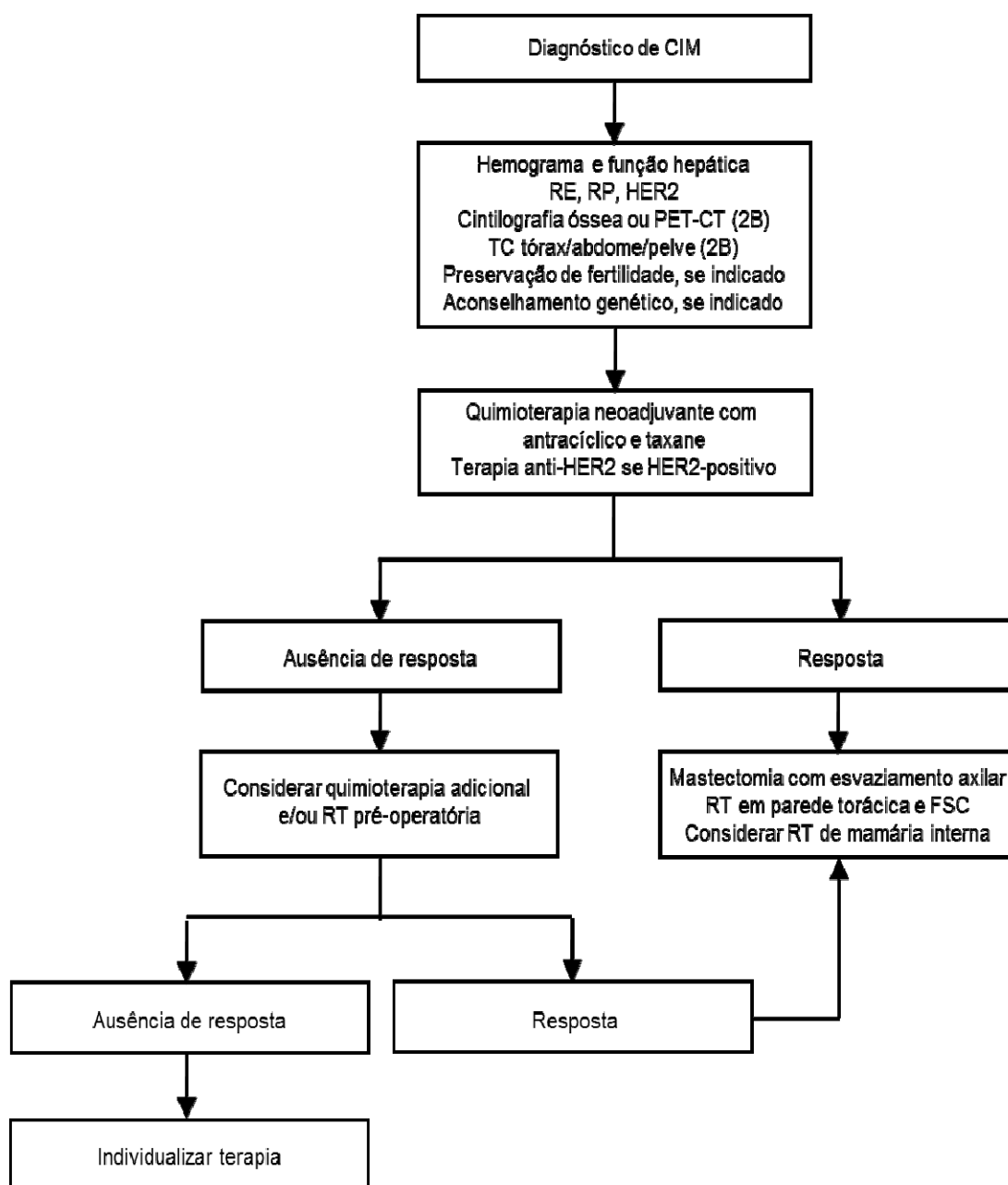
Nas pacientes com doença localizada, recomenda-se atualmente iniciar o tratamento com quimioterapia neoadjuvante, visando à redução da massa tumoral e à avaliação de resposta *in vivo*. Cerca de três semanas após a conclusão da quimioterapia, indica-se mastectomia radical com esvaziamento axilar, quando apropriado (VAN UDEN et al. 2015) (Figura 5).

O papel da cirurgia no manejo do CIM localizado foi avaliado em série retrospectiva de 232 pacientes tratados no Instituto Curie, na França. Após exposição a quimioterapia neoadjuvante, um grupo foi submetido a radioterapia exclusiva (N=118), e outro grupo a cirurgia mamária, seguida ou não por radioterapia (N=114). A adição da cirurgia associou-se a maior

controle locorregional, ainda que sem diferença em sobrevida global ou sobrevida livre de doença (ABROUS-ANANE et al. 2011).

A abordagem cirúrgica recomendada é a mastectomia radical com esvaziamento axilar. Terapias conservadoras locais devem ser consideradas experimentais no manejo do CIM, uma vez que a extensão da doença pode ser subestimada em 60% dos casos e que, portanto, é alto o risco de comprometimento das margens de ressecção. De forma similar, a biópsia de linfonodo sentinela em pacientes com CIM não se mostrou uma estratégia confiável, já que a taxa de falso negativo é inaceitavelmente alta (VAN UDEN et al. 2015).

O emprego de radioterapia adjuvante na parede torácica, incluindo linfonodos axilares, supraclaviculares e infraclaviculares ipsilaterais, é recomendado em pacientes com CIM. Apesar de um impacto em sobrevida não ter sido documentado de maneira uniforme, o incremento do controle locorregional faz da radioterapia uma modalidade importante no manejo da doença. Os regimes de fracionamento podem variar, mas doses cumulativas superiores a 50 Gy costumam ser recomendadas (BRISTOL et al. 2008).



Fonte: Adaptado de NCCN (2016).

Figura 5 - Algoritmo de tratamento neoadjuvante do carcinoma inflamatório de mama (CIM). Todas as recomendações têm categoria 2A de evidência (baseadas em menor nível de evidência, mas com consenso uniforme entre os especialistas), a menos que indicado diferente. 2B, recomendação baseada em menor nível de evidência, mas com consenso razoável entre os especialistas; FSC; fossa supraclavicular; RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona; RT, radioterapia; TC, tomografia computadorizada.

Estudos retrospectivos e não-randomizados estabeleceram o papel da quimioterapia com antracíclicos no tratamento sistêmico em pacientes com CIM. Um relato da experiência de 20 anos do *MD Anderson Cancer Center* mostrou que o tratamento baseado em antracíclico resulta em sobrevida global de 40% em 5 anos e 33% em 10 anos (UENO et al. 1997). Mais recentemente, os taxanos foram incorporados aos regimes de quimioterapia perioperatória, devido aos resultados superiores obtidos com a combinação das drogas em comparação com antracíclicos isolados (DE LAURENTIIS et al. 2008; CRISTOFANILLI et al. 2004; DAWOOD e CRISTOFANILLI 2015). Atualmente, curso inicial de quimioterapia com antracíclico, seguido por tratamento adicional com taxanos, constitui o alicerce do tratamento neoadjuvante do carcinoma inflamatório (YAMAUCHI et al. 2012).

Resposta patológica completa é um desfecho importante em estudos de tratamento neoadjuvante em câncer de mama, uma vez que há uma correlação clara entre RCp e maior sobrevida (CORTAZAR et al. 2014). Em pacientes com CIM, a associação entre RCp e melhores resultados oncológicos em longo prazo também foi observada (UENO et al. 1997; HENNESSY et al. 2006). Assim, esforços para melhorar as taxas de RCp, como a inclusão de novos quimioterápicos e de agentes-alvo, têm sido aplicados.

O CIM expressa HER2 com maior frequência que os carcinomas não-inflamatórios, o que provê racional para testar terapias dirigidas contra esse alvo molecular (VIENS et al. 2010). O trastuzumabe é um anticorpo

monoclonal anti-HER2 que mostrou aumentar a sobrevida de pacientes com doença HER2-positiva metastática ou localizada (SLAMON et al. 2001; ROMOND et al. 2005). A alta taxa de RCp observada com a adição de trastuzumabe no tratamento neoadjuvante do câncer de mama (BUZDAR et al. 2005) levou à condução de diversos estudos que avaliaram o papel da droga e do lapatinibe, outro agente anti-HER2, no manejo da doença localmente avançada, incluindo carcinoma inflamatório. Subgrupo do estudo NOAH e análise de três estudos de fase II mostraram taxa de RCp de 55% e taxa de resposta clínica em até 95% com o uso de agentes anti-HER2 em pacientes com CIM (BASELGA et al. 2007; (CRISTOFANILLI et al. 2006; JOHNSTON et al. 2008; BOUSSEN et al. 2010), o que indica que a terapia anti-HER2 deve ser incorporada ao tratamento neoadjuvante das pacientes com CIM HER2-positivo.

O bevacizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF, tem papel estabelecido no tratamento do câncer de mama metastático. A droga mostrou aumentar a taxa de resposta e a sobrevida livre de progressão, mas não a sobrevida global, em diferentes estudos clínicos (MILLER et al. 2007). Os estudos que avaliaram a incorporação de bevacizumabe ao tratamento neoadjuvante mostraram, de forma geral, um aumento de RCp, mas não de sobrevida livre de doença ou sobrevida global (VON MINCKWITZ et al. 2014; EARL et al. 2015; SIKOV et al. 2015; NAHLEH et al. 2016). Por fim, no cenário do tratamento adjuvante, a adição do bevacizumabe não melhorou os desfechos oncológicos em comparação com quimioterapia isolada (CAMERON et al. 2013).

As numerosas evidências que apontam para a importância do processo de angiogênese na fisiopatogenia do CIM (MCCARTHY et al. 2002; VAN DER AUWERA et al. 2004, 2005, NEUFELD et al. 1999; ARIAS-PULIDO et al. 2012) trouxeram expectativa quanto ao impacto do bevacizumabe no manejo da doença. A adição do antiangiogênico à quimioterapia com doxorrubicina e docetaxel mostrou reduzir em 66,7% a expressão de VEGFR-2 em 21 pacientes com CIM ou carcinoma avançado não inflamatório, mas sem impacto em sobrevida livre de doença ou sobrevida global (WEDAM et al. 2006). Os estudos de fase II BEVERLY-1 e BEVERLY-2 mostraram que a adição de bevacizumabe não parece aumentar a resposta à quimioterapia ou reduzir o risco de recorrência em pacientes com CIM HER2-negativo (BERTUCCI et al. 2016; PIERGA et al. 2012). À luz do conjunto desses dados, deve-se considerar que o benefício do uso de antiangiogênicos no tratamento perioperatório do câncer de mama, em especial do CIM, deve ser considerado negligenciável.

Os estudos PEGASE-02, PEGASE-05 e PEGASE-07 avaliaram o emprego de quimioterapia em altas doses acompanhada de resgate autólogo com células-tronco em pacientes com CIM (VIENS et al. 1999; PALANGIE et al. 2004; GONÇALVES et al. 2015). Em conjunto, a alta toxicidade encontrada e os resultados oncológicos insatisfatórios desencorajaram o emprego de quimioterapia em alta dose no manejo da doença.

Apesar das já citadas particularidades biológicas do CIM, o tratamento sistêmico da doença, seja no cenário perioperatório ou paliativo,

não difere daquele empregado em tumores não-inflamatórios de alto risco (YAMAUCHI et al. 2012). A procura por alvos terapêuticos acionáveis farmacologicamente é uma necessidade para otimizar os resultados oncológicos do tratamento do CIM. Neste cenário, a compreensão do papel das quimiocinas na fisiopatogenia da doença pode abrir novas perspectivas de tratamento.

1.2 QUIMIOCINAS

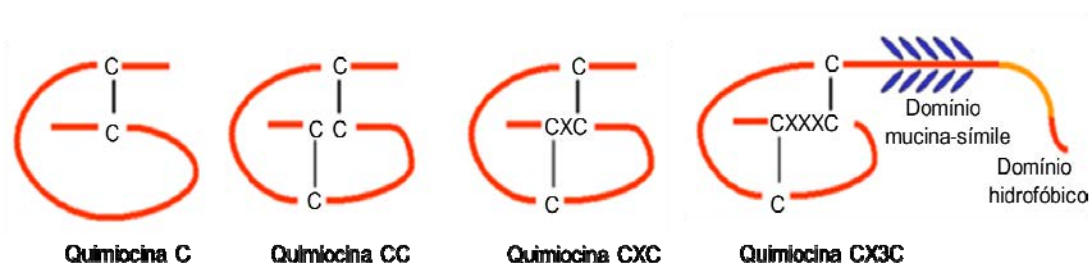
1.2.1 Introdução

Uma associação entre inflamação e câncer foi descrita pela primeira vez no século XIX. A inflamação é um componente-chave do microambiente tumoral e tem sido proposta com a sétima marca registrada do câncer. Dentro da complexa rede de mediadores inflamatórios associados a neoplasias, as quimiocinas exercem papel de destaque (CONDEELIS e POLLARD 2006).

Quimiocinas são uma família de pequenas citocinas que compartilham a propriedade de induzir migração em células adjacentes. Devem seu nome à condensação das palavras “quimiotaxia” e “citocinas”. Ainda que diferentes classes de citocinas e fatores de crescimento tenham potencial de induzir migração direcional de células, são as quimiocinas os principais mobilizadores celulares (BESTEBROER et al. 2010).

Caracterizam-se estruturalmente pelo pequeno tamanho (8-10 quilodaltons) e pela presença de uma estrutura proteica conservada,

estritamente dependente de duas pontes dissulfeto conectando resíduos de cisteína, os quais são essenciais para manter seu formato tridimensional.



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

Figura 6 - Estrutura dos diferentes grupos de quimiocinas. As linhas pretas correspondem a pontes dissulfeto.

As posições relativas dos resíduos de cisteína determinam a identificação de quatro subfamílias. As quimiocinas CC, que têm os dois primeiros resíduos de cisteína em posições adjacentes, e as quimiocinas CXC, que têm resíduos separados por um único aminoácido interponente, correspondem ao maior número de moléculas (25 e 15, respectivamente). A subfamília C, cujos membros têm um único resíduo de cisteína na terminação amina, e as quimiocinas CX3C, com três resíduos separando as moléculas de cisteína, são representadas por uma minoria de moléculas (Figura 6) (BESTEBROER et al. 2010).

De forma geral, as quimiocinas interagem com receptores acoplados à proteína G de domínio transmembrana, que são encontrados nas superfícies de suas células-alvo. Constituem-se de sete receptores rodopsina-símbles cuja atividade de sinalização é mediada por proteínas G

heterotrimétricas, as quais, uma vez ativadas, induzem migração celular direcional ao longo do gradiente do ligante.

A classificação das quimiocinas baseada na estrutura dos ligantes é refletida na classificação de seus receptores, que são estritamente limitados aos membros de cada subfamília. Assim, os receptores de quimiocinas CC (CCR1 a 10) e os seis receptores de quimiocinas CXC (CXCR1 a 6) reconhecem apenas quimiocinas CC e CXC, respectivamente. De forma similar, o único receptor de quimiocina C (XCR1) e o único receptor de quimiocina CX3C (CX3CR1) conectam-se apenas a seus respectivos ligantes (Quadro 1) (MANTOVANI et al. 2010).

As quimiocinas CXC são divididas em dois grupos, de acordo com a presença da sequência de aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina (sequência ELR). O grupo ELR-positivo, do qual faz parte CXCL8 (também conhecido como IL-8), é caracterizado pela indução de migração de neutrófilos e pela interação com CXCR1 e CXCR2. O outro grupo de quimiocinas CXC, do qual CXCL13 é um exemplo, prescinde da sequência ELR e tende a ser quimioatraente para linfócitos (MANTOVANI et al. 2010).

1.2.2 Função Biológica

Algumas quimiocinas, consideradas pró-inflamatórias, são produzidas em resposta a condições inflamatórias e a estímulos imunes. Outras, denominadas homeostáticas, controlam o endereçamento (*homing*) de leucócitos e a recirculação de linfócitos em condições fisiológicas (Quadro 1). Induzem o rearranjo do citoesqueleto, a adesão a células endoteliais e a

migração direcional. Agem de forma coordenada com proteínas da superfície celular para direcionar vários subtipos de células hematopoiéticas até sítios anatômicos específicos, incluindo a adesão de células-tronco ao osso durante a vida fetal e após um transplante de medula (CABIOGLU et al. 2009).

Em geral, polimorfonucleares (PMN) são alvos maiores das quimiocinas CXC ELR-positivos, que agem através de CXCR1 e CXCR2; monócitos são recrutados principalmente por quimiocinas CC agindo através de CCR1, CCR2 e CCR5; linfócitos Th1 (*T helper 1*) e NK (*Natural Killer*), agentes chave da inflamação do tipo 1, são principalmente responsivas a quimiocinas CXC através de CXCR3; linfócitos Th2 e eosinófilos, associados à resposta inflamatória do tipo 2, são atraídos através da ação de agonistas de CCR3 e CCR4 (Quadro 1) (MANTOVANI et al. 2010).

Enquanto as quimiocinas têm um papel conhecido no recrutamento leucocitário, agora está claro que desempenham atividades muito mais amplas, incluindo a regulação da diferenciação celular, proliferação, sobrevivência e senescência (CABIOGLU et al. 2009). Tal espectro de atividades biológicas, aliada ao fato de que múltiplas células malignas expressam receptores de quimiocinas, confere a esse grupo de citocinas função importante na carcinogênese. De fato, a migração celular direcional, cuja regulação é a principal função biológica das quimiocinas, tem papel em vários aspectos da biologia tumoral, incluindo disseminação metastática, infiltração leucocitária e angiogênese (MÜLLER et al. 2001).

Diversos modelos ajudam a compreender a relação das quimiocinas com o câncer. Tem-se provado que as quimiocinas e seus receptores são alvos de oncogenes de diferentes classes, tais como *RET* no carcinoma papilífero de tireoide e beta-catenina no câncer de mama. O sistema das quimiocinas também é modulado pela inativação de genes supressores tumorais. Um exemplo é o gene *VHL*, que tem como alvo o fator de transcrição HIF1, o qual por sua vez transativa CXCR4 e CCR7 (MANTOVANI et al. 2010). Em outros casos, fatores de transcrição que controlam a ativação de quimiocinas, como NF- κ B (fator nuclear- κ B), são desregulados em células tumorais (GRIFFITHS et al. 2014). Por fim, a ativação cruzada entre receptores quimiotáticos e fatores de crescimento foi reportada em diversos tumores (MANTOVANI et al. 2010).

A compreensão do papel das quimiocinas na carcinogênese exige o estudo do microambiente tumoral. O microambiente é povoado por diversos grupos celulares, incluindo adipócitos, fibroblastos e uma ampla variedade de células hematopoiéticas, assim como vasos sanguíneos e linfáticos e suas células associadas. As quimiocinas produzidas por células neoplásicas e estromais são agentes essenciais para o recrutamento de células imunes para o microambiente tumoral, uma característica fundamental do câncer que, nos últimos anos, tem sido reconhecida como um alvo terapêutico importante (BURSTEIN et al. 2017).

Quadro 1 - Quimiocinas.

Nome	Nome alternativo	Receptor	Função	Função imune principal
CXCL1	GRO α	CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL2	GRO β	CXCR2	Homeostática	Tráfego de neutrófilos
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL4	PF4	Desconhecido	Homeostática	Pró-coagulante
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Inflamatória	Tráfego de neutrófilos
CXCL9	Mig	CXCR3	Inflamatória	Resposta Th1, tráfego Th1, CD8, NK
CXCL10	IP-10	CXCR3	Inflamatória	Resposta Th1, tráfego Th1, CD8, NK
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Inflamatória	Resposta Th1, tráfego Th1, CD8, NK
CXCL12	SDF-1	CXCR4	Homeostática	Endereçamento à M.O.
CXCL13	BLC	CXCR5	Homeostática	Posicionamento de cél B e Thf
CXCL14	BRAK	Desconhecido	Inflamatória	Endereçamento à pele
CXCL15	Lungkine	Desconhecido	Desconhecida	Desconhecido
CXCL16		CXCR6	Inflamatória	Migração de NK e CLI
CCL1	I-309	CCR8	Inflamatória	Tráfego de Th2 e Treg
CCL2	MCP-1	CCR2	Inflamatória	Tráfego de monócito inflamatório
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	Inflamatória	Migração MØ/NK, interação CD/cél T
CCL4	MIP-1 β	CCR5	Inflamatória	Migração MØ/NK, interação CD/cél T
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Inflamatória	Migração MØ/NK, interação CD/cél T
CCL6	C-10	Desconhecido	Desconhecida	Desconhecido
CCL7	MCP-3	CCR2, CCR3	Inflamatória	Mobilização de monócitos
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3	Inflamatória	Resposta Th2, endereçamento à pele
CCL9/10	MIP-1g	Desconhecido	Desconhecida	Desconhecido
CCL11	Eotaxina	CCR3	Inflamatória	Migração de Eo e basófilo
CCL12	MCP-5	CCR2	Inflamatória	Tráfego de monócito inflamatório
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3, CCR5	Inflamatória	Resposta Th2
CCL14	HCC-1	CCR1	Homeostática	Desconhecido
CCL15	Leucotactina-1	CCR1, CCR3	Homeostática	Desconhecido
CCL16	HCC-4	CCR1, CCR2, CCR5	Homeostática	Desconhecido
CCL17	TARC	CCR4	Ambas	Resposta Th2, endereçamento à pele
CCL18	PARC	CCR8	Homeostática	Resposta Th2, endereçamento à pele
CCL19	ELC	CCR7	Homeostática	Endereçamento de cél T e CD a LND
CCL20	MIP-3 α	CCR6	Ambas	Resposta Th17, endereçamento
CCL21	SLC	CCR6, CCR7	Ambas	Endereçamento de cél T e CD a LND
CCL22	MDC	CCR4	Ambas	Resposta Th2, migração de Th2/Treg
CCL23	MPIF-1	Desconhecido	Inflamatória	?
CCL24	Eotaxina-2	CCR3	Inflamatória	Migração de Eo/basófilo
CCL25	TECK	CCR9	Homeostática	Endereçamento de cél T ao intestino
CCL26	Eotaxina-3	CCR3, CX3CR1	Inflamatória	Migração de Eo/basófilo
CCL27	CTAK	CCR10	Homeostática	Endereçamento à pele
CCL28	MEC	CCR3, CCR10	Inflamatória	Endereçamento à mucosa
XCL1	Linfotactina α	CXCR1	Ambas	Apresentação por CD CD8 ⁺
XCL2	Linfotactina β	CXCR1	Ambas	Apresentação por CD CD8 ⁺
CX3CL1	Fractalcina	CX3CR1	Inflamatória	Migração de NK, monócito e cél T

CD, célula dendrítica; cél, célula; NK, *natural killer*; M.O, medula óssea; MØ, macrófago; Th, *T helper*; Thf, *T helper* folicular ; Treg, *T regulatório*.

Fonte: Adaptado de MANTOVANI et al. (2010) e GRIFFITHS et al. (2014)

Os macrófagos assumem papel de destaque nesse cenário. Tem-lhes sido atribuída função em ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, incluindo homeostase, inflamação, reparo, funções metabólicas e malignidade. Sob influência de fatores liberados pelas células malignas, essas células são convertidas em macrófagos associados a tumores (TAMs), que representam um componente importante da massa tumoral no carcinoma de mama e desempenham uma função chave no desenvolvimento da neoplasia (TANG 2013). Estudos clínicos e epidemiológicos indicam uma associação entre a densidade de TAMs e mau prognóstico em diversos tipos de câncer (JINUSHI et al. 2011; SHREE et al. 2011; DENARDO et al. 2009). Os maiores atraentes dos precursores monocíticos em tumores são CCL2 e CCL5, quimiocinas encontradas no estroma tumoral, assim como em células neoplásicas. O achado indica correlação entre quimiocinas e TAMs (MANTOVANI et al. 2010).

Os macrófagos têm sido classificados ao longo do que pode ser considerado uma escala linear, na qual as células classicamente ativadas (M1) representam um extremo, enquanto os macrófagos ativados de forma alternativa (M2) representam o outro polo. Os macrófagos M1 são células pró-inflamatórias caracterizadas pela alta expressão de citocinas como IL-12, óxido nítrico-sintase 2 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e pela alta atividade microbicida e tumoricida. Por outro lado, macrófagos M2 são imunossupressores e produzem altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β , além de baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias (DENARDO et al. 2009).

Os macrófagos na forma M1 têm o potencial de contribuir nas formas mais precoces da neoplasia, especialmente devido à lesão de DNA induzida por radicais livres, que pode predispor à transformação de células hospedeiras. À proporção que o tumor progride, o microambiente tumoral influencia a maior parte dos TAMs a exibir propriedades pró-tumorais M2-símile, ao passo que os macrófagos M1 se comportam como agentes fagocíticos. Os TAMs agem, portanto, como células de dupla função, que desempenham papel chave no desenvolvimento do câncer de mama (DENARDO et al. 2009).

Outras células inflamatórias do microambiente tumoral também têm tido seu papel na carcinogênese e sua interface com o sistema de quimiocinas estudados. Linfócitos tumor-infiltrantes (em inglês: *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, ou TILs) podem se correlacionar com maior sobrevida. Por outro lado, em tumores como o melanoma, o papel protetor dos TILs é comprometido pela alta proporção de células T regulatórias (Tregs), as quais suprimem a atividade antitumoral de células T-efetoras, como células NK (MANTOVANI et al. 2010).

CXCL9 e CXCL10 são os principais estímulos de atração sobre TILs, embora outras quimiocinas, como CX3CL1 e CXCL16, possam estar envolvidas no processo (MANTOVANI et al. 2010). CCL17 e CCL22, por sua vez, têm a propriedade de recrutar células T que inibem respostas antitumorais, e estão comumente associadas a mau prognóstico. Já a presença de células NK no infiltrado tumoral é incomum e se correlaciona com maior sobrevida. Quimiocinas que agem sobre CXCR1 e CXCR3 são

consideradas os principais determinantes da infiltração por células NK (MANTOVANI et al. 2010).

Leucócitos polimorfonucleares não são considerados agentes decisivos na inflamação relacionada ao câncer, mas seu papel pode ser revisitado. Número elevado de polimorfonucleares é encontrado em biópsias de diversas neoplasias humanas, e acredita-se que essas células sejam recrutadas por quimiocinas CXC ELR-positivas (MANTOVANI et al. 2010).

Células dendríticas mieloides e plasmocitoides estão presentes em vários tipos de câncer, mas em estado imaturo e aparentemente refratário a sinais de maturação. São localizados na borda de invasão do tumor e são excluídos da massa tumoral. Há evidência de que CCL20, CCL12, CCL5 e CCL19 têm a propriedade de atrair células dendríticas que ativam células T citotóxicas tumor-específicas em diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama (MANTOVANI et al. 2010).

A despeito das lacunas científicas que circundam o papel das quimiocinas na carcinogênese, estratégias terapêuticas dirigidas contra esse grupo de citocinas já estão em avaliação clínica. A hiper-regulação de certas quimiocinas nos tumores, em comparação com as células normais, cria a perspectiva do desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer (ALI e LAZENNEC 2007).

A manipulação do microambiente tumoral pelo tratamento com quimiocinas pode ser usado para obter respostas citotóxicas. Diversas evidências experimentais dão suporte a essa estratégia. A oferta intratumoral de CCL21 em modelo de neoplasia de cólon, utilizando o vírus

da varíola como vetor, resultou em aumento da infiltração de células T CD4⁺ e na inibição do crescimento tumoral. De forma similar, injeções intratumorais de vetores adenovirais expressando CCL16, CCL17, CCL22 e CCL27 foram capazes de inibir crescimento e atrair células T ativadas. Vários tumores murinos foram modificados para hiper-regular quimiocinas, de forma a incrementar a resposta antitumoral (MANTOVANI et al. 2010).

A alta expressão de IL-8 pode tornar um tumor altamente angiogênico e invasivo. Um anticorpo humanizado anti-IL-8 foi desenvolvido e, em modelos pré-clínicos, foi capaz de reduzir angiogênese, crescimento tumoral e metástases de melanoma e câncer de bexiga. Um antagonista de CCR1 e CCR5, receptores de CCL2, levam à redução da infiltração macrofágica e do crescimento tumoral. De forma análoga, carlumabe, um anticorpo anti-CCL2, mostrou-se seguro em estudo de fase Ib em combinação com quimioterapia em pacientes com tumores sólidos. Contudo, não se observou supressão prolongada de CCL2 sérico ou respostas tumorais (BRANA et al. 2015).

O bloqueio da via CXCL12/CXCR4 é uma estratégia promissora no manejo do câncer de mama. O silenciamento da expressão de CXCR4 através do emprego de pequeno RNA de interferência (siRNA) e os antagonistas de CXCR4 TN14003 e AMD3100 têm mostrado potencial eficácia clínica (MANTOVANI et al. 2010).

Há um importante problema a ser equacionado para tornar viáveis terapias baseadas em quimiocinas: a heterogeneidade do tumor. Quimiocinas que são benéficas a um paciente podem ser prejudiciais a outro. Este problema poderia ser superado pela tipificação do perfil de

quimiocinas de cada tumor antes do início da intervenção. Isso reforça a necessidade de se estudar profundamente o sistema de quimiocinas e seu papel na carcinogênese dos diversos tumores humanos (ALI e LAZENNEC 2007).

1.2.3 Quimiocinas no câncer de mama

A mama normal expressa uma variedade de quimiocinas, ainda que em baixos níveis. CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8 foram detectados no leite humano. Células epiteliais da mama normal em cultura também secretam IL-8, além de TNF- α e IL-6. Em muitos casos, quimiocinas são encontradas em maiores níveis em tumores de mama em comparação com tecidos mamários normais, o que sugere participação dessas proteínas na patogênese da doença. De fato, estudos recentes têm mostrado que interações entre receptores de quimiocinas e células de câncer de mama e seus ligantes em órgãos hospedeiros desempenham papel na disseminação maligna e na progressão da doença (CABIOGLU et al. 2007).

