



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**INACELLI QUEIROZ DE SOUZA CAIRES**

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 E  
CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Recife

2019

INACELLI QUEIROZ DE SOUZA CAIRES

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 E  
CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER  
DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

**Área de concentração:** Biologia Aplicada à Saúde.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Recife

2019

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Caires, Inacelli Queiroz de Souza

Avaliação imunohistoquímica da expressão de CXCL12 e CXCR4 e correlação prognóstica em pacientes portadoras de câncer de mama / Inacelli Queiroz de Souza Caires - 2019.

65 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Câncer de mama 2. Microambiente tumoral 3. Quimiocinas  
I. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de (orient.) II. Título

616.99465

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-324

INACELLI QUEIROZ DE SOUZA CAIRES

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 E  
CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER  
DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 24/05/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Presidente e Orientadora)  
Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador interno)  
Núcleo de Pesquisa Para Inovação Terapêutica - NUPIT/UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Raul Antônio Morais Melo (Examinador externo)  
Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – Universidade de Pernambuco – UPE

Dedico este meu trabalho aos meus dois filhos: Gabriela Queiroz Caires e Miguel Queiroz Caires.

“Para que eles saibam o valor da necessidade infindável da busca pelo conhecimento e da sabedoria na construção do indivíduo”.

## AGRADECIMENTOS

A maioria dos desafios profissionais que já enfrentei na vida foram muito lineares, baseados em uma meta e para isso bastava seguir passos específicos para consegui-los. Desta vez foi diferente, o que para mim tornou esta tarefa muito difícil. Conseguir encaixar em um conjunto único: a vida acadêmica, o trabalho e a vida familiar, compondo as intersecções exatas, tornou esta matemática uma incitação.

Agradeço inicialmente a Deus e à Nossa Senhora pela força de não desistir e seguir em frente. Agradeço aos meus adorados pais, Cilvanceli e Maria Inalda, pela preocupação e cuidado de sempre; ao meu amado esposo, Rafael, pelo apoio e compreensão neste período e aos meus queridos filhos Gabriela e Miguel, pela energia que transmitem diariamente, dando força para acordar e tentar ser melhor a cada dia. Agradeço à minha sogra, Maria do Rosário (*in memoriam*) que nos deixou durante esta fase da pós-graduação e que certamente estaria exaltando muito este momento.

Não deixando de citar e agradecer ao restante de minha família, meus irmãos: Leonardo e Isabelli, Neide (minha babá), meu sogro Cícero, meus cunhados André, Camila, Rosana e André Victor, sem deixar também de mencionar Elizabete, Bruno, Marianne, Vitória, Lívia e Heitor pela paciência e carinho nesta fase. Agradeço também aos meus outros tão importantes familiares.

Faço um reconhecimento especial para a minha orientadora, a professora Sinara, a qual tenho muita gratidão. Ela me aceitou como discente de forma muito leve e muito me ajudou com suas contribuições acadêmicas e trouxe-me muitos ensinamentos de vida. Certamente, a possibilidade de conviver com ela foi um dos maiores ganhos desta pós-graduação.

Agradeço ao Felipe, à Tamires e à Mariana pela ajuda no preparo dos experimentos; aos professores do LIKA e aos colegas de sala pelo aprendizado e agradáveis momentos. Agradeço a todos os meus amigos que muito me incentivaram e ajudaram neste momento.

Agradeço também à FACEPE, pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa, aos pacientes que participaram deste projeto, aos meus pacientes pela torcida e à todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para realização desta investigação científica.

