

# **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD44, SOX2, E STAT3 NO CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO E METASTÁTICO**

**DENISE SOBRAL VIANA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio  
Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de  
Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração em Oncologia**

**Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade**

**Coorientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres**

**São Paulo**

**2020**



## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\***

V616 Viana, Denise Sobral  
**Avaliação da expressão de CD44, SOX2 e STAT3 no câncer de mama localmente avançado e metastático** / Denise Sobral Viana - São Paulo; 2020.  
59p.  
Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.  
Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Fatores de transcrição/Transcription Factors. 2. Neoplasia da Mama/Breast Neoplasms. 3. Citometria de Fluxo/Flow Cytometry. 4. Linfócitos T/T Lymphocytes. 5. receptor CD44/CD44 receptor

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.



*Esperança, acreditar e vencer*



## DEDICATÓRIA

*À minha família, em especial à **Marcus Vinícius**, meu esposo, meu amor e companheiro incansável que compreendeu e aceitou minhas ausências e nunca poupou esforços para me ajudar.*

*Ao meu amado **filho Marcus Aurélio** que cresceu junto com este projeto e foi uma energia motivante.*

*Aos meus pais, que sempre foram exemplos de dignidade e amor ao próximo, **Ivonildo e Marinez** que participaram da base da minha formação, do meu conhecimento e me tornaram o ser humano que sou hoje. Sei o quanto eles devem estar orgulhosos de mim onde quer que estejam.*

*Aos pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco, pelos ensinamentos diários de fé e perseverança para a realização*



## AGRADECIMENTOS

À DEUS ...

Ao **Dr. Vitor Piana de Andrade**, pela confiança depositada, dedicação, eficiência e ensinamentos na elaboração desta tese.

À **Dra. Leuridan Torres**, minha coorientadora, grande incentivadora, uma fonte de inspiração, ganhei também uma amiga, que possibilitou a minha aproximação com este grupo de doutores e mestres. Sempre presente em todos os momentos para a realização dos experimentos envolvidos nesta tese, o que fez aumentar ainda mais a minha admiração e minha eterna gratidão.

À **Superintendência Geral do Hospital de Câncer de Pernambuco**, na figura de Dr. Iran Costa, incentivador deste projeto e Dr. Hélio Fonseca atual Diretor e incentivador deste projeto. A **todos os funcionários e alunos do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP** pela simpatia e cordialidade em nos atender.

À **Superintendência de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco** em primeiro plano na pessoa de **Dr. José Peixoto**, meu professor de Mastologia, chefe do departamento na época da minha inclusão no grupo de doutoramento do A.C.Camargo Cancer Center, quem também me recebeu no HCP em 2007 e sou eternamente grata.

À **Dr Guilherme Costa** hoje responsável pela superintendência e na sequência dos trabalhos, a todos os integrantes do departamento, como Sônia de Ratis e Solange Alves, pela ajuda e acesso as informações que tornaram possível este trabalho.

Às **pacientes do HCP**, pela incansável luta contra o câncer e que nunca se negaram a ajudar nos projetos de pesquisa, vencendo todo tipo de dor e medo, somente para ajudar futuras gerações.

À biblioteca do A.C.Camargo e a bibliotecária do HCP na pessoa de **Edna Meireles** e de todos os funcionários, pela incansável busca pelos artigos mais difíceis, a qualquer hora ou dia da semana, de forma eficiente e sempre muito amigável.

Aos **meus colegas de turma de mestrado e doutorado** pelo incentivo desde do início e aos colegas do Departamento de Mastologia do HCP: **Dr. Carlos Eduardo Caiado Anunciação, Dra. Carolina de Souza Vasconcelos, Dra. Cinthya Roberta Santos de Jesus, Dra. Claudia Maria Silva Pereira, Dra. Daniele Cristina da Silva Moraes , Dra. Isabel Cristina Ribeiro**



**de Oliveira Lima, Dr. José Mário Gadelha Resende, Dr. Paulo Vicente de Oliveira Lima, Dr. Jose Peixoto, Dra. Nathália Volois Montarroyos de Moraes**, a todas as funcionárias, aos voluntários e as enfermeiras e técnicas de enfermagem pelos cuidados no atendimento especial com todos que estão envolvidos na realização desta tese.

Ao **Departamento de Serviço Social do HCP**, nas pessoas de Cláudia Beltrão, Luciana Caldas e a todos os integrantes, pela ajuda incomensurável na lida com os pacientes e com as rotinas do serviço.

Agradeço ao amigo e enfermeiro **Aluízio Marques da Silva Junior** que participou desde início da minha vida profissional, meu muito obrigada.

A minha amiga e radiologista que me acompanha e me ajuda sempre **Dra. Patricia Moura Cravo Teixeira**.

A minha professora de Patologia e amiga **Dra. Maria do Carmo Abreu e Lima** que está sempre me conduzindo por caminhos certos na minha profissão, meu muito obrigada.

Agradeço **ao apoio do Departamento de Psicologia, Nutrição, Fisioterapia e Enfermagem**, especialmente às enfermeiras e técnicas de enfermagem do bloco cirúrgico, do ambulatório de Mastologia e da enfermaria Santa Águeda do HCP.

A minha amiga e instrumentadora **Niedja R. V. Carvalho** que me auxilia em todas as cirurgias no HCP e contribui muita paz para mim e toda nossa equipe.

Ao Departamento de Oncologia em especial ao **Dr. Marcelo Ramos Tejo Salgado** que prontamente se dedicou e atendeu às pacientes deste trabalho.

Ao **Departamento de Patologia do HCP**, na pessoa de Dr. Sérgio Ricardo Soares Moura, chefe do departamento, pela eficiência e dedicação na avaliação dos espécimes patológicos, e a todos os integrantes, pelos cuidados com as rotinas do serviço.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares** pelos seus ensinamentos, incentivo e auxílio fundamental na elaboração dessa tese. Agradeço a ajuda, no levantamento dos prontuários, aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

Ao **Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros**, meu primeiro orientador de bolsa PIBIC na Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN em 1998, bem como a todos que fizeram parte do Departamento de Cirurgia Experimental, onde comecei a minha jornada científica.

Ao **Dr. Prof. Carlos Alberto Almeida de Araújo**, cirurgião torácico, obrigada pelos ensinamentos.

A **Dra. Christine Marques de Miranda** por tudo que aprendi da forma mais ética e toda minha



formação cirúrgica, minha inspiração e minha amiga, muito obrigada por 17 anos de incansáveis ensinamentos, minha eterna gratidão.

Agradeço também ao **Dr. Marcos Peres** pelos ensinamentos cirúrgicos na Residência de Cirurgia Geral no Hospital Agamenon Magalhães- HAM.

Ao **Dr. Antônio S. Figueira Filho**, *in memoriam* chefe do Departamento de Mastologia na época da Residência e a todos os colegas que me acolheram no Hospital Universitário Osvaldo Cruz HUOC, em especial ao **Dr. João Esberard de Vasconcelos Beltrão Neto**, que me ensinaram a arte da Mastologia.

A minha amiga, **Maria das Graças da Cruz** *in memoriam*, *vizinha* na infância e adolescência, que teve câncer de mama e foi o meu primeiro contato com esta patologia, ela me mostrou um caminho para seguir, uma guerreira lutando contra a metástase desta doença e fazer seus curativos foram muito importantes para mim, meu muito obrigada.

Aos amigos e companheiros de trabalho, todos do bloco cirúrgico e a todo o grupo de anestesistas do HCP em especial a minha anestesista e amiga **Dra. Simone Borges Diu Barros** sou eternamente grata por seu excelente trabalho, competência e companheirismo.

A **Sra. Suely Francisco**, bibliotecária-apoio ao aluno do A.C.Camargo Cancer Center, pelas sugestões, orientações e revisão desta tese.

A **Sra. Karla Cristina Brito de Barros, Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kunari** da pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pelo cuidado, organização e competência.



## RESUMO

Viana DS. **Avaliação da expressão de CD44, SOX2 e STAT3 e no câncer de mama localmente avançado e metastático.** [Doutorado] São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

**Introdução:** O câncer de mama (CM) está associado ao aumento contínuo na incidência, com altas taxas de mortalidade em vários países. Existem quatro imunofenotipos de CM, luminal A, Luminal B, triplo negativo e HER2+. Algumas proteínas que estão presentes nas células tumorais e no microambiente tumoral fazem parte do processo da tumorigênese e metástases. A molécula de CD44 é considerada um importante marcador de resposta inflamatória e está presente em todos os leucócitos e na superfície de células tronco tumorais, estando envolvido com invasão tumoral e metástase. Alguns autores demonstraram que o *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) e *sex determining region Y related group box 2* (SOX2) estão relacionados com a regulação da divisão celular de células somáticas e com a tumorigênese e a metástase no CM. **Objetivo:** Avaliar a expressão de CD44+, SOX2 e STAT3 no sangue de pacientes com câncer de mama localmente avançado e metastático. **Métodos:** É um estudo de coorte transversal realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) no período de março de 2017 a abril de 2018. Participaram deste estudo, 65 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de câncer de mama e idade entre 28 a 64 anos. Destas, 51 mulheres tinham tumor de mama em estágio III (localmente avançado) e 14 com doença metastática (estágio IV). Como grupo controle, foram 24 mulheres clinicamente saudáveis com idade entre 18 anos a 65 anos. As análises da expressão de CD44+, SOX2 e STAT3 foi realizada por citometria de fluxo. **Resultados:** foram observados níveis elevados de células CD44+, CD24<sup>neg</sup> e CD44+/CD24<sup>neg</sup> CD44+/CD24<sup>neg</sup>SOX2+ no sangue das pacientes com tumores de mama LB, HER2+ e Triplo negativos comparados aos controles (p<0,0001). Níveis baixos CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ no sangue das pacientes comparado aos controles. Foram observados níveis elevados de células CD44+/CD24<sup>neg</sup> e CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ no com CM localmente avançado comparado a CM metastático (p<0,05). As pacientes com CM





triplo negativo apresentaram níveis elevados de linfócitos TCD3+SOX2+ comparado aos grupos com subtipos LB e HER2+ ( $p < 0,05$ ). O grupo de pacientes CM HER2+ apresentou baixos níveis de TCD3+SOX2+ comparado aos controles e LA ( $p < 0,05$ ). Níveis elevados de linfócitos TCD3 totais  $p = 0,0007$  e baixos de TCD3+SOX2+  $p = 0,02$  no CM localmente avançado comparado a doença metastática. Níveis elevados de linfócitos TCD3+SOX2+ em pacientes linfonodos negativos quando comparado aos grupos N1 ( $p = 0,004$ ) e N2 ( $p < 0,0001$ ). Foram observados níveis elevados de células CD24<sup>neg</sup> e CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ e de linfócitos TCD3+, e baixos níveis de TCD3+STAT3+ no CMTM localmente avançado comparado ao metastático. **Conclusão:** Os níveis das moléculas CD44, CD24, SOX2+ e STAT3+ no sangue mostraram ser alterados nas pacientes com CM em estágios mais avançados independente do imunofenótipo.

**Descritores:** Fatores de transcrição. Câncer de mama. Citometria de Fluxo. Linfócitos T 5. receptor CD44



## SUMMARY

Viana DS. [Evaluation of the expression of CD44, SOX2 and STAT3 in locally advanced and metastatic breast cancer]. [Doutorado] São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

**Introduction:** Breast cancer (BC) is associated with a continuous increase in incidence, with high mortality rates in several countries. There are four immunophenotypes of BC, luminal A, Luminal B, triple negative (TNBC), and HER2+. Some proteins that are present in tumor cells, and the tumor microenvironment are part of the process of tumorigenesis and metastases. The CD44 molecule is considered an important marker of the inflammatory response. It is present in all leukocytes and on the surface of tumor stem cells, being involved with tumor invasion and metastasis. Some authors have demonstrated that the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and sex determining region Y related group box 2 (SOX2) are related to the regulation of somatic cell division and tumorigenesis and metastasis in BC. **Objective:** To evaluate the expression of CD44+, SOX2, and STAT3 in the blood of patients with locally advanced and metastatic breast cancer. **Methods:** A cross-sectional study was carried out at the Pernambuco Cancer Hospital (HCP) and at the Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) from March 2017 to April 2018. 65 female patients diagnosed with breast cancer participated in this study, aged between 28 and 64 years. Of these, 51 women had stage III (locally advanced) breast tumor, and 14 with metastatic disease (stage IV). As a control group, there were 24 clinically healthy women aged 18 to 65 years. The analysis of CD44+, SOX2, and STAT3 expression was performed by flow cytometry. **Results:** elevated levels of CD44+, CD24<sup>neg</sup> and CD44+/CD24<sup>neg</sup>, CD44+/CD24<sup>neg</sup> SOX2+ cells were observed in the blood of patients with LB, HER2+ and TNBC compared to controls ( $p < 0.0001$ ). Low CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ levels in patients' blood compared to controls. Elevated levels of CD44+/CD24<sup>neg</sup> and CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ cells were observed in locally advanced compared to metastatic BC ( $p < 0.05$ ). Patients with TNBC had elevated TCD3+SOX2+ lymphocytes compared to groups with subtypes LB and HER2+ ( $p < 0.05$ ). HER2+ patient had low levels of TCD3+ SOX2+



compared to controls and LA ( $p < 0.05$ ). High levels of total TCD3 ( $p = 0.0007$ ) and low levels of TCD3 + SOX2 + ( $p = 0.02$ ) in locally advanced BC compared to metastatic disease. Elevated levels of TCD3+SOX2+ in negative lymph node patients compared to groups N1 ( $p = 0.004$ ) and N2 ( $p < 0.0001$ ). High levels of CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ cells and TCD3+ were observed, and low levels of TCD3+ STAT3+ in locally advanced TNBC compared to metastatic. **Conclusion:** the levels of CD44, CD24, SOX2 +, and STAT3 + molecules in the blood were altered in breast cancer more advanced independent immunophenotype.

**Keywords:** Transcription Factors. Breast cancer. Flow Cytometry. T Lymphocytes. CD44 receptor



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa global da incidência de CM em mulheres.....	3
<b>Figura 2</b>	Mecanismos de ativação de células TCD4+ e TCD8+ .....	5
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática das vias de ativação do CD44 .....	10
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática da cascata de sinalização de STAT3 .....	12
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática das funções do fator de transcrição SOX2 no câncer .....	13
<b>Figura 6</b>	Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	22
<b>Figura 7</b>	Análise dos níveis de células CD44+, CD24neg, e de CD44+/CD24neg com expressão de SOX2 (CD44+/CD24neg / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24neg / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama e controles.....	29
<b>Figura 8</b>	Análise dos níveis de células CD44+, CD24neg, e de CD44+/CD24neg com expressão de SOX2 (CD44+/CD24neg / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24neg / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama localmente avançado e metastático .....	30
<b>Figura 9</b>	Análise dos níveis de células CD44+, CD24neg, e de CD44+/CD24neg com expressão de SOX2 (CD44+/CD24neg / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24neg / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama de acordo com o comprometimento linfonodal.....	31



<b>Figura 10</b>	Análise dos níveis de linfócitos T (CD3+) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama e controles.....	32
<b>Figura 11</b>	Análise dos níveis de linfócitos T (CD3+) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama localmente avançado e metastático.....	33
<b>Figura 12</b>	Análise dos níveis de linfócitos T (CD3+) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama de acordo com o comprometimento linfonodal .....	34
<b>Figura 13</b>	Análise dos níveis de células CD44+, CD24neg, e de CD44+/CD24neg com expressão de SOX2 (CD44+/CD24neg / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24neg / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) localmente avançado e metastático .....	36
<b>Figura 14</b>	Análise dos níveis de linfócitos T (CD3+) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) localmente avançado e metastático.....	37



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação molecular dos tumores de mama .....	5
<b>Tabela 2</b>	Descrição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 65 mulheres com câncer de mama atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. (2017-2018).....	27



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>ALDH1</b>	Aldeído desidrogenase 1
<b>APCs</b>	do inglês, Antigen-presenting cell
<b>ASCO</b>	do inglês, <i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>CAM</b>	do inglês, <i>cell adhesion molecules</i>
<b>CAP</b>	do inglês, <i>College of American Pathologists</i>
<b>CBA</b>	do inglês, <i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CD</b>	do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
<b>CM</b>	Câncer de mama
<b>CK</b>	do inglês, cytokeratins
<b>CTLs</b>	do inglês, Cytotoxic T lymphocytes
<b>DCs</b>	do inglês, Dendritic cell
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGFR</b>	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>ELISA</b>	Do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMT</b>	Do inglês Epithelial–mesenchymal transition
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>HCP</b>	Hospital de câncer de Pernambuco
<b>HER 2</b>	do inglês, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2</i>
<b>HIV</b>	do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>HTLV</b>	do inglês, <i>Human T-lymphotropic virus</i>
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMIP</b>	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IFN-</b>	do inglês, <i>Interferon gamma</i>



<b>LA</b>	Luminal A
<b>LB</b>	Luminal B
<b>mAb</b>	do inglês <i>monoclonal antibodies</i>
<b>MAPK</b>	do inglês, <i>Mitogen Activate dProtein Kinases</i>
<b>MDSCs</b>	do inglês, <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
<b>MFI</b>	do inglês, mean fluorescence intensity
<b>MiR</b>	Micro RNA
<b>MHC</b>	do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>
<b>MMP-9</b>	do inglês, <i>matrix metallo peptidase 9</i>
<b>MT1-MMP</b>	do inglês, membrane type 1-matrix metalloproteinase
<b>NK</b>	do inglês, <i>Natural Killer Cell</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pg/mL</b>	Picrogramas por mililitro
<b>QT neo</b>	Quimioterapia neoadjuvante
<b>RI</b>	Receptor I
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RPC</b>	Resposta patológica completa
<b>RNA</b>	do inglês, <i>Ribonucleicacid</i>
<b>STAT3</b>	do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOX2</b>	do inglês, <i>sex determining region Y related group box 2</i>
<b>SOE</b>	Sem outras especificações
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TCR</b>	do inglês <i>T cell receptor</i>
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	do inglês, <i>Transforming growth factor alfa</i>
<b>TGF <math>\beta</math></b>	do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TH17</b>	do inglês, T cell helper 17
<b>TN</b>	Triplo negativo
<b>Tregs</b>	T reguladoras