Evidências apontam que a hipexpressão de algumas quimiocinas ou receptores de quimiocinas, como CXCR4 e CCR7, têm papel prognóstico adverso no câncer de mama (GÜNTHER et al 2005; CABIOGLU et al. 2007). Além disso, tem-se sugerido que o sistema de quimiocinas pode influenciar o padrão de disseminação metastática da doença, com implantes preferenciais em sítios específicos (CABIOGLU et al. 2009).

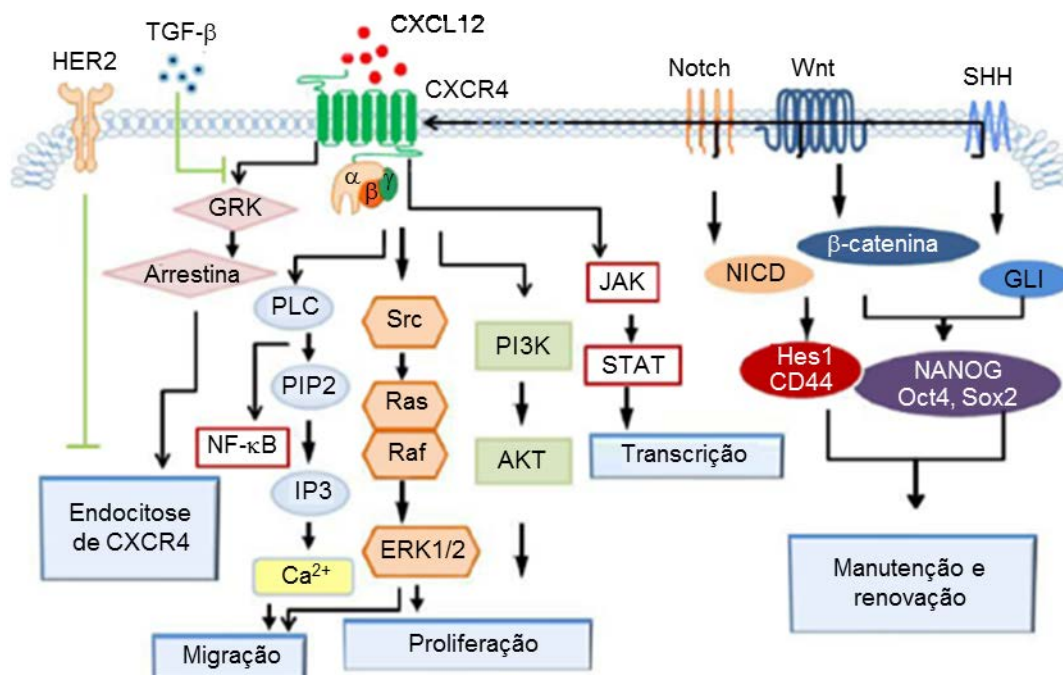
No cenário do CIM, análise de perfil gênico documentou que CXCL2, CCL3 e CCL5 têm expressão aumentada, quando comparados com

carcinomas não-inflamatórios (BIECHE et al. 2004; BERTUCCI et al. 2004a). Há indícios, portanto, de que quimiocinas estejam envolvidas na patogênese do carcinoma inflamatório de mama. As evidências, contudo, são incipientes, e novas informações sobre o papel de quimiocinas no CIM são necessárias.

1.2.4 CXCR4 e CXCL12

CXCR4 é um receptor de superfície celular acoplado à proteína G do tipo rodopsina-símile, com 352 aminoácidos, expresso de forma constitutiva em tecidos linfáticos, timo, cérebro, baço, estômago e intestino delgado, entre outros sítios. O ligante de CXCR4 é CXCL12, também conhecida como SDF-1 (fator derivado do estroma-1; em inglês, *Stromal-Derived Factor-1*), uma quimiocina expressa em uma variedade de células, incluindo fibroblastos e células endoteliais (XU et al 2015).

A interação entre CXCL12 e CXCR4 leva à ativação de vias de transdução de sinal que mediam sobrevivência, proliferação, quimiotaxia, migração e adesão celular (Figura 7), o que lhes confere importância em numerosos processos fisiológicos, como o trânsito e homeostase de linfócitos, o endereçamento e retenção de células hematopoiéticas na medula óssea, a vascularização do trato gastrointestinal e a migração de neurônios e células germinativas (LI et al. 2004).



Fonte: Adaptado de XU et al. (2015).

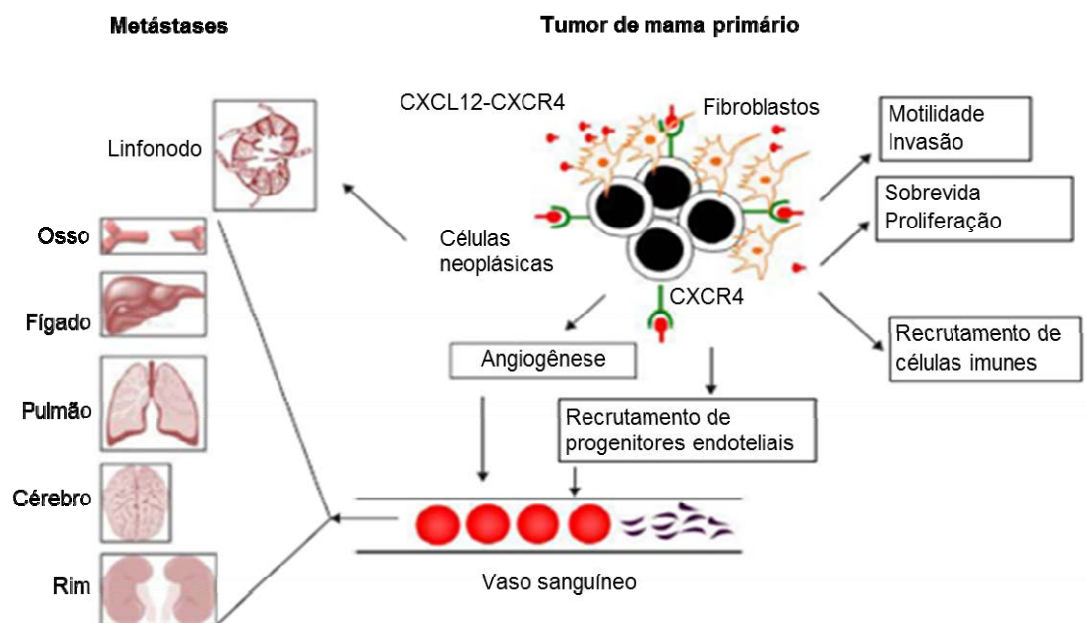
Figura 7 - Vias moleculares mediadas por CXCR4. CD44, grupamento de diferenciação 44; CXCR4, receptor de quimiocina CXC do tipo 4; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; GLI, homólogo do oncogene associado ao glioma; HER2, receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; NF-κB, fator nuclear-κB; NICD, domínio intracelular notch; OCT, fator de transcrição ligante do octâmero; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; SDF-1, fator derivado do estroma-1; TGF-β, Fator de transformação do crescimento β.

Diversas evidências apontam para uma atuação do eixo CXCL12/CXCR4 no processo de carcinogênese: (1) CXCR4 é altamente expresso em várias neoplasias malignas, como câncer de boca, esôfago, estômago, cólon, fígado, pâncreas, mama, ovário, próstata, pulmão, rim, cérebro, melanoma e leucemia. CXCL12, por sua vez, é hiper-regulado em neoplasias como câncer de mama, ovário e tireoide (MIRISOLA et al. 2009; SHAN et al. 2015); (2) proteínas a jusante de CXCR4 em diferentes cascatas de sinalização, como PI3K/AKT, MAPK (proteína-quinase ativada

por mitógeno, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) e PLC/PKC (fosfolipase C/proteína-quinase C, do inglês *Phospholipase C/Protein Kinase C*), têm atividade pró-tumoral (Figura 7) (XU et al. 2015); (3) células neoplásicas aumentam sua propriedade de migração transendotelial e cooptam o sistema de quimiocinas normalmente utilizado para tráfego de leucócitos como mecanismo de endereçamento a sítios metastáticos específicos. De fato, órgãos com maior secreção de CXCL12, como fígado, medula óssea, pulmão, cérebro e linfonodos, são os sítios metastáticos preferenciais do câncer de mama (OKUYAMA KISHIMA et al. 2015; WURTH et al. 2015); (4) CXCL12 liberado por células estromais recruta progenitores endoteliais circulantes e leva ao aumento da densidade vascular na lesão neoplásica (ORIMO et al. 2005); (5) CXCL12/CXCR4 pode transativar as vias de sinalização mediadas por EGFR e HER2 (XU et al. 2015); (6) células dendríticas recrutadas ao sítio tumoral por CXCR4 têm propriedade imunossupressora, devido à inativação de células T citotóxicas, portanto promovem crescimento tumoral (Figura 8) (ZOU et al. 2001).

O papel de CXCL12/CXCR4 no câncer de mama foi documentado em modelos pré-clínicos. A inoculação de linhagem de células de câncer de mama com baixa expressão de CXCR4 (MCF-7) em camundongos imunossuprimidos forma uma massa tumoral de volume reduzido, quando comparada com a inoculação de linhagem com CXCR4 hiperexpresso (MDA-MB-231) (DEWAN et al. 2006). Além disso, células tumorais com redução da expressão de CXCR4 através da interferência de RNA apresentam menor crescimento tumoral, em comparação com células com

CXCR4 normo- ou hiperexpresso, em animais imunocompetentes (SMITH et al. 2004; LAPTEVA et al. 2005).



Fonte: Adaptado de XU et al. (2015)

Figura 8 - Potencial papel de CXCR4 no câncer de mama.

No cenário do carcinoma inflamatório de mama, o papel do eixo CXCL12/CXCR4 é menos claro. CABIOGLU et al. (2007) identificaram expressão de CXCR4 em 18 de 44 pacientes com CIM investigadas. Sugeriu-se que CXCR4 poderia representar fator prognóstico adverso nas pacientes com CIM, mas o pequeno tamanho da amostra não permitiu análises robustas de sobrevida. Em dois modelos experimentais de carcinoma inflamatório, mostrou-se que CXCL12 aumenta a migração transendotelial das células neoplásicas e estimula vias de sobrevida e migração, e que o efeito é reduzido por inibidores de CXCR4 (SINGH et al. 2010; WURTH et al. 2015). Algumas evidências apontam, portanto, para a

participação de CXCR4 e CXCL12 no desenvolvimento de CIM. Contudo, os estudos não se propuseram a comparar o papel do eixo CXCL12/CXCR4 em tumores inflamatórios e não-inflamatórios e careceram de correlações maduras com os desfechos clínicos, incluindo sobrevida.

1.2.5 CCR7

O receptor de quimiocina CC do tipo 7 (CCR7) é uma proteína transmembrana acoplada à proteína G expressa em vários subtipos de células imunes, incluindo células T e células dendríticas maduras. Dados obtidos ao longo das últimas duas décadas creditam a CCR7 e a seus dois ligantes, CCL19 e CCL21, importância fundamental no sistema imune adaptativo (FÖRSTER et al. 2016). A interação de CCR7 com um de seus ligantes controla a diferenciação de progenitores de células T, e sua presença divide as células T de memória em dois grupos: as células T de memória efetora (CCR7-negativas) e de memória central (CCR7-positivas) (CABIOGLU et al. 2007). Além disso, CCR7 guia linfócitos e células dendríticas para linfonodos, seja a partir da circulação sanguínea ou de vasos linfáticos aferentes (FÖRSTER et al. 2016).

CCL21 e, em menor proporção, CCL19 são expressos na superfície luminal das células endoteliais e disparam uma cascata de sinalização mediada por CCR7 que promove a ativação de integrinas expressas em linfócitos, as quais permitem uma adesão firme ao endotélio e a subsequente migração para o parênquima linfonodal (FÖRSTER et al. 2016). Acredita-se que as células neoplásicas com hiper-regulação de CCR7

apropriam-se das ferramentas migratórias das células imunes, deslocando-se para vasos linfáticos e para zonas de células T de linfonodos no sentido do gradiente de CCL21.

Estudos clínicos têm reportado que CCR7 é expresso em múltiplos carcinomas, como câncer de pulmão, esôfago, estômago, cólon, pâncreas e mama (DING et al. 2003; TAKANAMI 2003; GÜNTHER et al. 2005; GUO et al. 2013; DU et al. 2017), e tem sido associado com maior risco de metástase linfonodal e pior sobrevida (MÜLLER et al. 2001; DU et al. 2017). Cerca de 70% dos carcinomas inflamatórios de mama apresentam-se com disseminação linfonodal ao diagnóstico (MATRO et al. 2015), o que levanta a hipótese de CCR7 ter papel na patogênese da doença. Contudo, o receptor é pouco investigado no cenário do CIM.

1.2.6 CXCR1

O receptor de quimiocina CXC do tipo 1 (CXCR1) é um receptor acoplado à proteína G rodopsina-símile que participa do processo da transdução de sinal intracelular. Tem alta afinidade pela quimiocina CXCL8, também conhecida como interleucina-8 (IL-8) (LIU et al. 2016). A interação de IL-8 com um de seus receptores, CXCR1 ou CXCR2, participa da tumorigênese de diversas neoplasias, incluindo câncer de mama, próstata, pulmão, colorretal e melanoma (GINESTIER et al. 2010; BRANDOLINI et al. 2015). CXCR1 e CXCR2 apresentam considerável similaridade estrutural entre si e são encontrados em células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos (SNOUSSI et al. 2010).

IL-8 é uma quimiocina inflamatória do tipo CXC que atua de forma parácrina e autócrina sobre as células-alvo e tem a propriedade de induzir a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos até o tecido adjacente (WAUGH e WILSON 2008). É regulada por uma variedade de estímulos diferentes, incluindo sinais inflamatórios, como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\alpha$, sinais químicos e ambientais, como exposição a agentes quimioterápicos e hipóxia, e hormônios esteroides. Ativa proteínas de múltiplas vias de sinalização intracelular a jusante dos receptores CXCR1 e CXCR2, como AKT, ERK, STAT-3 e MMP-9 (CAO et al. 2016).

O eixo IL-8/CXCR1-2 tem importância na carcinogênese. O aumento da expressão de IL-8 ou de seus receptores é observado em células malignas, neutrófilos e TAMs, o que sugere que a quimocina pode funcionar como um fator regulatório importante no microambiente tumoral. A partir da ativação de múltiplos alvos intracelulares, IL-8 promove respostas angiogênicas em células endoteliais, aumenta a proliferação e sobrevivência de células endoteliais e neoplásicas e potencializa a migração de células malignas, o que lhes confere maior potencial de disseminação à distância (WAUGH e WILSON 2008). Além disso, IL-8 é um regulador do recrutamento de polimorfonucleares para o sítio tumoral, o que também pode contribuir para o desenvolvimento de metástases (BELLOCQ et al. 1998). Por fim, o emprego de um antagonista de CXCR1/2 inibiu o crescimento tumoral em modelo de câncer de pulmão, o que reforça o papel dos receptores na carcinogênese (KHAN et al. 2015).

As evidências correlacionando o eixo IL-8/CXCR1-2 à patogênese do câncer de mama são robustas. IL-8 e seus receptores são detectados em células malignas mamárias (MILLER et al. 1998). Os níveis da quimiocina são significativamente mais altos em pacientes com neoplasia de mama do que em controles sadios. Polimorfismos nos genes que codificam IL-8 e CXCR2 estão associados com maior incidência da doença (SNOUSSI et al. 2010). Foi demonstrado que CXCR1 é hiperexpresso em células-tronco tumorais mamárias, as quais têm comportamento refratário às intervenções antineoplásicas e são tidas como responsáveis pela repopulação tumoral após exposição à atividade citotóxica da quimioterapia (GINESTIER et al. 2010; SINGH et al. 2013a). Reparixina, um inibidor de CXCR1, mostrou reduzir a massa tumoral e a população de células-tronco, além de conter a formação de metástases, em modelos animais de câncer de mama (BRANDOLINI et al. 2015). Entretanto, há poucas evidências acerca do papel de IL-8 e seus receptores no carcinoma inflamatório de mama.

1.2.7 Fosfo-mTOR

O crescimento, invasão e metástase do câncer são mediados por diversas vias de sinalização intracelular. AKT, que transmite sinais de receptores como EGFR, HER2 e HER3, é uma das vias mais estudadas. Uma vez estimulados, esses receptores levam à ativação de fosfoinositídeos ligados à membrana, como PI3K. A fosforilação de AKT conduz à ativação de uma cascata de diferentes proteínas envolvidas na apoptose,

crescimento celular e proliferação. Essa via comumente está ativada no câncer de mama.

Um componente-chave na via AKT é a serina/treonina-quinase denominada mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos; em inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*). mTOR é um regulador central do crescimento celular e da síntese tumoral e desempenha papel importante na formação e progressão tumoral, o que fez da proteína um alvo importante no tratamento do câncer de mama, do câncer renal e de tumores neuroendócrinos (WALSH et al. 2012).

No câncer de mama hormônio-sensível, um mecanismo de resistência à terapia endócrina é a sinalização aberrante através da via PI3K/AKT/mTOR. Um substrato do complexo 1 da mTOR (mTORC1), denominado S6 quinase 1, fosforila o domínio de ativação 1 do receptor de estrógeno, o que promove ativação do receptor de maneira independente do ligante. O mecanismo torna mTOR um alvo a ser explorado em tumores de mama RE-positivos resistentes à manipulação hormonal. De fato, o uso do everolimo, um inibidor de mTOR, mostrou aumentar a sobrevida livre de progressão de pacientes com câncer de mama hormônio-sensível com falha após inibidor de aromatase, em um estudo de fase III (BASELGA et al. 2012).

Os resultados são uma prova de que a via PI3K/AKT/mTOR exerce papel de destaque no câncer de mama, pelo menos no grupo RE-positivo. Infelizmente, carece-se de fatores preditivos claros de resposta ao

tratamento com agentes anti-mTOR, o que torna importante a busca por biomarcadores.

A expressão de mTOR e de sua forma ativa, fosfo-mTOR (p-mTOR), tem sido investigada em diversos tumores, em especial no câncer de mama. O papel da proteína na patogênese do carcinoma inflamatório de mama, contudo, é desconhecido.

1.2.8 FOXP3

TILs são linfócitos que migraram da circulação sanguínea para um tumor (CHEN et al. 2017). Incluem várias células do sistema imune, algumas das quais colaboram na erradicação de células neoplásicas, como linfócitos T CD8, células NK e macrófagos. Outros tipos celulares, como Tregs e células supressoras derivadas de linhagem mieloide, promovem a proliferação e a sobrevivência de células tumorais. Podem ser utilizados para monitorar a resposta imunológica e podem prever a resposta ao tratamento em diversas neoplasias (ASANO et al. 2016).

FOXP3 (do inglês *Forkhead box P3*) é um fator de transcrição que contém um domínio de ligação ao DNA o qual suprime a expressão de genes alvo. É expresso de forma constitutiva no núcleo de Tregs e desempenha papel importante no desenvolvimento e na função dessas células. Tregs são caracterizadas pela expressão de CD4, CD25 e FOXP3, mas é FOXP3 o principal marcador utilizado para identificar esse subgrupo de linfócitos (WEST et al. 2013). Sob condições normais, Tregs são

essenciais na supressão de respostas imunes inapropriadas, o que lhes confere papel na tolerância imunológica a tecidos nativos.

A inibição da atividade imune por Tregs pode ser justificada pela secreção de TGF- β e IL-10, o que modula negativamente a proliferação através da inibição de IL-2 e da hiporregulação do complexo de histocompatibilidade maior (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) do tipo II em monócitos (SHOU et al. 2016). A capacidade de Tregs de reduzir a atividade de células T efetoras faz com que FOXP3 seja compreendido como um sinalizador do escape à vigilância imunológica antitumoral. De fato, vários estudos mostraram uma associação entre hiperexpressão de FOXP3 e pior prognóstico (SHOU et al. 2016).

Além de estar presente em linfócitos T regulatórios, há evidências de que a proteína é expressa em muitas células tumorais, inclusive no câncer de mama. Contudo, o papel de FOXP3 em células tumorais é incerto. Parece desempenhar função na supressão da resposta imune, de forma similar à sua função em Tregs; por outro lado, a expressão da proteína pode suprimir o crescimento neoplásico por si, por inibir a expressão de oncogenes tumorais (NAIR et al. 2013). FOXP3 pode atuar, portanto, como um supressor tumoral em alguns cenários, e como promotor de progressão da neoplasia em outros.

Há necessidade de ampliar a compreensão sobre o duplo papel da proteína no câncer. Ainda que numerosas publicações tenham explorado o papel de FOXP3 em tumores de mama, há poucas evidências sobre Tregs ou FOXP3 em carcinomas inflamatórios.

1.2.9 PD-L1

PD-L1 (ligante da proteína de morte celular programada 1, do inglês *Programmed Death Ligand 1*) é uma proteína transmembrana que pertence à família B7 de moléculas imunes e é hiper-regulada em resposta a sinais pró-inflamatórios, como interferon- γ (NANDA et al. 2016). Desempenha papel essencial na contenção da resposta imune citotóxica através da interação com o receptor PD-1 (proteína de morte celular programada 1, ou *Programmed Death-1*), o qual é expresso em células T CD8, CD4 e NK, células B, monócitos ativados e células dendríticas (BECKERS et al. 2016). A interação entre PD-L1 e PD-1 é importante para moderar a resposta imune celular através da indução de tolerância das células T, o que contribui para evitar o desenvolvimento de fenômenos auto-imunes (CHEN et al. 2017).

A expressão de PD-L1 é observada em células hematopoiéticas, epiteliais e endoteliais em resposta à inflamação (BECKERS et al. 2016) e tem sido descrita em taxas de 20% a 70% em uma variedade de tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, bexiga, ovário e melanoma (GHEBEH et al. 2007; CHEN et al. 2017; SUN et al. 2016). A expressão de PD-L1 em tumores sólidos tem sido associada à supressão da atividade e à indução de apoptose de células T.

A inibição do ponto de checagem imune PD-1/PD-L1 tem sido apontada como o maior avanço da oncologia nos últimos anos (BURSTEIN et al. 2017). Bons resultados em melanoma, câncer de pulmão, rim e bexiga levaram à aprovação de agentes anti-PD-1 no Brasil, e novos estudos devem ampliar o espectro de neoplasias candidatas à modulação imune.

Dados de estudos clínicos em câncer de pulmão sugerem que a expressão de PD-L1 prediz maior eficácia da terapia imune, o que faz dele um biomarcador de interesse (TAUBE et al. 2014).

No câncer de mama, o impacto da terapia contra pontos de checagem imunológicos parece depender do subtipo intrínseco da doença. Estudos preliminares em tumores de triplo-negativos mostram taxas de respostas de 18% a 33% com agentes anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (NANDA et al. 2016), o que reforça a importância do estudo do marcador na doença. Por outro lado, tumores com expressão de receptores hormonais parecem ser pouco sensíveis ao tratamento com agentes anti-PD1. Há poucas informações sobre o papel de PD-L1 ou da imunoterapia em carcinomas inflamatórios de mama.

1.3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA PESQUISA

O curso agressivo do CIM, aliado a suas características epidemiológicas e moleculares particulares, sugerem que o CIM pode ser uma entidade biológica distinta, mais do que um subtipo no espectro do CANI. Vários marcadores biológicos têm sido propostos como ferramentas prognósticas e preditivas no CIM; contudo, na prática clínica, apenas a expressão de receptores hormonais e o status HER2 alcançaram ampla aplicação. Existem indícios de que o sistema de quimiocinas contribua para formatar a inflamação relacionada ao câncer de mama. Há uma ampla interface entre a atividade imune no microambiente tumoral, o sistema de

quimiocinas e carcinogênese. Diversas evidências apontam para a importância das quimiocinas no câncer de mama, mas os dados no CIM são mais frágeis. Tem sido imputado valor prognóstico no câncer de mama a outras proteínas, como fosfo-mTOR, FOXP3 e PD-L1, mas seu papel na patogênese do CIM é desconhecido. A compreensão de vias moleculares importantes na patogênese e na disseminação do CIM pode ajudar a identificar alvos terapêuticos que venham a ser úteis no manejo da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o papel o papel de CXCL12, CXCR4, CCR7, CXCR1, fosfo-mTOR, FOXP3 e PD-L1 na patogênese do CIM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar as características e os desfechos clínicos das pacientes com CIM e compará-los com pacientes com CANI;
- b. Identificar fatores prognósticos na população estudada;
- c. Determinar associação entre a expressão dos biomarcadores e as características dos pacientes e os desfechos clínicos;
- d. Comparar a expressão dos biomarcadores no CIM e no CANI.

3 PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Os pacientes com carcinoma inflamatório foram identificados em duas diferentes frentes. A primeira parte do trabalho, retrospectiva, avaliou doentes com diagnóstico de CIM atendidas no Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) do Instituto do Câncer do Ceará entre 2004 e 2015. Foram rastreadas as pacientes com CIM tratadas por dois oncologistas clínicos (D.R.R.F. e R. A.R.) ao longo do período.

Pacientes com CANI, caracterizados pelos estádios clínicos IIIA, IIIB, IIIC ou IV (Quadro 1) e ausência de fenótipo inflamatório, identificadas aleatoriamente nos ambulatórios dos dois especialistas, constituiu o grupo controle da pesquisa. Os dados clínicos dos dois grupos foram tabulados a partir da revisão de prontuários. Preencheu-se formulário específico para a pesquisa, com as informações que se desejava registrar (anexo 3). Um total de 24 pacientes com tumores de mama triplo-negativos, oriundos de um segundo banco de dados também voltado para o estudo de quimiocinas, foi incorporado ao grupo CANI.

A segunda parte do trabalho estudou pacientes com CIM recém-diagnosticado, as quais foram acompanhadas prospectivamente pelo investigador desde a primeira consulta no serviço de oncologia clínica até o fim do tratamento neoadjuvante. As avaliações foram efetuadas em

ambulatório específico de carcinoma inflamatório de mama. Buscou-se incluir todas as pacientes com CIM encaminhadas para o ambulatório de oncologia clínica do HHJ no período do estudo. O diagnóstico clínico de CIM exigiu a presença de eritema difuso em pelo menos um terço da mama, com desenvolvimento em menos de seis meses.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 4), as doentes nesse grupo foram submetidas a biópsia cutânea em cunha da região de maior hiperemia da área acometida, com os devidos cuidados de antissepsia. O material oriundo da biópsia cutânea foi mantido em refrigeração a -70 graus centígrados.

Os critérios de inclusão na parte prospectiva do estudo foram: diagnóstico clínico de CIM; desempenho clínico de 0 a 2, classificado conforme o escore do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (anexo 5); expectativa de vida superior a 12 semanas; e assinatura do TCLE.

Foi um critério de exclusão a presença de disfunção orgânica grave que impedisse a realização de terapia sistêmica, conforme a avaliação do médico assistente, e alterações inflamatórias em mama previamente tratada por tumor não-inflamatório (CIM secundário).

Os blocos de parafina com o material da biópsia diagnóstica da mama de todas as pacientes foram rastreados para a realização de estudos moleculares.

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

O bloco de microarranjos de tecido, ou *tissue microarray* (TMA), foi construído a partir de amostras de câncer de mama armazenados no Serviço de Patologia do HHJ. O bloco foi composto por 94 amostras de tecido, em duplicata, além de amostras de fígado, tonsila palatina, baço e próstata, utilizadas como controle positivo da reação.

Lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas para confirmar o diagnóstico de câncer de mama invasivo. Em seguida, uma área tumoral representativa foi selecionada a partir da leitura das lâminas coradas em HE e marcada nos blocos doadores, conforme metodologia anteriormente descrita (LIU et al. 2010).

Para montar o bloco de TMA, removeu-se cilindro com 1 mm de diâmetro do bloco doador, o qual depois foi inserido no bloco receptor. O procedimento de construção do bloco foi realizado no A.C. Camargo Cancer Center com o equipamento *Manual Tissue Microarrayer*, modelo MTA-1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, EUA) (Figura 9). Em seguida, o bloco foi submetido a cortes de 4 µm de espessura e preparado para análise imuno-histoquímica (IHQ).

De forma geral, no processo de preparação das lâminas para IHQ, as lâminas foram desparafinizadas em xileno antes da hidratação com álcool gradiente, e em seguida lavadas em água destilada. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0) com vapor. A imunocoloração foi efetuada com um sistema de detecção de

polímero (Novolink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), de acordo com a recomendação dos fabricantes.



Figura 9 - *Manual Tissue Microarrayer*, modelo MTA-1.

Os anticorpos primários e as respectivas diluições foram: anti-CXCR1 (ab14936, Abcam, Cambridge, Reino Unido, diluição 1:500); anti-CXCR4 (ab2074, Abcam, diluição 1:500); anti-CXCL12 (ab9797, Abcam, diluição 1:1000); anti-CCR7 (ab32527, Abcam, diluição 1:1000); anti-PDL-1 (ab205921, Abcam, diluição 1:100); anti-fosfo-mTOR (Ser2448, Thermofisher Scientific, Waltham, EUA, diluição 1:500) e anti-FOXP3 (ab20034, Abcam, diluição 1:100). As reações foram preparadas em laboratório comercial (Laboratório Argos, Fortaleza, Brasil), de acordo com as recomendações dos fabricantes dos anticorpos.

As diluições foram determinadas por métodos de titulação padrão, de forma a obter uma coloração final que resultasse em menos manchas de fundo. Todas as lâminas foram lidas por patologista experiente (P.R.A.) e pelo investigador, sem conhecimento prévio dos dados clínico-patológicos, e os casos discordantes foram resolvidos por consenso.

A expressão hormonal foi considerada positiva se pelo menos 10% das células apresentavam marcação. O status HER2 foi dito positivo nos casos com expressão classificada como 3+ à IHQ, ou 2+ complementada por amplificação de HER2 documentada por FISH (hibridização fluorescente *in situ*, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*).