## RESUMO

Quimiocinas são peptídeos que regulam funções celulares e que podem apresentar alterações em sua expressão capazes de alterar os processos de proliferação e disseminação tumoral. CXCL12 é uma quimiocina que participa da migração celular e sua ligação ao receptor CXCR4 está envolvida com o processo de crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Este estudo tem por objetivo avaliar a expressão de CXCL12 e CXCR4 em amostras de pacientes portadores de Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) de mama e correlacioná-las com Sobrevida Global (SG), Sobrevida Livre de Doença (SLD) e com variáveis clínicas e patológicas. O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), de 2011 a 2014, com dados obtidos por meio de análise de prontuários e a pesquisa de CXCL12/CXCR4 realizada por imunohistoquímica (IHC). A análise estatística foi realizada por teste Kaplan-Meier para cálculo de sobrevida e a regressão Logit para correlação entre as variáveis. A amostra foi formada por 22 pacientes com CDI do sexo feminino, a idade média ao diagnóstico foi 56,8 anos (34 - 84) e maioria dos tumores localmente avançados. Na população global, a SG não foi alcançada e a SLD foi de 7,13 anos. Após a estratificação da expressão de CXCL12 e CXCR4, a ausência da expressão do CXCL12 foi associada a uma maior SLD HR 0,481 (IC 95% 0,08 – 2,72,  $p = 0,408$ ) e a presença da expressão do CXCR4 foi relacionada a uma maior SLD, com HR 1,7 (IC 95% 0,18 – 16,42,  $p = 0,643$ ), ambos sem significância estatística. A perda da expressão do CXCL12 estromal foi observada em graus histológicos (GH) mais elevados (IC 95% -28,58 - - 10,13,  $p < 0,001$ ) e houve uma correlação positiva entre o CXCL12 estromal e invasão angiolímfática (IAL) (IC 95% 28,33 – 52,98,  $p < 0,001$ ). A realização de quimioterapia neoadjuvante foi associada à negatividade da expressão do CXCL12 estromal (IC 95% 0,10 – 0,39,  $p = 0,001$ ). As principais limitações do estudo são a reduzida amostra e a não realização da pesquisa das quimiocinas nos sítios das metástases e previamente ao tratamento. A relação entre CXCL12 / CXCR4 pode ser um importante marcador prognóstico e possível alvo terapêutico, sendo sugerido novos estudos para entendimento deste papel no microambiente tumoral.

Palavras-chave: CXCL12. CXCR4. Câncer de mama. Microambiente tumoral.

## ABSTRACT

Chemokines are peptides regulate cellular functions and that may present alterations in their expression capable of altering the processes of tumor proliferation and dissemination. CXCL12 participate in cell migration and its binding to the CXCR4 receptor and this process is involved in the tumor growth, angiogenesis and metastasis. This paper aimed to evaluate the expression of CXCL12 and CXCR4 in samples from patients (pts) with Invasive Ductal Carcinoma (IDC) and to correlate with Overall Survival (OS), Disease Free Survival (SLD) and the clinical pathological variants. The study was realized in Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), from 2011 to 2014, the data obtained through medical records analysis and the CXCL12/CXCR4 survey performed by immunohistochemistry (IHC). Statistical analysis was performed using Kaplan-Meier for survival and the Logit test for correlation between variables. The sample consisted of 22 female pts with IDC, mean age at diagnosis was 56.8 y.o. (34-84), the majority of tumors were locally advanced. In the global population, SG was not achieved and SLD was 7.13 years. When stratification of CXCL12 and CXCR4 expression occurred, absence of CXCL12 expression was associated with a higher SLD HR 0.481 (95% CI 0.08 - 2.72,  $p = 0.408$ ) and the presence of CXCR4 expression was related to a higher SLD, with HR 1.7 (95% CI 0.18 - 16.42,  $p = 0.643$ ), both with no statistical significance. Loss of stromal CXCL12 expression was observed in higher HG (95% CI -28.58 - - 10.13,  $p = 0.000$ ) and there was a positive correlation between stromal CXCL12 and IAL (95% CI 28.33 - 52.98,  $p < 0.001$ ). Neoadjuvant chemotherapy was associated with negativity of stromal CXCL12 expression (95% CI 0.10-0.39,  $p = 0.001$ ). The other clinical variants did not show relation with CXCL12/CXCR4. The limitations of the study were the reduced sample and the absence of chemokine research in metastases and prior to treatment. The relationship between CXCL12/CXCR4 can be an important prognostic biomarker and possible target therapy and we suggest new studies to understand this role in the tumor microenvironment.