<b>TNF</b>	do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TNFR1</b>	do inglês, <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
<b>TRH</b>	Terapia de reposição hormonal
<b>VEGF</b>	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>YB-1</b>	do inglês, <i>Y-box binding protein-1</i>
<b>WHO</b>	do inglês, World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer de Mama.....	2
1.1.1	Epidemiologia.....	2
1.1.2	Diagnóstico.....	3
1.1.3	Classificação Molecular e Estadiamento Clínico.....	4
1.2	Mecanismos Celulares e Moleculares no Câncer.....	6
1.2.1	Ativação da Resposta Imune Celular.....	6
1.2.2	Marcadores de Superfície Celular CD44 e CD24.....	7
1.2.3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (STAT).....	10
1.2.4	<i>Sex Determining Region Y-Box 2</i> (SOX2).....	12
1.3	Moléculas CD44, SOX2 e STAT3 e a Carcinogênese.....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.1	Objetivos Específicos.....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1	Descrição Geral do Estudo.....	19
3.2	CrITÉRIOS de Elegibilidade.....	19
3.3	População do Estudo.....	20
3.4	Diagnóstico e Estadiamento.....	20
3.5	Técnicas de Citometria de Fluxo.....	20
3.6	Análises de CD44, CD24, SOX2 e STAT3 por Citometria de Fluxo.....	22
3.7	Análise Estatística.....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	Descrição das Características Clínicas.....	26
4.2	Análise dos Níveis de Células CD44+, CD24neg, CD44+/CD24neg com Expressão de SOX2 e STAT3.....	28



4.3	Análise dos Níveis de Linfócitos T (CD3+) totais e com Expressão de SOX2 e STAT3 .....	32
4.4	Análise dos Pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo Localmente Avançado e Metastático.....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Termo de consentimento livre e esclarecido

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Cópia do Parecer Consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco

**Anexo 2** Sistema TNM de classificação de tumores malignos (7ª edição) ASCC/UICC





# INTRODUÇÃO



---

# 1 INTRODUÇÃO

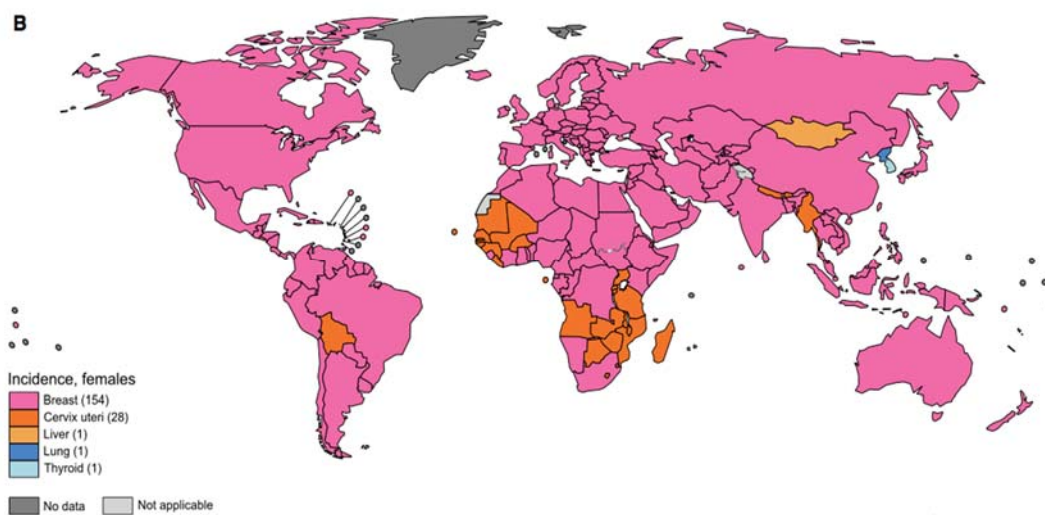
## 1.1 CÂNCER DE MAMA

### 1.1.1 Epidemiologia

O Câncer de Mama (CM) é uma doença caracterizada por crescimento de células anormais heterogêneas que se inicia no tecido glandular mamário e apresenta capacidade intrínseca de progressão para outros órgãos (Nathanson et al. 2001). O CM resulta da interação de fatores genéticos com fatores ambientais que podem levar ao acúmulo de mutações de novos oncogenes e genes supressores de tumor (Nathanson et al. 2001). Porém, alterações genéticas hereditárias representam 5 a 10% dos casos de CM com história familiar de tumores mama e/ou ovário (Economopoulou et al. 2015). Nas síndromes hereditárias, as mutações de genes supressores de tumor como BRCA1 e BRCA2 são as mais frequentes. Esses genes apresentam a função de reparo do DNA, participam do ciclo celular e na remodelação da cromatina e nos processos de mitoses. O gene BRCA2 tem um importante papel na recombinação de genes homólogos, e manter a estabilidade dos cromossomas (Bolton 2012).

Dentre os tumores em mulheres, o câncer de mama é o que apresenta a maior incidência no mundo (Figura 1). Foi estimado para 2018, cerca 2,1 milhões de casos de câncer de mama, sendo aproximadamente um caso de CM para cada 4 casos de câncer em mulheres no mundo (Bray et al. 2018). Em 2018, a estimativa de mortalidade por CM foi de aproximadamente 626.000 casos, representando mais de 6,6% da mortalidade por câncer no mundo (Bray et al. 2018). Sugere-se que a elevada incidência de CM seja devido a associação de fatores demográficos, socioeconômicos e comportamentais, como ter menos filhos, postergar a gestação, obesidade e o sedentarismo (Bray et al. 2018).





Fonte: GLOBOCAN Bray et al. (2018)

**Figura 1** - Mapa global da incidência de CM em mulheres.

Nos países desenvolvidos, houve uma discreta redução da incidência de CM devido ao declínio das terapias de reposição hormonal (TRH). Por outro lado, o CM apresenta uma elevada taxa de mortalidade, e isso representa um grave problema de saúde pública no mundo (Ban e Godellas 2014).

No Brasil, o CM corresponde a 28% dos casos novos de câncer a cada ano e para o ano de 2018, a estimativa foi de 59.700 casos novos. No estado de Pernambuco, a estimativa foi de 2.680 de casos novos para cada 100.000 mulheres, sendo estimado para Recife, aproximadamente 770 casos (Santos 2018)

### 1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do CM depende da história clínica, exame físico e exames radiológicos complementares e principalmente das biópsias para o diagnóstico definitivo por anatomia patológica (Senkus et al. 2015). O principal exame radiológico de detecção precoce de CM é a mamografia convencional bidimensional (2D). Esse exame apresenta alta especificidade para detecção de câncer de mama em estágios iniciais, e associado ao exame de mamografia tridimensional (3D), houve um aumento da taxa de detecção em mulheres assintomáticas, diminuindo a necessidade de repetição do exame radiográfico e de resultado falso-positivo devido a elevada qualidade na definição da imagem (Friedewald et al. 2014).

Os programas de rastreamento mamográficos podem detectar tumores impalpáveis, assintomáticos e microcalcificações que quando tratadas precocemente diminuem a taxa de



---

mortalidade por CM. No Brasil, existem controvérsias quanto ao início e fim do programa de rastreamento, cujas diretrizes adotadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) determinam a realização de mamografia em intervalos de dois anos para as mulheres com idade entre 50 e 69 anos (Santos 2018). A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) recomenda realizar a mamografia anualmente para todas as mulheres com mais de 40 anos (Urban et al. 2017). Nos casos de mulheres com alto risco de desenvolver CM e nas que apresentam mutações nos genes BRCA1 e/ou BRCA2, geralmente com idade inferior a 40 anos, a mamografia tem reduzida sensibilidade para detecção de CM e nesses casos, sugere-se a realização da ressonância nuclear magnética (RNM) por ser um exame mais sensível para detecção de tumor em estágio inicial (Lauby-Secretan et al. 2015; Arasu et al. 2019).

A descrição da anatomia patológica, das alterações detectadas nos exames radiológicos, associados ao estudo do comportamento biológico dos tumores de mama são fundamentais para o diagnóstico e conduta terapêutica. A biópsia pode ser cirúrgica ou guiada por ultrassonografia, mamografia ou RNM e tem por finalidade definir as características histológicas do tumor, como tamanho, tipo histológico, grau nuclear, a contagem mitótica, invasão vascular e peritumoral (Devi et al. 2000; Sparano et al. 2015).

### 1.1.3 Classificação molecular e estadiamento clínico

Para classificação do imunofenótipo de CM, utiliza-se a técnica de imunohistoquímica para análise da expressão de receptores hormonais estrógeno (RE) e de progesterona (RP), *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (HER2). Também é realizado o ensaio de proliferação celular, utilizando o marcador KI67 (de Azambuja et al. 2007; Parker et al. 2009). Perou et al. (2000) realizaram a análise de expressão genica por *microarrays*, e foram descritos 5 fenótipos de tumores de mama: Luminal A (LA), Luminal B (LB), super expressão de HER2 (HER2+), subtipo basal e normal *breast-like*.

Os tumores de mama classificados como triplo negativos pela imunohistoquímica são aqueles que não apresentam expressão de RE, RP e HER2. O triplo negativo não expressa RE/RP e HER2, sendo caracterizado pela expressão de citoqueratina (CK)-5, CK6, CK14, CK17, do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), E-caderina e p63, sendo associado ao pior prognóstico (Parker et al. 2009; Koboldt et al. 2012).

O tumor triplo-negativo tem vários perfis moleculares e apresenta imunofenótipos Basal like (RE-, RP-, HER2-, CK5/6+ e/ou EGFR+) e Não Basal (RE-, RP-, HER2-, CK 5/6- e EGRF-



(Bhargava et al. 2009). Foram descritos e avaliados para classificar os tumores de mama triplo negativos a expressão da citoqueratina 5/6 e fatores de crescimento epidermal para identificar com acurácia e elevada especificidade os tumores de fenótipo basal, porém é razoável definir tumores do tipo basal como aqueles tumores que são negativos para ER, PR e HER2, e que o perfil de expressão gênica ou de marcadores adicionais não são um requisito para identificar esses tumores do tipo basal (Kreike et al. 2007).

O luminal A apresenta a expressão RE e RP, e não HER2, sendo considerado de melhor prognóstico. O luminal B expressa RE+ menos de 20% com ou sem expressão de HER2, sendo associado ao pior prognóstico e à recidiva tumoral (Perou et al. 2000; Goldhirsch et al. 2011; Koboldt et al. 2012). Os tumores de subtipo HER2+ são positivos para HER2+ e podem ou não expressar receptores hormonais.

O triplo negativo não expressa RE/RP e HER2, sendo associado ao pior prognóstico (Parker et al. 2009; Koboldt et al. 2012). Em 2011, foi apresentada uma proposta de classificação molecular na 12ª Conferência de *Gallen International Breast Cancer* com as definições clínica-patológica a partir da expressão dos receptores RE e de RP e HER2 e assim foram definidos os subtipos tumorais pelo perfil molecular encontrado no tumor de mama (Tabela 1; (Gnant et al. 2011)).

**Tabela 1** - Classificação molecular dos tumores de mama.

	<b>RE/RP</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki67</b>
<b>Luminal A</b>	Positivo	Negativo	<14%
<b>Luminal B</b>	Positivo	Negativo ou Positivo	≥14%
<b>HER2+</b>	Positivo ou negativo	Positivo	<14% ou ≥14%
<b>Triplo Negativo</b>	Negativo	Negativo	<14% ou ≥14%

Fonte: Gnant et al. (2011).

RE: receptor estrógeno; RP: receptor progesterona; HER2: receptor de fator de crescimento epidermal tipo 2; Ki67: índice de proliferação. Fonte: Adaptado da St. Gallen International Expert Consensus in 2011.

O estadiamento TNM corresponde a terminologia padronizada para definir o tamanho tumoral (T), o estágio de disseminação para os gânglios linfáticos (N) e a presença de metástase (M) sistêmicas para ossos, fígado, pulmão e demais órgãos, constituindo o sistema TNM o estadiamento anatômico do câncer. Este sistema se aplica a praticamente todos os tipos de tumores e visa determinar o volume de doença ou carga tumoral de um indivíduo. Porém, ficou





---

evidente que para um mesmo estadiamento anatômico, havia pacientes que evoluíam de forma diferente e que a inclusão das características biológicas dos tumores poderia definir melhor os grupos de pacientes semelhantes nos protocolos de tratamentos específicos em cada estágio da doença. Sendo assim, foram incorporadas ao sistema TMN (8ª edição), o grau tumoral que varia de 1 a 3, a expressão ou não do marcador biológico HER 2+, a expressão ou não dos receptores de estrógeno e progesterona, e o teste genético do OncotipeDx e desta forma, definindo o estadiamento prognóstico ( Amin 2018).

## 1.2 MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES NO CÂNCER

### 1.2.1 Ativação da resposta imune celular

Os efeitos potenciais do infiltrado inflamatório no câncer de mama são numerosos e complexos. A maioria dos estudos de câncer de mama que usam hematoxilina-eosina e análises multivariadas que mostra o infiltrado inflamatório está associado a melhor, pior, ou nenhuma relação com o prognóstico. No entanto, há evidências de que a função destas células inflamatórias é frequentemente comprometida com resposta imune. De fato, a afirmação de que o sistema imune promove ou previne o câncer não pode ser interpretada sem definir o fenótipo celular imune que participa em cada processo (Cho et al. 2003).

No câncer de mama, a presença de metástase de células epiteliais mamárias em linfonodos sentinelas que drenam o tumor primário representa o indicador prognóstico mais forte de progressão da doença. A presença de elevado percentual de células TCD4+ (possivelmente Treg) em locais de tumores primários correlaciona-se positivamente com a progressão da doença, incluindo metástase para linfonodos sentinela e aumento no tamanho do tumor primário (Lin e Scott 2013).

O percentual de células T reguladoras aumenta de acordo com o estágio da doença, do normal para o carcinoma ductal *in situ* e do carcinoma ductal *in situ* para um carcinoma invasivo (Lin e Scott 2013). Em pacientes com carcinoma invasivo, elevado número de células T reguladoras indica pior prognóstico e redução de sobrevida dos pacientes em geral (Lin e Scott 2013).

O câncer de mama se apresenta como tumores sólidos que são constituídos por uma variedade de componentes celulares, como as células malignas, endoteliais, estruturais e células do sistema imune (Al-Hajj et al. 2003; Burkholder et al. 2014). O ambiente tumoral é composto



por células do sistema imune, como linfócitos TCD8+ citotóxico, Th1/Th17, células NK, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) (Verma et al. 2013). O primeiro é gerado pelo receptor das células T (TCR) que se liga a antígenos apresentados no contexto de molécula de histocompatibilidade principal de classe I ou II expresso na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). O segundo sinal é proporcionado por interação de uma molécula co-estimuladora CD28 expresso nas células T com as moléculas B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) presentes na superfície da APCs (Figura 2).



Fonte: Fulop et al. (2012) Tamas et al. (2012)

**Figura 2** - Mecanismos de ativação de células TCD4+ e TCD8+.

### 1.2.2 Marcadores de superfície celular CD44 e CD24

Algumas moléculas expressas em células do sistema imune podem ser utilizadas como biomarcadores por ser expressas em células tumorais, sendo envolvidos no processo da tumorigênese e metástases. A molécula CD44 é considerado um importante biomarcador de resposta inflamatória, e se apresenta na forma de receptores de membrana celular e livre no plasma (solúvel). O CD44 está presente em todos os leucócitos e também na superfície de células tronco tumorais (Honeth et al. 2008). Os tumores de células tronco são considerados com fenótipos mais agressivos e apresentam uma subpopulação de células cancerígenas com



---

alto poder de regeneração e diferenciação estando envolvidos com resistência a tratamentos convencionais, alta incidência de recorrência e metástase (An et al. 2015).

Quanri et al. (2011) demonstraram elevados níveis séricos de CD44 em pacientes com CM e desfecho clínico desfavorável, sendo um índice de prognóstico em pacientes com câncer de mama do Her2+, pois participa da interação entre as células cancerígenas e o microambiente do tumor, favorecendo o crescimento da neoplasia, invasão e a metástase (Quanri et al. 2011). Em tumores luminiais, Tsunoda et al. (2011) sugeriu associação da expressão genética de CD44+/CD24-com a superexpressão de outros genes com ALDH1 e SOX2 que estão relacionados com pacientes que apresentam linfonodos positivos axilares, micrometástases e resistência aos tratamentos convencionais em tumores que apresentavam tal expressão gênica.

A molécula CD44 foi utilizada como biomarcador de tumor de células tronco, sendo o tamanho do tumor e a presença de metástases a distância diretamente associado ao aumento dos níveis séricos desta molécula (Quanri et al. 2011). Honeth et al. (2008) demonstraram a associação da elevada expressão de CD44 no tecido tumoral e em especial nos tipos basal, sendo que 94% dos tumores hereditários BRCA1 apresentam CD44 de superfície, e sugeriram que o CD44 seja um bom marcador fenotípico de células tronco tumorais. Chung et al. (2013) relataram que os fatores de transcrição presentes no citoplasma após serem ativados por mecanismo de fosforilação, direcionam-se para o núcleo e promovem a transcrição de proteínas capazes de aumentar a pluricelularidade e a capacidade tumoral de invasão e metástase (Chung et al. 2013).

A molécula CD24 é expressa na superfície celular glicosilada, sendo a sua elevada expressão descrita em câncer de ovário, mama, próstata, bexiga, rins, entre outros, estando envolvido na adesão celular e metástase (Kristiansen et al. 2003). É um ligante alternativo para P-selectina, um receptor de adesão presentes em plaquetas e células endoteliais (Aigner et al. 1998). Através do qual sua interação facilita a passagem de células tumorais do sangue periférico para os tecidos. As associações metastáticas do CD24 aumentam sua importância como fator prognóstico (Lee et al. 2009).