A expressão de CXCR4, CXCL12, CXCR1, CCR7 e fosfo-mTOR foi graduada com a utilização de escore semiquantitativo, que dividiu os tumores em quatro categorias de expressão, conforme metodologia anteriormente descrita (modificada de BUSKENS et al. 2003): 0, definida como marcação em menos de 5% das células; 1+, caracterizada por marcação discreta em mais de 5% ou moderada em menos de 50% das células; 2+, definida pela marcação moderada em mais de 50% das células ou intensa em até 50% das células; e 3+, escore conferido aos tumores em que mais de 50% das células apresentavam marcação forte.

O ponto de corte de positividade dos marcadores foi estabelecido individualmente para cada marcador, tendo como meta dividir os grupos positivo e negativo de forma tão equilibrada quanto possível. CXCL12 foi dito positivo nos tumores em que expressão 1+ ou superior foi constatada. A positividade de CCR7 (citoplasmático) e p-mTOR foi caracterizada pelos

escores 2+ ou 3+. Já a expressão dos receptores CCR7 (membranar) e CXCR1 foi definida como positiva nos casos em que o escore foi considerado 3+. Uma exceção foi o marcador CXCR4, em que se usou método de avaliação previamente estabelecido que denominou positiva a marcação em mais de 5% das células, equivalente ao escore 1+ (ZHANG et al. 2012). Quanto a PD-L1 e FOXP3, a expressão foi analisada tanto no estroma quanto no tumor, com ponto de corte de 1%. Os controles positivos foram amostras de fígado para CXCR4 e CXCL12, de tonsila palatina para CXCR1 e PD-L1, de próstata para fosfo-mTOR e de baço para CCR7, conforme relatos prévios (WALSH et al. 2012; SUN et al. 2016; ABCAM 2017a-d).

3.3 CONGELAÇÃO

Amostras de pele da região acometida da mama foram coletadas e imediatamente preservadas sob refrigeração a -70 graus centígrados. Para a realização da análise histológica, uma fração do material foi banhada no meio Tissue-Tek para congelação e cortada no criostato Microm HM 525 (GMI, Ramsey, EUA) em amostras de 3 µm. Em seguida, as peças foram fixadas e coradas com hematoxilina e eosina para a confecção de lâminas. Parte do material foi mantido sob refrigeração, com o plano de ser submetido a teste com PCR para dosagem de RNA mensageiro (RNAm) das quimiocinas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi efetuada com o programa *SPSS Statistics* 20.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Foram investigadas associações entre a expressão dos diversos marcadores e desfechos como resposta patológica completa, resposta à quimioterapia neoadjuvante, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

O teste qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados, conforme apropriado, para pesquisar as associações entre os biomarcadores em estudo e as demais características categóricas clínicas e patológicas dos pacientes. O teste t de Student foi empregado para investigar a correlação entre as idades dos grupos de doentes.

O método de Kaplan-Meier foi usado para estimar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão, e o teste log-rank foi usado para testar a diferença entre os grupos. As variáveis que mostraram associação com sobrevida à análise univariada 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.

A sobrevida global foi calculada a partir da diferença entre a data da biópsia e a data do óbito, e a sobrevida livre de doença foi determinada pela diferença entre a data da cirurgia e a data da recidiva da doença ou óbito. Em ambos os desfechos de sobrevida, os pacientes que não desenvolveram

eventos ao final do período de seguimento foram censurados na data da última consulta.

Resposta patológica completa foi definida como a ausência de neoplasia invasiva na mama e na axila após o tratamento neoadjuvante. Considerou-se haver uma resposta à quimioterapia quando da redução em pelo menos 30% na soma das lesões-alvo, em conformidade com os critérios RECIST 1.1 (SCHWARTZ et al. 2016).

A categorização dos tumores de acordo com o subtipo intrínseco foi feita a partir dos dados imuno-histoquímicos. Chamaram-se de luminais os tumores com expressão hormonal, subdivididos em luminais A e B de acordo com o valor de Ki-67, utilizando-se o valor de 14% como ponto de corte. Tumores com coexpressão de receptor de estrógeno e HER2 foram incluídos no grupo luminal-B, neoplasias HER2-positivas sem expressão hormonal foram categorizadas como HER2-enriquecidos, e tumores triplo-negativos foram incluídos em grupo à parte.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

O plano de pesquisa deste estudo foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará (processo 04/2013) e do A.C.Camargo Cancer Center (Projeto 2305/16) e devidamente aprovado por ambos. Todas as pacientes que integraram a parte prospectiva do projeto assinaram o TCLE para registrar a concordância com a inclusão no estudo. A utilização das amostras do arquivo foi feita após a assinatura do Termo de

Fiel Depositário das Amostras. O estudo transcorreu em regime de confidencialidade e o tratamento dos dados foi efetuado com os devidos cuidados éticos. O estudo seguiu os padrões de aconselhamento de pesquisas em seres humanos, seguindo as recomendações de Boas Práticas Clínicas.

3.6 FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)/Fundação Cearense de Apoio do Desenvolvimento (FUNCAP)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de número PR2-0101-00054.01.00/15, para o custeio dos insumos para a realização dos testes patológicos.

4 RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 194 pacientes, das quais 99 tinham diagnóstico de CIM e 95 tinham diagnóstico de CANI (Tabela 1). Na parte exclusivamente retrospectiva da pesquisa, foram analisadas 81 e 84 pacientes com CIM e CANI, respectivamente. Já na parte prospectiva, ao longo de 65 semanas consecutivas de ambulatórios dedicados à pesquisa, foram rastreadas 42 pacientes, das quais 29 concordaram em participar do estudo e foram submetidas a biópsia cutânea. Essas 29 pacientes foram acompanhadas ao longo do tratamento neoadjuvante, e seus dados clínicos e patológicos foram incorporados ao estudo das pacientes inseridas no trecho retrospectivo. O tempo mediano de seguimento entre todos os pacientes vivos foi de 36,3 meses.

A Tabela 1 mostra as características basais das pacientes avaliadas, de acordo com o fenótipo da doença. As pacientes com CIM tiveram envolvimento linfonodal mais extenso, maior incidência de doença metastática ao diagnóstico, menor proporção de tumores triplo-negativos e maior incidência de tumores luminais-B, quando comparadas com as pacientes com CANI.

As pacientes com CIM tiveram maior incidência global de metástases à distância, quando analisado todo o período de seguimento. Todos os sítios de disseminação metastática pesquisados foram encontrados com maior frequência no grupo CIM; a diferença foi estatisticamente significativa

quando analisadas as metástases ósseas, linfonodais e pleurais (Tabela 2).

Tabela 1 - Características basais das pacientes.

Característica ^a	CANI (N=95) No. (%)	CIM (N=99) No. (%)	P
Idade mediana em anos (variação)	52,0 (24-84)	50,0 (31-88)	0,303
N			
N0 (N=32)	19 (20,4)	13 (13,5)	0,005
N1 (N=70)	38 (40,9)	32 (33,3)	
N2 (N=76)	36 (38,7)	40 (41,7)	
N3 (N=11)	0 (0,0)	11 (11,5)	
M			
M0 (N=159)	88 (94,6)	71 (71,7)	<0,001
M1 (N=33)	5 (5,4)	28 (28,3)	
Grau histológico			
1 (N=10)	6 (8,8)	4 (6,7)	0,677
2 (N=61)	30 (44,1)	31 (51,7)	
3 (N=57)	32 (47,1)	25 (41,7)	
Invasão vascular			
Ausente (N=40)	22 (44,9)	18 (35,3)	0,327
Presente (N=60)	27 (55,1)	33 (64,7)	
Receptor de estrógeno			
Negativo (N=121)	65 (69,1)	56 (57,1)	0,085
Positivo (N=71)	29 (30,9)	42 (42,9)	
Receptor de progesterona			
Negativo (N=127)	66 (71,0)	61 (64,2)	0,322
Positivo (N=61)	27 (29,0)	34 (35,8)	
HER2			
Negativo (N=143)	75 (84,3)	68 (75,6)	0,146
Positivo (N=36)	14 (15,7)	22 (24,4)	
Ki67			
0-14% (N=20)	8 (13,8)	12 (20,3)	0,347
>14% (N=97)	50 (86,2)	47 (79,7)	
Triplo-negativo			
Não-triplo-negativo (N=100)	41 (45,1)	59 (63,4)	0,012
Triplo-negativo (N=84)	50 (54,9)	34 (36,6)	
Subtipo biológico			
Luminal-A (N=11)	5 (6,7)	6 (7,9)	0,048
Luminal-B (N=33)	11 (14,7)	22 (28,9)	
Triplo-negativo (N=84)	50 (66,7)	34 (44,7)	
HER2 (N=23)	9 (12,0)	14 (18,4)	
Esquema de QT neoadjuvante			
Antracíclico + taxane (N=122)	67 (82,7)	55 (87,3)	0,566
Antracíclico ou taxane (N=21)	13 (16,0)	8 (12,7)	
Outro (N=1)	1 (1,2)	0 (0,0)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; CANI, carcinoma avançado não-inflamatório; CIM, carcinoma inflamatório de mama; QT, quimioterapia.

A sobrevida global em 5 anos das pacientes com CIM e CANI foi de 37,7% e 68,7%, respectivamente (*Hazard Ratio* [HR] 2,81; intervalo de confiança de 95% [IC 95%] 1,68-4,71; $P < 0,001$). A sobrevida mediana foi de 35,5 meses no grupo CIM, e não foi atingida no grupo CANI (Figura 10).

Tabela 2 - Distribuição das pacientes por sítios de metástases, de acordo com o fenótipo da doença.

Sítio de metástase	CANI (N=95) No. (%)	CIM (N=99) No. (%)	P
Osso (N=38)	10 (10,5)	28 (29,5)	0,001
Fígado (N=29)	10 (10,5)	19 (20,2)	0,065
Linfonodo (N=28)	8 (8,4)	20 (21,3)	0,013
Pulmão (N=22)	7 (7,4)	15 (16,0)	0,066
Recidiva local (N=18)	6 (6,4)	12 (13,5)	0,107
SNC (N=17)	6 (6,3)	11 (11,7)	0,196
Pleura (N=14)	3 (3,2)	11 (11,7)	0,025
Qualquer (N=79)	25 (26,3)	54 (56,8)	<0,001

CANI, carcinoma avançado não-inflamatório; CIM, carcinoma inflamatório de mama.

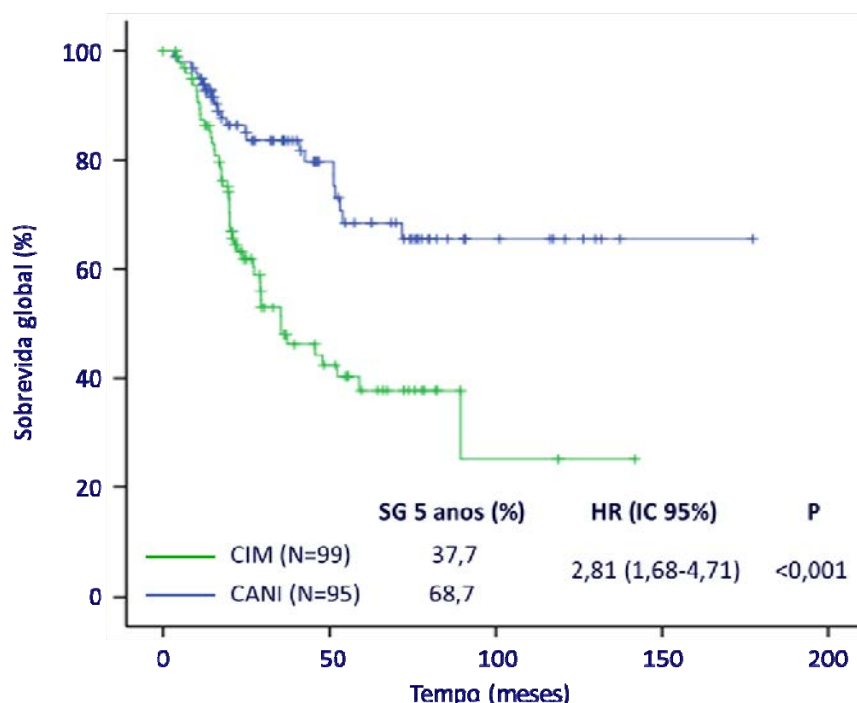


Figura 10 - Sobrevida global de acordo com o fenótipo da doença. CANI, carcinoma avançado não-inflamatório; CIM, carcinoma inflamatório de mama; HR, *hazard ratio*; IC 95%, intervalo de confiança 95%; SG 5 anos, sobrevida global em 5 anos.

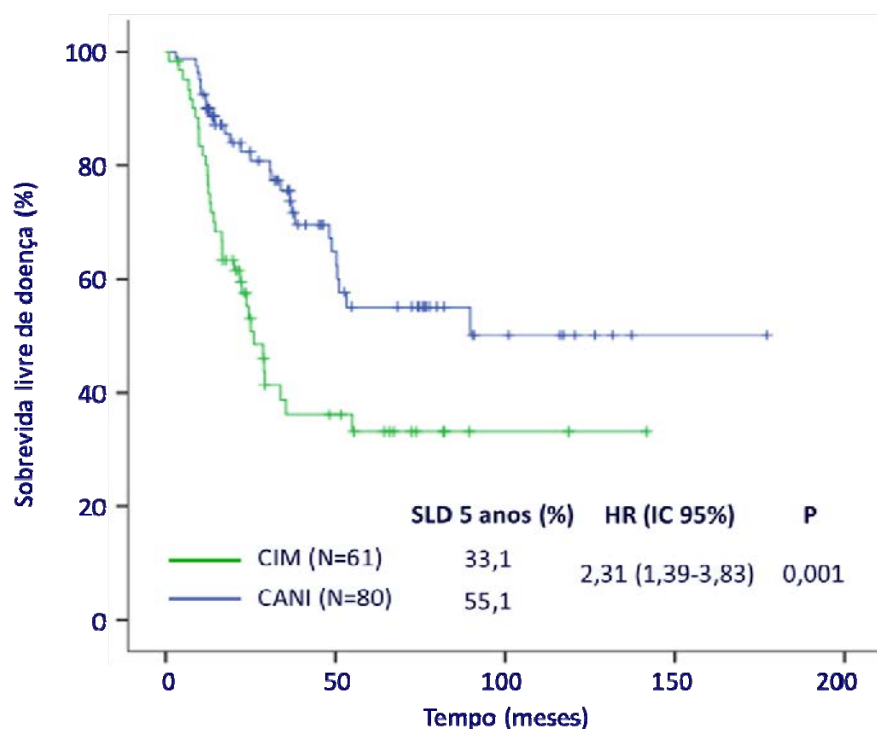


Figura 11 - Sobrevida livre de doença de acordo com o fenótipo da neoplasia. CANI, carcinoma avançado não-inflamatório; CIM, carcinoma inflamatório de mama; HR, *hazard ratio*; IC 95%, intervalo de confiança 95%; SLD 5 anos, sobrevida livre de doença em 5 anos.

A sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 33,1% no grupo CIM e de 55,1% no grupo CANI (HR 2,31; IC 95% 1,39-3,83; P=0,001) (Figura 11).

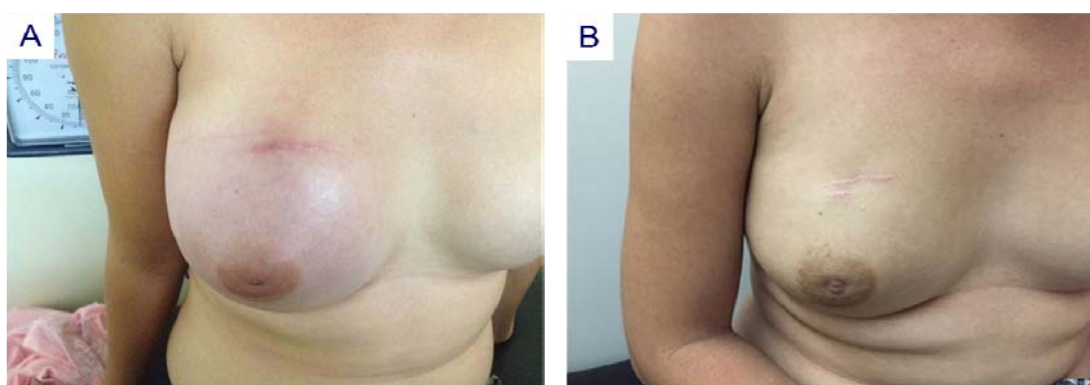


Figura 12 - Exame físico de paciente com carcinoma inflamatório da mama ao diagnóstico (A) e ao fim do tratamento neoadjuvante (B). Observa-se a redução da hiperemia e do edema na mama.

Resposta à quimioterapia neoadjuvante foi encontrada em 76,4% das 144 pacientes avaliáveis, enquanto 9% tiveram estabilização da doença e 14,6% progressão da neoplasia (Figura 12). A taxa de resposta patológica completa identificada em toda a população foi 15,3%, e significativamente maior nos tumores triplo-negativos (Tabela 3). Não houve diferença entre CIM e CANI na taxa de resposta à quimioterapia (73,4% vs. 78,8%, respectivamente; $P=0,456$) ou na taxa de RCp (12,5% vs. 17,5%, respectivamente; $P=0,407$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação da resposta patológica completa (RCp) e da taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante com as características clínico-patológicas basais.

Característica ^a	RCp (N=22)		Taxa de resposta à QT (N=110)	
	No. (%)	P	No. (%)	P
N				
N0-1	13 (16,0)	0,770	62 (72,5)	0,961
N2-3	9 (14,3)		48 (76,2)	
Fenótipo				
Não-inflamatório	14 (17,5)	0,407	63 (78,8)	0,456
Inflamatório	8 (12,5)		47 (73,4)	
Invasão vascular				
Ausente	6 (18,8)	0,147	25 (78,1)	0,949
Presente	3 (6,4)		37 (78,7)	
Receptores hormonais				
Negativo	17 (19,3)	0,099	66 (75,0)	0,664
Positivo	5 (9,1)		43 (78,2)	
Triplo-negativo				
Não triplo-negativo	7 (9,6)	0,042	56 (76,7)	0,620
Triplo-negativo	14 (22,2)		46 (73,0)	
Ki67				
0-14%	3 (30,0)	0,172	7 (70,0)	0,685
>14%	10 (13,2)		60 (78,9)	
HER2				
Negativo	17 (16,3)	1,000	76 (73,1)	0,339
Positivo	4 (13,8)		24 (82,8)	
Subtipo intrínseco				
Luminal-A	1 (20,0)	0,323	3 (60,0)	0,715
Luminal-B	2 (7,4)		22 (81,5)	
Basaloide	14 (22,2)		46 (73,0)	
HER2	2 (11,1)		13 (72,2)	

^a número de casos avaliáveis de total de 144 pacientes submetidos a quimioterapia (QT) neoadjuvante

Um total de 24 pacientes foi submetido a biópsia cutânea. Apenas 4 das 18 pacientes com CIM tiveram biópsia cutânea positiva para malignidade, enquanto em nenhuma paciente do grupo CANI se encontraram células neoplásicas ao estudo histológico (Tabela 4). A baixa positividade fez com que se entendesse que a pesquisa com PCR do material coletado prospectivamente traria informações pouco consistentes, motivo pelo qual se optou por prescindir dessa ferramenta molecular em favor da análise exclusiva dos blocos de parafina mantidos em arquivo, através de imuno-histoquímica.

Tabela 4 - Positividade da biópsia cutânea, de acordo com o fenótipo da doença.

	CANI (N=10) No. (%)	CIM (N=18) No. (%)	P
Biópsia cutânea			
Positiva	0 (0)	4 (22)	0,26
Negativa	10 (100)	14 (78)	

CANI, carcinoma avançado não-inflamatório; CIM, carcinoma inflamatório de mama.

Os blocos de parafina dos 194 pacientes foram rastreados. Apenas 123 blocos (63% do total) foram efetivamente disponibilizados para a confecção do TMA. Os motivos de exclusão dos blocos da análise patológica foram identificados na Figura 13. A principal causa de perda de material foi a não-localização de blocos, uma vez que vários deles eram mantidos em arquivo em outras instituições.

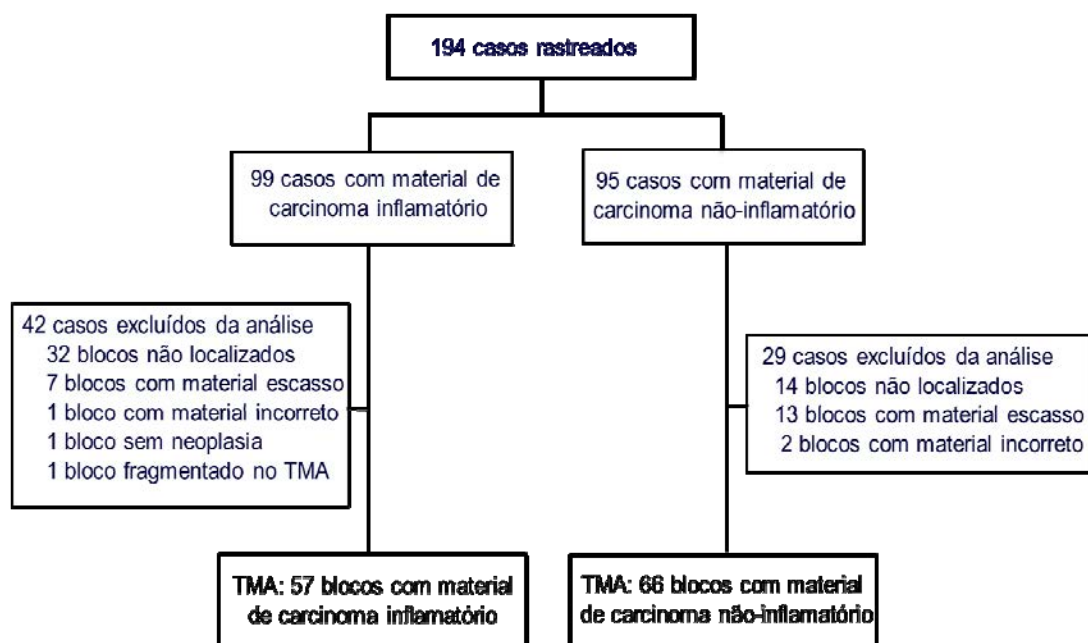


Figura 13 - Fluxograma dos blocos de parafina rastreados. TMA, *tissue microarray*.

As Figuras 14 a 19 ilustram os escores de marcação dos diferentes marcadores pesquisados. A expressão de CXCL12, quando presente, foi discreta (figura 15), ao passo que houve marcação forte por CXCR1 na quase totalidade dos tumores investigados (Figura 17). A expressão de FOXP3 e PD-L1 foi rara nas amostras (Figura 19). A Figura 20 mostra os controles positivos das reações.

A expressão de CXCR4 foi maior nas pacientes com CIM, assim como nas doentes que desenvolveram metástases em algum momento do curso da neoplasia e nas pacientes com tumores não-triplo-negativos. A taxa de RCp foi significativamente menor nas pacientes CXCR4-positivas (Tabela 5).

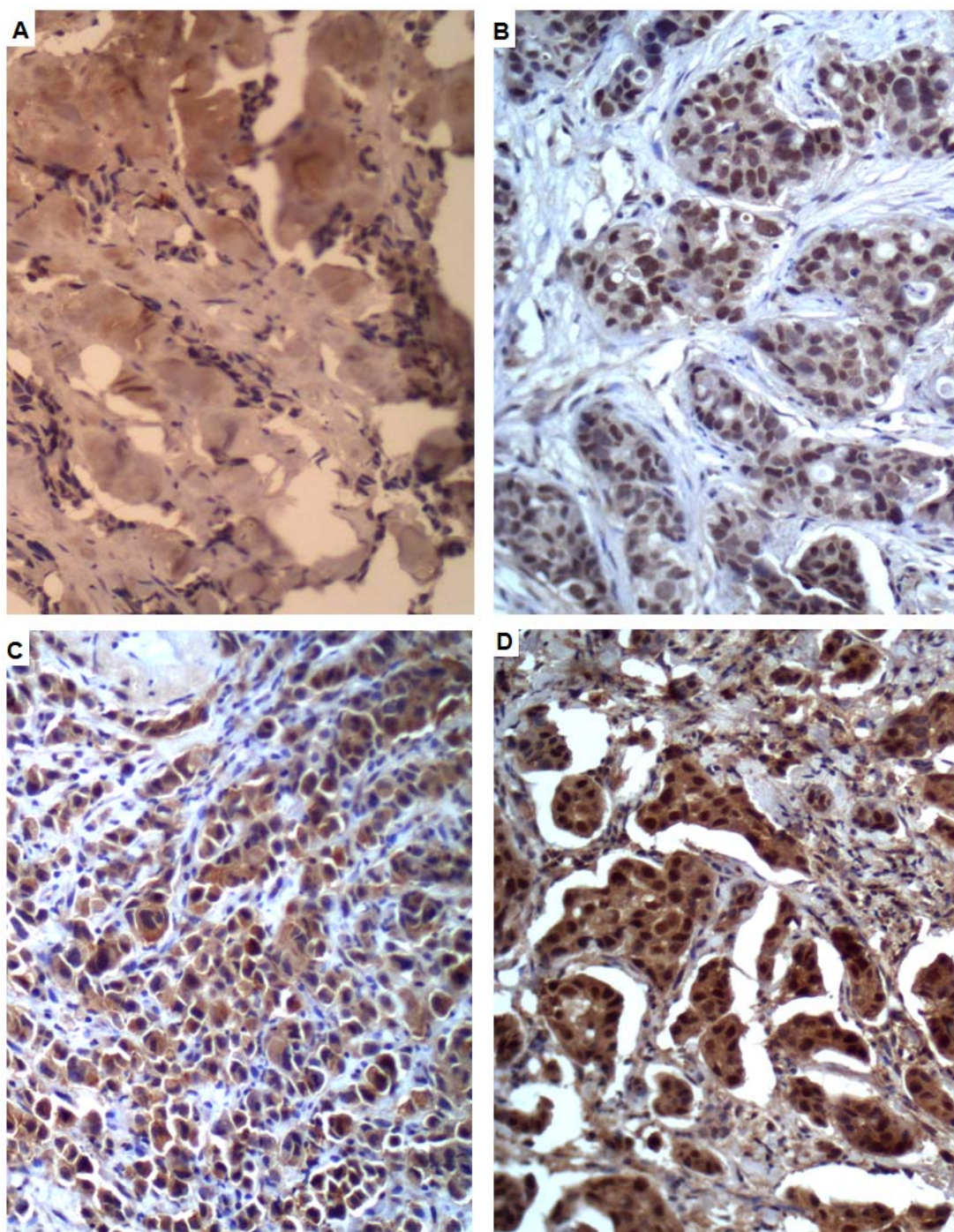


Figura 14 - Escores de expressão de CXCR4 nas pacientes com câncer de mama analisadas. A, B, C e D, escores 0, 1+ 2+ e 3+, respectivamente. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

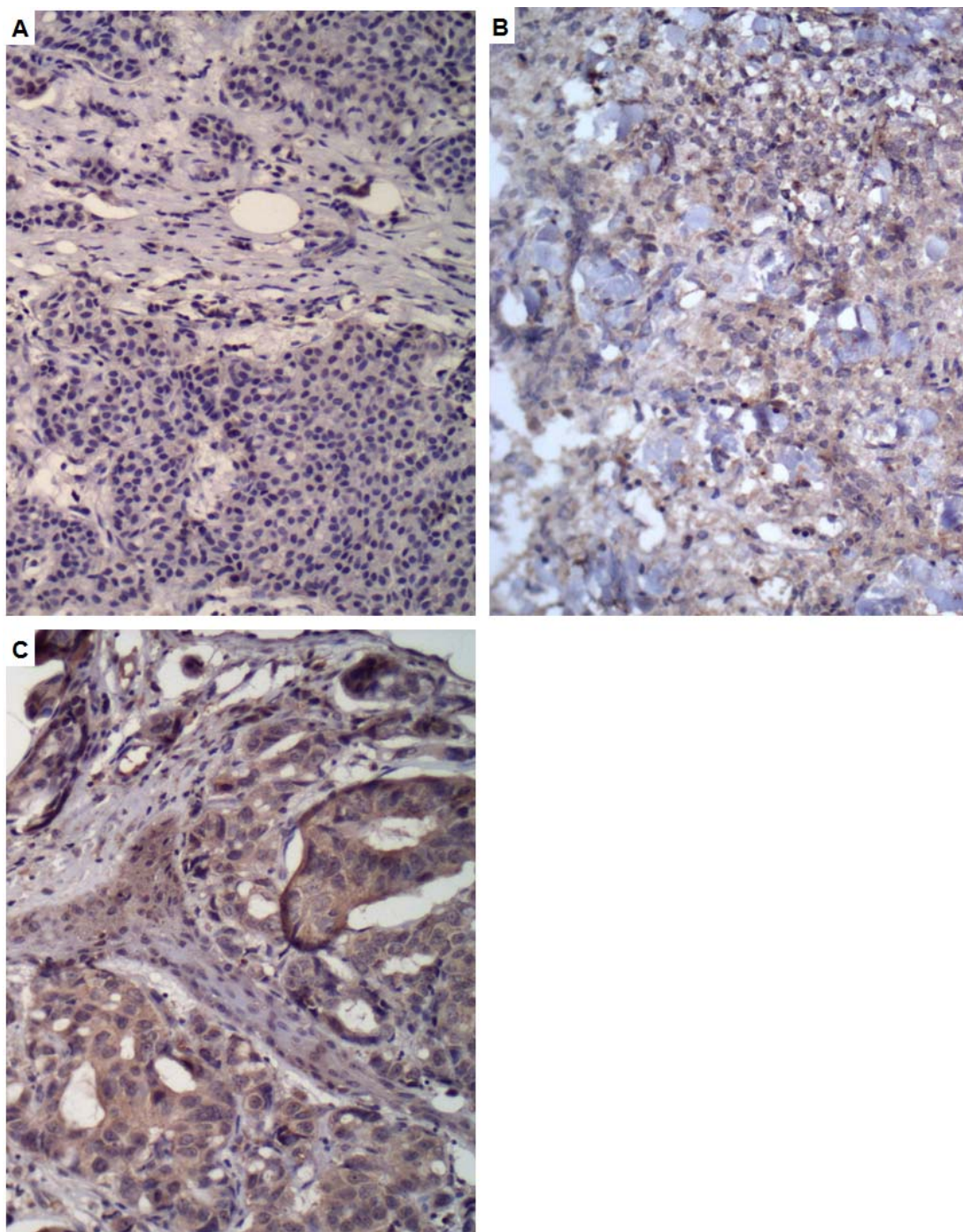


Figura 15 - Escores de expressão de CXCL12 nas pacientes com câncer de mama analisadas. A, B e C, escores 0, 1+ e 2+, respectivamente. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