Keywords: CXCL12. CXCL4. Breast cancer. Tumor microenvironment.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação espacial de taxas ajustadas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação, baseada em estatísticas do INCA.....20
- Figura 2 - A célula cancerígena e as células do microambiente tumoral (CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; PD-1: Programmed death 1)..... 26
- Figura 3 - Interação entre quimiocinas (CC, CXC, C e CX3C) e seus receptores (CCR e CXCR – receptores convencionais e AKCR – receptor atípico).. 28
- Figura 4 - Expressão de CXCR4 e CXCR7 na membrana e suas ligações à proteína G e ativação de vias de proliferação intracelulares.....29
- Figura 5 - Interação entre o CXCL12 de células estromais e FACs e com o CXCR4 da célula tumoral, influenciada pelo TGF- $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$  e outros estimuladores da proliferação celular. ....31
- Figura 6 - Sobrevida livre de doença (SLD) na população do estudo. ....45
- Figura 7 - Sobrevida global (SG) na população do estudo.....45
- Figura 8 - Padrão da marcação imunohistoquímica de amostras de mama com anticorpo anti-CXCR4. (A) Tecido mamário normal (aumento 400x). (B e C) Carcinoma Ductal in situ - CDIS (aumentos de 100x e 400x, respectivamente). (D) Carcinoma Ductal Invasivo - CDI (aumento de 100x) e (E e F) com evidência para a marcação celular citoplasmática (aumento de 400x). ....47
- Figura 9 - Padrão da marcação imunohistoquímica de amostras de mama com anticorpo anti-CXCL12. (A e B) Tecido mamário normal (aumentos de 100x e 400x, respectivamente) demonstrando positividade no estroma o componente celular. (C) CDI (aumento de 100x) e (D, E e F) evidenciando a marcação citoplasmática das células tumorais e estroma em amostras com CDI (aumento de 400x).....48
- Figura 10 - Sobrevida livre da doença (SLD) relacionada à expressão de CXCL12. ....49
- Figura 11 - Sobrevida livre da doença (SLD) relacionada à expressão de CXCR4. Legenda:azul: ausência de expressão, verde: presença de expressão.50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Incidência e mortalidades estimadas por câncer e por sexo nos EUA em 2019. ....	18
Tabela 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma* .....	19
Tabela 3 - Estadiamento TNM.....	23
Tabela 4 - Exemplos de drogas antagonistas do CXCR4 com suas indicações e propriedades.....	32
Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo .....	41
Tabela 6 - Expressão por IHC e classificação por subtipo histológico .....	43
Tabela 7 - Tratamento realizado e desfecho .....	44
Tabela 8 - Expressão IHC de CXCR4 e CXCL12.....	46
Tabela 9 - Correlação entre a expressão de CXCL12 celular e estromal e CXCR4 com variáveis clínicas nos pacientes da amostra pelo método de Logit.	51
Tabela 10 - Correlação entre o grau histológico e o a expressão do CXCL12 estromal e do CXCR4.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AJCC</b>	–	American Joint Committee on Cancer
<b>AMPc</b>	-	Monofosfato cíclico de adenosina
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	-	Marcador Miofibroblástico Ativado
<b>BBT</b>	-	Boster Biological Technology
<b>CA</b>	–	Câncer
<b>CDI</b>	–	Carcinoma ductal invasivo
<b>CTLA4</b>	-	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
<b>CXCL12</b>	-	<i>(C-X-C motif) ligand 12</i>
<b>CXCL16</b>	-	<i>(C-X-C motif) ligand 16</i>
<b>CXCR4</b>	-	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
<b>CXCR7</b>	-	<i>C-X-C chemokine receptor type 7</i>
<b>DAB</b>	-	Diaminobenzidina 3,3'
<b>EC<sub>50</sub></b>	-	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
<b>ELISA</b>	-	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMT</b>	-	Transição Epitélio-Mesenquimal
<b>EUA</b>	-	Estados Unidos da América
<b>FACEPE</b>	–	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco
<b>FACs</b>	-	Fibroblastos associados ao câncer
<b>FDA</b>	-	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FISH</b>	-	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
<b>HC</b>	-	Hospital das Clínicas
<b>HER2</b>	-	<i>Human Epidermal Growth Factor 2</i>