Nos tumores de células tronco, em 2015, Zhou (2015) e colaboradores constataram um aumento de CD44+/CD24- em culturas de células com macrófagos que também participam na ativação de células tumorais com proliferação e metástases à distância ao serem expostas ao processo de apoptose. Em pacientes com CM e em tratamento quimioterápico, as medicações

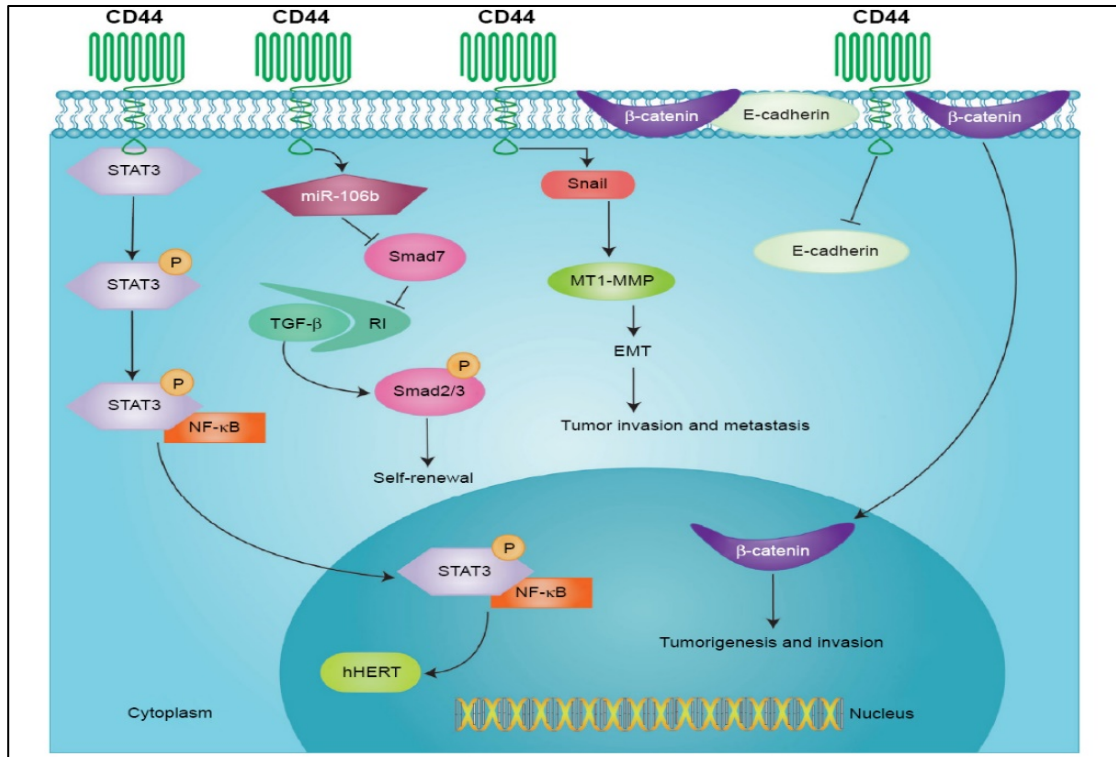


também promovem a morte programada de células e aumento de citocinas inflamatórias (Zhou et al. 2015).

Siveen et al. (2014) relataram aumento dos níveis de interleucina 6 (IL6) associados ao aumento de apoptose celular e crescimento tumoral. A interação das IL6 através dos seus receptores promovem a ativação através da fosforilação da tirosinaquinase e aumento do sinal de transcrição STAT3 para síntese de proteínas pro tumorais. Nesse sentido, alguns autores demonstraram que o STAT3 está relacionado com a regulação da divisão celular de células somáticas, pois controla a expressão de genes antiapoptótica e pro-proliferativo durante a resposta imune (Marotta et al. 2011).

Além dos receptores de membrana como o CD44, existem proteínas intracelulares denominadas fatores de transcrição que participam da ativação, sinalização e produção de fatores de crescimento importantes para diferenciação e proliferação celular. Os fatores de transcrição estão envolvidos nos mecanismos de carcinogêneses e metástases tumorais, pois são responsáveis pelos processos de divisão celular desordenada e consequente formação de tumores malignos (Wu et al. 2015); Figura 3).





Fonte: WU et al. (2015)

**Figura 3** - Representação esquemática das vias de ativação do CD44. O CD44 promove a fosforilação do STAT3, levando à translocação nuclear de pSTAT3 e à ativação do hHERT. A regulação positiva da família miR-106b pela CD44 reprime a inibição Smad7, que inibe a sinalização de TGF- $\beta$  / Smad2/3, suprimindo o receptor TGF- $\beta$  / Smad2/3, promovendo a auto renovação das células cancerígenas; O Snail1 regula positivamente a expressão da metaloproteínase da matriz I da membrana (MTI-MMP), que promove a invasão tumoral. CD44 desassocia a formação da E-caderina associada à membrana -  $\beta$ - complexo de catenina, a liberação de  $\beta$ -catenina se transloca para o núcleo e ativa genes relacionados à invasão e migração celular.

### 1.2.3 Signal transducer and activator of transcription (STAT)

As proteínas da família STAT são fatores de transcrição citoplasmático e pertencem a uma família altamente conservada de proteínas, e compreendem sete membros, STAT1 a STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. As moléculas de STATs estão localizados no citoplasma em seu estado inativo. A fosforilação de resíduos específicos de tirosina é um passo para a ativação do STAT (Darnell et al. 1994; Darnell 1997).

Geralmente, a sinalização de STAT3 é baixa e ocorre após a ativação da JAK, seguindo fosforilação, dimerização, translocação nuclear e ligação ao DNA de STAT3 (Wang et al. 2018a). A Expressão dos fatores de reprogramação nas linhagens de células tumorais e a ativação do STAT3 no câncer de mama e a ativação de STAT3 por fosforilação depende da



---

resposta a citocinas e fatores de crescimento. A ativação de STAT3 na célula tumoral, eleva o nível de BCL-1 e Bcl-XL, que são genes antiapoptóticos e proteínas do ciclo celular a cyclin D1 e c-Myc, o que torna o tumor resistente a tratamentos quimioterápicos que atuam nos mecanismos de morte celular programada (Sikka et al. 2014).

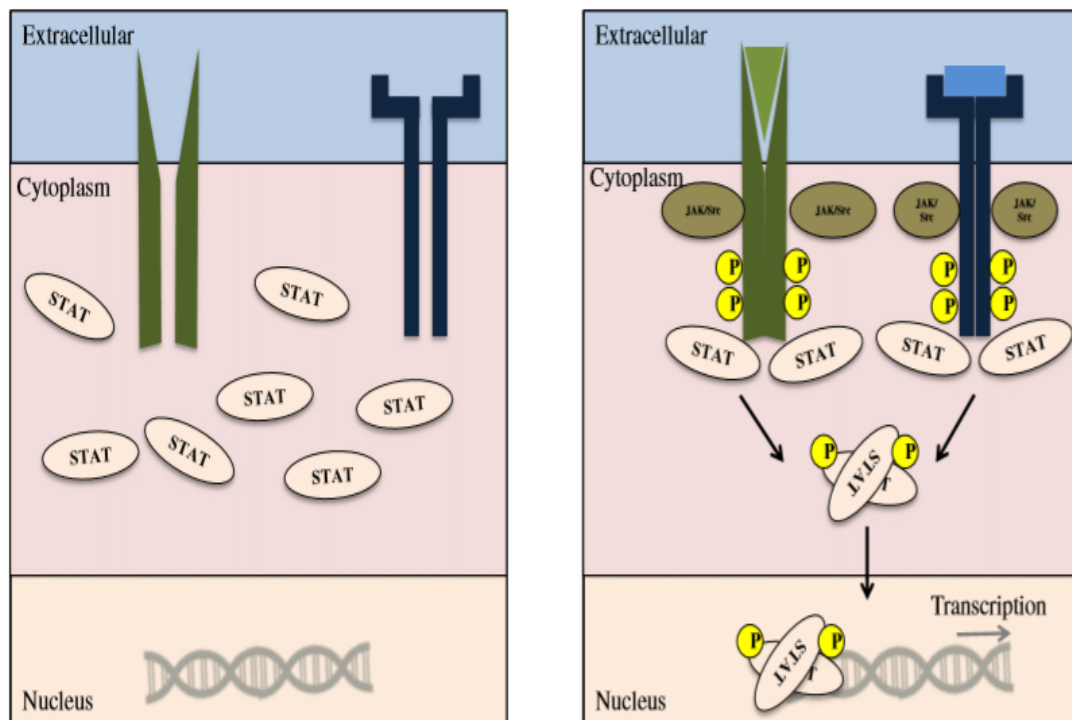
Suyang et al. (2015) relataram a elevada expressão proteica de STAT3 no tecido tumoral de 51 casos de CM comparados com regiões de tecido mamário normal. Níveis elevados de STAT3 foram descritos nos tumores em estágio IV comparados aos com estádios I e II. Por sua vez, quando relacionado a presença de linfonodos, foram observados elevados níveis de expressão de STAT3 nas pacientes com linfonodos positivos (Suyang et al. 2015).

Sonnenblick et al. (2015) relataram que pacientes com CM apresentaram resistência ao tratamento relacionada a baixos níveis de citocinas e quimiocinas, sendo necessárias para ativação da resposta imune. As alterações na produção de citocinas e quimiocinas podem comprometer a resposta imune celular e estão associados aos níveis elevados de STAT3. Esses autores descreveram expressão elevada de STAT3 nas pacientes com CM HER2+ e resistência a terapia com trastuzumabe.

Alguns autores mostraram a relação da elevada expressão de p-STAT3 com um desfecho desfavorável nos pacientes com câncer colorretal, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, câncer de esôfago e câncer pancreático (Chen et al. 2008; Bollrath et al. 2009; Stark e Darnell 2012; Dodd et al. 2015).

Além disso, Siveen et al. (2014) demonstraram que a presença do STAT3 na célula tumoral, quando ativado pelas vias de sinalização autócrinas e parácrinas, eleva o nível de genes anti-apoptóticos e proteínas do ciclo celular, tornando o tumor resistente a tratamentos quimioterápicos.





Fonte: Zhi et al. (2016)

**Figura 4** – Representação esquemática da cascata de sinalização de STAT3. A esquerda, as proteínas STAT existem em um estado inativo dentro do citoplasma na ausência de seu ligante. A direita, após a ligação do ligante (verde: fator de crescimento, azul: citocina) aos seus receptores cognatos, os receptores dimerizam e recrutam as cinases de JAK/src. As moléculas fosforiladas translocam para o núcleo após a dimerização, se ligam ao DNA e regulam a transcrição de vários genes oncogênicos.

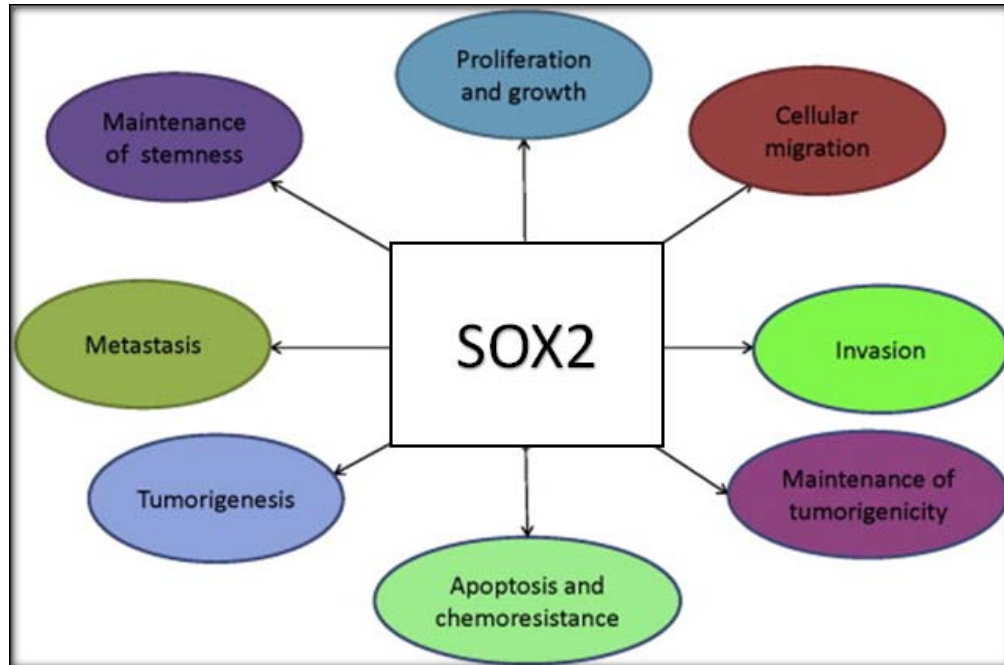
#### 1.2.4 Sex determining region Y-box 2 (SOX2)

O gene *Sex determining region Y-box 2* (SOX2) codifica o fator de transcrição SOX2, que contribui significativamente para a regulação da divisão celular. O SOX2 participa do desenvolvimento embrionário inicial, diferenciação neural e outros processos biológicos. As funções de SOX2 foram descritas na participação do ciclo celular e liberação de fatores de crescimento responsáveis pela angiogênese (Feng and Lu 2017).

Jung et al. (2015b) relataram a associação direta de SOX2 com a tumorigênese e a metástase. Nas células troncos embrionárias, a redução da expressão de SOX2 está associada com a perda do estado pluripotente e uma propensão para a diferenciação. Estudos envolvendo populações de células tumorigênicas têm demonstrado a expressão anômala de fatores de transcrição relacionados à autorrenovação de células embrionárias, como *Octamer-binding*



*transcription factor 4* (OCT4), SOX2 e Nanog, e seu envolvimento na carcinogênese de vários tumores (Zhang et al. 2012) (Figura 4).



Fonte: Ren et al. (2016)

**Figura 5** - Representação esquemática das funções do fator de transcrição SOX2 no câncer.

O SOX2 apresenta comportamento distinto nos diversos tipos de tumores malignos, sendo elevada a sua expressão nos tumores pulmão de pequenas células e nos carcinomas basocelulares de mama (células-like). Entretanto, é pouco expresso no carcinoma gástrico e coriocarcinoma (Bass et al. 2009). Rizzino et al. (2013) demonstraram que a interação de SOX2, OCT4, KLF4 e c-Myc nas células somáticas humanas foram capazes de se tornarem tumores indiferenciados e a expressão da molécula de SOX2 também foi identificada e associada diferentes subtipos de carcinoma mamário (Cox et al. 2013; Liang et al. 2013; Ye et al. 2014).

A expressão elevada de SOX2 tem sido encontrada em 30% dos tumores analisados por imunohistoquímica (Leis et al. 2011). Outros autores demonstraram *in vitro* que a expressão de SOX2 em células tronco embrionárias está associada com expressão elevada de CD44+ e tem a capacidade de formar tumores indiferenciados e metastáticos em linhagens tumorais com características clínicas desfavoráveis (Huang et al. 2014).





### 1.3 MOLÉCULAS CD44, SOX2 e STAT3 E A CARCINOGENESE

A carcinogênese é dependente de um pequeno subconjunto de células dentro do tumor, chamadas de *Cancer stem cells* (CSCs), oriundas de mutações em genes associados ao controle da proliferação celular e diferenciação das células-tronco com capacidade de iniciar e manter o crescimento tumoral (Dalerba et al. 2007; Shackleton et al. 2009)

Chou et al. (2013) mostraram uma relação entre receptores de membrana como o CD44 ativando fatores de transcrição que são proteínas intracelulares que participam da sinalização e produção de fatores de crescimento fundamentais para diferenciação e proliferação celular, estes fatores de transcrição estão envolvidos nos mecanismos de carcinogênese e das metástase, são eles os responsáveis pelos processos de divisão celular desordenada nos tumores malignos, após sua ativação pelo mecanismo de fosforilação com o STAT3, direcionando-se para o núcleo e promovem a transcrição de proteínas capazes de aumentar a capacidade tumoral de invasão e metástase como SOX2 (Chung et al. 2013).

Liu et al. (2014) observaram níveis elevados de SOX2+ e CD24+ em células tronco tumorais no carcinoma hepatocelular. Foi demonstrado que baixa expressão de CD24 está relacionada a redução dos níveis de SOX2 e STAT3. As moléculas CD24 e STAT3 são importantes na regulação de células tronco tumorais no carcinoma hepático.

A expressão de SOX2 no carcinoma de células escamosas de esôfago e pulmão levou ao aumento da proliferação e diferenciação de células basais e indução de células tronco tumorais pluripotenciais. Por sua vez, Zhang et al. (2012) relataram a expressão de SOX2 no câncer de ovário e observaram um aumento da proliferação, clonogenicidade e tumorigênese *in vivo* e *in vitro*.

Alguns autores demonstraram que células tronco/ progenitoras basais são de origem do carcinoma de células escamosas, sendo necessária a cooperação entre SOX2 e STAT3 no microambiente tumoral para o início do processo de carcinogênese associada a SOX2 (Chen et al. 2012). Segundo Radenkovic et al. (2013), estudos das vias de ativação que levam a carcinogênese aumenta o conhecimento sobre comportamento tumoral, e dos mecanismos biológicos de progressão para metástase, com possível descoberta de novos medicamentos específicos (Radenkovic et al. 2013).

As células tronco tumorais apresentam fenótipo CD44+/CD24- expressam maior heterogeneidade tumoral e resistência aos tratamentos atuais. O STAT3 e SOX2 foram descritos



como importantes fatores de transcrição para progressão tumoral. Os estudos in vitro demonstraram o aumento de expressão de SOX2 em pacientes com CM. Dessa forma, decidiu-se avaliar a expressão de CD44+/CD24-, STAT3 e SOX2 no sangue periférico de paciente com CM localmente avançado e metastático. Como justificativa para esse estudo, a imunologia desperta interesse em encontrar biomarcadores específicos que explique o comportamento agressivo das neoplasias; a tentativa de identificar a nível molecular, a interferência dos mediadores da resposta imune e correlacionar com os estágios da neoplasia; a busca de mediadores da resposta imune capazes de promover tratamentos mais específicos e eficientes para os tumores resistentes aos tratamentos preconizados; a importância de identificar mediadores no sangue periférico por ser um método acessível, rápido, de baixo custo e observar como se comportam nas pacientes com câncer nos diversos estágios da doença; por fim, este estudo deseja explorar os conhecimentos de moléculas que possam estar relacionadas com o processo de tumorigênese, angiogênese e metástase.





# OBJETIVOS



---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de CD44<sup>+</sup>, SOX2 e STAT3 no sangue de pacientes com câncer de mama localmente avançado e metastático

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis de células CD44<sup>+</sup> e CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> no sangue periférico dos pacientes e controles;
- Determinar os níveis de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> com expressão de STAT3 e SOX2 no sangue periférico dos pacientes e controles;
- Determinar os níveis de linfócitos T com expressão de STAT3 e SOX2 no sangue periférico dos pacientes e controles;
- Comparar os níveis de CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>, e linfócitos T com expressão STAT3 e SOX2 entre os subtipos tumorais e controles;
- Comparar os níveis de CD44<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>, e linfócitos T com expressão STAT3 e SOX2 entre os pacientes com tumor localmente avançado e metastático; e de acordo com o comprometimento de linfonodos regionais axilares.



# MATERIAIS E MÉTODOS



---

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 DESCRIÇÃO GERAL DO ESTUDO

É um estudo de coorte transversal realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) no período de março de 2017 a abril de 2018. O HCP é um hospital que atende exclusivamente os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), é responsável por aproximadamente 55% dos atendimentos oncológicos do Estado de Pernambuco. A grande maioria dos pacientes atendidos no HCP são de baixa renda, e chegam ao serviço oncológico com tumores avançados. As análises dos marcadores estudados foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

Em relação aos aspectos éticos, este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HCP, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa (TCLE; Apêndice 1). O parecer consubstanciado encontra-se na plataforma Brasil sob no. CAAE 51422115.3.0000.5205 (Anexo 1).