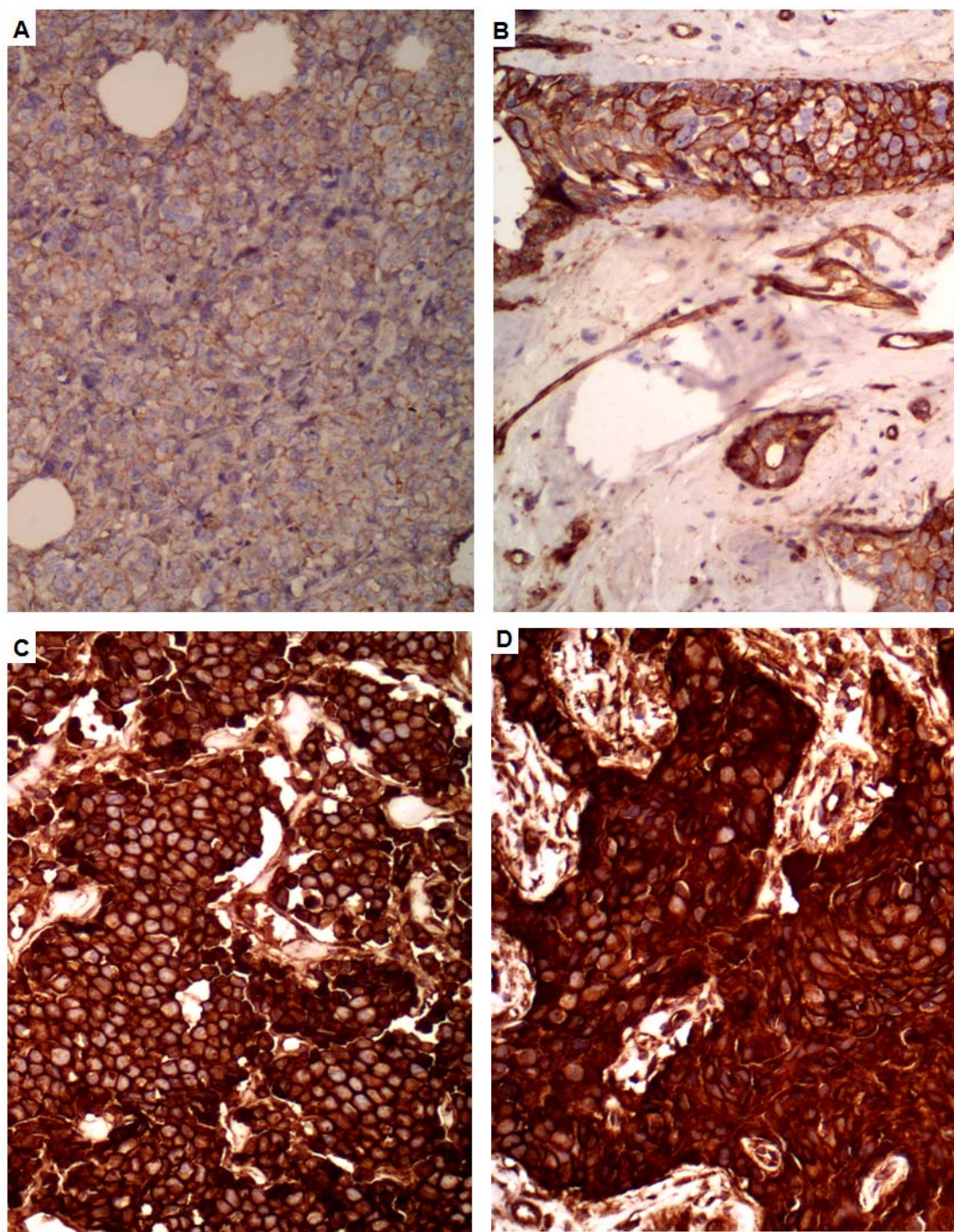


Figura 16 - Escores de expressão de CCR7 nas pacientes com câncer de mama analisadas. A, Membrana 1+, Citoplasma 0; B, Membrana 2+, citoplasma 1+; C, membrana 3+, citoplasma 2+; D, membrana 3+, citoplasma 3+. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

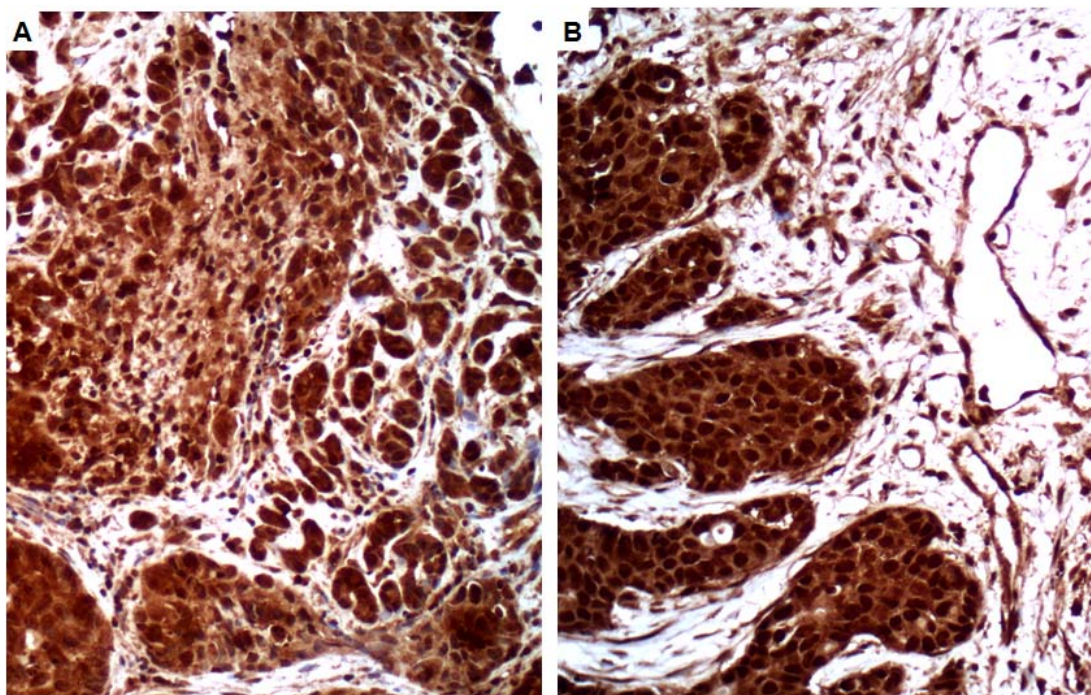


Figura 17 - Escores de expressão de CXCR1 nas pacientes com câncer de mama analisadas. A e B, escores 2+ e 3+, respectivamente. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

Assim como CXCR4, a expressão citoplasmática de CCR7 e CXCR1 associou-se com menor taxa de RCp (Tabelas 7 e 9).

A expressão de CCR7 foi maior entre os tumores hormônio-sensíveis e não-triplo-negativos, independente de a marcação ter sido pesquisada no citoplasma ou na membrana (Tabela 9).

Apenas 6 pacientes foram considerados FOXP3-positivos. A detecção de FOXP3 no estroma mostrou-se correlacionada com menor incidência de metástases e com menor resposta à quimioterapia neoadjuvante (Tabela 10).

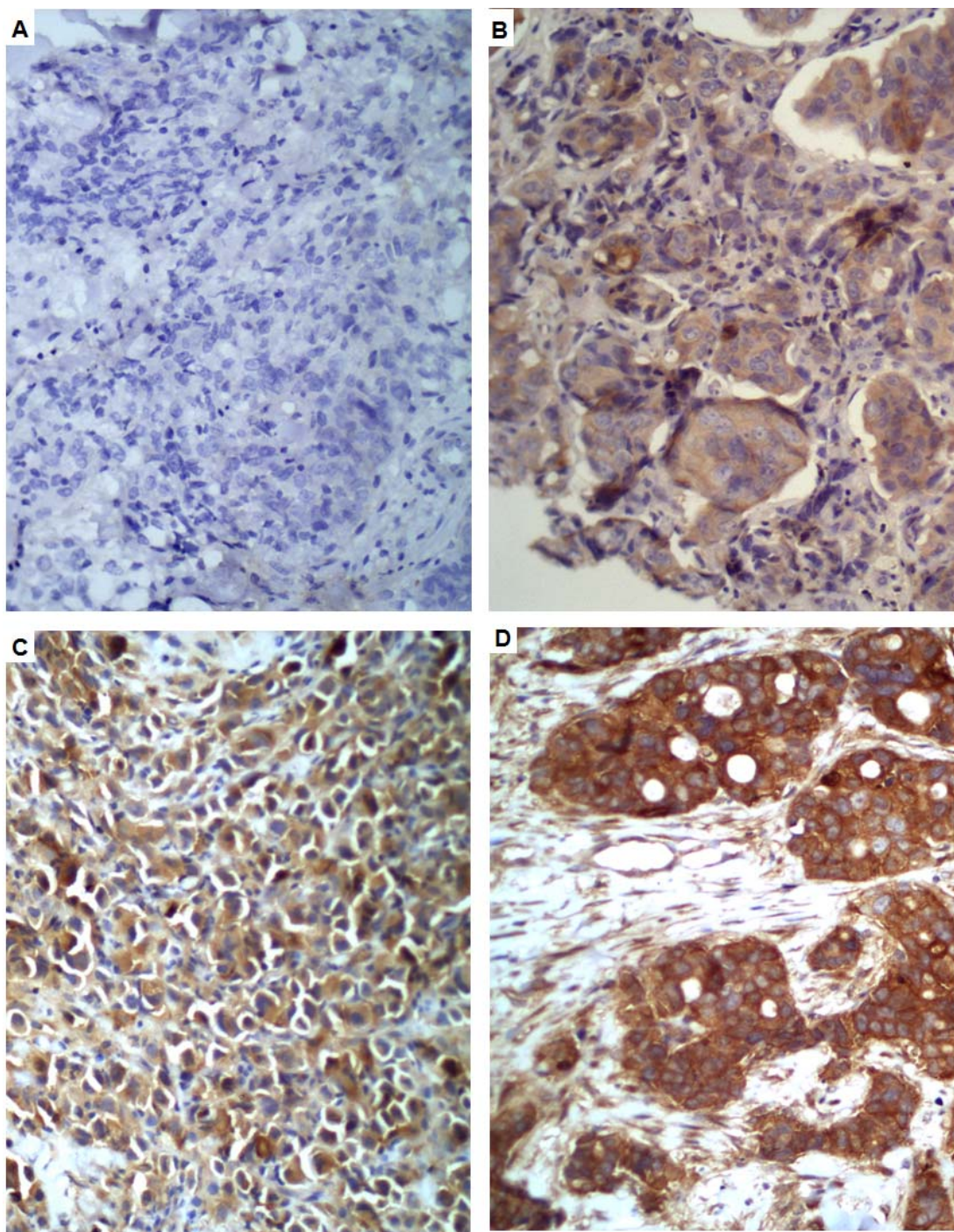


Figura 18 - Escores de expressão de fosfo-mTOR nas pacientes com câncer de mama analisadas. A, B, C e D, escores 0, 1+ 2+ e 3+, respectivamente. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

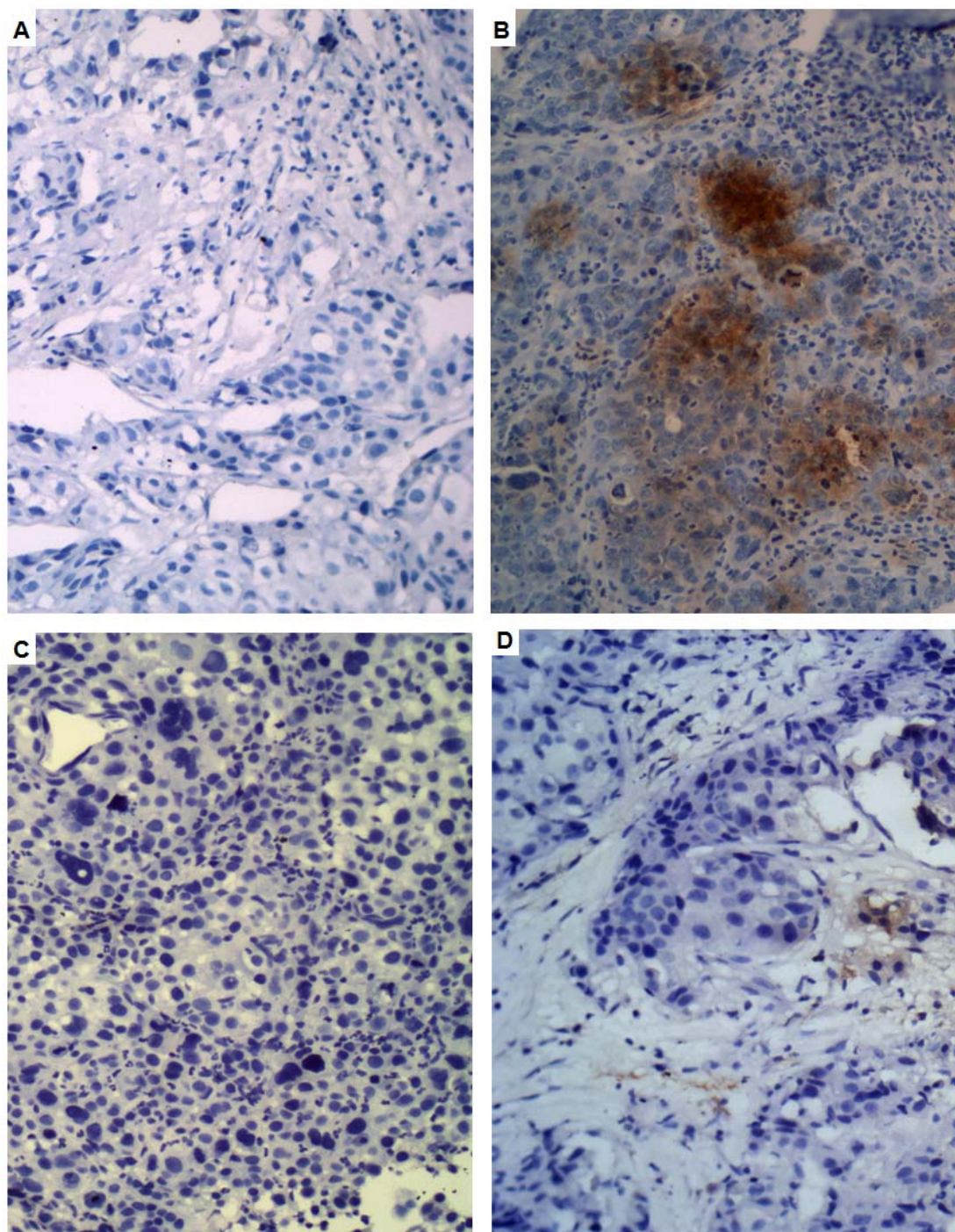
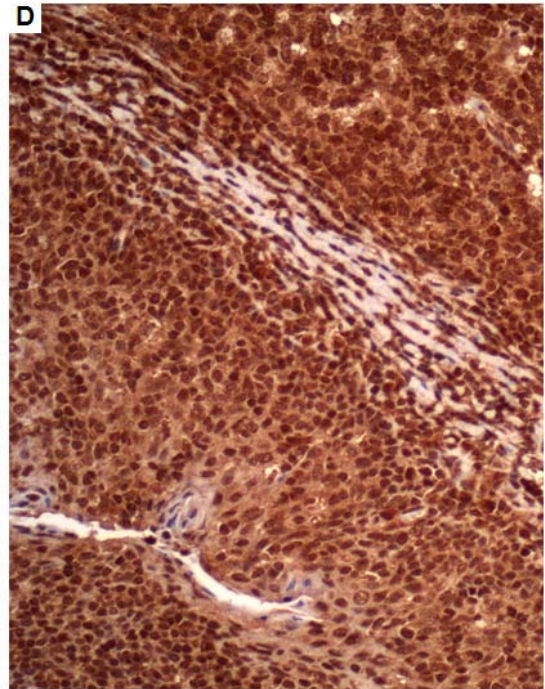
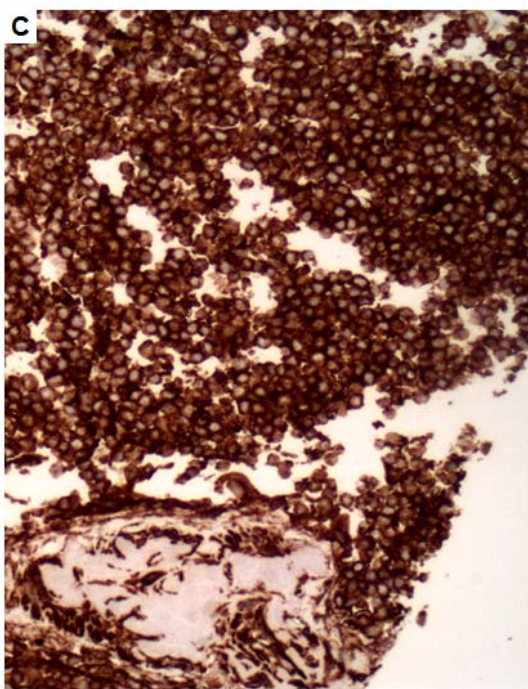
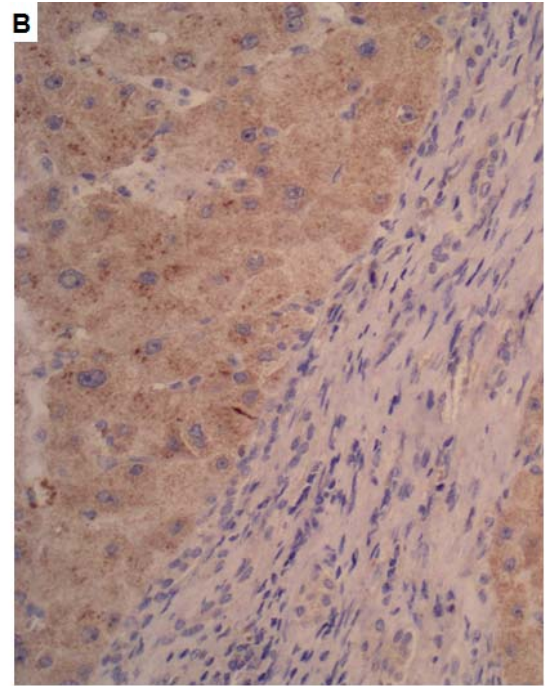
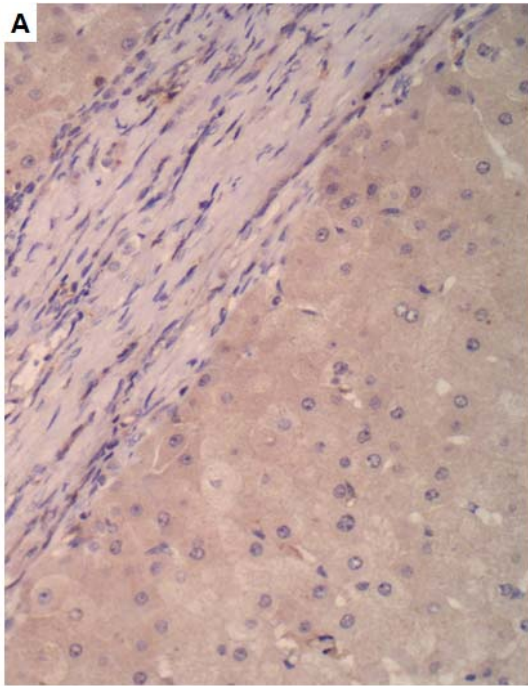


Figura 19 - Escores de expressão de FOXP3 (A e B) e PD-L1 (C e D) nas pacientes com câncer de mama analisadas. A e C, marcação citoplasmática em menos de 1% das células; B e D, marcação citoplasmática em mais de 1% das células. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.



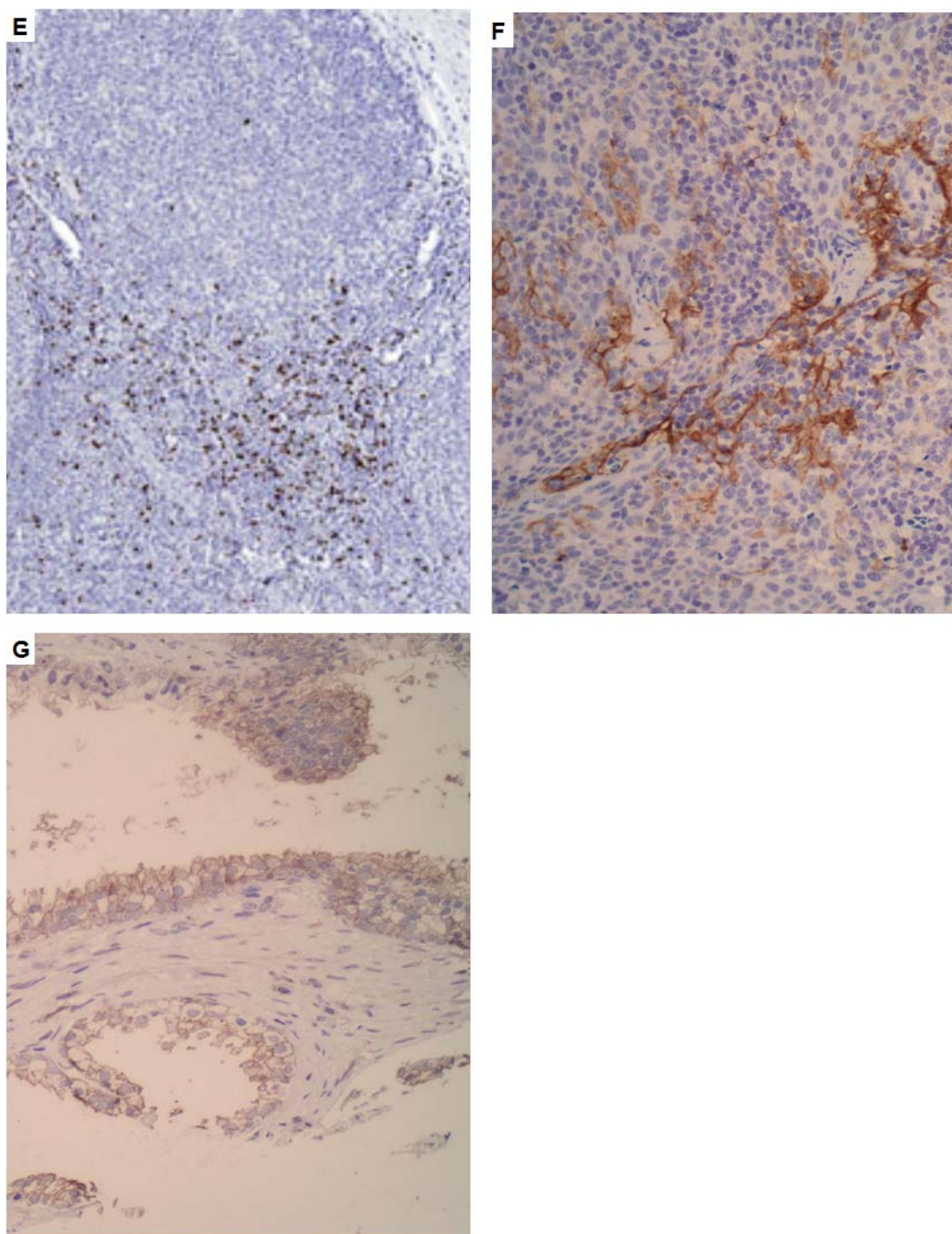


Figura 20 - Controles positivos das reações. A e B, CXCR4 e CXCL12, respectivamente, em amostra de fígado. C, CCR7 no baço. D, E e F, CXCR1, FOXP3 e PD-L1, respectivamente, na tonsila palatina. G, fosfo-mTOR na próstata. Imagens de microscópio com aumento de 200 vezes.

Tabela 5 - Expressão de CXCR4 de acordo com as características clínico-patológicas.

Característica ^a	CXCR4-negativo (N=15) No. (%)	CXCR4-positivo (N=77) No. (%)	P
Status linfonodal			
N0-1	8 (57,1)	37 (50,0)	0,624
N2-3	6 (42,9)	37 (50,0)	
Metástase			
Qualquer	0 (0,0)	29 (38,7)	0,002
Osso	0 (0,0)	9 (12,0)	0,347
Fígado	0 (0,0)	12 (16,0)	0,205
Pulmão	0 (0,0)	6 (8,0)	0,584
SNC	0 (0,0)	4 (5,3)	1,000
Pleura	0 (0,0)	6 (8,0)	0,584
Linfonodo	0 (0,0)	11 (14,7)	0,200
Fenótipo			
Não-inflamatório	12 (80,0)	37 (48,1)	0,023
Inflamatório	3 (20,0)	40 (51,9)	
Receptor hormonal			
Negativo	13 (86,7)	48 (63,2)	0,131
Positivo	2 (13,3)	28 (36,8)	
HER2			
Negativo	14 (93,3)	54 (79,4)	0,285
Positivo	1 (6,7)	14 (20,6)	
Triplo-negativo			
Não-triplo-negativo	3 (20,0)	37 (51,4)	0,026
Triplo-negativo	12 (80,0)	35 (48,6)	
Resposta à QT neoadjuvante			
Ausente	0 (0,0)	15 (26,8)	0,101
Presente	10 (100,0)	41 (73,2)	
RCp			
Ausente	6 (60,0)	52 (92,9)	0,015
Presente	4 (40,0)	4 (7,1)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Não se observou correlação estatisticamente significativa entre CXCL12, fosfo-mTOR, FOXP3 tumoral ou PD-L1 e qualquer das características clínico-patológicas pesquisadas (Tabelas 6, 8, 10 e 11).

À análise univariada, detectou-se associação entre status linfonodal (N2-3 vs. N0-1), doença metastática à apresentação, carcinoma inflamatório e ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante com pior sobrevida global. À análise multivariada, mostraram-se fatores independentes de mau prognóstico o status linfonodal N2-3, o fenótipo inflamatório e a ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante (Tabela 12).

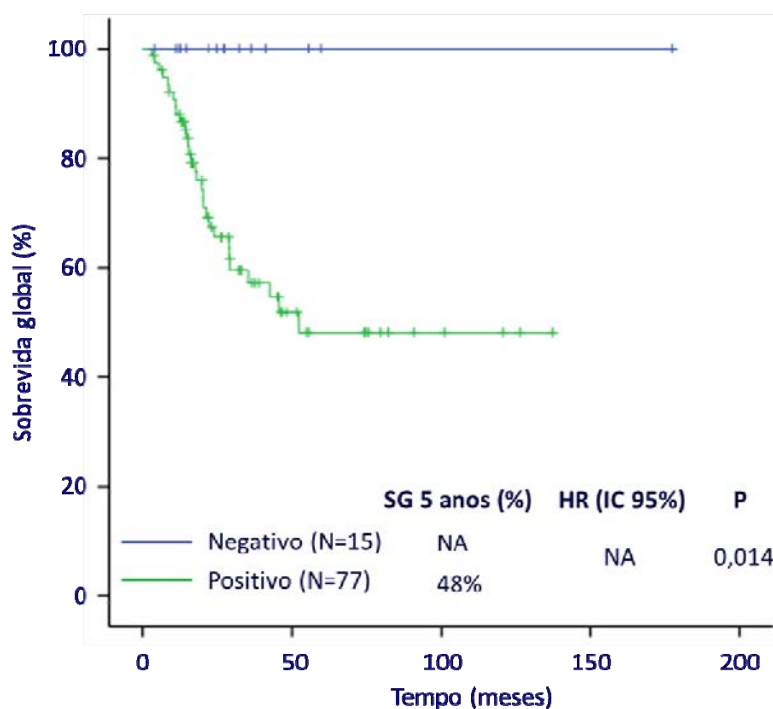


Figura 21 - Sobrevida global de acordo com a expressão de CXCR4. HR, hazard ratio; IC 95%, intervalo de confiança 95%; NA, não se aplica; SG 5 anos, sobrevida global em 5 anos.

Não foi possível efetuar regressão de Cox com a variável CXCR4, devido à ausência de eventos no grupo com baixa expressão do receptor. Deve-se reportar que foi observado maior número de mortes no grupo CXCR4-positivo (39% vs. 0%; $P=0,002$), e que a análise log-rank mostrou pior sobrevida no grupo com maior expressão do receptor ($P=0,014$) (Figura 21). Quando realizada análise multivariada das variáveis associadas a menor SLD, observou-se que status inflamatório, ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante e presença de invasão angiolinfática comportaram-se como fatores prognósticos adversos com valor independente (Tabela 12).

Tabela 6 - Expressão de CXCL12 de acordo com as características clínico-patológicas.