<b>HIF<math>\alpha</math></b> -	<i>Hypoxia-inducible fator</i>
<b>HIV</b> –	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HR</b> –	<i>Hazard Ratio</i>
<b>IAL</b> –	Invasão angiolinfática
<b>ICH GCP</b> -	Boas Práticas Clínicas da Conferência Internacional de Harmonização
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> -	<i>Interferon <math>\gamma</math></i>
<b>IHC</b> –	Imunohistoquímica
<b>IL-4</b> –	<i>Interleucina 4</i>
<b>IMC</b> -	Índice de Massa Córpora
<b>INCA</b> –	Instituto Nacional de Câncer
<b>IP3</b> -	Fosfatidilinositol 3
<b>IPN</b> –	Invasão perineural
<b>JAK/STAT</b> -	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
<b>Ki67</b> –	Índice de Proliferação Celular
<b>LLC</b> -	Leucemia linfocítica crônica
<b>MMR</b> –	<i>Mismatch Repair Genes</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> -	<i>Factor nuclear kappa B</i>
<b>NPY3R</b> -	<i>Neuropeptide Y receptor 3</i>
<b>p38 MAP-</b>	<i>P38 mitogen-activated protein kinase</i>
<b>PBS</b> -	<i>Phosphate buffered saline</i> Tampão fosfato-salino
<b>PD1</b> -	<i>Programmed death 1</i>
<b>RE</b> -	Receptor de Estrógeno
<b>RH</b> -	Receptor Hormonal
<b>RP</b> –	Receptor de Progesterona

<b>RR –</b>	Risco Relativo
<b>RT-PCR -</b>	Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa
<b>SABC -</b>	Complexo de estreptavidina-biotina
<b>SC -</b>	Subcutâneo
<b>SDF-1 -</b>	<i>Stromal Derived Factor1</i>
<b>SEER -</b>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End results</i>
<b>SG -</b>	Sobrevida Global
<b>SLD -</b>	Sobrevida Livre de Doença
<b>SLR –</b>	Sobrevida Livre de Recorrência
<b>T –</b>	Tamanho tumoral
<b>TCLE-</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF-b1 -</b>	Fator de Crescimento Transformador-b1
<b>TMO -</b>	Transplante de medula óssea
<b>UFPE -</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>WB -</b>	<i>Western Blot</i>
<b>α -</b>	Alfa
<b>β -</b>	Beta
<b>γ –</b>	Gama
<b>δ –</b>	Delta
<b>ε –</b>	Épsilon
<b>Φ -</b>	Phi

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
3.1	CÂNCER DE MAMA.....	18
3.2	O MICROAMBIENTE TUMORAL.....	25
3.3	O MICROAMBIENTE TUMORAL: QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4.....	27
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	37
4.2	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE .....	37
4.3	TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	38
4.4	ANÁLISE DE IMAGENS.....	39
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>
7.1	PERSPECTIVAS.....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública da humanidade nos dias atuais, tendo sido esperados aproximadamente 18,1 milhões de novos casos em 2018, acompanhados por 9,6 milhões de mortes no mundo (GLOBOCAN 2018). O câncer de mama representa o subtipo mais frequente em mulheres na maior parte dos países, responsável nos Estados Unidos por cerca de 30% dos casos de cânceres femininos a serem diagnosticados em 2019, sendo a segunda causa de morte nesta população (SIEGEL; MILLER; JEMA, 2019). No Brasil, é também o câncer mais diagnosticado em mulheres e foram estimados 59.700 casos novos de câncer de mama em 2018, com um risco esperado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, correspondendo à principal causa de morte por neoplasia maligna com frequência esperada na população feminina brasileira de 13,68 óbitos/100.000 mulheres em 2018. Em Pernambuco, a incidência esperada foi de 2.680 casos de câncer de mama na população feminina em 2018 (INCA 2018).