### 3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

**Crítérios de inclusão:** mulheres com carcinoma de mama, idade acima de 18 anos e apresentavam estadiamento clínico de tumores localmente avançado e de doença metastática. Para as participantes do grupo controles, os critérios foram mulheres clinicamente saudáveis com idade acima de 18 anos, e acompanhantes dos pacientes atendidos no HCP.

**Crítérios de exclusão** (Pacientes e voluntárias saudáveis): tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico prévio, gestação e lactação; neoplasia prévia, exceto câncer de pele não melanoma; usuárias de medicamentos imunossupressores por um período longo; história clínica de HIV e HTLV, hepatites, doenças autoimunes e auto-inflamatórias; história familiar de câncer de mama.



### 3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Participaram deste estudo, 65 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de câncer de mama, e idade entre 28 a 64 anos. Destas, 51 mulheres tinham tumor de mama em estágio III (localmente avançado) e axila positiva, e 14 com doença metastática (estádio IV).

Como grupo controle, foram avaliadas 24 mulheres clinicamente saudáveis com idade entre 18 anos a 65 anos que não apresentam no exame clínico suspeita de tumor e sem história familiar de câncer de mama.

No momento da inclusão, foi aplicado um questionário contendo os critérios de elegibilidade. Foram obtidos os dados como nome e número de registro, idade ao diagnóstico inicial e história familiar para câncer de mama.

### 3.4 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

- **Diagnóstico clínico:** foi realizado o diagnóstico clínico com história clínica e exame físico, acrescido dos exames de imagens. As pacientes que apresentavam tumores impalpáveis nas mamas eram encaminhadas para realizar core biopsia guiada por ultrassonografia. As pacientes que tinham tumores palpáveis realizaram exames de ultrassonografia e mamografia, e posteriormente a core biopsia;
- **Diagnóstico patológico:** as pacientes realizaram o procedimento de biópsia por agulha grossa (core biopsy) e o material era processado e interpretado pelo patologista do serviço de anatomopatologia do HCP. Os cortes histológicos do material biológico foram dispostos em lâminas e coradas pela hematoxilina e eosina (HE). Foram classificados o tipo histológico, o grau nuclear, a invasão angiolinfática seguindo o preconizado por Page et al. (1999) e Goldhirsch et al. (2011).

O painel prognóstico era realizado em seguida e corresponde ao imunofenótipo das pacientes determinado através da técnica de imunohistoquímica. O grau histológico foi classificado de acordo com o sistema de Nottingham proposto por Elston e Ellis (1991), onde o tumor é classificado como bem diferenciado (baixo grau ou grau I), moderadamente diferenciado (grau intermediário ou grau II), ou pouco diferenciado (alto grau ou grau III). Os dados histopatológicos foram obtidos através dos laudos do serviço de anatomia patológica do



---

HCP. Os principais dados obtidos foram: tamanho do tumor, tipo histológico, grau nuclear, grau histológico, status linfonodal e estadiamento clínico.

Os tumores mamários foram classificados como triplo-negativos quando negativos para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (Diaz et al. 2007). Foram considerados Her-2 positivos, os tumores com coloração intensa (3+) em toda membrana celular, e em mais de 30% das células avaliadas (Peppercorn e Partridge 2008). A interpretação dos receptores hormonais baseou-se no consenso da *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists* (ASCO/CAP) de 2013 (Wolff et al. 2014). Todas as lâminas das pacientes incluídas foram revisadas por um segundo patologista do serviço de anatomia patológica do HCP.

- **Estadiamento clínico:** o estadiamento para tumor maligno de mama foi realizado após a confirmação para neoplasia de mama, e com os exames de tomografia de tórax, abdome e cintilografia óssea, determinando a ausência ou presença de tumores, e de lesões secundárias. As pacientes com tumor de mama que apresentaram lesões secundárias foram classificadas em estágio metastático. O estadiamento clínico foi realizado com base no sistema TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7ª edição; Anexo 2) de classificação de tumores malignos preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (Edge e Compton 2010).

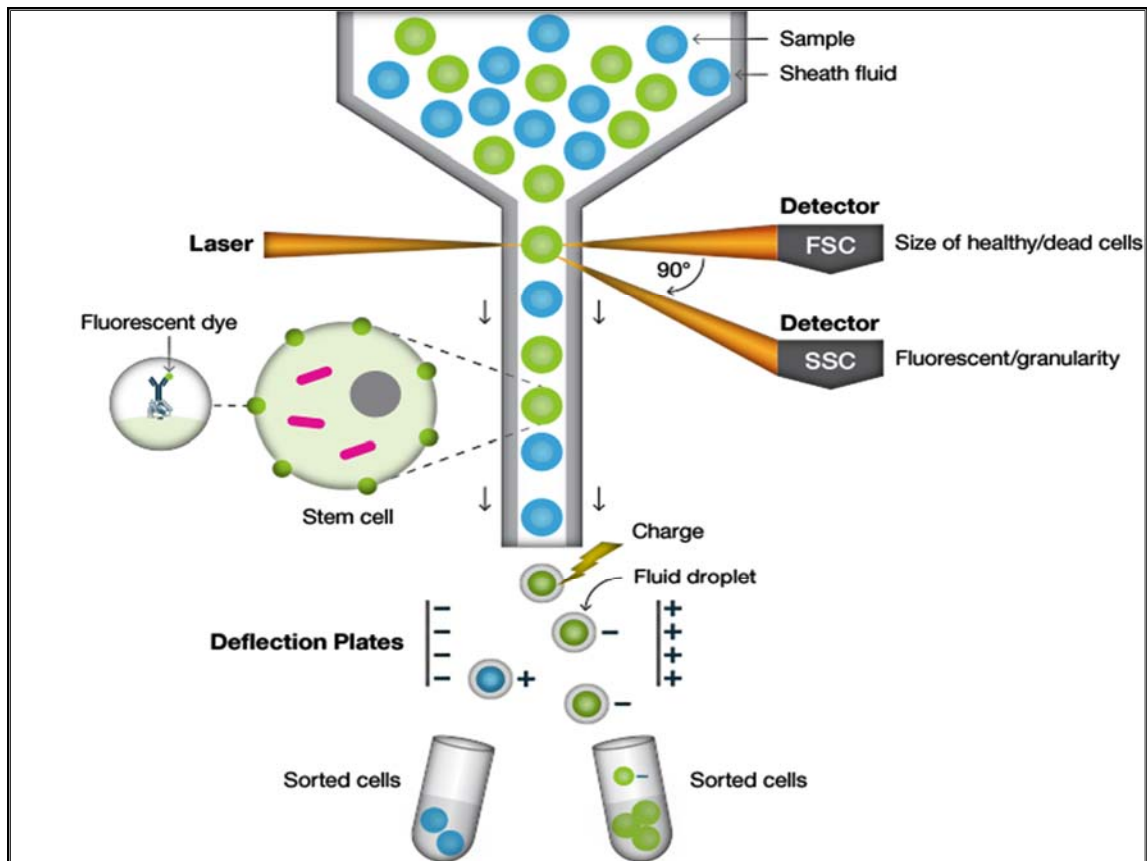
### 3.5 TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma tecnologia avançada e rápida que permite contar, examinar e classificar células individuais e medir simultaneamente múltiplos parâmetros, sendo de análise quantitativa. No citômetro de fluxo, o sistema de fluidos canaliza uma amostra de células em um único fluxo para que as células passem uma a uma através de um feixe focalizado de um laser. À medida que cada célula passa através do feixe, as propriedades de dispersão da luz e a fluorescência são coletadas pelo sistema óptico e direcionadas para vários detectores. Os sinais recebidos pelos detectores são então convertidos em valores numéricos pelo sistema eletrônico e analisados em software específico. Conforme uma célula passa por um feixe de laser, a luz é espalhada em direções diferentes e dois parâmetros são definidos: tamanho de célula, representado pela dispersão direta da luz do laser (Forward Scatter - FSC); e complexidade celular (granularidade), representada por dispersão lateral da luz do laser (Side





Scatter - SSC). Esta informação é exibida visualmente em um gráfico de pontos (dot plot), no qual cada ponto representa uma única célula, diferenciadas pela forma como dispersam a luz e pela fluorescência, que é proporcionalmente direta à quantidade de moléculas expressas na célula. A Figura 5 apresenta uma visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.



Fonte: <https://www.bio-rad.com/featured/en/flow-cytometer.html>

**Figura 6** - Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo

### 3.6 ANÁLISES DE CD44, CD24, SOX2 E STAT3 POR CITOMETRIA DE FLUXO

O volume de 4 mL de amostra de sangue venoso das pacientes foi coletado em tubo com ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer®) e mantidas a temperatura ambiente (24 °C). O tempo entre a coleta e o processamento foi de até 60 minutos. Antes do processamento, o tubo com amostra de sangue foi colocado no equipamento homogenizador (BD Bioscience) e em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo



---

A primeira etapa foi a análise das proteínas expressas na superfície celular (CD44, CD24 e CD3). As células foram fixadas com 100  $\mu$ L de BD Cytotfix/Cytoperm™ pré-aquecido e incubadas por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, após centrifugação à 250 x g por 8 minutos, foram adicionados 5 uL de anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD44 e anti-CD24 (BD Biosciences, USA). Os anticorpos monoclonais são conjugados a fluoróforos, como PE, FITC, PerCP e PECY-7, que diferem um do outro pela cor que emitem. Os anticorpos monoclonais têm especificidade para moléculas expressas na membrana e no interior das células, o que possibilita caracterizar leucócitos humanos e outras células humanas, bem como analisar suas funções. Essas moléculas são identificadas como *clusters of differentiation* (CD).

As proteínas STAT3 e SOX2 são expressas no interior das células (citoplasma e núcleo, respectivamente). Para detecção dessas proteínas foi realizada a permeabilização das células, utilizando os reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, USA). Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, as células foram permeabilizadas com 750  $\mu$ L de Perm Buffer III (BD Biosciences, USA) à 4 °C e incubadas por 30 minutos submergidas no gelo, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, centrifugadas à 250G por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Foram realizadas três lavagens com *phosphate buffered saline* (PBS) 1x concentrado (pH 7,4). Em seguida foi realizada a marcação intracelular com os anticorpos monoclonais anti-SOX2 e anti-STAT3, sendo incubado por 40 minutos protegido da luz. Em seguida, uma nova etapa de lavagem foi realizada, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de *Stain Buffer* e realizada aquisição no citômetro de fluxo. Após as lavagens, foi realizada aquisição de 50.000 eventos celulares no equipamento FACSVÉRSE (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e as análises foram realizadas no programa FACSSUÍTE (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi apresentada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR; percentil 25 e 75).



O teste *Shapiro Wilk* foi utilizado para avaliação da distribuição das amostras. Foi utilizado testes não paramétricos de *Mann-Whitney* para análise entre dois grupos e *Kruskall-wallis* para análise de múltiplas comparações múltipla de Dunn's.

A análise dos dados foi realizada pelo software *GraphPad Prism v8.0* (GraphPad Software, San Diego, CA). Para todas as análises foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .





# RESULTADOS

---

---



---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram avaliadas um total 65 mulheres com carcinoma invasivo tipo não especial e 24 mulheres saudáveis. Não houve diferença significativa na mediana de idade entre as pacientes (47 anos; IQR 40,0-56,0) e os controles (49 anos; IQR 44,5 – 53,5;  $p=0,675$ ). A maioria apresentava tumores localmente avançados (78,46%). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal invasivo sem outras especificações (98,46% SOE). Com relação ao tamanho do tumor, a maioria das pacientes apresentou tumor > 5 cm (86,15%).

O fenótipo tumoral mais frequente foi triplo negativo (TN) (44,61%), seguido de luminal B (29,23%) e de HER2 (26,15%). A maioria das pacientes apresentava estágio IIIB (50,8%), seguido de estádios IIIA (27,7%) e IV (21,5%). Quanto ao status linfonodal, verificou-se que 84,6% das pacientes apresentavam linfonodos positivos e grau nuclear III (53,8%). (Tabela 1).



**Tabela 2** – Descrição das frequências absolutas e relativas das características clínicas de 65 mulheres com carcinoma de mama atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. (2017-2018).

<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS-PATOLÓGICAS</b>	<b>PACIENTES N=65</b>
<b>IDADE</b>	
Mediana (IQR)	47 (40,0 – 56,0)
<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>	
	<b>N (%)</b>
Carcinoma invasivo tipo não especial	64 (98,46)
Lobular invasivo	1 (1,54)
<b>TAMANHO</b>	
≤ 2 cm	2 (3,09)
> 2 e ≤ 5 cm	7 (10,76)
> 5 cm	56 (86,15)
<b>STATUS LINFONODAL</b>	
N0	10 (15,4)
N1	35 (53,8)
N2	20 (30,8)
<b>IMUNOFENÓTIPO</b>	
Luminal B	19 (29,23)
HER2+	17 (26,15)
Triplo Negativo	29 (44,61)
<b>GRAU NUCLEAR</b>	
1	3 (13,9)
2	21 (32,3)
3	35 (53,8)
<b>ESTADIAMENTO CLÍNICO</b>	
IIIA	18 (27,7)
IIIB	33 (50,8)
IV	14 (21,5)



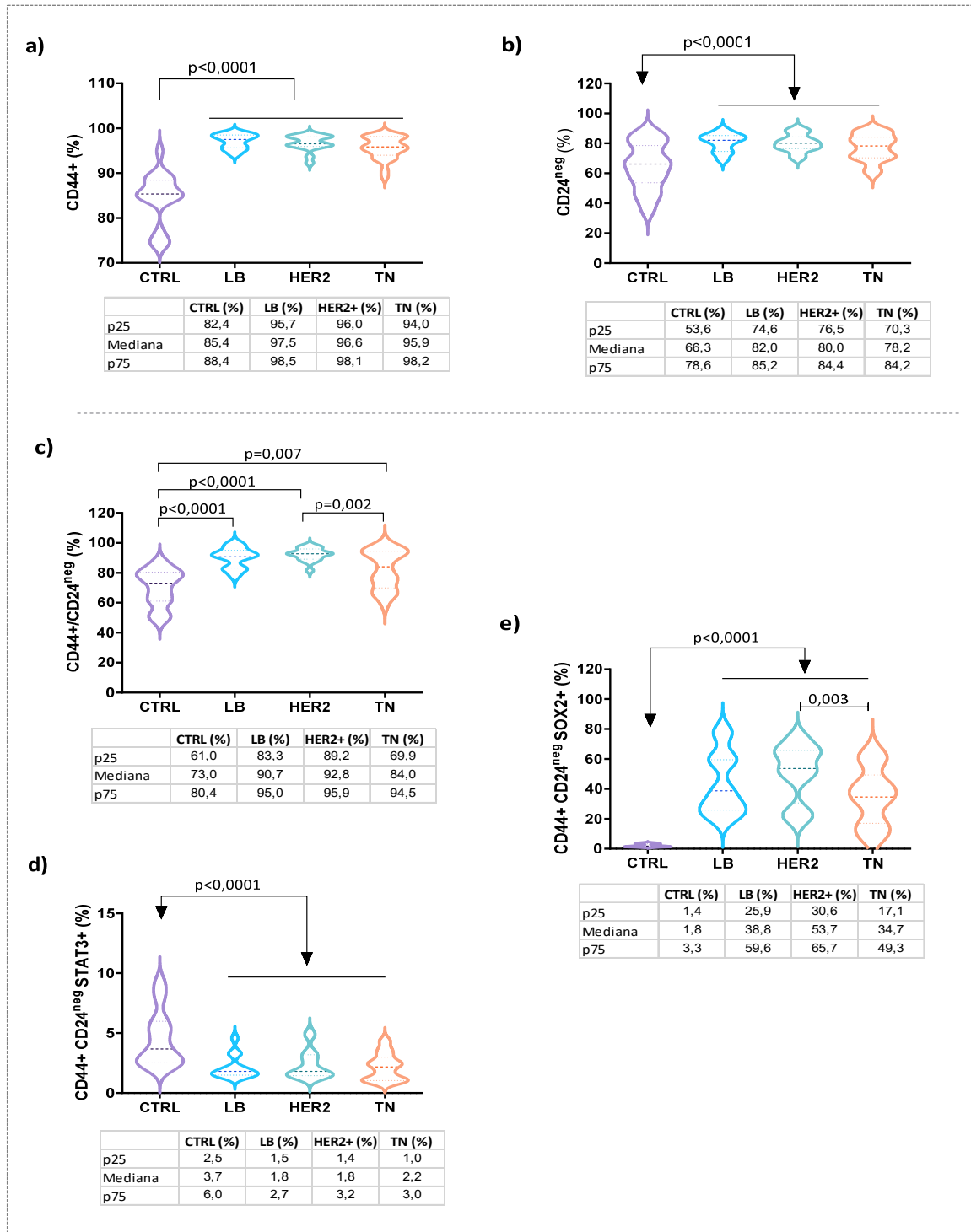
---

## 4.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CÉLULAS CD44+, CD24NEG, CD44+/CD24NEG COM EXPRESSÃO DE SOX2 E STAT3

- **Comparação entre os subtipos tumorais e controles**

Foram observados níveis elevados de células CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>neg</sup> e CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> no sangue das pacientes com tumores de mama LB, HER2<sup>+</sup> e Triplo negativos comparados aos controles ( $p < 0,0001$ ). Elevados níveis de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> nas pacientes com CM HER2<sup>+</sup> comparados as do subtipo triplo negativo ( $p = 0,002$ ). Também foram observados níveis elevados de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> com expressão de SOX2<sup>+</sup> nas pacientes com CM (LB, HER2<sup>+</sup> e TN) comparados aos controles ( $p < 0,0001$ ). Com relação as células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup>, as pacientes apresentaram níveis baixos dessas células no sangue quando comparado aos controles. A descrição dos valores de mediana, percentil 25 e 75 consta na Figura 7.