Característica ^a	CXCL12-negativo (N=47) No. (%)	CXCL12-positivo (N=38) No. (%)	P
Status linfonodal			
N0-1	22 (50,0)	16 (43,2)	0,544
N2-3	22 (50,0)	21 (56,8)	
Metástase			
Qualquer	15 (31,9)	13 (36,1)	0,689
Osso	6 (12,8)	6 (16,7)	0,617
Fígado	7 (14,9)	4 (11,1)	0,749
Pulmão	4 (8,5)	1 (2,8)	0,382
SNC	2 (4,3)	1 (2,8)	1,000
Pleura	4 (8,5)	2 (5,6)	0,606
Linfonodo	3 (6,4)	5 (13,9)	0,284
Fenótipo			
Não-inflamatório	26 (55,3)	15 (39,5)	0,146
Inflamatório	21 (44,7)	23 (60,5)	
Receptor hormonal			
Negativo	29 (63,0)	22 (57,9)	0,631
Positivo	17 (37,0)	16 (42,1)	
HER2			
Negativo	39 (86,7)	25 (78,1)	0,324
Positivo	6 (13,3)	7 (21,9)	
Triplo-negativo			
Não-triplo-negativo	19 (42,2)	21 (58,3)	0,150
Triplo-negativo	26 (57,8)	15 (41,7)	
Resposta à QT neoadjuvante			
Ausente	5 (15,2)	6 (24,0)	0,504
Presente	28 (84,8)	19 (76,0)	
RCp			
Ausente	30 (90,9)	24 (96,0)	0,627
Presente	3 (9,1)	1 (4,0)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Tabela 7 - Expressão de CXCR1 de acordo com as características clínico-patológicas.

Característica^a	CXCR1-negativo (N=29) No. (%)	CXCR1-positivo (N=48) No. (%)	P
Status linfonodal			
N0-1	14 (50,0)	21 (46,7)	0,782
N2-3	14 (50,0)	24 (53,3)	
Metástase			
Qualquer	8 (27,6)	15 (32,6)	0,646
Osso	4 (13,8)	5 (10,9)	0,727
Fígado	3 (10,3)	8 (17,4)	0,513
Pulmão	3 (10,3)	1 (2,2)	0,292
SNC	1 (3,4)	1 (2,2)	1,000
Pleura	1 (3,4)	3 (6,5)	1,000
Linfonodo	2 (6,9)	3 (6,5)	1,000
Fenótipo			
Não-inflamatório	19 (65,5)	23 (47,9)	0,133
Inflamatório	10 (34,5)	25 (52,1)	
Receptor hormonal			
Negativo	21 (75,0)	29 (60,4)	0,196
Positivo	7 (25,0)	19 (39,6)	
HER2			
Negativo	20 (74,1)	37 (86,0)	0,210
Positivo	7 (25,9)	6 (14,0)	
Triplo-negativo			
Não-triplo-negativo	11 (40,7)	23 (48,9)	0,496
Triplo-negativo	16 (59,3)	24 (51,1)	
Resposta à QT neoadjuvante			
Ausente	6 (28,6)	5 (14,7)	0,300
Presente	15 (71,4)	29 (85,3)	
RCp			
Ausente	17 (81)	34 (100,0)	0,018
Presente	4 (19,0)	0 (0,0)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Tabela 8 - Expressão de fosfo-mTOR (p-mTOR) de acordo com as características clínico-patológicas.

Característica ^a	p-mTOR-negativo (N=33) No. (%)	p-mTOR-positivo (N=63) No. (%)	P
Status linfonodal			
N0-1	12 (38,7)	32 (52,5)	0,212
N2-3	19 (61,3)	29 (47,5)	
Metástase			
Qualquer	14 (42,4)	21 (34,4)	0,444
Osso	4 (12,1)	11 (18,0)	0,455
Fígado	5 (15,2)	9 (14,8)	1,000
Pulmão	5 (15,2)	3 (4,9)	0,124
SNC	1 (3,0)	4 (6,6)	0,654
Pleura	4 (12,1)	3 (4,9)	0,236
Linfonodo	6 (18,2)	4 (6,6)	0,157
Fenótipo			
Não-inflamatório	14 (42,4)	34 (54,0)	0,283
Inflamatório	19 (57,6)	29 (46,0)	
Receptor hormonal			
Negativo	23 (71,9)	37 (58,7)	0,209
Positivo	9 (28,1)	26 (41,3)	
HER2			
Negativo	24 (82,8)	47 (82,5)	0,972
Positivo	5 (17,2)	10 (17,5)	
Triplo-negativo			
Não-triplo-negativo	12 (38,7)	32 (53,3)	0,186
Triplo-negativo	19 (61,3)	28 (46,7)	
Resposta à QT neoadjuvante			
Ausente	3 (16,7)	11 (22,4)	0,743
Presente	15 (83,3)	38 (77,6)	
RCp			
Ausente	15 (83,3)	44 (89,8)	0,672
Presente	3 (16,7)	5 (10,2)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Observou-se uma associação entre p-mTOR e a expressão citoplasmática ou membranar de CCR7. Detectou-se também associação positiva entre CCR7 citoplasmática e CXCR1, assim como com CCR7 membranar (Tabelas 13 e 14).

Tabela 9 - Expressão de CCR7 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação celular.

Característica ^a	CCR7 citoplasmático		P	CCR7 membranar		P
	Negativo (N=32) No. (%)	Positivo (N=52) No. (%)		Negativo (N=28) No. (%)	Positivo (N=56) No. (%)	
Status linfonodal						
N0-1	16 (55,2)	25 (48,1)	0,540	11 (42,3)	30 (54,5)	0,304
N2-3	13 (44,8)	27 (51,9)		15 (57,5)	25 (45,5)	
Metástase						
Qualquer	12 (37,5)	14 (28,0)	0,367	11 (39,3)	15 (27,8)	0,288
Osso	4 (12,5)	6 (12,0)	1,000	4 (14,3)	6 (11,1)	0,729
Fígado	6 (18,8)	4 (8,0)	0,177	5 (17,9)	5 (9,3)	0,298
Pulmão	4 (12,5)	1 (2,0)	0,073	2 (7,1)	3 (5,6)	1,000
SNC	1 (3,1)	2 (4,0)	1,000	1 (3,6)	2 (3,7)	1,000
Pleura	3 (9,4)	3 (6,0)	0,674	2 (7,1)	4 (7,4)	1,000
Linfonodo	4 (12,5)	5 (10,0)	0,731	3 (10,7)	6 (11,1)	1,000
Fenótipo						
Não-inflamatório	17 (53,1)	25 (48,1)	0,653	16 (57,1)	26 (46,4)	0,355
Inflamatório	15 (46,9)	27 (51,9)		12 (42,9)	30 (53,6)	
Receptor hormonal						
Negativo	25 (80,6)	27 (51,9)	0,009	22 (78,6)	30 (54,5)	0,032
Positivo	6 (19,4)	25 (48,1)		6 (21,4)	25 (45,5)	
HER2						
Negativo	25 (83,3)	38 (80,9)	0,783	24 (92,3)	39 (76,5)	0,122
Positivo	5 (16,7)	9 (19,1)		2 (7,7)	12 (23,5)	
Triplo-negativo						
Não-triplo-negativo	9 (30,0)	30 (58,8)	0,012	8 (30,8)	31 (56,4)	0,031
Triplo-negativo	21 (70,0)	21 (41,2)		18 (69,2)	24 (43,6)	
Resposta à QT neoadjuvante						
Ausente	4 (19,0)	7 (17,9)	1,000	2 (11,8)	9 (20,9)	0,712
Presente	17 (81,0)	32 (82,1)		15 (88,2)	34 (79,1)	
RCp						
Ausente	17 (81)	38 (97,4)	0,046	3 (100,0)	52 (91,2)	1,000
Presente	4 (19,0)	1 (2,6)		0 (0,0)	5 (8,8)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Tabela 10 - Expressão de FOXP3 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação.

Característica ^a	FOXP3 tumoral		P	FOXP3 estromal		P
	Negativo (N=71) No. (%)	Positivo (N=7) No. (%)		Negativo (N=57) No. (%)	Positivo (N=6) No. (%)	
Status linfonodal						
N0-1	34 (50,7)	4 (57,1)	1,000	22 (48,9)	3 (50,0)	1,000
N2-3	33 (49,3)	3 (42,9)		23 (51,1)	3 (50,0)	
Metástase						
Qualquer	21 (29,6)	2 (28,6)	1,000	23 (48,9)	0 (0,0)	0,030
Osso	8 (11,3)	1 (14,3)	1,000	9 (19,1)	0 (0,0)	0,574
Fígado	10 (14,1)	0 (0,0)	0,586	10 (21,3)	0 (0,0)	0,581
Pulmão	2 (2,8)	1 (14,3)	0,249	3 (6,4)	0 (0,0)	1,000
SNC	2 (2,8)	0 (0,0)	1,000	2 (4,3)	0 (0,0)	1,000
Pleura	4 (5,6)	0 (0,0)	1,000	4 (8,5)	0 (0,0)	1,000
Linfonodo	7 (9,9)	1 (14,3)	0,546	8 (17,0)	0 (0,0)	0,574
Fenótipo						
Não-inflamatório	42 (59,2)	2 (28,6)	0,229	18 (38,3)	1 (16,7)	0,402
Inflamatório	29 (40,8)	5 (71,4)		29 (61,7)	5 (83,3)	
Receptor hormonal						
Negativo	49 (70,0)	4 (57,1)	0,671	26 (55,3)	2 (40,0)	0,652
Positivo	21 (30,0)	3 (42,9)		21 (44,7)	3 (60,0)	
HER2						
Negativo	53 (82,8)	5 (71,4)	0,604	28 (68,3)	5 (100,0)	0,301
Positivo	11 (17,2)	2 (28,6)		13 (31,7)	0 (0,0)	
Triplo-negativo						
Não-triplo-negativo	27 (40,3)	4 (57,1)	0,443	28 (63,6)	3 (60,0)	1,000
Triplo-negativo	40 (59,7)	3 (42,9)		16 (36,4)	2 (40,0)	
Resposta à QT neoadjuvante						
Ausente	9 (17,6)	1 (14,3)	1,000	4 (11,4)	3 (50,0)	0,051
Presente	42 (82,4)	6 (85,7)		31 (88,6)	3 (50,0)	
RCp						
Ausente	43 (84,3)	7 (100,0)	0,577	33 (94,3)	6 (100,0)	1,000
Presente	8 (15,7)	0 (0,0)		2 (5,7)	0 (0,0)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Tabela 11 - Expressão de PD-L1 de acordo com as características clínico-patológicas e o sítio de marcação.

Característica ^a	PD-L1 tumoral		P	PD-L1 estromal		P
	Negativo (N=84) No. (%)	Positivo (N=3) No. (%)		Negativo (N=66) No. (%)	Positivo (N=4) No. (%)	
Status linfonodal						
N0-1	43 (53,1)	1 (33,3)	0,603	33 (51,6)	2 (50,0)	1,000
N2-3	38 (46,9)	2 (66,7)		31 (48,4)	2 (50,0)	
Metástase						
Qualquer	31 (37,8)	0 (0,0)	0,297	28 (43,8)	2 (50,0)	1,000
Osso	11 (13,4)	0 (0,0)	1,000	11 (17,2)	0 (0,0)	1,000
Fígado	14 (17,1)	0 (0,0)	1,000	13 (20,3)	1 (25,0)	1,000
Pulmão	6 (7,3)	0 (0,0)	1,000	5 (7,8)	0 (0,0)	1,000
SNC	4 (4,9)	0 (0,0)	1,000	3 (4,7)	1 (25,0)	0,220
Pleura	6 (7,3)	0 (0,0)	1,000	5 (7,8)	0 (0,0)	1,000
Linfonodo	9 (11,0)	0 (0,0)	1,000	9 (14,1)	0 (0,0)	1,000
Fenótipo						
Não-inflamatório	38 (45,2)	2 (66,7)	0,592	22 (33,3)	1 (25,0)	1,000
Inflamatório	46 (54,8)	1 (33,3)		44 (66,7)	3 (75,0)	
Receptor hormonal						
Negativo	16 (27,6)	0 (0,0)	1,000	12 (25,2)	1 (25,0)	1,000
Positivo	42 (72,4)	2 (100,0)		35 (74,5)	3 (75,0)	
HER2						
Negativo	52 (62,7)	2 (66,7)	1,000	34 (52,3)	3 (75,0)	0,618
Positivo	31 (37,3)	1 (33,3)		31 (47,7)	1 (25,0)	
Triplo-negativo						
Não-triplo-negativo	59 (79,7)	3 (100,0)	1,000	41 (73,2)	4 (100,0)	0,564
Triplo-negativo	15 (20,3)	0 (0,0)		15 (26,8)	0 (0,0)	
Resposta à QT neoadjuvante						
Ausente	41 (51,9)	1 (33,3)	0,611	41 (67,2)	1 (25,0)	0,123
Presente	38 (48,1)	2 (66,7)		20 (32,8)	3 (75,0)	
RCp						
Ausente	54 (93,1)	1 (50,0)	0,161	44 (93,6)	4 (100,0)	1,000
Presente	4 (6,9)	1 (50,0)		3 (6,4)	0 (0,0)	

^a número de casos avaliáveis de total de 188 pacientes; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa; SNC, sistema nervoso central.

Tabela 12 - Análise univariada e multivariada da sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Variável	Sobrevida global				Sobrevida livre de doença			
	Análise univariada		Análise multivariada		Análise univariada		Análise multivariada	
	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
N2-3 (vs. N0-1)	1,84 (1,14-2,97)	0,012	1,80 (1,09-2,98)	0,021	1,43 (0,87-2,36)	0,156		
M1 (vs. M0)	2,09 (1,21-3,63)	0,008	1,34 (0,73-2,44)	0,337	NA	NA		
Inflamatório (vs. não)	2,81 (1,68-4,71)	<0,001	1,95 (1,12-3,37)	0,017	2,31 (1,39-3,83)	0,001	2,68 (1,23-5,84)	0,013
Resposta à QT neo	0,19 (0,11-0,35)	<0,001	0,43 (0,32-0,58)	<0,001	0,32 (0,19-0,56)	<0,001	0,36 (0,16-0,84)	0,018
RCp	0,36 (0,13-1,03)	0,057			0,45 (0,20-1,01)	0,053		
Expressão hormonal	0,67 (0,41-1,10)	0,116			0,93 (0,56-1,54)	0,783		
HER2	1,24 (0,69-2,22)	0,46			1,26 (0,68-2,35)	0,448		
Triplo-negativo	1,16 (0,71-1,89)	0,534			0,86 (0,51-1,44)	0,579		
Invasão angiolímfática	2,21 (0,90-5,45)	0,084			2,60 (1,13-5,98)	0,024	3,65 (1,48-8,99)	0,005
Diferenciação (G1-2 vs. 3)	0,78 (0,57-2,06)	0,782			0,77 (0,42-1,43)	0,421		
CXCR4 ^a	NA	NA	NA	NA	5,89 (0,79-43,7)	0,083		
CXCL12	1,32 (0,64-2,73)	0,442			1,19 (0,51-2,76)	0,679		
CCR7 membranar	1,31 (0,55-3,12)	0,539			1,27 (0,49-3,26)	0,617		
CCR7 citoplasmático	0,93 (0,42-2,07)	0,877			1,15 (0,46-2,84)	0,760		
CXCR1	1,79 (0,75-4,31)	0,188			1,22 (0,49-3,00)	0,658		
p-mTOR	0,67 (0,33-1,35)	0,272			0,92 (0,41-2,07)	0,856		
FOXP3 tumoral	0,42 (0,05-3,17)	0,406			0,85 (0,23-3,09)	0,857		
FOXP3 estromal	0,75 (0,17-3,22)	0,700			0,38 (0,05-2,98)	0,363		
PD-L1 tumoral	0,04 (0,00-135,52)	0,451			0,04 (0,00-133,62)	0,448		
PD-L1 estromal	0,71 (0,09-5,28)	0,745			0,87 (0,11-6,49)	0,893		

^anão foi possível efetuar regressão COX; HR, hazard ratio; IC 95%, intervalo de confiança 95%; NA, não se aplica; neo, neoadjuvante; p-mTOR, fosfo-mTOR; QT, quimioterapia; RCp, resposta patológica completa.

Tabela 13 - Correlação entre os marcadores.

Marcador	CXCR4	CXCL12	CCR7-c	CCR7-m	CXCR1	p-mTOR	FOXP3-t	FOXP3-e	PD-L1-t	PD-L1-e
CXCR4	-	0,745	0,520	0,097	0,751	0,205	0,343	1,000	0,258	1,000
CXCL12	0,745	-	0,064	1,000	0,804	0,258	1,000	0,202	1,000	0,618
CCR7-c	0,520	0,064	-	<0,001	0,042	<0,001	1,000	0,665	1,000	0,303
CCR7-m	0,097	1,000	<0,001	-	0,799	0,004	0,407	0,164	1,000	0,571
CXCR1	0,751	0,804	0,042	0,799	-	0,625	1,000	0,056	1,000	0,312
p-mTOR	0,205	0,258	<0,001	0,004	0,625	-	0,690	0,659	0,556	1,000
FOXP3-t	0,343	1,000	1,000	0,407	1,000	0,690	-	0,174	1,000	1,000
FOXP3-e	1,000	0,202	0,665	0,164	0,056	0,659	0,174	-	1,000	1,000
PD-L1-t	0,258	1,000	1,000	1,000	1,000	0,556	1,000	1,000	-	0,057
PD-L1-e	1,000	0,618	0,303	0,571	0,312	1,000	1,000	1,000	0,057	-

Os valores correspondem ao valor-P das correlações. c,citoplasmático; e, estromal; t; tumoral.

Tabela 14 - Correlações estatisticamente significativas entre os marcadores.

Marcador		CCR7c		P	CCR7m		P
		Negativo (N=32) No. (%)	Positivo (N=52) No. (%)		Negativo (N=29) No. (%)	Positivo (N=48) No. (%)	
CCR7m	Negativo	19 (59,4)	9 (17,3)	<0,001			
	Positivo	13 (40,6)	43 (82,7)				
CXCR1	Negativo	15 (48,4)	9 (23,1)	0,042			
	Positivo	16 (51,6)	30 (76,9)				
p-mTOR	Negativo	20 (66,7)	12 (23,5)	<0,001	17 (53,1)	10 (20,4)	0,004
	Positivo	10 (33,3)	39 (76,5)		15 (46,9)	39 (79,6)	

p-mTOR, fosfo-mTOR.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS GERAIS

Estudos sobre carcinoma inflamatório foram prejudicados pela carência de definição padronizada da condição. CIM pode ser definido de diferentes formas, uma vez que há apresentações fenotípicas distintas da doença (CHANG et al. 1998). Ademais, o aspecto histológico não é específico, o que contribui para confusão diagnóstica. Na parte prospectiva desta pesquisa, foram adotados os critérios diagnósticos propostos por painel de especialistas internacionais, o qual recomendou a presença de: (1) estabelecimento rápido de eritema, edema e/ou pele em casca de laranja e/ou calor local; (2) eritema em pelo menos um terço da mama; e (3) duração da história de até seis meses (DAWOOD et al. 2011a). O diagnóstico das pacientes na parte retrospectiva do estudo foi dado conforme a avaliação dos médicos assistentes durante a abordagem inicial.

A Tabela 15 mostra as características dos pacientes com CIM em diferentes estudos. Dada a apresentação incomum do CIM, a maior parte dos dados sobre desfechos clínicos é oriunda de pequenas séries de casos de instituições isoladas (MATRO et al. 2015). Estudos de base populacional também têm sido reportados, mas carecem de informações importantes, tais como características clínico-patológicas e padrão de recidiva (WINGO et al. 2004).

Tabela 15 - Características clínico-patológicas de pacientes com carcinoma inflamatório de mama em diferentes estudos.

^aSeguimento mediano dos pacientes vivos; NR, não reportado; NA, não se aplica; Pro, prospectivo; RE, receptor de estrógeno; Reg, registro; Ret, retrospectivo; SG, sobrevida global; SM, sobrevida mediana; TS, tempo de seguimento.

Autor	N	Idade mediana (anos)	Tipo	TS (meses)	Estádio IV (%)	N0/N1/N2-3 (%)	RE-positivo (%)	HER2-positivo (%)	Triplo-negativo (%)	SG 5 anos		SM (meses)	
										III	IV	III	IV
Ueno et al. 1997	178	51	Ret	89 ^a	0	NR	40	NR	NR	40	NA	37	NA
Wingo et al. 2004	3626	57,6	Reg	NR	25,3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Low et al 2004	46	53	Pro	201 ^a	0	NR	46	NR	NR	36	NA	45,6	NA
Bertucci et al. 2004b	74	51	Retr	48	0	16/64/20	48	43	NR	41	NA	38	NA
Hance et al. 2005	3648	58	Reg	NR	NR	17/NR/NR	54	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cristofanilli et al. 2007	240	51	Ret	69	0	16/35/53	48	NR	NR	40,5	NA	NR	NA
Gonzalez-Angulo et al. 2007	398	51	Reg	69,6 ^a	0	14/NR/NR	37	39,2	NR	46,1	NA	50,4	NA
Dawood et al. 2011b	828	NR	Reg	19	0	NR	51	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Robertson et al. 2010	70	55	Reg	NR	NR	NR	42,9	44,3	32,9	NR	NR	NR	NR
Schlichting et al. 2012	5526	57	Reg	NR	19,6	NR	55,4	NR	NR	NR	NR	57	21
Masuda et al. 2014	1075	50,1	Retr	38,4	22,3	16/42/42	44,5	36,7	24,8	47,8	24,8	NR	NR
Matro et al. 2015	673	53	Ret	29	29	17/45/36	44	32	26	62	28	66	26
Este estudo	99	50,0	Ret	36,8 ^a	27,6	14/33/53	42,9	24,4	36,6	41	0	47,8	27,3

Tem-se reportado consistentemente que o diagnóstico de carcinoma inflamatório se dá em idade mais precoce, em comparação com tumores não-inflamatórios. A Tabela 15 mostra que a idade mediana ao diagnóstico de CIM em diversas publicações variou entre 50 e 58 anos. Por outro lado, a idade mediana ao diagnóstico do câncer de mama é geralmente superior a 60 anos (CHANG et al. 1998). Análise dos dados do programa de vigilância epidemiológica norte-americano *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) evidenciou que a idade mediana quando do diagnóstico de carcinoma inflamatório e não-inflamatório entre mulheres brancas é de 57 anos e 62 anos, respectivamente (CHANG et al. 1998).

Quando se analisam apenas tumores localmente avançados, a diferença na idade ao diagnóstico é menos evidente. Na presente pesquisa, não se identificou diferença estatisticamente significativa na idade mediana entre a população com CIM e com carcinomas avançados não-inflamatórios. De forma similar, análise de 4304 pacientes com câncer de mama localmente avançado, incluindo 828 casos de tumor inflamatório, mostrou que a distribuição etária não diferiu de acordo com o fenótipo da doença (DAWOOD et al. 2011b).

Tumores inflamatórios de mama comumente carecem da expressão de receptores hormonais. Diversos estudos têm mostrado que a expressão de receptores de estrógenos é identificada em 40% a 50% das pacientes com CIM (Tabela 15). Uma análise de 2.014 pacientes com CIM no Registro de Câncer de Califórnia identificou a expressão de receptores de estrógenos (RE) em 56% dos casos, uma taxa inferior à detectada em pacientes com

câncer de mama não-T4 (80%) e em doentes com câncer de mama localmente avançado (67%) ($P < 0,0001$ em ambas as comparações) (ZELL et al. 2009). A positividade hormonal de 42,9% observada nesta pesquisa entre doentes com CIM está em linha, portanto, com o habitualmente reportado. Não se identificou, no presente estudo, diferença na expressão hormonal entre as populações com CIM e com CANI.

Tumores HER2-positivos compreendem 20% a 25% da população com câncer de mama (MATRO et al. 2015). Numerosos estudos têm mostrado que, em pacientes com CIM, a incidência de neoplasias HER2-positivas é mais alta, comumente entre 30% e 40% do total (Tabela 15). Por exemplo, a experiência publicada a partir do Registro de Câncer da Califórnia mostrou que a hiperexpressão de HER2 é mais comum em pacientes com CIM que em tumores não-T4 (40% vs. 22%, $P < 0,0001$) (ZELL et al. 2009).

A presente pesquisa detectou hiperexpressão de HER2 em apenas 24,4% das pacientes com CIM, uma proporção inferior à habitualmente descrita em tumores inflamatórios, e que se assemelha à frequência reportada na população geral. Não se demonstrou valor prognóstico de status HER2 nesta pesquisa, um achado similar ao reportado na população com CIM em diferentes publicações (PARTON et al. 2004; ZELL et al. 2009).

De forma geral, os tumores triplo-negativos correspondem a 12% a 17% do total de casos de câncer de mama (FOULKES et al. 2010). Neste estudo, a população de tumores triplo-negativos representou 36,6% do total de carcinomas inflamatórios. O dado acompanha os relatos de múltiplas

publicações que identificaram uma incidência de triplo-negativos em 25% a 35% das pacientes com CIM (Tabela 14).

Entre os tumores avançados não-inflamatórios, a frequência de tumores triplo-negativos observada foi de 51,8%, estatisticamente maior que na população CIM. Deve-se ressaltar que 24 pacientes com tumores triplo-negativos de um segundo banco de dados, parte de uma avaliação mais ampla do estudo de quimiocinas, foram incorporados ao grupo controle da presente pesquisa, de forma a tornar mais robusta a avaliação da expressão de biomarcadores. Portanto, reconhece-se haver um aumento artificial da representação de doentes triplo-negativos no grupo não-inflamatório. Ao excluirmos os 24 casos de tumores triplo-negativos que foram adicionados ao grupo controle, os tumores triplo-negativos passam a constituir 32,8% do total de carcinomas não-inflamatórios, uma taxa similar à observada no grupo CIM. Ainda assim, a proporção de tumores triplo-negativos no grupo controle foi substancialmente maior que a comumente descrita em tumores de mama, o que sugere que a distribuição dos subtipos intrínsecos na população de tumores localmente avançados é distinta daquela do câncer de mama em geral.

Buscou-se categorizar os tumores de mama nos diferentes subtipos intrínsecos, a partir da correlação com os dados imuno-histoquímicos. Observou-se que apenas 7% dos tumores foram definidos como luminais-A, o grupo de menor proliferação e de curso clínico mais indolente, enquanto 21% foram classificados como luminais-B. Além disso, tumores luminais-B foram mais frequentes no grupo de tumores inflamatórios, em comparação

com tumores não-inflamatórios. CHEANG et al. (2009), em análise de 2.847 neoplasias de mama hormônio-sensíveis, identificaram proporção de tumores luminais-A e luminais-B de 59% e 34%, respectivamente.

Os dados da presente pesquisa indicam, portanto, que os tumores luminais-A são infreqüentemente representados dentre os tumores de mama localmente avançados, o que contribui para explicar a agressividade da doença. Além disso, a maior proporção de tumores luminais-B no grupo CIM reforça a impressão de que os tumores inflamatórios têm particularidades biológicas distintas daquelas dos tumores avançados não-inflamatórios. Os achados recapitulam as conclusões de VAN LAERE et al. (2013), que observaram que os subtipos moleculares agressivos (basaloide, HER2-enriquecido, *claudin-low* e luminal-B) correspondem a 75% dos carcinomas inflamatórios, mas a apenas 42% dos carcinomas não-inflamatórios.

Ressalte-se que 40% dos pacientes na pesquisa não tinham valor de Ki-67 documentado, uma vez que o marcador de proliferação somente passou a ser reportado rotineiramente nos laudos histopatológicos do Instituto do Câncer do Ceará em 2009. Isto impossibilitou a categorização de numerosos casos luminais, que foram excluídos da análise da variável. Todos os tumores triplo-negativos ou HER2, por sua vez, foram devidamente classificados em seus subtipos intrínsecos, já que o valor de Ki-67 não é importante na definição desses subgrupos. O fato levou à minimização da participação relativa dos tumores luminais no conjunto de tumores da pesquisa. Ainda assim, é possível constatar que a relação

tumores luminais-A/luminais-B é distinta da habitualmente reportada (CHEANG et al. 2009).

O estudo do curso natural do câncer de mama exige um tempo longo de seguimento. Meta-análise com dados individuais de mais de 46 mil pacientes com doença hormônio-sensível mostrou que a taxa de recorrência do câncer de mama se mantém constante ao longo dos anos 5 a 14 após o diagnóstico (PAN et al. 2016). O padrão é diferente do descrito na doença RE-negativa, na qual recidivas em curto espaço de tempo são comuns (LIN e WINER 2008). Nesta pesquisa, a elevada incidência de tumores RE-negativos observada e a alta agressividade do tumor inflamatório contribuíram para a observação de recidivas precoces. O tempo mediano de seguimento entre as pacientes vivas no presente estudo foi de 36,8 meses, suficiente para capturar um número robusto de recidivas e óbitos em uma população com neoplasia de alta agressividade, mas limitado para detectar detalhes das pacientes com sobrevida em mais longo prazo. As séries de casos de CIM publicados comumente têm descrito tempos de seguimento inferiores a 3 a 5 anos (Tabela 15) (LOW et al. 2004).

Identificou-se taxa de sobrevida global em 5 anos de 41% nas pacientes com CIM e estágio clínico III analisadas neste estudo. A sobrevida em 5 anos de pacientes no mesmo estágio tem sido reportada de forma muito consistente entre 40% e 46% em diversos estudos (Tabela 15). Os dados indicam que, apesar da gravidade do diagnóstico, pacientes com CIM submetidas a terapia multidisciplinar otimizada têm perspectiva concreta de sobrevida em longo prazo. De fato, a análise de algumas séries com tempo

de acompanhamento mais extenso permite identificar taxa de sobrevida em 10 anos em torno de 30% a 40% (PALANGIE et al. 1994; UENO et al. 1997; LOW et al. 2004).

Resposta patológica completa tem sido associada com maior sobrevida global em diversos estudos, inclusive no cenário do carcinoma inflamatório. A experiência do *MD Anderson Cancer Center* mostrou que a sobrevida global em 5 anos de pacientes com CIM submetidos a quimioterapia neoadjuvante aumentou de 37% para 82% ($P=0,01$) naquelas doentes com resposta patológica completa nos linfonodos axilares (HENNESSY et al. 2006). A associação entre RCp na mama e axila e maior sobrevida também foi identificada em análise de 527 pacientes com CIM tratados na mesma instituição, à exceção do grupo com expressão de receptores hormonais (RH) e simultânea positividade de HER2, no qual RCp não teve valor prognóstico (MASUDA et al. 2014).