Apesar da elevada incidência, a mortalidade por câncer de mama vem caindo ao longo dos anos, 1,9% por ano de 2008 a 2012 (KOHLENER et al., 2015). Um importante fator que contribui para este fato é a melhora dos métodos de rastreio da doença com a implementação da mamografia diagnóstica, permitindo uma identificação da doença em estágios precoces (KOHLENER et al., 2015, BERRY et al., 2005, DE GELDER et al., 2015, HELLQUIST et al., 2011). A inovação das técnicas cirúrgicas e a introdução dos quimioterápicos, das drogas bloqueadoras hormonais e dos avanços nas técnicas de radioterapia têm ajudado nos ganhos destas casuísticas. Mesmo com estes progressos terapêuticos, muitos pacientes evoluem desfavoravelmente, com disseminação da doença e óbito.

A célula tumoral pode apresentar mecanismos capazes de sobrepujar os mecanismos de homeostase tecidual do indivíduo por meio da ativação de vias de sinalização que levam a hiperproliferação, inibição da apoptose, bloqueio do reconhecimento tumoral pelas células de defesa, aumento da angiogênese e consequente aumento da nutrição tumoral, mutação nos genes de reparo, alterações na dinâmica do microambiente tumoral e invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Cada tipo tumoral, até mesmo em diversas fases da doença, pode apresentar habilidade de resistir ao tratamento e atualmente é importante,

além de qual via de sinalização está hiperativada em determinado câncer, investigar e tentar saber como ele é capaz de burlar possíveis terapias direcionadas para alvos específicos e encontrar outras vias para a sua subsistência.

O microambiente tumoral vem apresentando crescente importância neste cenário de desenvolvimento do câncer. Sabe-se hoje que o desequilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e a célula tumoral pode levar ao crescimento do câncer, bem como a angiogênese induzida pela hipóxia com o aumento da proliferação celular (HIRATA; SAHAI, 2017). Quimiocinas são peptídeos que participam do controle da movimentação celular, do processo de adesão e proliferação durante a embriogênese ou da restauração tecidual após um dano (HARALDSEN; ROT, 2006). As Quimiocinas e seus receptores podem estar hiperexpressos em células tumorais, afetando os processos de multiplicação, sobrevivência e invasividade (ROSTÈNE et al., 2011). A Quimiocina CXCL12 ((C-X-C motif) ligand 12) /SDF1 (*Stromal Derived Factor1*) atua através de dois receptores: CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) e CXCR7 (C-X-C chemokine receptor type 7). O CXCR4 é regulado pelo desacoplamento da Proteína G, ativado por fosforilação (SUN et al., 2002). O CXCL12/SDF-1 liga-se ao CXCR4 e este processo ativa a proliferação celular tumoral, a angiogênese, a migração celular e metástase. A expressão de CXCR4 tem sido identificada como um fator preditivo de mau prognóstico em pacientes portadores de melanoma e gliomas (SCALA et al., 2005, BIAN et al., 2007). Contudo, o real papel da relação do CXCL12 com o seu receptor CXCR4 ainda permanece incerto nos variados tipos de câncer. Por exemplo, uma metanálise demonstrou que a alta expressão de CXCL12 foi associada à redução da Sobrevida Global (SG) em pacientes com câncer de esôfago e câncer de pulmão, enquanto que em pacientes com câncer de mama, a alta expressão de CXCL12 conferiu uma melhor SG (SAMARENDRA et al., 2017). Especificamente para o câncer de mama, resultados da metanálise realizada por Liu et al. (2018) demonstraram que a alta expressão de CXCL12 foi associada a melhor Sobrevida Livre de Doença (SLD).