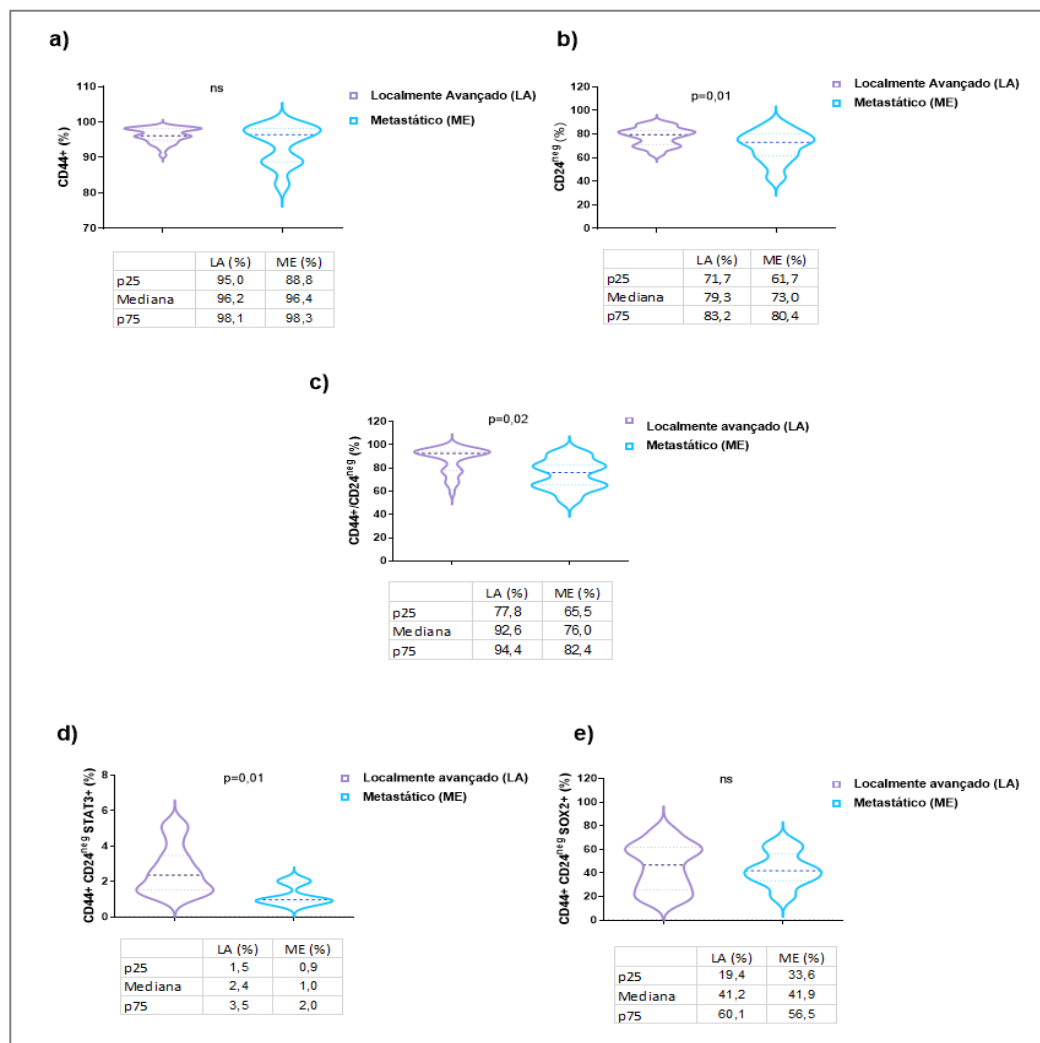
**Figura 7** - Análise dos níveis de células CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>neg</sup>, e de CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> com expressão de SOX2 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> / SOX2<sup>+</sup>) e de STAT3 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> / STAT3<sup>+</sup>) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama luminal B (LB; n=19), HER2+ (n=17) e triplo negativo (TN; n=29) e mulheres saudáveis (controles – CTRL; n=24). Os gráficos estão representados em valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75. Foi utilizado o teste *Kruskal Wallis* corrigido. Foi considerado  $p < 0,05$ .





- **Comparação entre os grupos de pacientes com CM localmente avançado e metastático**

Foram observados níveis elevados de células  $CD24^{neg}$  e  $CD44^+/CD24^{neg}$  e  $CD44^+/CD24^{neg}STAT3^+$  no sangue de pacientes com CM localmente avançado comparado a CM metastático ( $p < 0,05$ ). A descrição dos valores de mediana, percentil 25 e p75 consta na Figura 8.

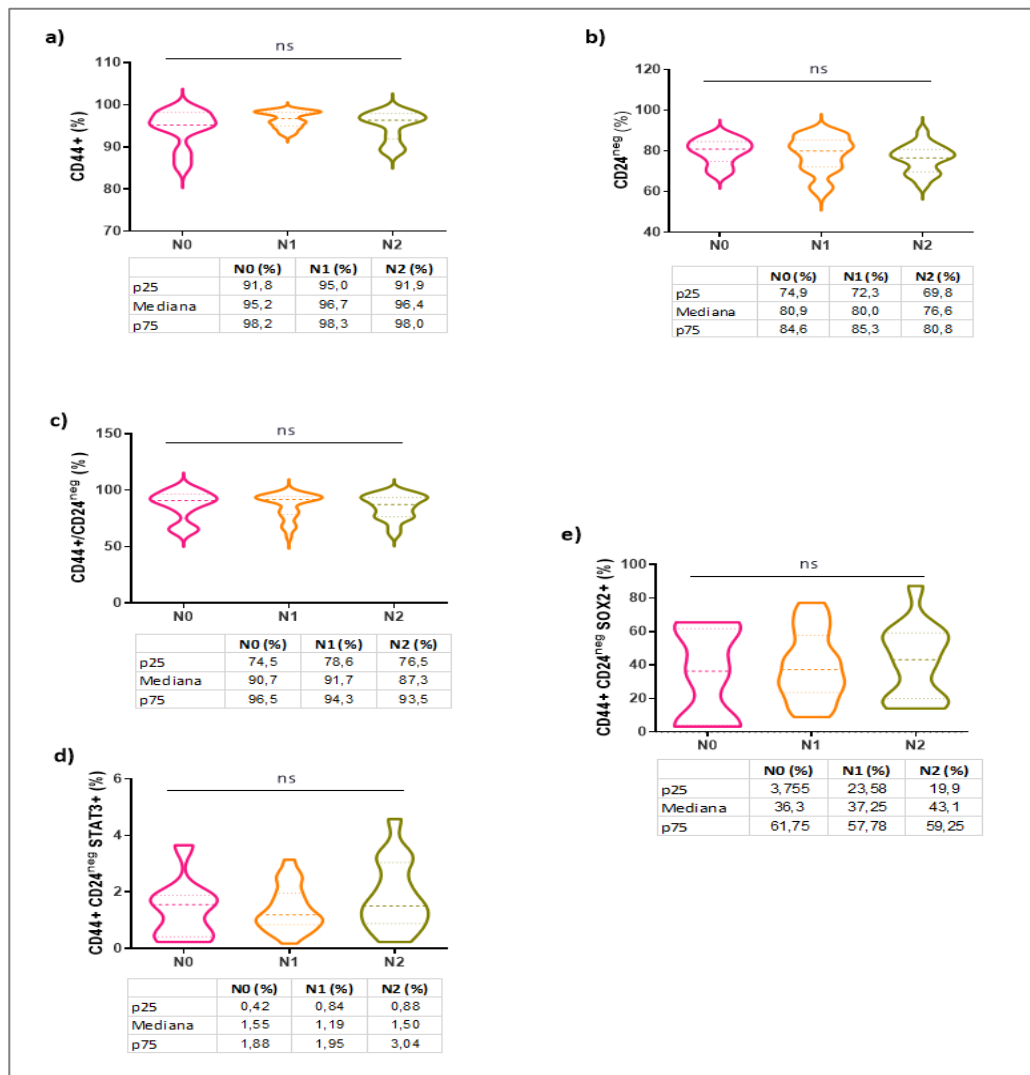


**Figura 8** - Análise dos níveis de células  $CD44^+$ ,  $CD24^{neg}$ , e de  $CD44^+/CD24^{neg}$  com expressão de SOX2 ( $CD44^+/CD24^{neg} / SOX2^+$ ) e de STAT3 ( $CD44^+/CD24^{neg} / STAT3^+$ ) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama localmente avançado (LA; estágio IIIA/B,  $n=51$ ) e com metástases (ME; estágio IV,  $n=14$ ). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste Mann Whitney. Foi considerado  $p < 0,05$ .



- **Comparação entre os grupos de acordo com comprometimento linfonodal (N0, N1 e N2)**

Não foram observadas diferenças significantes entre os valores de mediana dos pacientes sem (N0) e com comprometimento linfonodal (N1 e N2) para os níveis de células CD44+, CD24<sup>neg</sup> e CD44+/CD24<sup>neg</sup>, e de CD44+/CD24<sup>neg</sup> SOX2+ e CD44+/CD24<sup>neg</sup>STAT3+ A descrição detalhada está na Figura 9.



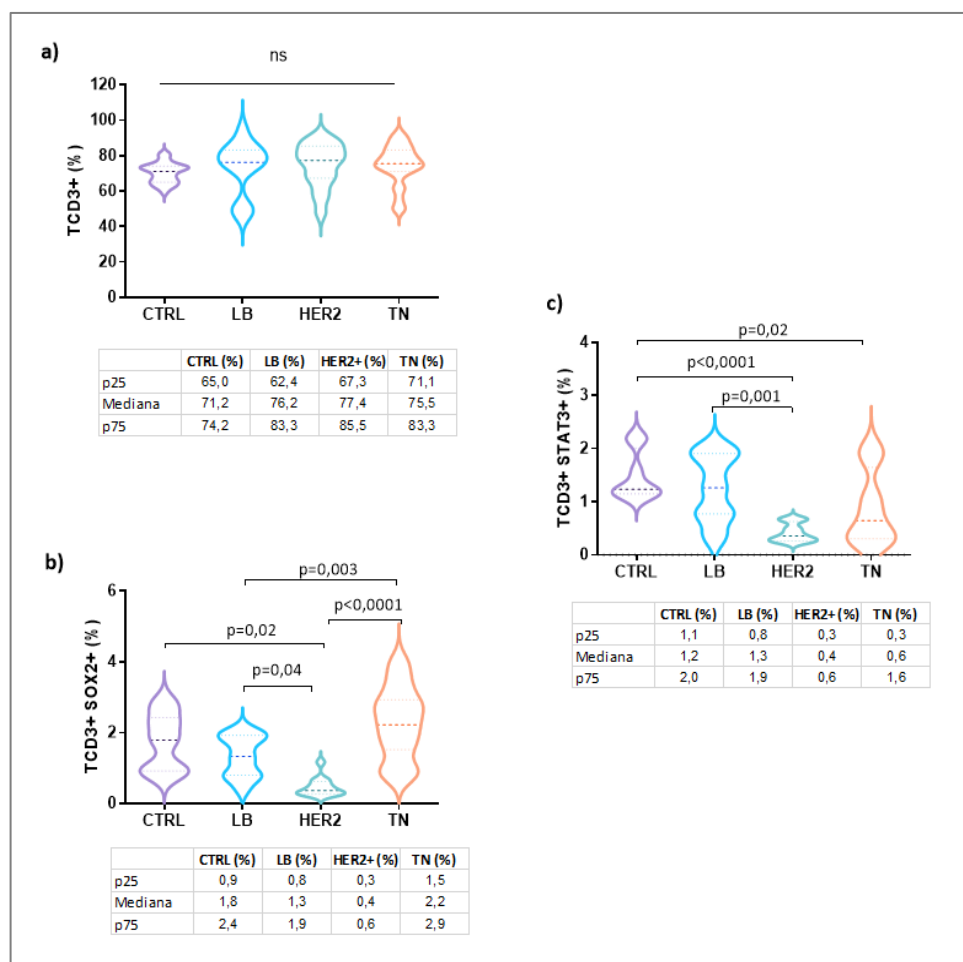
**Figura 9** - Análise dos níveis de células CD44+, CD24<sup>neg</sup>, e de CD44+/CD24<sup>neg</sup> com expressão de SOX2 (CD44+/CD24<sup>neg</sup> / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24<sup>neg</sup> / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama de acordo com o comprometimento linfonodal N0 (n=10), N1 (n=35) e N2 (n=0). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste *Kruskal Wallis*. Foi considerado p<0,05.



### 4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LINFÓCITOS T (CD3<sup>+</sup>) TOTAIS E COM EXPRESSÃO DE SOX2 E STAT3

- **Comparação entre os subtipos tumorais e controles**

Os pacientes com CM triplo negativo apresentaram níveis elevados de linfócitos TCD3+SOX2+ quando comparado aos grupos com subtipos LB e HER2+ ( $p<0,05$ ). O grupo de pacientes CM HER2+ apresentou baixos níveis de TCD3+SOX2+ comparado aos controles e LB ( $p<0,05$ ) (Figura 10).

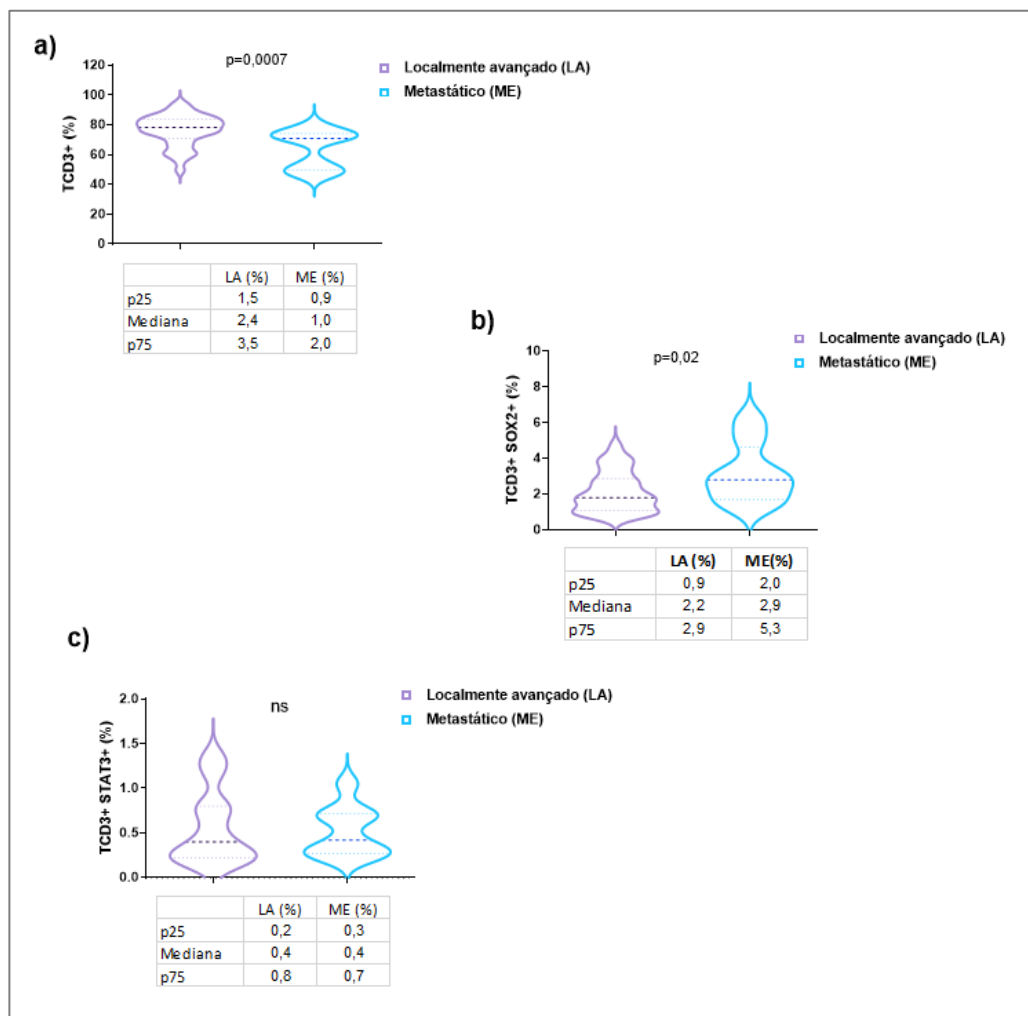


**Figura 10** - Análise dos níveis de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama luminal B (LB, n=19), HER2+ (n=17) e triplo negativo (TN, n=29) e de mulheres saudáveis (controles – CTRL, n=24). Os gráficos estão representados em valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75. Foi utilizado o teste *Kruskal Wallis* corrigido. Foi considerado  $p<0,05$ .



- **Comparação entre os grupos de pacientes com CM localmente avançado e metastático**

As pacientes com CM localmente avançado apresentaram níveis elevados de linfócitos TCD3 totais quando comparado ao grupo com doença metastática ( $p=0,0007$ ). Com relação TCD3+SOX2+, foram observados baixos níveis no grupo com CM localmente avançado comparado ao com doença metastática ( $p=0,02$ ) (Figura 1).

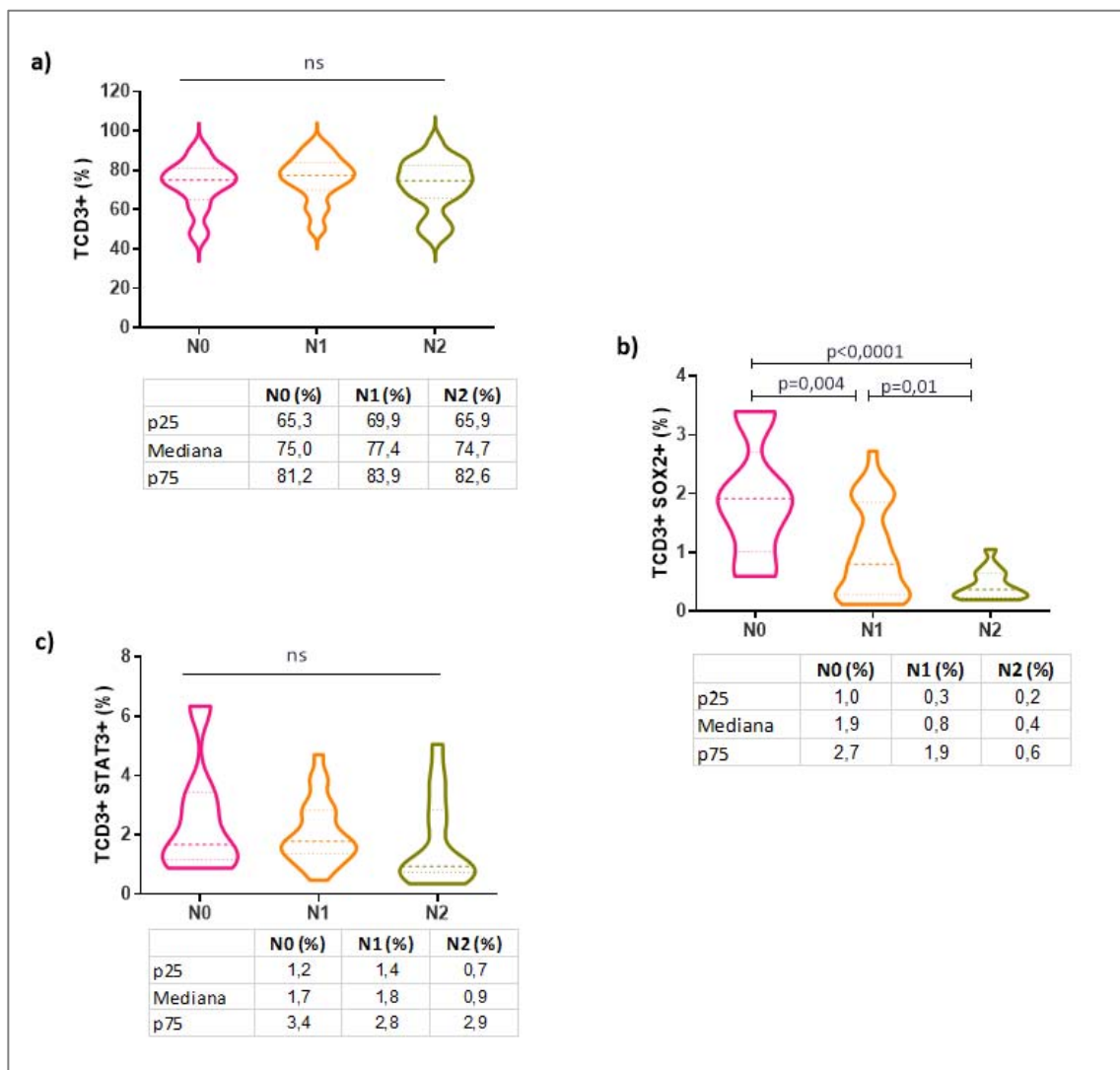


**Figura 11** - Análise dos níveis de linfócitos T ( $CD3^+$ ) totais, e com expressão de SOX2 ( $TCD3+SOX2^+$  e  $STAT3$  ( $TCD3+ STAT3^+$ ) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama localmente avançado (LA; estágio IIIA/B,  $n=51$ ) e com metástases (ME; estágio IV,  $n=14$ ). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste Mann Whitney. Foi considerado  $p<0,05$ .