Na presente pesquisa, a análise univariada mostrou uma redução em 49% do risco de óbito nos pacientes com RCp, achado que não se mostrou estatisticamente significativo. A experiência do *National Cancer Institute*, nos EUA, com 46 pacientes com CIM, também não registrou diferença significativa de sobrevida de acordo com a presença de RCp (LOW et al. 2004). Em ambos os casos, a ausência de associação pode ser explicada pelo número limitado de pacientes analisados.

Tabela 16 - Estudos sobre quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado, incluindo carcinoma inflamatório.

Autor	População	N (total)	N (CIM)	Esquema terapêutico	RCp (%)
Therasse et al. 2003	Todas	448	92	CEF vs. CEF intensificado	10 vs. 14
Bertucci et al. 2004b	Todas	74	74	Baseado em A ou E	26
Fraschi et al. 2006	Todas	200	47	EP vs. CiEP	6 vs. 16*
Von Minckwitz et al. 2008	Todas	1390	30	DAC	21
Untch et al. 2010	HER2-negativo	1050	69	EC→D±X	15,7
Costa et al. 2010	Todas	287	93	TAC	8,3
Untch et al. 2011a	Todas	736	NR	EC→P vs. Edd→Pdd→CMF	14,3 vs. 20,9*
Ellis et al. 2011	Todas	372	115	AC vs. AC metronômico	20,7 vs. 24,3
Masuda et al. 2014	Todas	527	527	Vários	15,2
Este estudo 2017	Todas	187	99	Vários	12
Van Pelt et al. 2003	HER2-positivo	22	9	DH	40
Burstein et al. 2003	HER2-positivo	40	6	PH	18
Hurley et al. 2006	HER2-positivo	30	4	DCiH	13
Limentani et al. 2007	HER2-positivo	31	NR	DVnH	39
Gianni et al. 2010	HER2-positivo	235	63	APCMF±H	19 vs. 38
Untch et al. 2010	HER2-positivo	445	45	EC→DH±X	31,7
Untch et al. 2011b	HER2-positivo	217	4	EC→PH	39
Pierga et al. 2012	HER2-positivo	52	52	FECB→DBH	63,5
Masuda et al. 2014	HER2-positivo	200	200	Vários±H	24,3
Von Minckwitz et al. 2014	HER2-positivo	273	NR	PDIHL±Cb	36,8 vs. 32,8
Este estudo 2017	HER2-positivo	36	22	Vários±H	13,8
Von Minckwitz et al. 2014	Triplo-negativo	315	R	PDIB±Cb	36,9 vs. 53,2*
Este estudo 2017	Triplo-negativo	78	34	Várias	20,4

*P<0,05; A, doxorrubicina; B, bevacizumabe; C, ciclofosfamida; Cb, carboplatina; Ci, cisplatina; CIM, carcinoma inflamatório de mama; CMLA, câncer de mama localmente avançado; D, docetaxel; dd, dose densa; D_L, doxorrubicina lipossomal; E, epirrubicina; F, fluorouracil; H, trastuzumabe; L, lapatinibe; M, metotrexato; NR, não reportado; P, paclitaxel; RCp, resposta patológica completa; Triplo-neg, triplo-negativo; V, vinorelbina; X, capecitabina.

A Tabela 16 lista os mais importantes estudos sobre quimioterapia neoadjuvante em tumores localmente avançados de mama que incluíram população com CIM. A taxa de RCp nas publicações que avaliaram pacientes sem categorização por subtipo intrínseco variou de 6% a 26%. Na presente pesquisa, a taxa de RCp identificada foi de 12%.

A taxa de RCp varia de acordo com o subtipo de câncer de mama. De forma geral, pacientes com tumores HER2-positivos, RH-negativos ou triplo-negativos têm taxas de RCp mais altas, quando comparados com pacientes hormônio-sensíveis (BASELGA et al. 2007; VON MINCKWITZ et al. 2014). Um padrão similar é descrito em pacientes com CIM. Estudos que incluíram apenas pacientes com doença localmente avançada HER2-positiva confirmaram a maior resposta à quimioterapia neoadjuvante, com taxas de RCp em torno de 30% (Tabela 16).

Nesta pesquisa, os 36 doentes HER2-positivos incluídos tiveram RCp de 13,8%, abaixo, portanto, do habitualmente descrito. Fração significativa dos doentes não teve acesso a trastuzumabe junto à quimioterapia neoadjuvante, uma vez que o agente anti-HER2 só se tornou disponível no Sistema Único de Saúde após a publicação pela Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos da Portaria No. 18, de 25 de julho de 2012. O estudo de fase III NOAH, que incluiu 235 pacientes HER2-positivas tratadas com quimioterapia neoadjuvante associada ou não a trastuzumabe, mostrou que a adição do agente-alvo aumentou a RCp de 19% para 38% ($P=0,001$) (GIANNI et al. 2010). A carência do agente anti-HER2 pode

justificar, assim, a baixa RCp do grupo HER2-positivo identificada na pesquisa.

Estudos dirigidos para tumores inflamatórios triplo-negativos são escassos. O estudo GeparSixto incluiu 315 pacientes com tumores de mama triplo-negativos em estádios II e III, entre os quais cerca de 4% com CIM. Identificou-se alta sensibilidade à quimioterapia. O tratamento neoadjuvante com paclitaxel, doxorrubicina lipossomal e bevacizumabe proporcionou RCp de 36,9%. Quando adicionado de carboplatina, observou-se aumento de RCp para 53,2% ($P=0,005$) (VON MINCKWITZ et al. 2014). A experiência do *MD Anderson Cancer Center* com 527 pacientes com diagnóstico de CIM mostrou dados mais modestos, com RCp de 12,4% no grupo triplo-negativo (MASUDA et al. 2014). O presente estudo identificou RCp em 22,2% e 9,6% dos tumores triplo-negativos e não-triplo-negativos analisados, respectivamente ($P=0,042$) (Tabela 3), o que reforça a impressão de maior sensibilidade desse grupo de tumores à quimioterapia.

Na presente pesquisa, não se observou diferença significativa na RCp quando analisados subgrupos de acordo com a expressão hormonal e o status HER2. Contudo, o pequeno número de indivíduos em cada subgrupo minimiza o poder dessa análise. Ademais, a indisponibilidade do trastuzumabe no tratamento neoadjuvante fez as taxas de RCp dos grupos HER2-positivo e HER2-negativo convergirem, conforme discutido anteriormente. Não foi propósito deste trabalho detectar diferenças entre os vários subtipos intrínsecos de câncer de mama, motivo pelo qual ele não foi dimensionado para tal.

Não se identificou nesta pesquisa diferença significativa na RCp entre pacientes com CIM ou com CANI (Tabela 3). CRISTOFANILLI et al. (2007) descreveram as características de 1071 pacientes com doença localmente avançada e também não observaram diferença entre a RPc dos pacientes com CIM ou CANI (11,7% e 13,9%, respectivamente. Observação similar foi reportada em subanálise do estudo GeparTrio, que descreveu taxa de RCp de 8,6% e 11,3% em pacientes com CIM e CANI, respectivamente. No mesmo estudo, pacientes com tumor inicialmente operável (T2-3) tiveram resposta patológica completa de 17,7%, significativamente superior à dos outros grupos (COSTA et al. 2010). Entretanto, a análise multivariada mostrou que o estágio clínico, por si, não foi um preditor independente de RCp, e que as diferentes taxas de RCp observadas provavelmente se deveram à heterogeneidade nas características dos tumores, como o status hormonal (COSTA et al. 2010). Portanto, não se pode afirmar de forma clara que pacientes com CIM têm resposta à quimioterapia neoadjuvante inferior à dos carcinomas localmente avançados não-inflamatórios ou à de pacientes com estádios iniciais, desde que pareados por subtipo intrínseco.

Dentre os pacientes tratados com intuito curativo, mostrou-se que pacientes com CIM tiveram maior incidência de recidiva, em comparação com pacientes com CANI. Considerando tanto as pacientes com doença metastática à apresentação inicial quanto aquelas nas quais metástases se apresentaram após o tratamento local, detectou-se maior incidência de implantes à distância nas pacientes com CIM em comparação com doentes com tumores de mama não-inflamatórios, em especial em ossos, pleura e

linfonodos. De forma similar, CRISTOFANILLI et al. (2007) mostraram que, em comparação com pacientes com tumores avançados não-inflamatórios, doentes com CIM tiveram maior incidência cumulativa de recorrência locorregional e de recorrência à distância em ossos e partes moles. Os dados indicam que o CIM tem maior potencial de disseminação metastática, e que características biológicas próprias do CIM podem direcionar as células neoplásicas a sítios específicos. Uma expressão diferencial de quimiocinas é um fator candidato a justificar esse fenômeno.

Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de resposta à quimioterapia neoadjuvante, identificada em 77% dos pacientes avaliáveis, e sobrevida global. É um achado semelhante ao descrito por UENO et al. (1997) que reportaram um aumento da sobrevida global e da sobrevida livre de doença em 15 anos no grupo com resposta parcial ou completa ao tratamento neoadjuvante. A ausência de redução tumoral no tumor primário é um marcador de resistência das micrometástases ao tratamento sistêmico, o que torna os pacientes mais suscetíveis à recidiva tumoral e à mortalidade por câncer. Resposta à quimioterapia neoadjuvante, fenótipo inflamatório e maior status nodal mostraram ter valor prognóstico independente, enquanto status metastático ao diagnóstico teve correlação com sobrevida apenas à análise univariada. Os achados reafirmam o mau prognóstico atribuível ao carcinoma inflamatório da mama.

Não foi possível identificar associação significativa entre presença de receptores hormonais e maior sobrevida global. O melhor prognóstico da

doença RE-positiva foi documentado nas pacientes com câncer de mama inicial e, embora existam dados conflitantes, também na doença localmente avançada. A análise de informações populacionais derivadas do banco de dados SEER mostrou que a sobrevida mediana em pacientes com CIM e RE-negativo é metade da encontrada em pacientes com expressão hormonal (2 anos vs. 4 anos, respectivamente; $P < 0,0001$) (HANCE et al. 2005). De forma similar, SORLIE et al. (2014) analisaram tumores localmente avançados e mostraram que os subtipos intrínsecos luminal-A e luminal-B, normalmente caracterizados por expressão hormonal à imuno-histoquímica, tiveram melhor prognóstico que os outros grupos. Por outro lado, em achado similar ao da presente pesquisa, a positividade hormonal isoladamente não esteve associada com melhor sobrevida em análise retrospectiva de 527 pacientes com CIM tratados no *MD Anderson Cancer Center* (MASUDA et al. 2014).

A ausência de diferença de sobrevida entre os grupos RE-positivo e RE-negativo no presente estudo poderia ser explicada pelo número limitado de pacientes da população analisada. O grupo RH-positivo teve redução não significativa do risco de óbito em 34%, o que faz especular que o aumento da amostragem poderia prover significância estatística à análise. Além disso, o ligeiro desequilíbrio entre as populações quanto ao status hormonal poderia ser implicado. Deve-se reconhecer que a adição de 24 pacientes de um segundo banco de dados ao grupo não-inflamatório (de melhor prognóstico) pode ter inflado a sobrevida do grupo sem expressão hormonal. De fato, após a remoção desses 24 casos do grupo controle, a análise

univariada mostrou que a expressão hormonal passou a ter valor prognóstico (HR 0,54; IC 95% 0,33-0,89; P=0,015).

O estudo da pele acometida mostrou presença de tumor na derme de apenas 4 das 18 pacientes com CIM biopsiadas. Este achado tornou improdutivo a realização de correlações clínico-patológicas da expressão de RNAm dos biomarcadores com as características clínicas das doentes, motivo pelo qual o estudo com PCR foi abortado ao longo do projeto. A positividade limitada da biópsia cutânea tem sido repetidamente reportada na literatura científica. Apesar de os êmbolos serem um dos achados histológicos mais consistentes no CIM, eles não são demonstrados em um quarto dos pacientes com o diagnóstico clínico da condição (CHARPIN et al. 1992; BONNIER et al. 1995). Em estudo de LOW et al. (2004) acometimento da derme foi identificado em apenas 23 das 40 pacientes com CIM submetidos a biópsia cutânea. Os pesquisadores observaram que a positividade em derme não mostrou impacto no prognóstico das doentes.

Esses dados reafirmam a recomendação de que a presença de êmbolos ao estudo histológico não é necessária para o diagnóstico de CIM (ROBERTSON et al. 2010; MERAJVER et al. 2017), e reforçam a impressão de que a hiperemia característica do CIM ao exame físico também se deve a alterações de células não-neoplásicas do parênquima mamário (WOODWARD 2015).

5.2 QUIMIOCINAS E DEMAIS MARCADORES EXPERIMENTAIS

5.2.1 CXCR4 e CXCL12

Esta pesquisa mostrou expressão mais intensa de CXCR4 em tumores inflamatórios que não-inflamatórios. Estudo envolvendo tumores de mama precoces identificou positividade de CXCR4 de apenas 5% e 11% em tumores linfonodo-negativo e linfonodo-positivo, respectivamente (CABIOGLU et al. 2005). Os dados contrastam com a taxa de 41% encontrada em 444 pacientes com CIM em publicação do *M.D. Anderson Cancer Center* (CABIOGLU et al. 2007), e de 93% na presente pesquisa. Em tumores localmente avançados não-inflamatórios, este estudo identificou uma incidência intermediária de expressão de CXCR4, de 75%, significativamente inferior à detectada no CIM. Os achados sugerem que CXCR4 tem importância na patogênese dos tumores de mama avançados, em especial do carcinoma inflamatório.

A diferença de positividade entre os estudos é parcialmente explicada pelos distintos pontos de corte utilizados na avaliação do receptor. CABIOGLU et al. (2005b) definiram como tumores de alta expressão de CXCR4 aqueles com marcação citoplasmática forte em pelo menos 30% das células, ou moderada em pelo menos 50%. ANDRE et al. (2009), por outro lado, utilizaram o ponto de corte de apenas 1%. Já ZHANG et al. (2012) definiram como CXCR4-positivos os tumores com mais de 5% das células marcadas. Diversas outras formas de avaliar a positividade de CXCR4 foram reportadas. Na presente pesquisa, optou-se por reproduzir a metodologia

utilizada por ZHANG et al. (2012). Em comparação com os dados de CABIOGLU et al (2005b), o ponto de corte mais baixo pode ter maximizado a porcentagem de pacientes com expressão do receptor.

A expressão de CXCR4 associou-se com pior sobrevida global nas pacientes incluídas na pesquisa. O valor prognóstico adverso de CXCR4 no câncer de mama foi evidenciado em diversos outros estudos. Meta-análise de ZHANG et al. (2014) com 3.865 pacientes mostrou que o grupo de maior expressão teve menor sobrevida livre de doença (Risco Relativo [RR] 0,77, IC 95% 0,70-0,86) e menor sobrevida global (RR 0,70, IC 95% 0,59-0,83). A positividade de CXCR4 no citoplasma ou na membrana teve associação mais evidente com metástases à distância, em comparação com a expressão nuclear. Uma segunda meta-análise, com 3.104 pacientes, reforçou o poder prognóstico adverso de CXCR4 (HR 2,02, IC 95% 1,43-2,85) (XU et al. 2013).

Por outro lado, diversas publicações não mostraram associação entre expressão de CXCR4 e sobrevida (ANDRE et al. 2009; HASSAN et al. 2009; MIRISOLA et al. 2009). A falta de uniformização da forma de analisar CXCR4 nos diferentes estudos pode ajudar a explicar a discrepância dos resultados.

A maior agressividade associada a CXCR4 tem sido atribuída à alta proliferação celular, à resistência à apoptose, à maior invasão local e à facilitação da disseminação linfática e hematogênica associadas à hiperexpressão da proteína. Além disso, estudos têm mostrado que CXCR4 é altamente expresso em células-tronco neoplásicas, as quais estão

associadas a resistência ao tratamento oncológico (ZHANG et al. 2014). Em conjunto, os dados podem justificar o pior prognóstico dos tumores CXCR4-positivos. Os tumores inflamatórios de mama são especialmente associados a vários dos fenômenos carcinogênicos citados acima, tais como alta atividade das vias de angiogênese e alta disseminação linfática e hematogênica. É possível supor que CXCR4 é um dos mediadores responsáveis pelas características biológicas do CIM.

A meta-análise de ZHANG et al. (2014) mostrou que a hiperexpressão de CXCR4 está mais comumente associada com metástase axilar (risco relativo [RR] 1,20, intervalo de confiança [IC] 95% 1,01-1,43). Na presente pesquisa, não se documentou associação entre CXCR4 e presença de metástase axilar ou acometimento axilar mais extenso (N2 ou N3). Achado similar ao presentemente descrito foi reportado por 10 dos 13 estudos incluídos na meta-análise, os quais não encontraram associação entre CXCR4 e extensão da doença linfonodal (ZHANG et al. 2014).

A heterogeneidade dos resultados indica que o impacto de CXCR4 na predição de acometimento linfonodal é limitado, o que exigiria uma grande casuística para se detectar diferença estatisticamente significativa. Ademais, reforça, mais uma vez, a impressão de que a ausência de uniformização dos métodos de análise de CXCR4 pode repercutir nos resultados.

Na presente pesquisa, observou-se que tumores CXCR4-positivos estão mais comumente associados a metástases à distância que tumores sem a expressão do receptor. O achado vai ao encontro dos dados de ZHANG et al. (2014) que reportaram que tumores CXCR4-positivos têm

maior risco de disseminação à distância (RR 1,52, IC 95% 1,17-1,98), e reforça a impressão de que CXCR4 tem importância no processo de metastatização.

Diversos dados experimentais apontam para um alto potencial metastático da doença CXCR4-positiva. A expressão de CXCR4 pelo tumor direciona células metastáticas para sítios onde CXCL12 é produzido em grande quantidade, como osso, fígado e pulmão (Figura 8) (XU et al. 2015). Camundongos com imunodeficiência combinada severa inoculados com células MDA-MB-231, que têm alta expressão de CXCR4, desenvolveram metástases espontâneas em pulmão, ao passo que a inoculação de células MCF-7, que possuem baixa expressão de CXCR4, não levou ao surgimento de metástases à distância (HELBIG et al. 2003). Em outro estudo, células malignas que se implantaram no parênquima pulmonar exibiram maior expressão de CXCR4 quando comparado com as células parentais. Ademais, anticorpos anti-CXCR4 inibiram a extravasação de células neoplásicas no fígado (WENDEL et al. 2012), além de terem reduzido metástases de câncer de mama em pulmão e linfonodos (LUKER e LUKER 2006).

Nesta pesquisa, a doença com expressão de CXCR4 foi acompanhada de incidência numericamente superior de metástases em ossos, fígado, pulmão, sistema nervoso central, pleura e linfonodos, ainda que o pequeno número de casos em cada sítio de metástase não confira poder estatístico à comparação sítio-por-sítio com tumores CXCR4-negativos.

Numerosos estudos descreveram maior expressão de CXCR4 entre tumores HER2-positivos (LI et al. 2004; SALVUCCI et al. 2006; LIU et al. 2010; ZHANG et al. 2012). Por outro lado, a meta-análise de ZHANG et al. (2014), a mais ampla avaliação feita da associação de HER2 e CXCR4, não mostrou associação entre as variáveis. Mais uma vez, portanto, os dados são conflitantes.

A associação entre CXCR4 e HER2 é sustentada por diversas evidências pré-clínicas. Em uma série de sofisticados experimentos de LI et al. (2004), observou-se que a expressão de CXCR4 é maior em células de câncer de mama MDA-MB-435 transfectadas com o gene HER2, em comparação com grupo controle. De forma complementar, o emprego do trastuzumabe, um anticorpo anti-HER2, associou-se à redução da expressão de CXCR4 em células HER2-positivas, mas não em células HER2-negativas. A depleção da expressão de HER2 mediada por RNA de interferência também mostrou modular negativamente CXCR4 (LI et al. 2004). O bloqueio da via PI3K/AKT/mTOR em diferentes níveis também foi capaz de inibir a expressão de CXCR4 em células HER2-positivas, o que sugere participação da via na interface entre HER2 e CXCR4 (LI et al. 2004). Evidenciou-se ainda que a hiper-regulação de CXCR4 induzida por HER2 é necessária para a invasão mediada por CXCL12 *in vitro*. Experimentos *in vivo* provaram que a migração de células malignas HER2-positivas e a sua adesão a células endoteliais foram inibidas após uso de anticorpo anti-CXCR4. Por fim, o emprego de dois inibidores de CXCR4, AMD3100 e TN14003, reduz de forma significativa o crescimento tumoral e a

disseminação metastática de tumores de mama HER2-positivos, mas não de tumores triplo-negativos (LEFORT et al. 2017).

Conforme esperado, no presente estudo a taxa de positividade de CXCR4 foi numericamente maior nos tumores HER2-positivos, em comparação com tumores sem expressão de HER2 (93% vs. 79%, respectivamente), ainda que não se tenha atingido significância estatística.

Positividade de CXCR4 foi mais comumente associada à expressão de receptores hormonais (ainda que sem significância estatística), e menos observada em neoplasias triplo-negativas. Tem sido reportado que estrógenos aumentam a expressão de CXCR4 e CXCL12 (ZHANG et al. 2014), e que a ativação da via de sinalização CXCL12/CXCR4 promove aumento da atividade transcricional do receptor de estrógeno (MANTOVANI et al. 2010). Parece haver uma interface, portanto, entre as vias mediadas por receptores de estrógeno e a via CXCL12/CXCR4.

Fatores importantes podem afetar a eficiência e reprodutibilidade da imuno-histoquímica como forma da avaliação de CXCR4, e podem justificar os resultados discordantes em diferentes estudos. O tipo e a duração da fixação do tecido, a escolha e diluição do anticorpo, o ponto de corte que define positividade à interpretação e o sítio celular onde a expressão é analisada são exemplos de aspectos que carecem de uniformização.

Nesta pesquisa, optou-se por estudar a expressão de CXCR4 no citoplasma das células neoplásicas, com análise semiquantitativa da intensidade de marcação e da porcentagem de células marcadas, em adaptação de metodologia previamente descritas que mostrou boa

correlação com os desfechos clínicos (ZHANG et al. 2012). Apesar de CXCR4 estar localizado na superfície de células não-estimuladas, o receptor é rapidamente internalizado após exposição a CXCL12 (HATTERMANN et al. 2014). De fato, numerosos estudos investigaram a expressão citoplasmática de CXCR4, com resultados robustos (SU et al. 2006; YASUOKA et al. 2008; LIU et al. 2010; ZHANG et al. 2012). A expressão nuclear de CXCR4 também mostrou correlação com disseminação linfonodal e com sobrevida de pacientes com câncer de mama, mas de forma menos consistente (YASUOKA et al. 2008; LIU et al. 2010; ZHANG et al. 2014), motivo pelo qual não foi investigada na presente pesquisa.

Estudos recentes mostraram que antagonistas de CXCR4, como AMD3100, inibem o crescimento tumoral em modelos animais de câncer de mama (LILES et al. 2003; LEFORT et al. 2017). Além disso, a modulação negativa de CXCR4 tem potencial de induzir parada do crescimento ou apoptose, assim como de prevenir invasão e metástase (GIL et al. 2013). Portanto, reforça-se a impressão de que CXCR4 tem importância no câncer de mama e é um alvo terapêutico a ser explorado. Uma vez que o CIM tem uma expressão especialmente alta de CXCR4 e apresenta características biológicas que podem ser explicadas pelo receptor da quimiocina, é razoável acreditar que estratégias anti-CXCR4 seriam promissoras em pacientes com carcinoma inflamatório.

Não foram identificadas associações estatisticamente significativas entre CXCL12 e as diversas características clínicas e patológicas pesquisadas. Positividade de CXCL12 foi observada em 52% e 36% dos

tumores inflamatórios e não-inflamatórios, respectivamente, reproduzindo o padrão descrito com CXCR4. A diferença, contudo, não foi estatisticamente significativa. O estudo foi realizado em 85 amostras tumorais, uma fração do total de 194 pacientes incluídos no estudo. Especula-se que a diferença poderia atingir significância estatística se a casuística fosse mais robusta.

A marcação de CXCL12 à imuno-histoquímica pode ser identificada no citoplasma ou na membrana das células neoplásicas. Estudo japonês mostrou que as células com expressão membranar da quimiocina têm nível mediano de RNAm de CXCL12 similar ao do grupo em que não se demonstrava qualquer expressão da proteína, ao passo que a expressão de RNAm das células com marcação citoplasmática é significativamente superior (KOBAYASHI et al. 2010). Os autores optaram por categorizar as células com marcação membranar no grupo de baixa expressão da quimiocina, ao lado das células em que CXCL12 não foi detectada, enquanto os tumores com marcação citoplasmática foram ditos de alta expressão (KOBAYASHI et al. 2010). Em consonância com essa observação, no presente trabalho optou-se por analisar a expressão de CXCL12 apenas no citoplasma das células neoplásicas.

O valor prognóstico de CXCL12 tem sido reportado em publicações com resultados conflitantes. Dois estudos retrospectivos com pacientes com câncer de mama mostraram que a hiperexpressão de CXCL12 correlacionou-se com menores sobrevida global e sobrevida livre de doença (KANG et al. 2005; MIRISOLA et al. 2009) e com maior acometimento linfonodal (KANG et al. 2005). Conclusões similares foram reportadas em

estudos com câncer colorretal, gástrico, de cavidade oral ou glioma (KOBAYASHI et al. 2010). SHAN et al (2015) observaram que a hiperexpressão de CXCL12 promove o processo de transição epitélio-mesenquimal e induz a formação de fenótipo de células-tronco, o que poderia explicar a observação de maior agressividade da doença.

Ao contrário, estudo japonês com 221 pacientes mostrou que a alta expressão de CXCL12 foi um fator relacionado com melhor sobrevida em tumores de mama com expressão hormonal, e não identificou associação da quimioterapia com metástase linfonodal (KOBAYASHI et al. 2010). De forma similar, a hiperexpressão transgênica de CXCL12 em linhagem de células de câncer de mama mostrou reduzir a disseminação à distância em camundongos (WENDT et al. 2008). Em tumores sem expressão hormonal, KOBAYASHI et al. (2010) não documentaram valor prognóstico de CXCL12. Na presente pesquisa, em população enriquecida de tumores RE-negativos e de tumores inflamatórios, também não se observou impacto de CXCL12 nos desfechos clínicos. As diferentes conclusões dos estudos sinalizam que é possível que o papel de CXCL12 seja diferente, a depender do subtipo biológico.

Estudos com camundongos mostraram que MCF7, uma linhagem celular com expressão de receptores de estrógeno, expressa CXCL12, ao passo que não se detecta a presença do receptor na linhagem MDA-MB-231, que carece de receptores hormonais (HALL e KORACH 2003; WENDT et al. 2008). KOBAYASHI et al (2010) provaram que estradiol induz a expressão de CXCL12 em linhagens celulares de câncer de mama RE-

positivo, e que a expressão hormonal é mais comum no grupo de tumores com alta expressão da quimiocina. Os dados sugerem uma correlação entre CXCL12 e tumores hormônio-dependentes.

Contudo, as evidências científicas, mais uma vez, não são uniformes. KANG et al. (2005) mostraram que tumores RE-negativos tiveram maiores níveis de RNAm de CXCL12. Na presente pesquisa, não se observou associação entre expressão hormonal e expressão de CXCL12.

Compreender a importância de CXCL12 torna-se mais difícil ao se perceber a heterogeneidade dos estudos que investigam a quimiocina. É digno de nota constatar que a expressão de CXCL12 em tecido mamário normal foi considerada discreta por KANG et al. (2005) enquanto KOBAYASHI et al. (2010) e WENDT et al. (2008) descreveram-na como de forte intensidade. Os resultados díspares refletem a já citada dificuldade de padronização dos estudos moleculares com quimiocinas, os quais são efetuados com diferentes ferramentas, anticorpos, diluições, sítios de investigação, escores de avaliação e pontos de corte.

5.2.2 CCR7

Há indicações de que o eixo CCL19-CCL21/CCR7 se correlaciona com metástases linfonodais em diferentes tipos de câncer. Estudos pré-clínicos com células de melanoma transfectadas com CCR7 mostraram que a presença do receptor é suficiente para conferir potencial de disseminação em linfonodos (WILEY et al. 2001). Meta-análise de DU et al. (2017) incluiu 1.697 indivíduos orientais com câncer gástrico e observou que tumores com

maior expressão de CCR7 estão associados com maior incidência de metástases linfonodais. Em pacientes com câncer colorretal, CCR7 também se correlacionou com acometimento de linfonodos (GÜNTHER et al. 2005). Por fim, detectou-se que um dos ligantes de CCR7, CCL21, é expresso em altos níveis em linfonodos de pacientes com câncer de mama, o que dá suporte a seu papel no endereçamento linfonodal de células neoplásicas (MÜLLER et al. 2001; CASSIER et al. 2011).

Na presente pesquisa, não se observou qualquer associação estatisticamente significativa entre a expressão citoplasmática ou membranar de CCR7 e a presença ou extensão de metástases linfonodais. A expressão citoplasmática de CCR7 foi encontrada em 67% dos pacientes axila-positiva, em comparação com 50% dos pacientes sem linfonodos acometidos ($P=0,482$).

É possível especular que CCR7 tenha papel importante no endereçamento linfonodal de células de tumores de mama precoces, mas que outros fenômenos envolvidos possam eclipsar o valor do receptor na disseminação de tumores localmente avançados, incluindo CIM.