Portanto, são necessários mais estudos que investiguem o papel da relação da expressão de CXCL12 e do receptor CXCR4 em pacientes com câncer na tentativa de esclarecer melhor os mecanismos de invasão e metástase e consequente disseminação tumoral com determinação de possíveis vias de terapia-alvo, além de definir o real papel preditivo e prognóstico destes marcadores. O

nosso estudo foi realizado com amostras de pacientes do Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), representando a realidade local, com a intenção de avaliar a expressão de CXCL12 e CXCR4 em pacientes com diagnóstico de CDI (Carcinoma ductal invasivo) de mama e objetiva somar dados à literatura mundial sobre o assunto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a expressão de CXCR4 e CXCL12 em amostras de pacientes com CDI de mama e correlacionar os resultados com a SLD e SG.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a marcação, por meio de imunohistoquímica (IHC), da quimiocina CXCL12 e do receptor CXCR4 no estroma tumoral e componente celular tumoral nas amostras diagnosticadas como CDI.
- ✓ Correlacionar a expressão de CXCR4 e CXCL12 com variáveis clínicas e histopatológicas da amostra tecidual: tamanho tumoral, acometimento linfonodal, estadiamento, grau histológico (GH), presença de infiltrado inflamatório, presença de invasão angiolinfática (IAL) e presença de invasão perineural (IPN).
- ✓ Avaliar a marcação tumoral para receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 (*Human Epidermal Growth Factor 2*) e o subtipo histológico e correlacioná-los com a expressão de CXCL12 e CXCR4.
- ✓ Descrever os principais sítios de metástases observados nos pacientes, bem como os tratamentos realizados (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e relacioná-los com a expressão de CXCR4 e CXCL12.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama representa o subtipo mais frequente em mulheres na maior parte dos países (SIEGEL; MILLER; JEMA, 2019) (Tabela 1). No Brasil é também o câncer mais diagnosticado em mulheres e foram estimados 59.700 casos novos de câncer de mama em 2018 (Tabela 2), com um risco esperado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 1), correspondendo à principal causa de morte por neoplasia maligna (INCA 2018).

Tabela 1 - Incidência e mortalidades estimadas por câncer e por sexo nos EUA em 2019

<b>Casos novos estimados</b>					
	<b>Homens</b>		<b>Mulheres</b>		
Próstata	174.650	20%		Mama	268.600 30%
Pulmão	116.440	13%		Pulmão	111.710 13%
Cólon e reto	78.500	9%		Cólon e reto	67.100 8%
Bexiga	61.700	7%		Corpo uterino	61.880 7%
Melanoma	57.220	7%		Melanoma	39.260 4%
Rim e pelve renal	44.120	5%		Tireóide	37.810 4%
Linfoma Não Hodgkin	41.090	5%		Linfoma Não Hodgkin	33.110 4%
Cavidade oral e faringe	38.140	4%		Rim e pelve renal	29.700 3%
Leucemia	35.920	4%		Pâncreas	26.830 3%
Pâncreas	29.940	3%		Leucemia	25.860 3%
Todos os sítios	870.970	100%		Todos os sítios	891.480 100%
<b>Mortes estimadas</b>					
	<b>Homens</b>		<b>Mulheres</b>		
Pulmão	76.650	24%	Pulmão	66.020	23%

Próstata	31.620	10%		Mama	41.760	15%
Cólon e reto	27.640	9%		Cólon e reto	23.380	8%
Pâncreas	23.800	7%		Pâncreas	21.950	8%
Fígado e vias biliares	21.600	7%		Ovário	13.980	5%
Leucemia	13.150	4%		Corpo uterino	12.160	4%
Esôfago	13.020	4%		Fígado e vias biliares	10.180	4%
Bexiga	12.870	4%		Leucemia	9.690	3%
Linfoma Não Hodgkin	11.510	4%		Linfoma Não Hodgkin	8.460	3%
Sistema Nervoso Central	9.910	3%		Sistema Nervoso Central	7.850	3%
Todos os sítios	321.670	100%		Todos os sítios	285.210	100%

Fonte: SIEGEL,  
2019.