- **Comparação entre os grupos de pacientes com CM de acordo com o comprometimento linfonodal**

As pacientes sem comprometimento linfonodal (N0) apresentaram níveis elevados de linfócitos TCD3+SOX2+ quando comparado aos grupos N1 ( $p=0,004$ ) e N2 ( $p<0,0001$ ). O grupo de pacientes com N1 apresentou níveis mais elevados linfócitos TCD3+SOX2+ comparado ao grupo N2 ( $p=0,01$ ). (Figura 12).



**Figura 12** - Análise dos níveis de linfócitos T ( $CD3^+$ ) totais, e com expressão de SOX2 (TCD3+SOX2+ e STAT3 (TCD3+ STAT3+)) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama de acordo com o comprometimento linfonodal N0 (n=10), N1 (n=35) e N2 (n=20). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste *Kruskal Wallis*. Foi considerado  $p<0,05$ .



---

#### **4.4 ANÁLISE NOS PACIENTES COM CANCER DE MAMA TRIPLO (CMTN) NEGATIVO LOCALMENTE AVANÇADO E METASTÁTICO**

- **Níveis de células CD44+, CD24NEG, CD44+/CD24neg com expressão de SOX2 e STAT3**

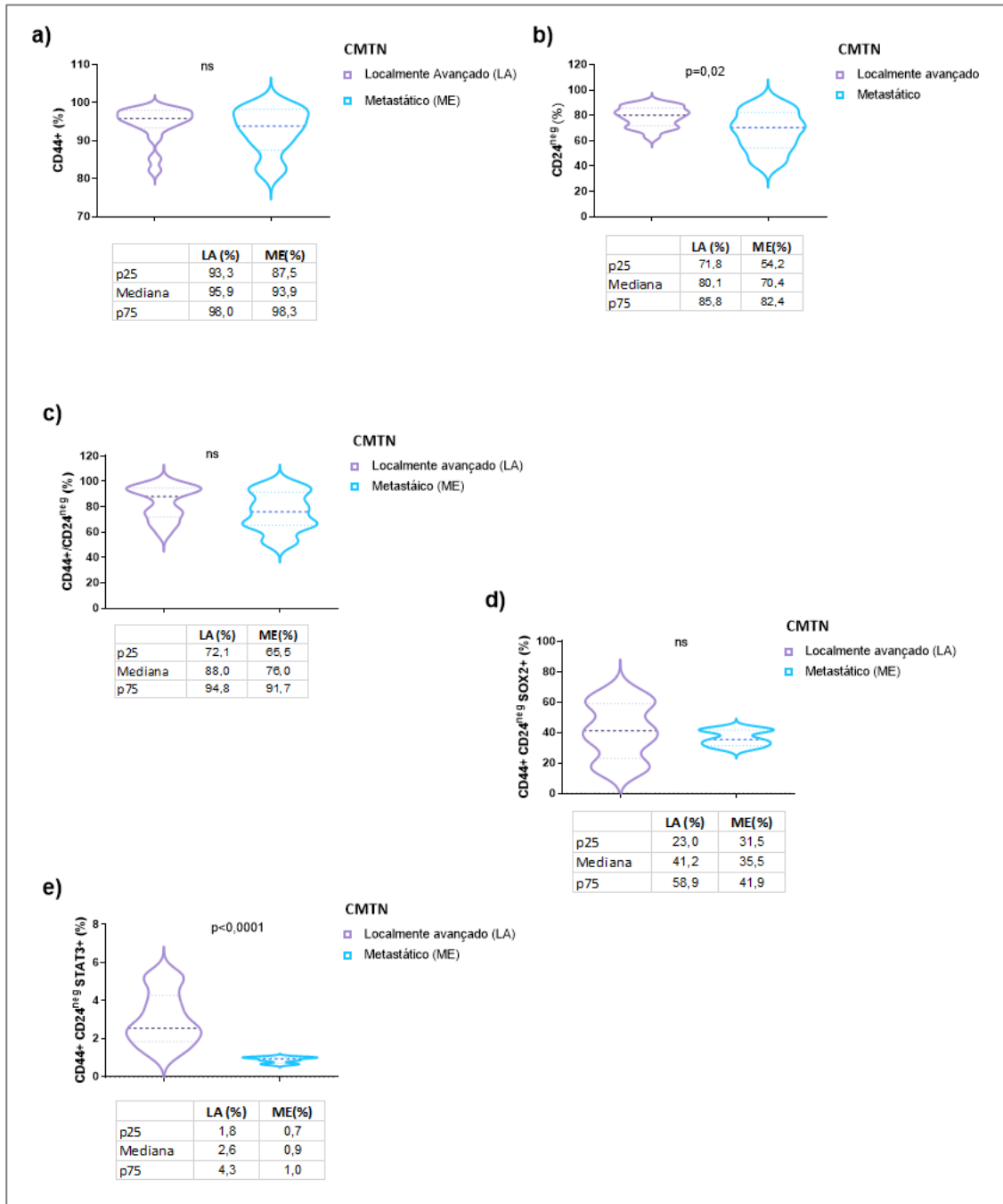
Como grupo de CMTN apresentava o maior número de pacientes (n=29), foi possível realizar a análise comparando pacientes com CM localmente avançado e metastático.

Foram observados níveis elevados de células CD24<sup>neg</sup> e CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> no sangue de pacientes com CMTN localmente avançado comparado ao grupo com doença metastática (p<0,05). A descrição dos valores de mediana, percentil 25 e p75 consta na Figura 13.

- **Níveis de linfócitos TCD3+ totais e com expressão de SOX2 e STAT3**

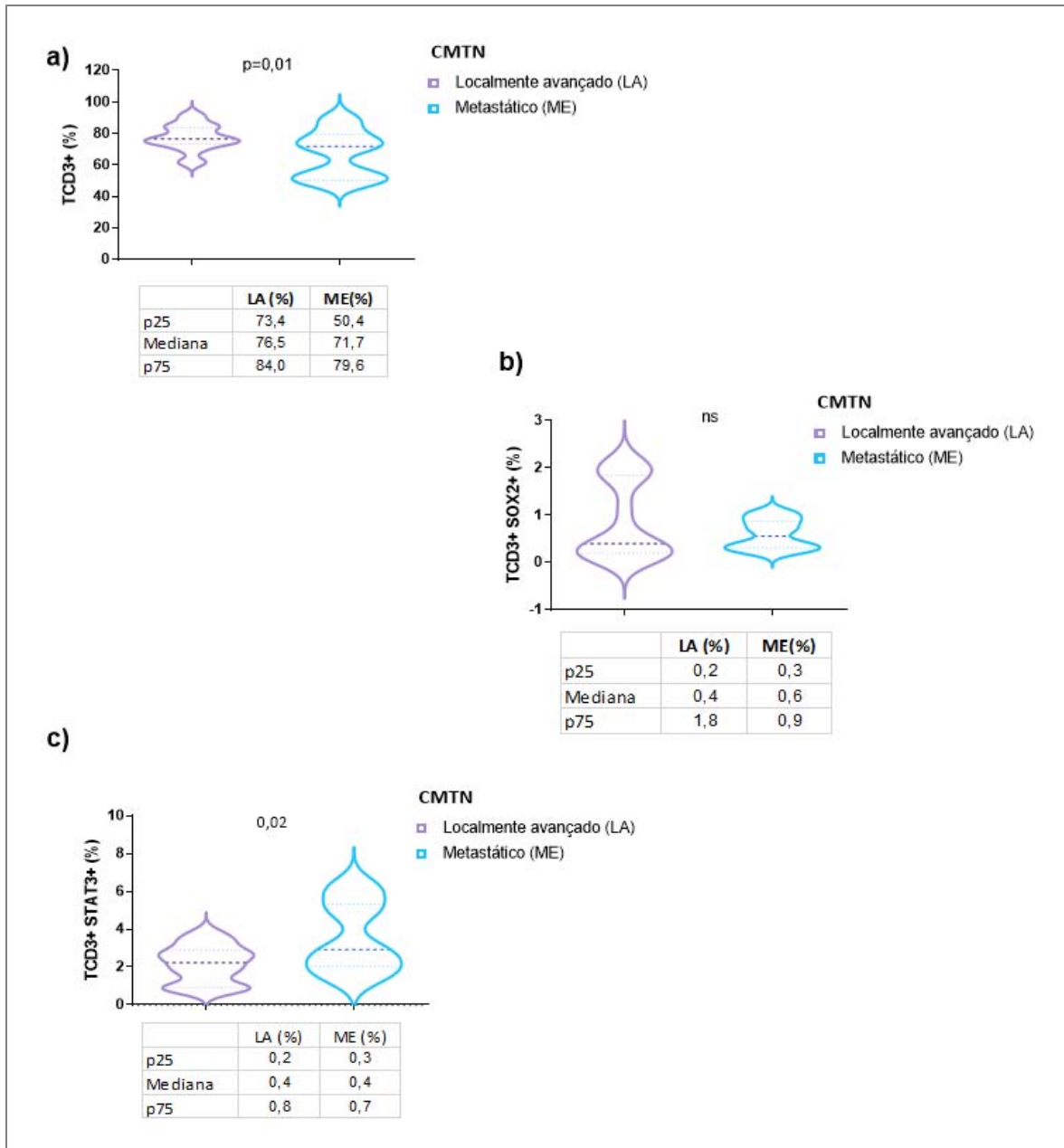
Foram observados níveis elevados de linfócitos TCD3<sup>+</sup> e baixos níveis de TCD3<sup>+</sup>STAT3<sup>+</sup> no sangue de pacientes com CMTN localmente avançado comparado ao grupo com doença metastática (p=0,01 e p=0,02, respectivamente; Figura 14).





**Figura 13** - Análise dos níveis de células CD44+, CD24<sup>neg</sup>, e de CD44+/CD24<sup>neg</sup> com expressão de SOX2 (CD44+/CD24<sup>neg</sup> / SOX2+) e de STAT3 (CD44+/CD24<sup>neg</sup> / STAT3+) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) localmente avançado (LA; estágio IIIA/B, n=20) e metastático (ME; estágio IV, n=9). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste Mann Whitney. Foi considerado p<0,05.





**Figura 14** - Análise dos níveis de linfócitos T ( $CD3^+$ ) totais, e com expressão de SOX2 ( $TCD3+SOX2+$  e  $STAT3$  ( $TCD3+ STAT3+$ ) no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) localmente avançado (LA; estágio IIIA/B,  $n=20$ ) e metastático (ME; estágio IV,  $n=9$ ). Os gráficos estão representados valores de mediana, percentil 25 (p25) e p75 em formato de box violino. Foi utilizado o teste Mann Whitney. Foi considerado  $p<0,05$ .







# DISCUSSÃO

---

---



---

## 5 DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços nas pesquisas nas últimas décadas, ainda há uma elevada incidência da mortalidade das mulheres com CM nos países em desenvolvimento como o Brasil. Diante das conquistas em tecnologia de diagnósticos por imagem e medicamentos para terapia alvo, ainda existem muitos tumores que apresentam resistência ao tratamento e grande poder de disseminação e óbito. Muitos pesquisadores tentam esclarecer quais os mecanismos que promovem essa elevada capacidade de invasão, disseminação e metástase tumoral, além de resistência as terapias existentes. Também há tentativas de explicar a relação entre o comportamento tumoral e a resposta imune do hospedeiro. Nesse caminho, os estudos têm evoluído para a avaliação de moléculas em culturas de células nos modelos animais e *in vitro*, mas no que tange ao estudo *in vivo* e principalmente, no sangue, ainda há poucos artigos publicados e nesta tese há uma direção para percorrer.

Nas pacientes estudadas nessa tese a maioria apresentava CM em estádios mais avançado com tumores maiores de 5 cm e axila comprometida no momento do diagnóstico. Tornando mais difícil o controle local do câncer e conseqüentemente favorecendo a evolução para doença metastática. Nos países em desenvolvimento os diagnósticos tardios são o principal desafio para controle do aumento da mortalidade. A maioria das pacientes estudadas apresentava mediana de idade de 47 anos, e corresponde aos achados mundiais de aumento da incidência e da mortalidade em mulheres com CM nessa faixa etária (Bray et al. 2018).

Os tumores apresentavam o subtipo triplo negativo mais frequente e esses tumores são os que apresentam características mais agressivas, com crescimento mais rápido, progridem facilmente para doença metastática e até o momento sem uma terapia alvo específica para tratamento desse subtipo tumoral. Acredita-se que alterações de moléculas específicas possam justificar o comportamento agressivo desses tumores e neste estudo comprovamos que o STAT3 é uma molécula envolvida nesses tumores, a via STAT3 foi apresentada como responsável pela resistência aos tratamentos e também pela sobrevivência da célula tumoral, pelos mecanismos de invasão e angiogênese através da fosforilação, dimerização e translocação nuclear do STAT3 quando interage com proteínas quinases e outras moléculas (Yang et al. 2012; Cho et al. 2019).



---

Nesse estudo mostramos um aumento dos níveis de expressão de CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> nos carcinomas localmente avançados quando comparados com carcinoma metastático. Acredita-se que na fase proliferativa do tumor exista um aumento dessa molécula e ativação dessa via para manter a biologia tumoral. Wang et al. (2018b) demonstraram um aumento de IL-22 nos tumores de mama TN, em consequência da ativação da via JAK-STAT3/MAPKS/AKT comparado a tecido normal de mama. A IL-22 está associada ao aumento da capacidade de migração e da resistência ao paclitaxel, medicamento utilizado nos tratamentos dos tumores TN.

A agressividade tumoral está diretamente associada ao status linfonodal e nesse estudo mais de 80% apresentavam axila clinicamente positivas no momento do diagnóstico, independente do subtipo tumoral. A associação com tumores de células tronco e status axilar pode ser visto nos estudos de Nogi et al. (2011) em que mostraram a associação de linfonodo sentinela positivo com a expressão da molécula CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> (Nogi et al. 2011). Esse estudo mostrou que não houve diferença estatística nos níveis de CD44<sup>+</sup>, STAT3<sup>+</sup> e SOX2<sup>+</sup>, com o comprometimento da axila de até 3 linfonodos comparados aos com mais de 4 linfonodos e com linfonodos livres de neoplasia atribuindo a esses achados ao maior percentual de doenças localmente avançadas e metastáticas mesmo nas pacientes com axila clinicamente negativas.

No estudo com 448 tumores primários de mama, McFarlane et al. (2015) apresentaram a relação entre o aumento da expressão de CD44 circulante com o aumento da recorrência a distância, diminuição do tempo livre de doença. Houve uma associação de tumores grandes de alto grau histológico e linfonodos positivos, o aumento da expressão de CD44 está relacionado diretamente com a adesão às células endoteliais e elevado poder metastático (McFarlane et al. 2015).

Quando se avalia a expressão do marcador de células tronco tumoral com os subtipos tumorais constatamos uma relação direta com o aumento da expressão de CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> no grupo das pacientes com CM se compararmos com o grupo controle, com  $p < 0,005$  e justificando a relação entre o potencial elevado do comportamento biológico tumoral e da agressividade da doença neoplásica no grupo com CM. Quando se compara com os subtipos tumorais constatamos que os subtipos Luminal B e TN apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle e com os demais subtipos com  $p < 0,005$ . Esses achados são semelhantes aos mostrados por Chekhum et al. (2015), eles avaliaram 132 pacientes com CM e a expressão de CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> por imunohistoquímica



---

nos diferentes subtipos tumorais e constatou que 44,8% das pacientes com TN apresentaram expressão de CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> elevada, eles também relacionaram com a sobrevida e a presença de metástases. Há uma relação direta entre a agressividade tumoral, independente do estágio em que se encontra a paciente, com o subtipo TN e o elevado potencial de metástase. Esse marcador pode ser preditivo de indicação de agressividade e justifica a relação entre os achados das doenças metastáticas com a presença de marcadores de células tronco (Chekhun et al. 2015; Zhang et al. 2018).

O segundo subtipo mais frequente nessa tese foram os tumores luminais B que correspondem a 29,23% das pacientes estudadas e nesse subgrupo tem-se uma heterogeneidade, na qual, alguns pacientes apresentam melhor desfecho clínico e outras piores, mesmo apresentando as mesmas características clínico patológicas. Observamos predomínio de doença localmente avançada, a presença de subtipo Luminal B está relacionado ao pior prognóstico nas pacientes que tem baixos níveis de receptores de estrógeno e progesterona e nas pacientes que apresentavam receptor HER2+ além da associação com elevado índice de proliferação celular, o KI-67. Mesmo neste grupo de pacientes que tem a possibilidade de tratamento com a hormonioterapia e quimioterapia como terapias sistêmicas (Ades et al. 2014).

Um marcador de superfície para células troncos, como o CD44+, que já está associado a tumores mais agressivos pode ser um fator preditivo de pior prognóstico, sendo possível que o surgimento de drogas que bloqueiam essa molécula, sirva como terapia alvo e possa mudar o prognóstico do CM. As células tronco tumorais apresentam fenótipo CD44+/CD24<sup>neg</sup> expressam maior heterogeneidade tumoral e resistência aos tratamentos atuais (Yousefnia et al. 2020).