Publicações em diferentes neoplasias encontraram valor prognóstico adverso da presença de CCR7 (GÜNTHER et al. 2005; DU et al. 2017). Em pacientes com carcinoma inflamatório de mama, o papel prognóstico de CCR7 foi sugerido em análise por imuno-histoquímica de 44 casos acompanhados no *MD Anderson Cancer Center*, que mostrou que pacientes com expressão de CCR7 tiveram sobrevida em 5 anos numericamente

inferior à de pacientes CCR7-negativos, ainda que sem significância estatística (20,0% vs. 41,9%, $P=0,24$) (CABIOGLU et al. 2009).

Tem-se sugerido que o eixo CCL19-CCL21/CCR7 contribui para a sobrevida de células tumorais através da ativação da via PI3K/AKT/mTOR, assim como colabora para o processo de transição epitélio-mesenquimal por meio da hiper-regulação de metaloproteinase da matriz, caderina-e, caderina-n e vimentina, o que concorre, por sua vez, para invasão tumoral e disseminação à distância (DU et al. 2017).

Por outro lado, CCR7 não teve impacto em sobrevida em estudo francês que analisou pacientes com câncer de mama precoce (CASSIER et al. 2011). De forma similar, a presente pesquisa não mostrou diferença de prognóstico nas pacientes CCR7-positivas.

A expressão de CCR7 foi estudada em diferentes sítios de metástases de câncer de mama. CABIOGLU et al. (2007) identificaram que CCR7 é mais expresso em metástases ósseas do que viscerais (27% e 0%, respectivamente), o que sugere que o receptor pode estar implicado no processo de endereçamento das células do câncer de mama ao esqueleto. ANDRE et al. (2006) por outro lado, detectaram maior positividade de CCR7 dentre pacientes com metástases cutâneas, mas não ósseas. Já na presente pesquisa, não se encontrou diferença no número de pacientes que desenvolveram metástases, assim como não se detectou um padrão de disseminação preferencial de acordo com a expressão de CCR7.

O estudo corrente mostrou uma maior expressão de CCR7 em pacientes hormônio-sensíveis. O achado contrasta com publicação de

ANDRE et al. (2006) e CABIOGLU et al. (2007), que não mostraram associação entre as variáveis. A positividade entre tumores triplo-negativos foi de 50%, enquanto entre tumores não-triplo-negativos foi de 77% ($P=0,031$). O achado sugere que CCR7 teria menor papel em tumores triplo-negativos, algo não previamente descrito.

O receptor CCR7 localiza-se originalmente na membrana celular. Contudo, a maior parte dos estudos que analisaram a presença do receptor avaliaram sua presença no citoplasma. Na presente pesquisa, optou-se por analisar a expressão de CCR7 nos dois sítios. Mostrou-se que a marcação na membrana e no citoplasma estão correlacionadas entre si ($P<0,001$) (Tabelas 13 e 14). Ademais, detectou-se o mesmo padrão de correlação entre CCR7 e as características clínicas e patológicas, independentemente da localização membranar ou citoplasmática do receptor. Uma exceção foi a associação negativa com resposta patológica completa, encontrada apenas nas pacientes com marcação citoplasmática de CCR7. O dado sugere que a expressão de CCR7 indica maior quimiorresistência por si, mas pode ser interpretado como resultante da menor proporção de tumores triplo-negativos ou sem expressão de receptores de estrógeno entre as pacientes CCR7-positivas, uma vez que ambas as condições conferem maior sensibilidade à quimioterapia.

Diferenças nítidas entre as publicações que estudaram a expressão de CCR7 por imuno-histoquímica podem ser identificadas. CASSIER et al. (2011) não observaram marcação de CCR7 em células tumorais, apenas em células do estroma. É um achado distinto do desta pesquisa, em que a

expressão do receptor foi encontrada na membrana celular ou no citoplasma em 98% e 89% dos casos, respectivamente. CABIOGLU et al. (2005b) por sua vez, identificaram expressão do marcador em 57% das células.

Os diferentes métodos empregados podem ter implicação nos resultados obtidos. ANDRE et al. (2006), CABIOGLU et al. (2007) e CASSIER et al. (2011) utilizaram o mesmo anticorpo anti-CCR7, mas diferentes diluições, agentes bloqueadores de peroxidase e tempos de incubação do anticorpo. Qualquer marcação definiu positividade de CCR7 no estudo de CASSIER et al. (2011), ao passo que CABIOGLU et al. (2005b) limitaram a positividade às doentes com marcação forte em mais de 50% das células, ANDRE et al. (2006) às pacientes com qualquer marcação forte, e a presente pesquisa às doentes com marcação moderada em mais de 50% das células ou qualquer marcação forte.

Sítios distintos de avaliação também podem ter repercussão nos resultados. A expressão de CCR7 no citoplasma de células tumorais ou em células estromais mostrou estar associada à maior presença de metástases linfonodais, enquanto a expressão nuclear do receptor correlacionou-se com axila negativa. A expressão citoplasmática mostrou associação com estadiamento avançado e sobrevida em alguns estudos em câncer de mama (CABIOGLU et al. 2005, 2007), mas não em outros (ANDRE et al. 2006). A heterogeneidade dos métodos e dos resultados sinaliza que uma padronização da forma de avaliação de quimiocinas e seus receptores seria bem-vinda, e que possivelmente a avaliação por imuno-histoquímica seria subótima para estudar o papel de CCR7 no câncer de mama.

5.2.3 CXCR1

Não se obteve qualquer correlação estatisticamente significativa entre CXCR1 e as diversas características clínico-patológicas basais pesquisadas. Observou-se taxa mais elevada de tumores com maior expressão de CXCR1 entre os carcinomas inflamatórios (71%) que nos tumores não-inflamatórios (54%), ainda que sem significância estatística. Em análise exploratória com ponto de corte de 5%, a diferença foi significativa (100% versus 85%, respectivamente; $P=0,029$). É um indício de que CXCR1 pode ter papel diferencial nos tumores inflamatórios, em relação aos carcinomas avançados não-inflamatórios.

Tem-se reportado que os níveis de IL-8 são mais elevados em pacientes sem expressão de receptores hormonais (SNOUSSI et al. 2010), mas não foi possível detectar diferença na expressão do receptor da quimiocina de acordo com o padrão hormonal, na amostra estudada.

Em modelo pré-clínico, ACETO et al. (2012) mostraram que a coexpressão de HER2 e HER3 induziu a sinalização autócrina de IL-8, o que levou à invasão de células mamárias. De forma similar, SINGH et al. (2013b) sugeriram que a sinalização IL-8/CXCR1-2 é parcialmente mediada por via dependente de HER2. A presente pesquisa não observou associação entre CXCR1 e HER2. O uso de diferentes ferramentas de pesquisa pode explicar os resultados distintos entre os estudos.

Constatou-se que tumores com maior expressão de CXCR1 tiveram menor taxa de RCp (0% versus 19%, $P=0,0018$). Características associadas à maior RCp, como ausência de expressão hormonal ou tumores triplo-

negativos, mostraram-se razoavelmente equilibradas entre os grupos de tumores com maior ou menor expressão de CXCR1, com ligeira superioridade numérica das duas condições no grupo com CXCR1 menos expresso. Isto indica que CXCR1 parece ser um fator preditor de resistência à quimioterapia com valor independente.

O achado pode ser justificado pela associação entre CXCR1 e células-tronco mamárias. Recentes publicações têm revelado que o receptor é hiperexpresso em um grupo altamente tumorigênico de células que expressam ALDH1, um marcador de células-tronco, tanto em linhagem de células de câncer de mama (GINESTIER et al. 2010) quanto em mamosferas obtidas a partir de amostras tumorais (SINGH et al. 2013b). Além disso, o bloqueio do receptor resultou em uma diminuição significativa da população global de células-tronco tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Outros estudos confirmaram o papel do eixo IL-8/CXCR1-2 na regulação da atividade de células-tronco isoladas a partir de ascite neoplásica, de derrames pleurais ou de tumores primários invasivos (BENOY et al. 2004; SINGH et al. 2013b). Portanto, sugere-se que a maior expressão de CXCR1 detectada por imuno-histoquímica seria indicativa da presença de tumores enriquecidos em células-tronco, por conseguinte mais resistentes à quimioterapia neoadjuvante.

Não se verificou correlação estatisticamente significativa entre CXCR1 e sobrevida global neste estudo. Contudo, a diferença encontrada na sobrevida em 3 anos entre os grupos de menor e maior expressão do receptor (78% versus 49%, respectivamente; $P=0,188$) não permite afastar a

existência de valor prognóstico adverso de CXCR1. BENOY et al. (2004) mostraram que maiores níveis séricos de IL-8 associam-se de forma independente à menor sobrevida pós-recidiva em câncer de mama, o que vai ao encontro dos dados pré-clínicos que indicam maior agressividade dos tumores em que a via IL-8/CXCR1-2 é hiperexpressa. O pior prognóstico da doença com alta expressão de CXCR1 também foi reportada no câncer gástrico (CAO et al. 2016).

A expressão de CXCR1 foi avaliada por imuno-histoquímica em poucos estudos. Em publicação sobre câncer gástrico, CAO et al. (2016) graduaram a intensidade da marcação por CXCR1 em quatro categorias e estimaram a porcentagem de células positivas. O produto dos dois valores definiu um escore, que variava de 0 a 300. O ponto de corte para definição dos grupos de expressão alta ou baixa do receptor foi o valor mediano da amostra. Na presente pesquisa, optou-se por adotar um escore semiquantitativo simplificado que dividiu os tumores em quatro grupos, com vistas à maior reprodutibilidade da avaliação. Buscando dividir os tumores em categoria de alta e baixa de forma a ter grupos de dimensão similar, optou-se por chamar de grupo de maior expressão apenas os tumores aos quais foi conferido escore 3+ (62% do total).

Dada a ausência de padronização da análise de CXCR1 por imuno-histoquímica, também foram feitas correlações estatísticas exploratórias com um menor ponto de corte, de 2+. Nesta segunda análise, verificou-se novamente associação do receptor com menor RCp, e passou-se a detectar também correlação entre a expressão do receptor com o grupo de tumores

triplo-negativos e com tumores inflamatórios, conforme citado anteriormente. Contudo, apenas seis pacientes (8% do total) foram classificados como escore 0 ou 1+ e, portanto, encaixaram-se no grupo de menor expressão, o que fragilizou as análises. Por este motivo, preferiu-se adotar o ponto de corte mais alto na análise primária do estudo.

5.2.4 FOSFO-mTOR

Estabeleceu-se um ponto de corte de 2+ para se definir o grupo de maior expressão de p-mTOR, de forma a dividir os grupos de forma tão equânime quanto possível. O ponto de corte reportado em estudos com p-mTOR varia amplamente nas publicações que analisaram o marcador em câncer de mama (BOSE et al. 2006; WALSH et al. 2012; JHAVERI et al. 2016). Foi feita análise exploratória com ponto de corte de 1+ (equivalente a 5% de expressão) na presente pesquisa, e os resultados não diferiram da análise primária.

Este estudo não identificou diferença na expressão de p-mTOR entre tumores inflamatórios e não-inflamatórios. Jhaveri et al. também não detectaram diferença na expressão de p-mTOR entre tumores inflamatórios e não-inflamatórios previamente expostos a quimioterapia (estádios II e III). Por outro lado, ambos os grupos exibiram maior expressão do que grupo de tumores não-inflamatórios não exposto anteriormente a quimioterapia. Em conjunto, os resultados indicam que p-mTOR não parece ter papel determinante na patogênese do CIM, e que a hiperativação da via

PI3K/AKT/mTOR pode ser um mecanismo de resistência à quimioterapia (JHAVERI et al. 2016).

Não se identificou qualquer correlação entre a expressão de p-mTOR e as diversas características clínico-patológicas basais ou os desfechos clínicos. É um achado similar ao de WALSH et al. (2012), que descreveram a expressão citoplasmática de p-mTOR em 188 pacientes com câncer de mama. Registre-se que, em adição à pesquisa da proteína no citoplasma, o estudo de WALSH et al. (2012) também reportou marcação da proteína em topografia nuclear e perinuclear, e ambas se mostraram mais frequentes em tumores triplo-negativos.

Dois estudos mostraram maior expressão de p-mTOR em tumores de alto grau (BOSE et al. 2006; WALSH et al. 2012), enquanto um estudo não observou associação entre as variáveis (ZHOU et al. 2004). Assim como na publicação de ZHOU et al. (2004), na presente pesquisa não houve correlação entre o grau de diferenciação tumoral e a expressão de p-mTOR. Os resultados inconsistentes sugerem não haver associação forte entre p-mTOR e diferenciação.

BOSE et al. (2006) mostraram que carcinomas invasivos com hiperexpressão de p-mTOR tiveram um risco de recorrência três vezes superior ($P=0,03$), um achado que não foi reproduzido na presente pesquisa. Os dados indicam que p-mTOR não parece ter um valor prognóstico decisivo no câncer de mama localmente avançado.

Identificou-se uma associação positiva entre p-mTOR e CCR7. Tem-se sugerido que o eixo CCL19-CCL21/CCR7 contribui para a sobrevida de

células tumorais através da ativação da PI3K/AKT/mTOR (DU et al. 2017). Em modelo em câncer de cabeça e pescoço, Wang et al mostraram que a quimiotaxia e a disseminação metastática de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (CECP) são dependentes de PI3K, e que a ativação de CCR7 promove ativação rápida da via PI3K/AKT/mTOR (WANG et al. 2005). Novamente em CECP, LIU et al. (2010) identificaram que o eixo CCR7-CCL19 induz a fosforilação de mTOR, e que a ativação de mTOR é revertida pela inibição de CCR7.

Em conjunto, os dados indicam que, em CECP, mTOR está envolvido na cascata CCR7/PI3K, e que mTOR desempenha papel importante na sobrevida induzida por CCR7. Os dados da atual pesquisa apontam que CCR7 e mTOR estão interligados também no câncer de mama localmente avançado, um achado não previamente reportado, e reforçam a impressão de que mTOR é uma proteína importante na cascata de ativação induzida por CCR7.

5.2.5 FOXP3

Em diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama, a infiltração por TILs regulatórios FOXP3-positivos tem sido associada com pior prognóstico (BATES et al. 2006; BOHLING e ALLISON 2008; YAN et al. 2011; TAKENAKA et al. 2013; MAEDA et al. 2014; SUN et al. 2014; ASANO et al. 2016; SHOU et al. 2016; YU et al. 2016), ao passo que outros estudos não identificaram associação entre FOXP3 e sobrevida (GOODEN et al. 2011; MAHMOUD et al. 2011; WEST et al. 2013). Um padrão por vezes

inconsistente do valor prognóstico de FOXP3 foi apontado por DELEEUW et al. (2012), que detectaram que FOXP3 está associado a pior sobrevida em pacientes com hepatocarcinoma, mas a melhor sobrevida em doentes com câncer colorretal.

Não se demonstrou valor prognóstico da expressão tumoral ou estromal de FOXP3 na população da presente pesquisa, mas, surpreendentemente, observou-se menor incidência de metástases nas pacientes com expressão de FOXP3 no estroma, em comparação com as pacientes sem expressão (0% vs. 40%, respectivamente; $P=0,030$). À análise univariada, ainda que não se tenha atingido significância estatística, o marcador pareceu se comportar como um fator de proteção. De fato, diante da diferença na fração de pacientes com metástases à distância, é possível especular que, com maior tempo de seguimento, o grupo FOXP3-negativo venha a ter maior mortalidade do que o grupo com expressão do marcador.

Em análise de 175 tumores RE-negativos por imuno-histoquímica, WEST et al. (2013) mostraram que altos níveis de TILs FOXP3-positivo correlacionaram-se com maior sobrevida livre de recorrência, particularmente em tumores basaloides. A população da presente pesquisa foi enriquecida de pacientes sem expressão de receptores hormonais, o que assemelha este estudo ao de WEST et al. (2013). Os melhores desfechos dos pacientes FOXP3-positivos em alguns estudos têm sido creditados à associação positiva entre TILs FOXP3-positivos e TILs CD8-positivos. Pode-se supor, assim, que o efeito imunossupressor de Tregs não seria capaz de

se sobrepor à atividade antitumoral de TILs CD8-positivos (SALAMA et al. 2009; YOON et al. 2012; WEST et al. 2013).

Além disso, tem-se mostrado que Tregs podem exercer atividade pró-inflamatória no câncer de cólon, assim como têm atividade de suprimir ou eliminar leucócitos inatos, tais como macrófagos, os quais têm papel na progressão tumoral (WEST et al. 2013). Os dados sustentam a possibilidade de TILs FOXP3-positivos terem efeito protetor direto sobre tumores de mama localmente avançados, possivelmente por serem enriquecidos de tumores RE-negativos. Os achados vão de encontro ao corpo de evidências de que FOXP3 seria um marcador de mau prognóstico.

As pacientes com expressão de FOXP3 no estroma tiveram taxa de resposta à QT neoadjuvante significativamente menor, quando comparadas com as pacientes FOXP3-negativas. Ademais, nenhum paciente com marcação de FOXP3 no estroma ou no tumor teve RCp. No câncer de mama, tem-se reportado que os TILs estão associados com maior taxa de RCp (DENKERT et al. 2015; KAEWKANGSADAN et al. 2016). Entretanto, os diferentes subtipos de células T no câncer de mama, como CD4, CD8, FOXP3 ou PD-1, têm características preditivas de resposta diferentes (ASANO et al. 2016).

O achado de quimiorresistência de tumores com expressão de FOXP3 foi reportado em múltiplas publicações (LADOIRE et al. 2008; ARUGA et al. 2009; VERMA et al. 2013). Em estudo com mulheres com câncer de mama localmente avançado, identificou-se que as pacientes com maior nível de Tregs FOXP3-positivos no sangue tiveram menor taxa de

RCp após quimioterapia neoadjuvante (VERMA et al. 2013). LADOIRE et al. (2008) mostraram que RCp foi observada em pacientes com câncer de mama nas quais houve um decréscimo brusco da contagem de células FOXP3-positivas após a quimioterapia.

Diferentes estudos identificaram que a taxa de RCp é mais elevada em pacientes com alta relação CD8+/FOXP3+, seja em população de tumores triplo-negativos, HER2-positivos ou localmente avançados (MIYASHITA et al. 2014; ASANO et al. 2016; KAEWKANGSADAN et al. 2016). O conjunto dos dados sugere que a imunossupressão mediada por FOXP3 correlaciona-se com a falha à indução de apoptose de células neoplásicas mediada por quimioterapia.

Entretanto, há estudos que apontam para o sentido contrário. Denkert et al publicaram que a detecção de RNAm de FOXP3 em tumores de mama, em especial no subgrupo HER2-positivo, teve correlação positiva com RCp (DENKERT et al. 2015). Dado semelhante foi descrito por ODA et al. (2012) que identificaram que a infiltração tumoral por células T FOXP3-positivas foi capaz de prever de forma independente uma maior taxa de RCp. Os autores atribuíram os achados à possível coexpressão de marcadores pró-inflamatórios, o que sugere uma ativação por retroalimentação de alças imunossupressoras como parte de uma reação imune (DENKERT et al. 2015).

A heterogeneidade das conclusões dos estudos que analisaram o valor preditivo de FOXP3 indica que o marcador, avaliado isoladamente, não parece ser uma ferramenta adequada de predição de resposta à

quimioterapia. Sugere-se que parâmetros combinados, como a relação CD8/FOXP3 ou a variação da contagem de células FOXP3-positivas ao longo do tratamento, podem ter maior poder discriminatório.

Não se mostrou associação entre a expressão estromal ou tumoral de FOXP3 e status hormonal nesta pesquisa. O dado diverge de estudos que reportaram maior expressão de FOXP3 em tumores RE-negativos (BATES et al. 2006; MAHMOUD et al. 2011; LIU et al. 2012; WEST et al. 2013; SHOU et al. 2016; YU et al. 2016). A presente pesquisa utilizou o mesmo anticorpo e a mesma diluição empregados por MAHMOUD et al. (2011) mas diferiu do estudo britânico nos seguintes aspectos: (1) chamou de positivo as amostras com expressão do marcador em mais que 1% das células, enquanto o trabalho de MAHMOUD et al. (2011) empregou ponto de corte de 3 células marcadas no estroma e no tumor; (2) investigou a expressão no estroma e na célula tumoral individualmente, ao passo que o estudo britânico adotou um escore combinado dos dois sítios; (3) analisou a marcação tumoral no citoplasma, em oposição ao núcleo; e (4) avaliou a expressão de FOXP3 nas amostras de 78 doentes, enquanto o estudo de MAHMOUD et al. (2011) incluiu 1.445 tumores. Em um cenário em que a positividade é rara, os distintos tamanhos de amostras poderiam justificar a diferença dos resultados.

É bem estabelecido que a expressão nuclear de FOXP3 é constitutiva em humanos, e que a localização nuclear também é observada em muitas células neoplásicas, onde a proteína age como um fator de transcrição. Muitas linhagens de células tumorais, incluindo câncer de pulmão, mama,

cólon e melanoma, expressam a proteína FOXP3. Em oposição à marcação estromal, cujo valor prognóstico é controverso, a expressão de FOXP3 no núcleo de células tumorais mostrou ser um marcador de bom prognóstico em diferentes estudos em câncer de mama (LADOIRE et al. 2011; CHEN et al. 2017).

Expressão predominantemente citoplasmática tem sido reportada em células de câncer de pâncreas ou de mama, mas seu significado não é bem compreendido (NAIR et al. 2013). Na presente pesquisa, não se identificou qualquer associação entre a expressão de FOXP3 no citoplasma de células tumorais e as características clínico-patológicas basais ou desfechos clínicos.

Uma meta-análise de 15 estudos mostrou que a presença de TILs FOXP3+ correlacionou-se com o status HER2-positivo (SHOU et al. 2016). A presente pesquisa analisou apenas 13 doentes com hiperexpressão de HER2 no grupo submetido a estudo de FOXP3, e não encontrou associação entre as variáveis.

As diferenças entre os resultados de diferentes autores podem ser explicadas pelo tamanho da população, pelos diferentes métodos de avaliação da expressão de FOXP3 ou pela utilização da técnica de TMA. Nesta pesquisa, a positividade de FOXP3 nas células tumorais e no estroma foi de apenas 9% e 10%, respectivamente. A baixa expressão do marcador e o tamanho limitado da amostra (em apenas 78 pacientes foi possível pesquisar a presença do fator de transcrição) fragilizam o poder estatístico das correlações efetuadas. De toda forma, os achados de menor incidência

de metástases e menos resposta à quimioterapia neoadjuvante na presente pesquisa contribuem para a compreensão do intrincado papel de FOXP3 em tumores avançados de mama, incluindo CIM.

5.2.5 PD-L1

Poucos estudos têm reportado a expressão de PD-L1 no câncer de mama. Estudo britânico analisou um total de 3.916 amostras de tumores de mama e identificou expressão da proteína nas células tumorais e no estroma de apenas 1,7% e 6% dos tumores, respectivamente (ALI et al. 2015). Em tumores triplo-negativos, por outro lado, a expressão é maior (GHEBEH et al. 2007; ALI et al. 2015). SUN et al. (2016) compararam a positividade de três diferentes anticorpos, pesquisando quatro diferentes pontos de corte, em grupo de 218 casos de tumores triplo-negativos. Quando se utilizou o ponto de corte de 1%, detectou-se que a positividade de PD-L1 nas células tumorais e no estroma foi de algo em torno de 13% e 30%, respectivamente, com razoável concordância entre os três anticorpos pesquisados (SUN et al. 2016). Na presente pesquisa, apesar de se estudar uma população enriquecida em tumores triplo-negativos, a taxa de positividade foi de apenas 3% e 6% nas células tumorais e no estroma, respectivamente, o que reproduz as taxas obtidas por ALI et al. (2015).

A avaliação da expressão de PD-L1 é desafiadora devido à heterogeneidade dos achados e à baixa reprodutibilidade das reações (WIMBERLY et al. 2015). Tem-se reportado grande variação na positividade de PD-L1 no câncer de mama, com taxas que vão de 1% a 30% em

diferentes estudos (ALI et al. 2015; WIMBERLY et al. 2015). A discrepância nos dados tem sido atribuída ao uso de diferentes populações de estudo, anticorpos e pontos de corte.

A expressão de PD-L1 tem sido associada a maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida global em pacientes com câncer de mama (SCHALPER et al. 2014; ALI et al 2015; BECKERS et al 2016; SUN et al. 2016), assim como com maior sensibilidade à quimioterapia neoadjuvante (WIMBERLY et al. 2015; BERTUCCI et al. 2015). Há uma correlação positiva entre PD-L1 e a presença de TILs, e é possível que a atividade antitumoral dos TILs contrabalance o papel imunossupressor de PD-L1 (DENKERT et al. 2015). Por outro lado, MUENST et al. (2014) analisaram 650 amostras de câncer de mama e identificaram que PD-L1 se associou com pior sobrevida global à análise multivariada. O motivo para as diferentes conclusões dos estudos não está claro. Na presente pesquisa, o baixo número de pacientes com tumores PD-L1 positivos impediu a realização de análises robustas do valor prognóstico do marcador.

Este estudo pôde confirmar a baixa expressão de PD-L1 em tumores de mama não selecionados, e sugere que tumores localmente avançados, incluindo carcinomas inflamatórios de mama, podem não ser bons candidatos à terapia com agentes anti-PD-1/anti-PD-L1. Correlações do marcador com as características basais e com desfechos clínicos foram prejudicadas devido ao baixo número de pacientes com expressão da proteína.

5.3 LIMITAÇÕES E CONTRIBUIÇÕES DA PESQUISA

Um total de 37% dos casos identificados não teve material encaminhado para a confecção do TMA, principalmente devido à não-localização dos blocos. Além disso, uma fração significativa do material biológico que fez parte do TMA mostrou-se inadequada para leitura, normalmente por insuficiência de tecido, apesar da confecção em duplicata. Ao fim, foram obtidos dados histológicos em 27% a 49% das peças que se buscaram coletar, a depender do marcador. É uma perda importante, que reduziu o poder estatístico do estudo.

Outras limitações deste estudo devem ser citadas. A inclusão de 24 pacientes com tumores triplo-negativos ao grupo controle o alterou de forma artificial, o que pode ter interferido na comparação com o grupo CIM. Há também limitações inerentes à natureza retrospectiva do estudo. Os tratamentos foram heterogêneos entre si, e as informações disponibilizadas não foram completas.

Ademais, o fato de os dados terem sido coletados em uma única instituição pode trazer um viés à pesquisa, apesar de o Hospital Haroldo Juaçaba ser um centro oncológico de referência regional, com grande volume de atendimento na área de mastologia.

O longo intervalo de tempo ao longo do qual os pacientes foram tratados permitiu uma análise madura dos dados de sobrevida e ampliou o número de casos identificados, mas trouxe prejuízo à conservação do material biológico e viu uma mudança no padrão de tratamento sistêmico,

com a uniformização do uso de taxanos e a incorporação de trastuzumabe à terapia neoadjuvante. Além disso, algumas análises de subgrupo, como por subtipo intrínseco de câncer de mama, não tiveram tamanho de amostra suficiente para análises robustas. Por fim, observou-se uma falta de uniformidade nos métodos de avaliação e nos resultados entre estudos que exploram a expressão imuno-histoquímica de quimiocinas e receptores.

Por outro lado, há contribuições da presente pesquisa que podem ser destacadas. Ela provê informações sobre o padrão de apresentação, tratamento e desfechos do carcinoma inflamatório de mama na cidade de Fortaleza, e mostra que os dados são similares aos reportados em diferentes centros internacionais. Os resultados reafirmam a agressividade do tumor inflamatório de mama, mas indicam que sobrevidas longas podem ser observadas. Explora diversas associações entre quimiocinas e características clínico-patológicas e desfechos dos pacientes, destacando, por exemplo, a aparente importância de CXCR4 na patogênese do CIM.

6 CONCLUSÕES

- a. Pacientes com CIM têm maior incidência de características clínicas de alto risco e distinto perfil de distribuição por subtipo intrínseco, além de pior sobrevida global e sobrevida livre de doença, em comparação com CANI.
- b. Fenótipo inflamatório, maior acometimento linfonodal e ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante são preditores independentes de menor sobrevida global na população estudada.
- c. CXCR4 está associada com resistência à quimioterapia, metástases à distância e pior sobrevida. CCR7 é mais expresso em tumores hormônio-sensíveis e sem resposta à quimioterapia e tem associação com CXCR1 e p-mTOR, o que sugere que o receptor está envolvido na ativação da via PI3K/AKT/mTOR. CXCR1 e FOXP3 também se correlacionaram com menor resposta à quimioterapia neoadjuvante.
- d. CXCR4 parece contribuir para a patogênese do CIM e pode ser um alvo terapêutico a ser explorado no tratamento da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abcam. **Anti-CXCR4 antibody ab2074** [datasheet]. 2017a. Available from: <URL:www.abcam.com/cxcr4-antibody-ab2074.html> [2017 Fev 01].

Abcam. **Anti-CXCR1 antibody ab124344** [datasheet]. 2017b. Available from: <URL:www.abcam.com/cxcr1-antibody-ab124344.html> [2017 Mar 01].

Abcam. **Anti-CCR7 antibody ab191575** [datasheet]. 2017c. Available from: <URL:www.abcam.com/ccr7-antibody-ab191575.html> [2017 Mar 01].

Abcam. **Anti-SDF1 antibody (ab9797)** [datasheet]. 2017d. Available from: <URL:www.abcam.com/sdf1-antibody-ab9797.html> [2017 Mar 01].

Abrous-Anane S, Savignoni A, Daveau C, et al. Management of inflammatory breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 79:1055-63.

Ali HR, Glont SE, Blows FM, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. **Ann Oncol** 2015; 26:1488-93.

Ali S, Lazennec G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 2007; 26:401-20.

Alpaugh ML, Tomlinson JS, Shao ZM, Barsky SH. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. **Cancer Res** 1999; 59:5079-84.

Anderson WF, Schairer C, Chen BE, Hance KW, Levine PH. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). **Breast Dis** 2005-2006; 22:9-23.

Andre F, Xia W, Conforti R, Wei Y, Boulet T, Tomasic G et al. CXCR4 expression in early breast cancer and risk of distant recurrence. **Oncologist** 2009; 14:1182-8.