Tabela 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma\*

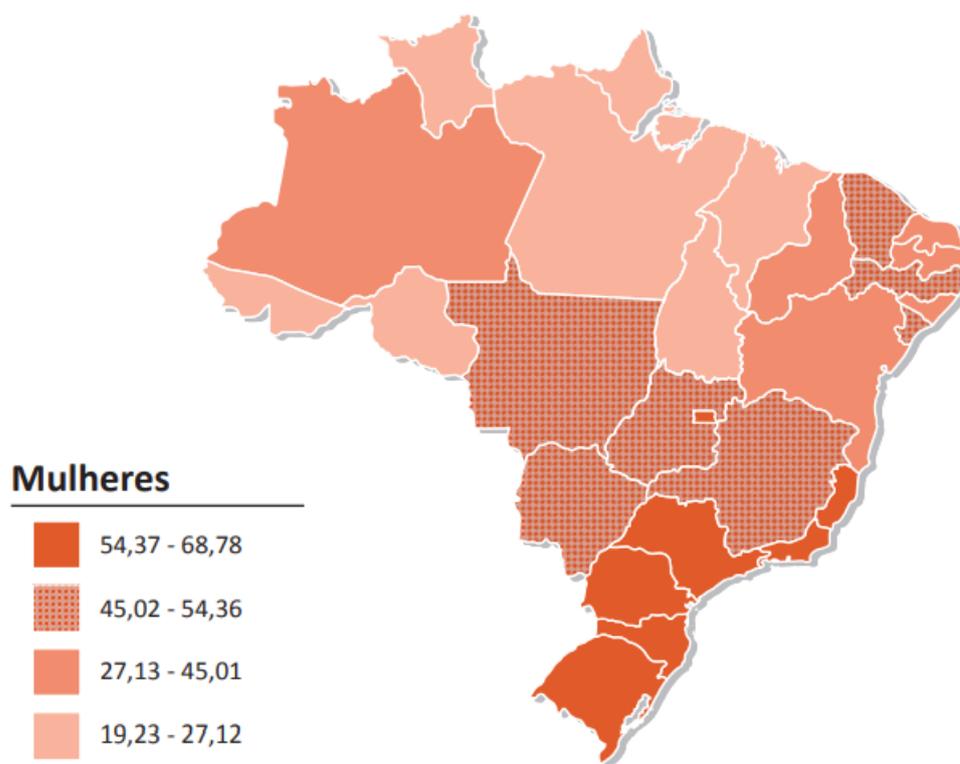
Localização Primária			Localização Primária		
	Caso	%		Caso	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	
Próstata	68.220	31,70%		Mama	59.700 29,50%
Pulmão	18.740	8,70%		Cólon e reto	18.980 9,40%
Cólon e reto	17.380	8,10%		Colo do útero	16.370 8,10%
Estômago	13.540	6,30%		Pulmão	12.530 6,20%
Cavidade oral	11.200	5,20%		Tireóide	8040 4%
Esôfago	8.240	3,80%		Estômago	7.750 3,80%
Bexiga	6.690	3,10%		Corpo do útero	6.600 3,30%
Laringe	6.390	3,00%		Ovário	6.150 3%
Leucemia	5.940	2,80%		Sistema Nervoso Central	5.510 2,70%

Sistema Nervoso				
Central	5.810	2,70%	Leucemia	4.860 2,40%

\* Números arredondados para múltiplos de 10.

**Fonte:** <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

Figura 1 - Representação espacial de taxas ajustadas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação, baseada em estatísticas do INCA.