Alguns autores demonstraram que nos subtipos luminais podem ocorrer resistência aos tratamentos hormonais e evoluir para apresentações clínicas mais agressivas, apresentando uma associação entre a resistência ao tratamento desse subtipo com a expressão elevada de marcadores de células tronco tumorais, a expressão de CD44<sup>high</sup> foi relacionada a resistência ao tratamento padrão e estadiamento avançado dos subtipos luminais (Uchiumi et al. 2019).

O subtipo HER2+ estava presente em 26,15% das pacientes avaliadas e esse subtipo apresenta uma terapia alvo que promove o controle do crescimento tumoral e progressão da doença, como anti-HER2, denominado trastuzumabe que é um anticorpo monoclonal, humanizado, derivado do DNA recombinante que se liga com alta afinidade ao Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. Alguns medicamentos quimioterápicos foram



---

modificados com ligação a moléculas que conferem mais ação e impedem que os sinais para a multiplicação de células tumorais se propagem para o núcleo da célula como a T-DM1 que é um anticorpo monoclonal associado ao quimioterápico.

A molécula HER2 também participa do processo de ativação e fosforilação através de sinais transmembrana. Quanri et al. (2011) apresentaram a relação entre os níveis séricos de CD44 solúvel (sCD44) em pacientes com CM em estágios clínicos inicial, avançado e metastático, sendo os níveis de sCD44 sérico foram mais elevados nos pacientes com metástases a distância. A taxa de sobrevida global não diferiu entre os pacientes com alta concentração de sCD44 e mesmo quando as pacientes apresentavam baixa concentração de sCD44 solúvel. No entanto, a concentração de sCD44 foi um preditivo de sobrevida global no câncer de Mama HER2+, enquanto nenhuma diferença nas taxas de sobrevida global foi observada em pacientes com câncer de mama HER2 negativo. Esse estudo apresenta uma associação entre níveis sCD44 de circulação e sobrevivência em pacientes de CM HER2+. Esses resultados sugerem um papel para o sCD44 como marcador prognóstico.

Além disso, o nível sCD44 pode oferecer um novo alvo terapêutico clínico no CM HER2-positivo (Quanri et al. 2011). Quanto ao tratamento com terapia alvo já existem em comercialização vários medicamentos que estão sendo indicados para tratamento de CM nesse subtipo e em pacientes com doença metastática.

Para aprofundar a investigação dos linfonodos, em estudos prospectivos com número maior de casos pode-se determinar o real significado clínico dos achados CD44+ em sangue periférico. Em 2007, alguns autores relataram a relação do CD44 com a indução da metástase hepática e a expressão solúvel de CD44 em modelos animais (Ouhtit et al. 2007). Esses autores descreveram as vias que ativam o CD44+ e promovem a invasão tumoral em CM (Ouhtit et al. 2018).

Para avaliar a molécula de STAT3 no CM, vários autores apresentaram a relação entre a ativação dessa molécula com a proliferação, sobrevivência e angiogênese, após estimulação por diversas quinases e fatores de crescimento que subsequentemente são responsáveis pela dimerização e ativação. Através das tirosinas cinases, a molécula de STAT3 pode ser translocadas do citoplasma para o núcleo e em alvos específicos regulam a transcrição genica (Zhi et al. 2016).

Na avaliação de terapias alvos específicas, os tumores HER2 positivos são estudados e avaliados quanto a ativação da molécula de STAT3 e foi apresentada, por alguns autores, como



---

um mecanismo desenvolvido para resistência ao tratamento medicamentoso já existente, essa ativação de STAT3 parece funcionar como gatilho para ativar outras moléculas. Essa via, talvez, no futuro também possa ser alvo de novos tratamentos que tente impedir a progressão e disseminação do CM (Wang et al. 2018a).

A ativação exacerbada e persistente das moléculas STAT3 é uma consequência de alterações tumorais que ativam ou não essas moléculas. O processo de ativação depende da interação com outras moléculas como receptores de IL-6, JAK e da fosforilação de cinases que podem tornar o STAT3 capaz de modular a resposta do hospedeiro no núcleo da célula.

Em nosso estudo, observamos um aumento dos níveis de STAT3 nas pacientes com CM localmente avançados comparado as com doença metastática. Acredita-se que níveis aumentados de STAT3 podem estar presentes nos subtipos de CM devido processo contínuo de ativação dos mecanismos tumorais associados a produção de fatores de crescimento e divisão celular (Gkouveris et al. 2015; Gyamfi et al. 2018).

O STAT3 parece participar como uma molécula responsável pela resposta imune, impedindo a imunossupressão. A molécula STAT3 ela está relacionada a expressão antiapoptótica e pro-proliferativo dos oncogenes, mas ela também participa da modulação das respostas imunes do hospedeiro e todas essas atividades regulam o processo de proliferação, invasão, angiogênese e metástase. Essa molécula participa do processo de imunossupressão. Essa imunossupressão se dar pela potente regulação negativa dos linfócitos T *helper* que também é um importante ativador de genes cruciais para imunossupressão.

Yu et al. (2007) demonstraram que a ativação constitutiva de STAT3 leva a uma inibição da expressão de mediadores necessários para a ativação da resposta imune contra células tumorais, além disso, a atividade de STAT3 promove a produção de fatores imunossupressores que ativam mais moléculas de STAT3 em diversos subconjuntos de células imunes, alterando programas da expressão gênica e, desse modo, inibindo respostas imunes antitumorais.

Alterações na regulação de STAT3 podem resultar em uma resposta de fase aguda anormal, levando à produção elevada de citocinas que pode causar supressão da resposta imune no microambiente tumoral. Por sua vez, isso pode proporcionar um cenário ideal para a evasão tumoral e metástase (Resemann et al. 2014). Neste estudo, observou- níveis baixos de linfócitos T STAT3+ nas pacientes com CM HER2+ e TN comparado aos controles e LB. Feng et al. (2016) mostraram que STAT3 é uma das principais vias de ativação para diferenciação em



---

células TH17, estando envolvidas na progressão tumoral e aumento de células T reguladores associadas ao tumor.

Na análise isolada do grupo de pacientes CM triplo negativo localmente avançado, observamos nível elevado de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> STAT3<sup>+</sup> e reduzido de linfócitos TCD3<sup>+</sup> STAT3<sup>+</sup> comparado ao grupo TN metastático. O STAT3 é super expresso e ativado constitutivamente no TN, o que está altamente relacionado à iniciação, progressão, metástase do TN, resistência à quimioterapia e resultados de sobrevida desfavorável. STAT3 não é apenas capaz de induzir a expressão de genes relacionados ao câncer, mas também interage fisicamente e coopera funcionalmente com outros fatores de transcrição oncogênicos, promovendo a agressividade de TN (Sirkisoon et al. 2018).

A resistência ao tratamento do CM nos modelos com RE<sup>+</sup> com uso de tamoxifeno, o medicamento com ação antagonista do RE, apresentou alterações quanto a sua ação sendo associado a elevada expressão de SOX2. Isso sugere que a expressão elevada de SOX2 está diretamente relacionada a pior prognóstico nas pacientes com CM (Huang et al. 2014).

O SOX2 está intrinsecamente envolvido em muitos processos associados ao câncer, como a proliferação celular, evasão da apoptose celular e metástase através de interações com a sinalização EGFR e várias outras vias e processos oncogênicos, essas interações também foram relacionadas com culturas de células tumorais (Liang et al. 2013).

Nesse estudo, observamos níveis elevados de linfócitos T totais e com expressão de SOX2<sup>+</sup> no estágio localmente avançado. A molécula de SOX2 ativadas estão presentes nos linfócitos Treg no processo de tumorigênese e promove alterações nos mecanismos antitumorais dos hospedeiros, além disso, esses níveis aumentados podem sinalizar uma evolução desfavorável para essas pacientes (Ormsbee Golden et al. 2013; Xu et al. 2017).

SOX2 funciona como fator de transcrição no núcleo para regular genes oncogênicos e quando super expresso participa da tumorigênese, angiogênese e dos processos de invasão e metástase. Porém, existem mecanismos próprios de controles que explicam que auto renovação e a pluripotência das células-tronco embrionárias que são reguladas por uma rede altamente integrada de fatores essenciais de transcrição, na qual inclui SOX2 como molécula chave para todos os mecanismos de tumorigênese (Ormsbee Golden et al. 2013; Xu et al. 2017).

Os níveis percentuais de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>neg</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> e CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup>/SOX2<sup>+</sup> foram elevados nas pacientes com CM comparado aos controles neste estudo. Em vários estudos, foram demonstrados a relação de CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>neg</sup> com as células tronco tumorais, e



---

SOX2 ativa genes e interferem nos mecanismos ontogenéticos (Yu et al. 2007; Marotta et al. 2011; Chekhun et al. 2015).

Em nosso estudo não abordamos a sobrevida, mas constatamos que os níveis percentuais de CD44+, e CD44+/CD24<sup>neg</sup>/SOX2+ foram elevados no sangue nas pacientes com CM LB, HER2+ e TN comparado ao grupo controle. No tecido tumoral, foram observados uma relação da expressão de CD44 e SOX2 no processo de tumorigênese, invasão e metástase por CM (Jung et al. 2015a). Huang et al. 2014 compararam as características clínicas de pacientes com CM e metástases axilares que apresentavam elevada expressão de SOX2, sendo significativa a expressão de SOX2 e independente dos outros fatores comuns de prognóstico incluindo o grau, tamanho do tumor, RE, e status de HER2 (Huang et al. 2014).

Nos tumores subtipo TN, vários autores tentaram associar o tratamento com paclitaxel ao silenciamento do gene SOX2 como uma forma de promover a diminuição da capacidade de invasão, inibir o crescimento de células tronco tumorais e evitar a resistência medicamentosa nas pacientes com CM com tumores TN (Mukherjee et al. 2017).

Na análise dos marcadores nos linfócitos T circulantes demonstraram que a expressão da molécula de SOX2 foi elevada em todos os subtipos tumorais se comparado aos controles e essa molécula nuclear tem relação direta com o processo de divisão celular. Outros autores demonstraram que em colônias de células a expressão molécula SOX2 apresentavam relação com vários genes que participam do processo da tumorigênese nas células tronco tumorais, essa interação foi vista também por outros autores que relacionados a metástase do CM e a expressão de SOX2 principalmente nos tumores do subtipo TN.

Foi demonstrado o envolvimento de SOX2 no processo de regulação do ciclo celular, diferenciação e participando da regulação da expressão de microRNAs. Todos os caminhos levam a associação da molécula de SOX2 com o controle da proliferação e a migração de células no CM (Jung et al. 2014; Liu et al. 2017; Oliphant et al. 2019). O SOX2 funciona como fator de transcrição e apresenta interação com RNA de cadeia longa não codificado, que são RNAs que apresentam mais de 200 nucleotídeos e sem capacidade de codificar proteínas, como um *plasmacytoma variant transcription*. Nesse caso, o fator de transcrição o SOX2 quando super expresso está associado a progressão do câncer de mama através da proliferação celular e da tumorigênese, assim como as recorrências e metástases (Li et al. 2017).

O CM triplo negativo que tem pior prognóstico, apesar de apresentar uma maior resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante, representa um desafio para os





---

estudiosos encontrar um tratamento específico a partir de um marcador de superfície ou nuclear que seja capaz de bloquear as vias de proliferação celular e impedir a evolução para metástase e óbito, vários tratamentos são empregados, porém nenhum como terapia alvo para este tipo de neoplasia (Sirkisoon et al. 2018).

Existe uma busca por marcadores pouco invasivos que possam servir para o diagnóstico e prognóstico no câncer. O STAT3 e SOX2 foram descritos como importantes fatores de transcrição para progressão tumoral. Essas moléculas no CM podem estar relacionadas ao pior prognóstico e são potenciais biomarcadores nos tumores de mama, sendo a sua utilização indicar à resposta a quimioterapia.

Segundo estudo de Sodja et al. (2016) a expressão de RNAm de SOX2 no sangue periférico foi um marcador promissor para triagem molecular de câncer de cabeça e pescoço e importante marcador prognóstico nos pacientes com doença avançada tratados com quimioterapia neoadjuvante, indicando um papel importante na disseminação de células tumorais circulantes e doença metastática.

Também é importante ressaltar que estudos comparando níveis de marcadores no sangue com metodologias quantitativas reduz os vieses das análises do tecido tumoral por técnica de imuno-histoquímica por ser um método semiquantitativos. Além disso, a investigação desses marcadores no sangue periférico apresenta algumas vantagens como ser menos invasiva, de fácil acesso e possibilita análises desde o diagnóstico, tratamento e recidiva. Esse estudo amplia o conhecimento sobre a participação do SOX2+, STAT3+, CD44 e CD24 no câncer de mama e mostra o potencial dessas moléculas para novas abordagens terapêuticas.





# CONCLUSÃO



## 6 CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo foi possível concluir:

- Foi possível determinar os níveis de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>low</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>, CD44+CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> e CD44+CD24<sup>neg</sup>SOX2<sup>+</sup>, e de TCD3+SOX2<sup>+</sup> e TCD3+STAT3<sup>+</sup> no sangue de pacientes e controles;
- Os níveis percentuais de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>low</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>, CD44+CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> e CD44+CD24<sup>neg</sup>SOX2<sup>+</sup>, e de TCD3+SOX2<sup>+</sup> e TCD3+STAT3<sup>+</sup> no sangue são diferentes entre os pacientes e controles;
- Existem diferenças dos níveis de CD44+CD24<sup>neg</sup> e CD44+CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup>, e de TCD3<sup>+</sup> e TCD3+SOX2<sup>+</sup> entre os pacientes com CM localmente avançado e metastático;
- Não houve diferenças nos níveis de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>low</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>, CD44+CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> e CD44+CD24<sup>neg</sup>SOX2<sup>+</sup> entre os pacientes sem e com comprometimento linfonodal;
- Os níveis de TCD3+SOX2<sup>+</sup> foram diminuídos no grupo de pacientes com comprometimento linfonodal (N1 e N2);
- Os pacientes com CM HER2<sup>+</sup> apresentaram níveis de linfócitos TCD3+SOX2<sup>+</sup> e TCD3+STAT3<sup>+</sup> mais reduzidos que os subtipos TN e LB;
- Na análise do grupo de paciente com CMTN localmente avançado, os níveis de CD44+CD24<sup>neg</sup>STAT3<sup>+</sup> foram elevados e diminuídos de TCD3+STAT3<sup>+</sup>;
- Os níveis de moléculas CD44, CD24, SOX2<sup>+</sup> e STAT3<sup>+</sup> no sangue mostraram ser alterados em pacientes com CM em estágios avançados.





---

## 7 REFERÊNCIAS

Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, De Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2794–803.

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J*. 1998;12(12):1241–51.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.

Amin MB. *AJCC cancer staging manual*. 8<sup>th</sup> ed. Chicago: Springer; 2018. Breast; p.598-628.

An H, Kim JY, Oh E, Lee N, Cho Y, Seo JH. Salinomycin Promotes Anoikis and Decreases the CD44+/CD24- Stem-Like Population via Inhibition of STAT3 Activation in MDA-MB-231 Cells. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141919.

Arasu VA, Miglioretti DL, Sprague BL, Alsheik NH, Buist DSM. Population-based assessment of the association between magnetic resonance imaging background parenchymal enhancement and future primary breast cancer risk. *J Clin Oncol*. 2019;27(12):954-63.

de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504–13.

Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014;23(3):409–22.

Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2009;41(11):1238–42.



- 
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2(5):444–55.
- Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2009;15(2):91–102.
- Bolton KL. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012;307(4):382.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A J Clin.* 2018;00(00):1–31.
- Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2014;1845(2):182–201.
- Chekhun S V., Zadvornyy T V., Tymovska YO, Anikusko MF, Novak OE, Polishchuk LZ. CD44+/CD24- Markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol.* 2015;37(1):58–63.
- Chen S-H, Murphy D, Lassoued W, Thurston G, Feldman MD, Lee WMF. Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(12):1994–2003.
- Chen S, Xu Y, Chen Y, Li X, Mou W, Wang L, et al. SOX2 Gene Regulates the Transcriptional Network of Oncogenes and Affects Tumorigenesis of Human Lung Cancer Cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e36326.
- Cho TM, Kim JY, Kim YJ, Sung D, Oh E, Jang S, et al. C-terminal HSP90 inhibitor L80 elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition. *Cancer Lett.* 2019;447(December 2018):141–53.
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1555-9.



- 
- Chou Y-T, Lee C-C, Hsiao S-H, Lin S-E, Lin S-C, Chung C-H, et al. The Emerging Role of SOX2 in Cell Proliferation and Survival and Its Crosstalk with Oncogenic Signaling in Lung Cancer. *Stem Cells*. 2013;31(12):2607–19.
- Chung SS, Aroh C, Vadgama J V. Constitutive activation of STAT3 signaling regulates hTERT and promotes stem cell-like traits in human breast cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e83971.
- Cox JL, Wilder PJ, Gilmore JM, Wuebben EL, Washburn MP, Rizzino A. The SOX2-interactome in brain cancer cells identifies the requirement of MSI2 and USP9X for the growth of brain tumor cells. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62857.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58(1):267–84.
- Darnell J, Kerr I, Stark G. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* (80- ). 1994;264(5164):1415–21.
- Darnell JE Jr. STATs and Gene Regulation. *Science* (80- ). 1997;277(5332):1630–5.
- Devi KR, Kuruvila S, Musa MM. Pathological prognostic factors in breast carcinoma. *Saudi Med J*. 2000;21(4):372–5.
- Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple Negative Breast Carcinoma and the Basal Phenotype: From Expression Profiling to Clinical Practice. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(6):419–30.
- Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*. 2015;34(17):2239–50.
- Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrris A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(1):1–8.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471–4.
- Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403–10.



- 
- Feng S, Chen XM, Wang JF, Xu XQ. Th17 cells associated cytokines and cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(19):4032–40.
- Feng X, Lu M. Expression of sex-determining region Y-box protein 2 in breast cancer and its clinical significance. *Saudi Med J.* 2017;38(7):685–90.
- Friedewald SM, Rafferty EA, Rose SL, Durand MA, Plecha DM, Greenberg JS, et al. Breast cancer screening using tomosynthesis in combination with digital mammography. *JAMA.* 2014;311(24):2499.
- Fulop T, Le Page A, Garneau H, Azimi N, Baehl S, Dupuis G, et al. Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection. *Longev Heal.* 2012;1(1):6.
- Gkouveris I, Nikitakis N, Sauk J. STAT3 Signaling in Cancer. *J Cancer Ther.* 2015;6:709-26.
- Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care.* 2011;6(2):136–41.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736–47.
- Gyamfi J, Lee Y, Eom M, Choi J. Interleukin-6 / STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci Rep.* 2018;(May):1–13.
- Honeth G, Bendahl P-O, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53.
- Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JYS, Chan SK, Lui PCW, et al. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology.* 2014;64(4):494–503.
- Jung K, Gupta N, Wang P, Lewis JT, Gopal K, Wu F, et al. Triple negative breast cancers comprise a highly tumorigenic cell subpopulation detectable by its high responsiveness to a Sox2 regulatory region 2 (SRR2) reporter. *Oncotarget.* 2015a;6(12):10366–73.