Arias-Pulido H, Chaheer N, Gong Y, Qualls C, Vargas J, Royce M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. **BMC Cancer** 2012; 12:298.

Aruga T, Suzuki E, Saji S, et al. A low number of tumor-infiltrating FOXP3-positive cells during primary systemic chemotherapy correlates with favorable anti-tumor response in patients with breast cancer. **Oncol Rep** 2009; 22:273-8.

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, et al. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. **Br J Surg** 2016; 103:845-54.

Baselga J, Semiglazov V, Manikhas GM, et al. Efficacy of neoadjuvant trastuzumab in patients with inflammatory breast cancer: data from the NOAH (NeOAdjuvant Herceptin) Phase III trial [abstract]. **Eur J Cancer** 2007; 5:193. [Presented at The European Cancer Conference; 2007 Sept 23-27; Barcelona (Espanha)]

Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:520-9.

Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **J Clin Oncol** 2006; 24:5373-80.

Bear HD, Tang G, Rastogi P, et al. Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:310-20.

Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. **Histopathology** 2016; 69:25-34.

Bellocq A, Antoine M, Flahault A, et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. **Am J Pathol** 1998; 152:83-92.

Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, et al. Increased serum interleukin-8 patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7157-62.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. **Cancer Res** 2004a; 64:8558-65.

Bertucci F, Tarpin C, Charafe-Jauffret E, et al. Multivariate analysis of survival in inflammatory breast cancer: impact of intensity of chemotherapy in multimodality treatment. **Bone Marrow Transplant** 2004b; 33:913-20.

Bertucci F, Finetti P, Vermeulen P, et al. Genomic profiling of inflammatory breast cancer: a review. **Breast** 2014; 23:538-45.

Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. **Oncotarget** 2015; 6:13506-19.

Bertucci F, Fekih M, Autret A, et al. Bevacizumab plus neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-negative inflammatory breast cancer (BEVERLY-1): a multicentre, single-arm, phase 2 study. **Lancet Oncol** 2016; 17:600-11.

Bestebroer J, De Haas CJ, Van Strijp JA. How microorganisms avoid phagocyte attraction. **FEMS Microbiol Rev** 2010; 34:395-414.

Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6789-95.

Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. **Mod Pathol** 2008; 21:1527-32.

Bonnier P, Charpin C, Lejeune C, et al. Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? **Int J Cancer** 1995; 62:382-5.

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

Boussen H, Cristofanilli M, Zaks T, DeSilvio M, Salazar V, Spector N. Phase II study to evaluate the efficacy and safety of neoadjuvant lapatinib plus paclitaxel in patients with inflammatory breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:3248-55.

Brana I, Calles A, LoRusso PM, et al. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. **Target Oncol** 2015; 10:111-23.

Brandolini L, Cristiano L, Fidoamore A, et al. Targeting CXCR1 on breast cancer stem cells: signaling pathways and clinical application modelling. **Oncotarget** 2015; 6:43375-94.

Bristol IJ, Woodward WA, Strom EA, et al. Locoregional treatment outcomes after multimodality management of inflammatory breast cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2008; 72:474-84.

Burstein HJ, Harris LN, Gelman R, et al. Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: a pilot study. **J Clin Oncol** 2003; 21:46-53.

Burstein HJ, Krilov L, Aragon-Ching JB, et al. Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol** 2017 Feb 1. [Epub ahead of print]

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.

Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:3676-85.

Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5686-93.

Cabioglu N, Gong Y, Islam R, et al. Expression of growth factor and chemokine receptors: new insights in the biology of inflammatory breast cancer. **Ann Oncol** 2007; 18:1021-9.

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.

Cameron D, Brown J, Dent R, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:933-42.

Cao Y, Liu H, Zhang H, et al. CXC chemokine receptor 1 predicts postoperative prognosis and chemotherapeutic benefits for TNM II and III resectable gastric cancer patients. **Oncotarget** 2016 Oct 21. [Epub ahead of print]

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.

Chang S, Parker SL, Pham T, Buzdar AU, Hursting SD. Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975-1992. **Cancer** 1998; 82:2366-72.

Charpin C, Bonnier P, Khouzami A, et al. Inflammatory breast carcinoma: an immunohistochemical study using monoclonal anti-pHER-2/neu, pS2, cathepsin, ER and PR. **Anticancer Res** 1992; 12:591-7.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:736-50.

Chen TH, Zhang YC, Tan YT, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict prognosis of breast cancer patients treated with anti-Her-2 therapy. **Oncotarget** 2017; 8:5219-32.

Colpaert CG, Vermeulen PB, Benoy I, et al. Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. **Br J Cancer** 2003; 88:718-25.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** 2006; 124:263-6.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet** 2014; 384:164-72.

Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo AM, Buzdar AU, et al. Paclitaxel improves the prognosis in estrogen receptor negative inflammatory breast cancer: The MD Anderson Cancer Center experience. **Clin Breast Cancer** 2004; 4:415-9.

Cristofanilli M, Boussen H, Baselga J, Spector N. A phase II combination study of lapatinib and paclitaxel as a neo-adjuvant therapy in patients with inflammatory breast cancer (IBC). **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100:55.

Cristofanilli M, Valero V, Buzdar AU, et al. Inflammatory breast cancer (IBC) and patterns of recurrence. **Cancer** 2007; 110:1436-44.

Cristofanilli M. Inflammatory breast cancer: a new approach. **Lancet Oncol** 2016; 17:544-6.

Costa SD, Loibl S, Kaufmann M et al. Neoadjuvant chemotherapy shows similar response in patients with inflammatory or locally advanced breast cancer when compared with operable breast cancer: a secondary analysis of the GeparTrio trial data. **J Clin Oncol** 2010; 28:83-91.

Dawood S, Merajver SD, Viens P, et al. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. **Ann Oncol** 2011a; 22:515-23.

Dawood S, Ueno NT, Valero V, et al. Differences in survival among women with stage III inflammatory and noninflammatory locally advanced breast cancer appear early: a large population-based study. **Cancer** 2011b; 117:1819-26.

Dawood S, Cristofanilli M. IBC as a rapidly spreading systemic disease: clinical and targeted approaches using the neoadjuvant model. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2015; 2015:56-9.

de Laurentiis M, Cancellò G, D'Agostino D, et al. Taxane based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. **J Clin Oncol** 2008; 26:44-53.

deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. **Clin Cancer Res** 2012; 18:3022-9.

deNardo DG, Barreto JB, Andreu P, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell** 2009; 16:91-102.

Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. **J Clin Oncol** 2015; 33:983-91.

de Santis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics 2011. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:409-18.

Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. **Biomed Pharmacother** 2006; 60:273-276.

Ding Y, Shimada Y, Maeda M, et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2003; 9:3406-12.

Du P, Liu Y, Ren H, Zhao J, Zhang X, Patel R. Expression of chemokine receptor CCR7 is a negative prognostic factor for patients with gastric cancer: a meta-analysis. **Gastric Cancer** 2017; 20:235-45.

Earl HM, Hiller L, Dunn JA, et al. Efficacy of neoadjuvant bevacizumab added to docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, for women with HER2-negative early breast cancer (ARTEMIS): an open-label, randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16: 656-66.

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

Ellis GK, Barlow WE, Gralow JR, et al. Phase III comparison of standard doxorubicin and cyclophosphamide versus weekly doxorubicin and daily oral cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor as neoadjuvant therapy for inflammatory and locally advanced breast cancer: SWOG 0012. **J Clin Oncol** 2011; 29:1014-21.

Förster R, Worbs T, Werth K. A 4-midable Connection: CCR7 Tetramers Link GPCR to Src Kinase Signaling. **Immunity** 2016; 44:9-11.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:1938-48.

Frasci G, D'Aiuto G, Comella P, et al. Weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel with granulocyte colony-stimulating factor support versus triweekly epirubicin and paclitaxel in locally advanced breast cancer: final analysis of a SICOG phase III study. **Br J Cancer** 2006; 95:1005-12.

Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. **Int J Cancer** 2007; 121:751-8.

Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. **Lancet** 2010; 375:377-84.

Gil M, Seshadri M, Komorowski MP, Abrams SI, Kozbor D. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013; 110:E1291-300.

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.

Gonçalves A, Pierga JY, Ferrero JM, et al. UNICANCER-PEGASE 07 study: a randomized phase III trial evaluating postoperative docetaxel-5FU regimen after neoadjuvant dose-intense chemotherapy for treatment of inflammatory breast cancer. **Ann Oncol** 2015; 26:1692-7.

Gong Y, Gonzalez-Angulo A, Broglio K, et al. Expression of Notch-1 and B-catenin: defining the molecular portrait of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100:S299.

Gonzalez-Angulo AM, Hennesy BT, Broglio K, et al. Trends for inflammatory breast cancer: is survival improving? **Oncologist** 2007; 12:904-12.

Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. **Br J Cancer** 2011; 105:93-103.

Günther K, Leier J, Henning G, et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. **Int J Cancer** 2005; 116:726-33.

Guo J, Lou W, Ji Y, Zhang S. Effect of CCR7, CXCR4 and VEGF-C on the lymph node metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncol Lett** 2013; 5:1572-78.

Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. **Mol Endocrinol** 2003; 17:792-803.

Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:966-75.

Hassan S, Ferrario C, Saragovi U, et al. The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer. **Am J Pathol** 2009; 175:66-73.

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.

Helbig G, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, et al. NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. **J Biol Chem** 2003; 278:21631-8.

Hennesy BT, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, et al. Disease-free and overall survival after pathologic complete disease remission of cytologically proven inflammatory breast carcinoma axillary lymph node metastases after primary systemic chemotherapy. **Cancer** 2006; 106:1000-6.

Hurley J, Doliny P, Reis I, et al. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:1831-8.

Jhaveri K, Teplinsky E, Silvera D, et al. Hyperactivated mTOR and JAK2/STAT3 pathways: molecular drivers and potential therapeutic targets of inflammatory and invasive ductal breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. **Clin Breast Cancer** 2016; 16:113-22.e1.

Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108:12425-30.

Johnston S, Trudeau M, Kaufman B, et al. Phase II study of predictive biomarker profiles for response targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in advanced inflammatory breast cancer with lapatinib monotherapy. **J Clin Oncol** 2008; 26:1066-72.

Kaewkangsadan V, Verma C, Eremin JM, Cowley G, Ilyas M, Eremin O. Crucial contributions by T lymphocytes (effector, regulatory, and checkpoint inhibitor) and cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a pathological complete response induced by neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. **J Immunol Res** 2016; 2016:4757405.

Kang H, Watkins G, Parr C, et al. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R402-10.

Khan MN, Wang B, Wei J, et al. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8(3-72)K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis. **Oncotarget** 2015; 6:21315-27.

Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. **Breast Cancer Res** 2000; 2:423-9.

Kobayashi T, Tsuda H, Moriya T, et al. Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 123:733-45.

Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2413-20.

Ladoire S, Arnould L, Mignot G, et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:65-72.

Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. **Cancer Gene Ther** 2005; 12:84-9.

Lefort S, Thuleau A, Kieffer Y, et al. CXCR4 inhibitors could benefit to HER2 but not to triple-negative breast cancer patients. **Oncogene** 2017; 36(9):1211-1222.

Lerebours F, Cizeron-Clairac G, Susini A, et al. miRNA expression profiling of inflammatory breast cancer identifies a 5-miRNA signature predictive of breast tumor aggressiveness. **Int J Cancer** 2013; 133:1614e23.

Li YM, Pan Y, Wei Y, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. **Cancer Cell** 2004; 6:459-69.

Liu FY, Zhao ZJ, Li P, Ding X, Zong ZH, Sun CF. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the survival of cells mediated by chemokine receptor 7 through PI3K/Akt in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2010; 48:291-6.

Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favourable prognostic indicator in basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R48.

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. **Blood** 2003, 102:2728-30.

Limentani SA, Brufsky AM, Erban JK, Jahanzeb M, Lewis D. Phase II study of neoadjuvant docetaxel, vinorelbine, and trastuzumab followed by surgery and adjuvant doxorubicin plus cyclophosphamide in women with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:1232-8.

Lin NU, Winer EP. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. **J Clin Oncol** 2008; 26:798-805.

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

Low JA, Berman AW, Steinberg SM, Danforth DN, Lippman ME, Swain SM. Long-term follow-up for locally advanced and inflammatory breast cancer patients treated with multimodality therapy. **J Clin Oncol** 2004; 22:4067-74.

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

Maeda N, Yoshimura K, Yamamoto S, et al. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. **Ann Surg Oncol** 2014; 21(Suppl 4):546-54.

Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3(+) infiltrating cells in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 127:99-108.

Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. **Cytokine Growth Factor Rev** 2010; 21:27-39.

Masuda H, Brewer TM, Liu DD, et al. Long-term treatment efficacy in primary inflammatory breast cancer by hormonal receptor- and HER2-defined subtypes. **Ann Oncol** 2014; 25:384-91

Matro JM, Li T, Cristofanilli M, et al. Inflammatory Breast Cancer Management in the National Comprehensive Cancer Network: the disease, recurrence pattern, and outcome. **Clin Breast Cancer** 2015; 15:1-7.

McCarthy NJ, Yang X, Linnoila IR, et al. Microvessel density, expression of estrogen receptor alpha, MIB-1, p53, and c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3857-62.

Merajver SD, Hayes DF, Vora SR. **Inflammatory breast cancer: pathology and molecular pathogenesis**. Atualizado pela última vez: Fev 7, 2017. Disponível em <URL: <https://www.uptodate.com/contents/inflammatory-breast-cancer-pathology-and-molecular-pathogenesis>> [2017 Fev 9]

Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:2666-76.

Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL. Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. **Anticancer Res** 1998; 18:77-81.

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

Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, et al. CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. **Eur J Cancer** 2009; 45:2579-87.

Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, et al. Tumour-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 148:525-34.

Moslehi R, Freedman E, Zeinomar N, Veneroso C, Levine PH. Importance of hereditary and selected environmental risk factors in the etiology of inflammatory breast cancer: a case-comparison study. **BMC Cancer** 2016; 16:334.

Muenst S, Schaerli AR, Gao F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 146:15-24.

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

Nahleh ZA, Barlow WE, Hayes DF, et al. SWOG S0800 (NCI CDR0000636131): addition of bevacizumab to neoadjuvant nab-paclitaxel with dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide improves pathologic complete response (pCR) rates in inflammatory or locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 158:485-95.

Nanda R, Chow LQ, Dees EC, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase Ib KEYNOTE-012 study. **J Clin Oncol** 2016; 34:2460-7.

Nair S, Aldrich AJ, McDonnell E, et al. Immunologic targeting of FOXP3 in inflammatory breast cancer cells. **PLoS One** 2013; 8:e53150.

[NCCN]. National Comprehensive Cancer Network. **NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer version 2.2016**. Available from: <URL:https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf> [2016 dez 11].

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J** 1999; 13:9-22.

Oda N, Shimazu K, Naoi Y, et al. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 136:107-16.

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

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell** 2005; 121:335-48.

Palangie T, Mosseri V, Mihura J, et al. Prognostic factors in inflammatory breast cancer and therapeutic implications. **Eur J Cancer** 1994; 30A:921-7.

Palangie T, Viens P, Roche H, et al. Dose-intensified chemotherapy and additional Docetaxel may improve inflammatory breast cancer patients outcome over two decades: Results from Institut Curie protocols 1977-1987 and two consecutive French multicenter trials Pegase 02 (1995-96) and Pegase 05 (1997-99) [abstract]. **J Clin Oncol** 2004; 22(14 suppl):848. [Presented at 2004 ASCO Annual Meeting; 2004 Jul 15; Nova Orleans, EUA].

Pan H, Gray RG, Davies C, et al. Predictors of recurrence during years 5-14 in 46,138 women with ER+ breast cancer allocated 5 years only of endocrine therapy (ET) [abstract]. **J Clin Oncol** 2016; 34 (suppl):A505. [Presented at 2016 ASCO Annual Meeting; 2016 Jun 02; Chicago, EUA].

Parton M, Dowsett M, Ashley S, Hills M, Lowe F, Smith IE. High incidence of HER-2 positivity in inflammatory breast cancer. **Breast** 2004; 13:97-103.

Pierga JY, Petit T, Delozier T, et al. Neoadjuvant bevacizumab, trastuzumab, and chemotherapy for primary inflammatory HER2-positive breast cancer (BEVERLY-2): an open-label, single-arm phase 2 study. **Lancet Oncol** 2012; 13:375-84.

Robertson FM, Bondy M, Yang W, et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:351-75.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1673-84.

Salama P, Phillips M, Grien F, et al. Tumour-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:186-92.

Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. **Breast Cancer Res Treat** 2006, 97:275-83.

Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2014; 20:2773-82.

Schlichting JA, Soliman AS, Schairer C, Schottenfeld D, Merajver SD. Inflammatory and non-inflammatory breast cancer survival by socioeconomic position in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database, 1990-2008. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 134:1257-68.

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.

Shan S, Lv Q, Zhao Y, et al. Wnt/ β -catenin pathway is required for epithelial to mesenchymal transition in CXCL12 over expressed breast cancer cells. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:12357-67.

Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer** 2016; 16:687.

Shree T, Olson OC, Elie BT, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. **Genes Dev** 2011; 25:2465-79.

Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). **J Clin Oncol** 2015; 33:13-21.

Singh B, Cook KR, Martin C, et al. Evaluation of a CXCR4 antagonist in a xenograft mouse model of inflammatory breast cancer. **Clin Exp Metastasis** 2010; 27:233-40.

Singh JK, Simões BM, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. **Breast Cancer Res** 2013a; 15:210.

Singh JK, Farnie G, Bundred NJ, et al. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. **Clin Cancer Res** 2013b; 19:643-56.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N Engl J Med** 2001; 344:783-92.

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:8604-12.

Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. **BMC Cancer** 2010; 10:283.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Su YC, Wu MT, Huang CJ, Hou MF, Yang SF, Chai CY. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. **Breast** 2006; 15:533-9.

Sun S, Fei X, Mao Y, et al. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. **Cancer Immunol Immunother** 2014; 63:395-406.

Sun WY, Lee YK, Koo JS. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. **J Transl Med** 2016; 14:173.

Taghian A, El-Ghamry MN, Merajver SD. **Inflammatory breast cancer: Clinical features and treatment**. Atualizado pela última vez: Jan 16, 2017. Disponível em: <URL:<https://www.uptodate.com/contents/inflammatory-breast-cancer-clinical-features-and-treatment>> [2017 jan 30].

Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. **Int J Cancer** 2003; 105:186-9.

Takenaka M, Seki N, Toh U, et al. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. **Mol Clin Oncol** 2013; 1:625-32.

Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Lett** 2013; 332:3-10.

Taube JM, Klein AP, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5064-74.

Therasse P, Mauriac L, Welnicka-Jaskiewicz M, et al. Final results of a randomized phase III trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with a dose-intensified epirubicin and cyclophosphamide + filgrastim as neoadjuvant treatment in locally advanced breast cancer: An EORTC-NCIC-SAKK multicenter study. **J Clin Oncol** 2003; 21:843-50.

Tomlinson JS, Alpaugh ML, Barsky SH. An intact overexpressed E-cadherin/alpha, beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:5231-41.

Ueno NT, Buzdar AU, Singletary SE, et al. Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M.D. Anderson Cancer Center. **Cancer Chemother Pharmacol** 1997; 40:321-9.

Untch M, Rezai M, Loibl S, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. **J Clin Oncol** 2010; 28:2024-31.

Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. PREPARE trial: a randomized phase III trial comparing preoperative, dose-dense, dose-intensified chemotherapy with epirubicin, paclitaxel and CMF versus a standard-dosed epirubicin/cyclophosphamide followed by paclitaxel $\pm$ darbepoetin alfa in primary breast cancer - results at the time of surgery. **Ann Oncol** 2011a; 22:1988-98.

Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. **J Clin Oncol** 2011b; 29:3351-7.

Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, et al. Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7965-71.

Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, et al. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7637-42.

Van der Auwera I, Yu W, Suo L, et al. Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. **PLoS One** 2010a; 5:e12616.

Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype. **Br J Cancer** 2010b; 103:532e41.

Van Laere S, Van der Auwera I, Van den Eynden G, et al. Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 93:237-46.

Van Laere SJ, Ueno NT, Finetti P, et al. Uncovering the molecular secrets of inflammatory breast cancer biology: an integrated analysis of three distinct affymetrix gene expression datasets. **Clin Cancer Res** 2013; 19: 4685-96.

Van Pelt AE, Mohsin S, Elledge RM, et al. Neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in breast cancer: preliminary results. **Clin Breast Cancer** 2003; 4:348-53.

Van Uden DJ, van Laarhoven HW, Westenberg AH, de Wilt JH, Blanken-Peeters CF. Inflammatory breast cancer: an overview. **Crit Rev Oncol Hematol** 2015; 93:116-26

Verma C, Eremin JM, Robins A, et al. Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: monocytic, granulocytic) and polarised T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and surgery: failure of abolition of abnormal treg profile with treatment and correlation of treg levels with pathological response to NAC. **J Transl Med** 2013; 11:16.

Viens P, Palangie T, Janvier M, et al. First-line high-dose sequential chemotherapy with rG-CSF and repeated blood stem cell transplantation in untreated inflammatory breast cancer: toxicity and response (PEGASE 02 trial). **Br J Cancer** 1999; 81:449-56.

Viens P, Tarpin C, Roche H, Bertucci F. Systemic therapy of inflammatory breast cancer from high-dose chemotherapy to targeted therapies: the French experience. **Cancer** 2010; 116(11 Suppl):2829-36.

von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, et al.; German Breast Group. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. **J Natl Cancer Inst** 2008;100:552-62.

von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:299-309.

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:747-56.

Walsh S, Flanagan L, Quinn C, et al. mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors. **Breast** 2012; 21:178-82.

Wang J, Zhang X, Thomas SM, et al. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. **Oncogene** 2005; 24:5897-904.

Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6735-41.

Wedam SB, Low JA, Yang SX, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:769-77.

Wendel C, Hemping-Bovenkerk A, Krasnyanska J, et al. CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model. **PLoS One** 2012; 7:e30046.

Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. **Oncogene** 2008; 27:1461-71.

West NR, Kost SE, Martin SD, et al. Tumour infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. **Br J Cancer** 2013; 108:155-62.

Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1638-43.

Wimberly H, Brown JR, Schalper K, et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2015; 3:326-32.

Wingo PA, Jamison PM, Young JL, Gargiullo P. Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States). **Cancer Causes Control** 2004; 15:321-8.

Woodward WA. Inflammatory breast cancer: unique biological and therapeutic considerations. **Lancet Oncol** 2015; 16:e568-76.

Wurth R, Tarn K, Jernigan D, et al. A preclinical model of inflammatory breast cancer to study the involvement of CXCR4 and ACKR3 in the metastatic process. **Transl Oncol** 2015; 8:358-67.

Xu TP, Shen H, Liu LX, Shu YQ. The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol** 2013; 37:725-731.

Xu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. **Drug Des Devel Ther** 2015; 9:4953-64

Yamauchi H, Woodward WA, Valero V, et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. **Oncologist** 2012; 17:891-9.

Yan M, Jene N, Byrne D, et al. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R47.

Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Kodama R, Sanke T. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. **BMC Cancer** 2008; 8:340.

Yoon HH, Orrock JM, Foster NR, Sargent DJ, Smyrk TC, Sinicrope F. Prognostic impact of FoxP3+ regulatory t-cells in relation to CD8+ T lymphocyte density in human colon carcinomas. **PLoS One** 2012; 7:e42274.

Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clin Transl Oncol** 2016; 18:497-506.

Zell JA, Tsang WY, Taylor TH, Mehta RS, Anton-Culver H. Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. **Breast Cancer Res** 2009; 11:R9.

Zhang M, Liu HX, Teng XD, Wang HB, Cui J, Jia SS. The differences in CXCR4 protein expression are significant for the five molecular subtypes of breast cancer. **Ultrastruct Pathol** 2012; 36:381-6.

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.

Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Y 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.

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. **Nat Med** 2001; 7:1339-46.

Anexo 1 - Estadiamento clínico do câncer de mama

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).

Anexo 2 - Agrupamento por estádios no câncer de mama.

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).

Anexo 3 - Ficha clínica

Ficha número: _____ Prontuário: _____ Data de preenchimento: ____/____/____

Nome: _____

Idade ao diagnóstico: ____ anos Data de Nascimento: ____/____/____

Estadiamento clínico (avaliação inicial) T____N____M____

Número da biópsia: _____ Data da biópsia: ____/____/____

Grau histológico: _____ Invasão vascular: _____

Expressão imunoistoquímica: RE: _____ RP: _____ Ki67: _____ HER2: _____

Se HER 2 2+, status FISH: _____

Fez QT neoadjuvante? (0) Não (1) Sim

Qual? (1) AC-Taxol semanal (2) AC-Docetaxel (3) AC-Taxol a cada 3 sem (4) Outra
(9) Não se aplica

Qual a resposta à QT neoadjuvante? (0) PD (1) DE (2) RP (3) RCp (9) NA

Houve recidiva da doença? (0) Não (1) Sim

Se sim, qual a data? ____/____/____

Houve disseminação para algum órgão? (É possível assinalar várias sítios)

(1) Osso (2) Fígado (3) Pulmão (4) Pleura (5) SNC (6) Recidiva local (7)
Linfonodos (9) Não se aplica

Houve óbito? (0) Não (1) Sim

Se sim, qual a data? ____/____/____

Se o paciente está vivo, qual a data da última visita médica? ____/____/____

Anexo 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Hospital Haroldo Juaçaba aprova e exige a prática de proteção e correta informação dos pacientes que participam de estudos clínicos. As informações a seguir são fornecidas para que você decida se deseja ou não participar deste estudo clínico. Você pode se recusar a assinar este documento, e desta maneira não participar deste estudo. Você deve saber que, mesmo que decida participar, está livre para se retirar do estudo em qualquer momento. Caso não participe do estudo, sua relação com a instituição não sofrerá qualquer interferência, assim como os serviços e assistência médica que são prestados a você.

O objetivo deste estudo é avaliar se existe alguma relação entre a expressão de quimiocinas, que são características moleculares do tumor de cada indivíduo, com a resposta ao tratamento e os resultados clínicos a longo prazo. Acreditamos que, caso exista uma relação entre a presença aumentada do marcador do tumor e o benefício do tratamento, conseguiremos dar o melhor tratamento aos nossos pacientes de forma individualizada.

Caso você já tenha realizado uma biópsia do tumor, não será submetida a nenhum tipo de procedimento nem será necessário colher nenhum novo exame caso concorde em participar do estudo. Apenas avaliaremos, e somente após sua autorização, o material da biópsia já coletado previamente e os dados do seu prontuário. O estudo não lhe trará nenhum benefício direto, porém poderá ajudar pacientes futuros.

Caso sua biópsia ainda não tenha sido realizada, o procedimento será efetuado da forma convencional, sem necessidade de nenhuma intervenção experimental. Serão removidas amostras de tecido do tumor e uma pequena amostra da pele acometida, respeitando-se rigorosamente todos os cuidados de segurança e anestesia.

Não haverá retenção de amostras para pesquisas futuras. Ao término do estudo, o material será descartado, pois as amostras são de sua

propriedade e você tem o direito de ser informado sobre o o destino do material.

A participação neste estudo não lhe traz qualquer custo, assim como não haverá nenhum tipo de pagamento. Por outro lado, você e seu acompanhante tem o direito de receber ressarcimento por eventuais despesas associadas à pesquisa, tais como custos de transporte, se necessário.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os dados de outros pacientes, e nenhuma identificação de paciente será divulgada. Seus dados médicos serão obtidos a partir da análise do seu prontuário. Seu nome não será relacionado às informações coletadas ou aos resultados obtidos com o estudo. Os pesquisadores identificarão você através de um número exclusivo do estudo, ao invés do seu nome.

Você pode retirar o consentimento de participação no estudo a qualquer momento, sem causar comprometimento ao seu atendimento médico. Você pode inclusive impedir que os pesquisadores divulguem qualquer informação coletadas a seu respeito. Caso isso ocorra, os médicos irão parar de coletar seus dados, mas poderão publicar as informações não-pessoais coletadas antes do seu cancelamento.

É recomendável afirmar que qualquer pesquisa envolvendo seres humanos envolve riscos, ainda que mínimos, como o de perda de material ou de vazamento de informação. Todos os cuidados serão tomados para proteger sua integridade como indivíduo, assim como o dos seus dados médicos. É permitido ao participante o direito de solicitar indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Este documento será elaborado em duas vias, umas das quais ficará retida com o pesquisador responsável, e a outra será entregue a você no ato da assinatura. Solicita-se que cada página do documento seja rubricada, e que a última página seja devidamente assinada.

Este termo de consentimento foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará. Trata-se do órgão responsável por avaliar que todos os procedimentos propostos neste estudo

atendem às exigências éticas das boas práticas em pesquisa clínica. O Comitê de Ética em Pesquisa fica situado no 6º andar do Anexo I do Hospital Haroldo Juaçaba, à Rua Papi Junior, 1222, Rodolfo Teófilo, e pode ser contactado pelo número (85) 3268.4653.

Através da minha assinatura, eu concordo livremente em participar deste estudo.

Nome do Participante ou Representante Legal

Data

Assinatura do Participante ou Representante Legal

Assinatura da Testemunha (em casos de analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

_____/_____/_____
Nome do Investigador Data

Assinatura do Investigador

Anexo 5 - Escala de *Performance Status* (ECOG)

ECOG	Características
0	Completamente ativo; capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição
1	Restrição a atividades físicas rigorosas; é capaz de trabalhos leves e de natureza sedentária
2	Capaz de realizar todos os cuidados pessoais, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho; em pé aproximadamente 50% das horas em que o paciente está acordado
3	Capaz de realizar somente cuidados pessoais limitados; confinado ao leito ou cadeira mais de 50% das horas em que o paciente está acordado
4	Completamente incapaz de realizar cuidados pessoais básicos; totalmente confinado ao leito ou à cadeira