- 
- Jung K, Gupta N, Wang P, Lewis JT, Gopal K, Ye X, et al. Triple negative breast cancers comprise a highly tumorigenic cell subpopulation detectable by its high responsiveness to a Sox2 regulatory region 2 ( SRR2 ) reporter. *Oncotarget*. 2015b;6(12):10366–73.
- Jung K, Wu F, Wang P, Ye X, Abdulkarim BS, Lai R. YB-1 regulates Sox2 to coordinately sustain stemness and tumorigenic properties in a phenotypically distinct subset of breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–13.
- Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):1–14.
- Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour Biological Aspects of CD24, A Mucin-Like Adhesion Molecule. *J Mol Histol*. 2003;35(3):255–62.
- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, et al. Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2353–8.
- Lee J-H, Kim S-H, Lee E-S, Kim Y-S. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1149-56.
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2011;31:1354–65.
- Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep*. 2017 Oct 23;7(1):13856.
- Liang S, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J, et al. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(2):205–11.
- Lin GG, Scott JG. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227-42.



---

Liu AY, Cai Y, Mao Y, Lin Y, Zheng H, Wu T, et al. Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):537–45.

Liu K, Xie F, Gao A, Zhang R, Zhang L, Xiao Z, et al. SOX2 regulates multiple malignant processes of breast cancer development through the SOX2 / miR-181a-5p , miR-30e-5p / TUSC3 axis. *Mol Cancer*. 2017 Mar 14;16(1):62.

Marotta LLC, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24– stem cell–like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2723-35.

McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, O’Grady A, McFarlane C, Montgomery N, et al. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015 May 10;6(13):11465-76.

Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep*. 2017 Aug 23;7(1):9170.

Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat Med*. 2001;7(5):552–6.

Nogi H, Suzuki M, Kamio M, Kato K, Kawase K, Toriumi Y, et al. Impact of CD44+CD24– cells on non-sentinel axillary lymph node metastases in sentinel node-positive breast cancer. *Oncol Rep*. 2011;25(4):1109–15.

Oliphant MUJ, Vincent MY, Galbraith MD, Pandey A, Zaberezhnyy V, Rudra P, et al. SIX2 Mediates Late-Stage Metastasis via Direct Regulation of SOX2 and Induction of a Cancer Stem Cell Program. *Cancer Res*. 2019 Feb 15;79(4):720-734.

Ormsbee Golden BD, Wuebben EL, Rizzino A. Sox2 Expression Is Regulated by a Negative Feedback Loop in Embryonic Stem Cells That Involves AKT Signaling and FoxO1. *PLoS One*. 2013;8(10):e76345.

Ouhtit A, Abd Elmageed ZY, Abdraboh ME, Lioe TF, Raj MHG. In vivo evidence for the role of CD44s in promoting breast cancer metastasis to the liver. *Am J Pathol*. 2007;171(6):2033–9.



- 
- Ouhtit A, Rizeq B, Saleh HA, Rahman MDM, Zayed H. Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion. *Int J Biol Sci.* 2018;14(13):1782–90.
- Page DL, Fitzgibbons PL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic Factors in Breast Cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;124:966–78.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160–7.
- Peppercorn J, Partridge AH. Breast cancer in young women: a new color or a different shade of pink? *J Clin Oncol.* 2008;26(20):3303–5.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52.
- Quanri JB, Joe J, Baek JM, Jin Q, Ensor J, Boulbes DR, et al. Serum CD44 levels and overall survival in patients with HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(3):1029–36.
- Radenkovic S, Milosevic Z, Konjevic G, Karadzic K, Rovcanin B, Buta M, et al. Lactate dehydrogenase, catalase, and superoxide dismutase in tumor tissue of breast cancer patients in respect to mammographic findings. *Cell Biochem Biophys.* 2013 Jun;66(2):287-95.
- Ren C, Ren T, Yang K, Wang S, Bao X, Zhang F, et al. Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G1/S arrest in Ewing’s sarcoma through the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):44.
- Resemann HK, Watson CJ, Lloyd-Lewis B. The stat3 paradox: a killer and an oncogene. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):603–11.
- Rizzino A. The Sox2-Oct4 Connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells.* 2013;31(6):1033–9.
- Santos MO. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. *Rev Bras Cancerol.* 2018;64(1):119–20.
- Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26(suppl 5):v8–30.



---

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*. 2009;138(5):822–9.

Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, Tan BKH, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014;1845(2):136–54.

Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Anderson A, Harrison A, Lange AM, et al. Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative breast cancers and HER2-enriched breast cancer. *Oncogene*. 2018;37(19):2502–14.

Siveen KS, Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014;1845(2):136–54.

Sodja E, Rijavec M, Koren A, Sadikov A, Korošec P, Cufer T. The prognostic value of whole blood SOX2, NANOG and OCT4 mRNA expression in advanced small-cell lung cancer. *Radiol Oncol*. 2016 Apr 23;50(2):188-96.

Sonnenblick A, Brohée S, Fumagalli D, Vincent D, Venet D, Ignatiadis M, et al. Constitutive phosphorylated STAT3-associated gene signature is predictive for trastuzumab resistance in primary HER2-positive breast cancer. *BMC Med*. 2015;13(1):177.

Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005–14.

Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012;36(4):503–14.

Suyang G, Wei G, Mingliang Z, Yong C. Expression of signal transducer and activator of transcription 3 in breast cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther*. 2015;11(5):56.

Tsunoda Y, Sakamoto M, Sawada T, Sasaki A, Yamamoto G, Tachikawa T. Characteristic genes in luminal subtype breast tumors with CD44+CD24–/low gene expression signature. *Oncology*. 2011;81(5–6):336–44.

Uchiumi K, Tsuboi K, Sato N, Ito T, Hirakawa H, Niwa T, et al. Cancer stem-like properties of hormonal therapy-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer*. 2019 Jul;26(4):459-70.



---

Urban LABD, Chala LF, Bauab S di P, Schaefer MB, Santos RP dos, Maranhão NM de A, et al. Breast cancer screening: updated recommendations of the Brazilian College of Radiology and Diagnostic Imaging, Brazilian Breast Disease Society, and Brazilian Federation of Gynecological and Obstetrical Associations. *Radiol Bras.* 2017;50(4):244–9.

Verma C, Eremin JM, Robins A, Bennett AJ, Cowley GP, El-Sheemy MA, 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 ch. *J Transl Med.* 2013;11(1):1.

Wang L, Wang Q, Gao M, Fu L, Li Y, Quan H, et al. STAT3 activation confers trastuzumab-emtansine (T-DM1) resistance in HER2-positive breast cancer. *Cancer Sci.* 2018a;109(10):3305–15.

Wang S, Yao Y, Yao M, Fu P, Wang W. Interleukin-22 promotes triple negative breast cancer cells migration and paclitaxel resistance through JAK-STAT3/MAPKs/AKT signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018b;503(3):1605–9.

Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(2):241–56.

Wu K, Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, et al. The role of CD44 in epithelial&ndash;mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3783.

Xu Y, Dong X, Qi P, Ye Y, Shen W, Leng L, et al. Sox2 communicates with tregs through CCL1 to promote the stemness property of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2017;35(12):2351–65.

Yang CM, Chiba T, Groner B. Expression of reprogramming factors in breast cancer cell lines and the regulation by activated Stat3. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2012 Jun;10(2):241-8.

Ye X, Wu F, Wu C, Wang P, Jung K, Gopal K, et al.  $\beta$ -Catenin, a Sox2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of Sox2 in breast cancer cells. *Cell Signal.* 2014 Mar;26(3):492-501.



---

Yousefnia S, Seyed Forootan F, Seyed Forootan S, Nasr Esfahani MH, Gure AO, Ghaedi K. Mechanistic Pathways of Malignancy in Breast Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 2020 Apr 30;10:452.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(1):41–51.

Zhang J, Chang DY, Mercado-Uribe I, Liu J. Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(9):1405–12.

Zhang JM, Wei K, Jiang M. OCT4 but not SOX2 expression correlates with worse prognosis in surgical patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2018;25(4):447–55.

Zhi E, Chai P, Shanmugam MK, Arfuso F, Dharmarajan A, Wang C, et al. Pharmacology & Therapeutics Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy. *Pharmacol Ther.* 2016;162:86–97.

Zhou N, Zhang Y, Zhang X, Lei Z, Hu R, Li H, et al. Exposure of tumor-associated macrophages to Apoptotic MCF-7 cells promotes breast cancer growth and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):11966–82.





# APÊNDICE E ANEXOS

---

---



**Apêndice 1** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

**Título da Pesquisa:** Avaliação da expressão de SOX2, STAT3 E CD44 em pacientes com câncer de mama de estadiamento inicial e avançado

**Pesquisadora Responsável pela pesquisa:** Dra. Denise Sobral Viana. (*Mastologista do hospital de Cancer de Pernambuco – HCP*).

**Pesquisadores envolvidos:** Dr. Victor Piana de Andrade (Anatomia Patológica, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo) e Dra. Leuridan Cavalcante Torres (*Diretora de pesquisa do IMIP, Recife*).

A Sra está sendo convidada a participar do estudo "Avaliação da expressão de SOX2, STAT3 E CD44 em pacientes com câncer de mama de estadiamento inicial e avançado" porque foi recentemente diagnosticada com câncer de mama. O estudo tem como finalidade a análise de amostras de sangue coletadas antes do início do tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. O estudo estudará o sangue por citometria de fluxo, um método comum e bem estabelecido nos laboratórios de diagnóstico mas pouco usado para estudar o câncer de mama. O estudo pretende encontrar novos marcadores tumorais que nos ajudem a fazer um diagnóstico melhor do câncer e que nos ajude a saber com antecedência quais pacientes irão responder bem ou mal ao tratamento indicado. Se confirmados, os marcadores poderiam auxiliar na determinação do melhor tratamento para pacientes diagnosticados com câncer de mama no futuro. Não há benefícios imediatos para você. Os possíveis benefícios são para as pacientes diagnosticados com câncer de mama no futuro.

Sua participação é inteiramente voluntária e a recusa não acarretará nenhum prejuízo no seu tratamento. Se aceitar participar neste momento, poderá, a qualquer momento, desistir de participar, devendo para isto apenas comunicar um dos pesquisadores, e esta decisão não acarretará nenhum prejuízo ao seu tratamento nesta instituição.





---

Se aceitar participar, a Sra será submetida à coleta de 20 ml de sangue (na veia do braço, com seringas e agulhas descartáveis; os mesmos da coleta de sangue comum que serão realizadas periodicamente como forma de acompanhamento de sua doença). Os riscos envolvidos incluem, além de algum tempo de espera adicional, dor de pequena intensidade e curta duração no local de punção da veia, vermelhidão na pele e sangramento de pequeno volume no caso de uso de outros medicamentos ou por alterações sanguíneas decorrentes da quimioterapia.

A participação nesta pesquisa não gerará nenhuma despesa para você e, por isso, não haverá nenhuma forma de reembolso pela doação de sangue.

As amostras serão armazenadas em freezers no laboratório até o momento do processamento e extração das moléculas, ficando sempre identificadas apenas sob um número de pesquisa (sem nome, registro hospitalar ou data), garantindo total sigilo. Ninguém além dos pesquisadores principais saberão que estas amostras são suas. As informações sobre o endereço e telefone para contato dos participantes da pesquisa serão armazenadas em computador, protegido com senha, com acesso limitado aos responsáveis pela pesquisa.

Caso concorde em participar, uma cópia assinada deste termo de consentimento lhe será entregue antes do início de qualquer procedimento relacionado à pesquisa. Gostaríamos de reforçar que sua participação neste estudo é voluntária. Você pode desistir de continuar no estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isso acarrete prejuízo algum para seu tratamento ou acompanhamento médico. No caso de dúvidas ou necessidade de qualquer esclarecimento adicional, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis nos seguintes telefones ou e-mails:

**Dra. Denise Sobral Viana**

(81) 3217 8000

denisemasto@gmail.com

**Dr. Victor Piana de Andrade**

Anatomia Patológica – AC Camargo Cancer Center

(11) 2189-5185 / 2189-5103

[victor.andrade@accamargo.org.br](mailto:victor.andrade@accamargo.org.br)



---

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco– HCP pelo telefone (81) 3217-8000. De segunda-feira à sexta feira das 8 horas às 16 horas.

Caso haja qualquer nova pesquisa com o material biológico doado, esta será previamente submetida à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Cancer de Pernambuco e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Precisamos também saber se o(a) Sr.(a) autoriza este armazenamento e se gostaria de ser contatado para autorização do uso das amostras já coletadas a cada novo projeto que venha a utilizar suas amostras e para isso, caso concorde com uma ou ambas as solicitações adicionais anteriores, assinale nos quadrados abaixo com quais delas você concorda:

- Estou de acordo com o armazenamento do material biológico por mim doado, para estudos futuros (outros projetos relacionados) no laboratório dos Pesquisadores Responsáveis.
- Desejo ser contatado em caso de novos projetos de pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do sujeito de pesquisa

Data

\_\_\_\_\_

/ \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

Data

\_\_\_\_\_

Testemunha 2



## Anexo 1 - Cópia do Parecer Consubstanciado

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SOX2, STAT3 E CD44 NO CANCER DE MAMA COM ESTADIAMENTO INICIAL E AVANÇADO

**Pesquisador:** DENISE SOBRAL VIANA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 51422115.3.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.419.968

#### Apresentação do Projeto:

O presente projeto foi apresentado como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutorado pelo A.C.Camargo Cancer Center. Esta pesquisa tem como finalidade a análise de amostras de sangue coletadas antes do início do tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. Será realizado um estudo do sangue por citometria de fluxo, um método comum e bem estabelecido nos laboratórios de diagnóstico, mas pouco usado para estudar o câncer de mama. Este estudo pretende encontrar novos marcadores tumorais que favoreçam em um melhor diagnóstico do câncer e contribuam na descoberta com antecedência quais pacientes irão responder bem ou mal ao tratamento indicado. Se confirmados, os marcadores poderiam auxiliar na determinação do melhor tratamento para pacientes diagnosticados com câncer de mama no futuro.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a expressão de SOX2, STAT3 E CD44 em pacientes com câncer de mama de estadiamento inicial e avançado.

Objetivo Secundário:

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597  
**Bairro:** Santo Amaro **CEP:** 50.040-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3217-8005 **Fax:** (81)3217-8005 **E-mail:** cep@hcp.org.br



**SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC**



Continuação do Parecer: 1.419.968

**Recomendações:**

Recomendações atendidas

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

as solicitações do parecerista foi atendida e portanto o projeto está aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_622358.pdf	09/01/2016 17:31:14		Aceito
Outros	Cartaresposta.pdf	07/01/2016 12:16:14	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Outros	anuenciamp.JPG	07/01/2016 12:15:42	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradocorrigido.pdf	07/01/2016 12:15:09	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Outros	ficha.pdf	07/01/2016 12:14:48	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostomama.pdf	26/11/2015 11:20:03	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Outros	anuenciamama.pdf	26/11/2015 11:18:36	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO3.jpg	19/11/2015 11:30:15	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO2.jpg	19/11/2015 11:30:02	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO1.jpg	19/11/2015 11:29:51	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMAMA.pdf	19/11/2015 11:27:03	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	19/11/2015 11:26:42	DENISE SOBRAL VIANA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597  
 Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)3217-8005 Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br



---

## Anexo 2 – Sistema TNM de classificação de tumores malignos (7ª edição) ASCC/UICC

### T – TUMOR PRIMÁRIO

TX – Tumor primário não avaliável

TO – Sem evidência de tumor primário

Tis – Carcinoma in situ:

- Tis (CDIS) Carcinoma ductal in situ;
- Tis (CLIS) Carcinoma lobular in situ;
- Tis (Paget's) Doença de Paget sem carcinoma invasivo.

T1 – Tumor  $\leq 2$  cm na sua maior dimensão:

- T1 mic – microinvasão 0,1 cm;
- T1a – Tumor com mais de 0,1 cm e menos que 0,5 cm na sua maior dimensão;
- T1b – Tumor com mais de 0,5 cm e menos que 1,0 cm na sua maior dimensão;
- T1c – Tumor com mais de 1,0 cm e menos que 2,0 cm na sua maior dimensão.

T2 – Tumor  $> 2,0$  cm e  $\leq 5$ cm na sua maior dimensão

T3 – Tumor  $> 5,0$  cm

T4 – Tumor de qualquer dimensão com extensão à parede torácica ou à pele:

- T4a – Extensão à parede torácica sem atingir o músculo peitoral;
- T4b – Edema ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados à mama (inclui pele de laranja);
- T4c – T4a + T4b;
- T4 d – Carcinoma inflamatório.

### N – ENVOLVIMENTO GANGLIONAR REGIONAL

Nx – Gânglios regionais não avaliáveis

N0 – Sem metástase ganglionar regional

N1 – Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais

N2 – Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais fixos ou nos gânglios da cadeia mamária interna clinicamente invadidos na ausência de gânglios axilares:

- N2a – Gânglios axilares ipsilaterais fixos ou fixos a outras estruturas;
- N2b – Metástases clinicamente aparentes na cadeia mamária interna na ausência de gânglios linfáticos axilares.



---

N3 – Metástases nos gânglios infraclaviculares ipsilaterais com ou sem gânglios linfáticos axilares, ou metástases clinicamente aparentes na cadeia mamária interna com nódulos axilares; ou metástases supraclaviculares com ou sem gânglios linfáticos axilares ou na mamária interna invadidos:

- N3a – Metástases nos gânglios infraclaviculares ipsilaterais;
- N3b – Metástases nos gânglios da mamária interna ipsilateral e nos gânglios axilares;
- N3c – Metástases nos gânglios supraclaviculares ipsilaterais.

M – METÁSTASE À DISTÂNCIA

MX – Metástase à distância não avaliada

M0 – Sem metástase à distância

M1 – Com metástase à distância

#### **ESTADIAMENTO TUMORAL UICC**

ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ESTADIO IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ESTADIO IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
ESTADIO IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
ESTADIO IIIC	QUALQUER T	N3	M0
ESTADIO IV	QUALQUER T	QUALQUER N	M1