Fonte: BRASIL. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

Vários fatores de risco são relacionados ao surgimento do câncer de mama como a idade avançada, o sexo feminino e a raça, sendo a raça branca mais acometida pela doença, contudo a raça negra apresenta tumores com doença mais avançada ao diagnóstico e maior mortalidade (CDC et al., 2012, RICHARDSON, 2016). A obesidade é outro fator de risco para câncer de mama, principalmente os subtipos receptor hormonal positivo, por provável maior conversão periférica de estrógeno, aumentando o risco da doença. Em uma metanálise com mais de 1000 estudos epidemiológicos para avaliação de fatores de risco para câncer em

mulheres, foi observado que um IMC > 25 apresenta um RR (risco relativo) aumentado para incidência de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa de 1,1 (CI 95% 1.1-1.2) (LAUBY-SECRETAN et al., 2016).

Menarca precoce é associada a um risco aumentado de câncer de mama (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER et al., 2012). Mulheres com menarca após os 15 anos apresentam um risco 16% menor da doença com RH (Receptor hormonal) negativo (RITTE et al., 2013). Mulheres nulíparas apresentam um risco aumentado de câncer de mama comparado às mulheres com filhos (RR 1,2 -1,7) (ROSNER; COLDITZ; WILLETT, 1994, COLDTIZ; ROSNER et al., 2000). Embora a paridade confira um risco aumentado de câncer de mama nos primeiros cinco anos após o parto, a paridade confere efeito protetor ao longo do tempo. A idade tardia do primeiro parto também é um fator de risco associado a câncer de mama. No trabalho científico *Nurses' Health Study*, foi comparada a incidência cumulativa de câncer de mama até os 70 anos em mulheres nulíparas perto da menopausa com mulheres mães em idade tardia e foram observadas taxas 20% e 10%, respectivamente, menores em mães aos 20 e 25 anos, comparadas às nulíparas e 5% maiores nas mulheres mães aos 35 comparadas à referida população (ROSNER; COLDITZ; WILLETT, 1994, COLDTIZ; ROSNER et al., 2000). Uma das justificativas pode ser que uma gravidez em idade tardia pode causar um estímulo proliferativo na glândula mamária (NICHOLS et al., 2019).

Mutações germinativas podem ser relacionadas ao surgimento do câncer, representando de 5-10% de todos os casos de câncer de mama, apesar de ser um número pequeno diante de todo o conjunto, a identificação deste subgrupo populacional ocasiona a oportunidade de realização de medidas preventivas de novos cânceres em indivíduos já acometidos e também de introdução de medidas de rastreio aos familiares (COUCH; NATHANSON; OFFIT, 2014). Inicialmente, realizava-se a pesquisa de mutações germinativas nos genes do BRCA 1 e 2, representando a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário, contudo, hoje sabe-se que outros genes estão relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama hereditário, como por exemplo: *p53*, *ATM*, *STK11*, *CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *CHEK2* e *MMR* (*Mismatch Repair Genes*) (LU et al., 2018).

O Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) é o tipo mais comum de neoplasia maligna de mama, representando 70 a 80 por cento das lesões invasivas. É também

denominado carcinoma infiltrante de nenhum tipo especial ou carcinoma infiltrante não especificado (NOS). Na avaliação patológica macroscópica, essas lesões são tipicamente massas duras, cinza-esbranquiçadas e ásperas, que invadem o tecido adjacente de maneira aleatória para criar a característica forma irregular e estrelada. Eles são caracterizados microscopicamente por cordões e ninhos de células tumorais com quantidades variáveis de formação de glândulas e características citológicas que variam de brandas a altamente malignas. As células malignas induzem uma resposta fibrosa à medida que se infiltram no parênquima mamário, sendo essa reação, em grande parte, responsável pela massa clinicamente e grosseiramente palpável, pela densidade radiológica e pelas características ultrassonográficas sólidas dos carcinomas invasivos típicos (SENKUS et al., 2015).

Na prática clínica, a classificação dos cânceres de mama baseada na IHC é muito utilizada, subdividindo os tumores em luminais, HER2 amplificados e triplo negativos. Os subtipos luminais são os mais frequentes e que mais apresentam uma expressão gênica semelhante ao epitélio luminal da mama e são classificados em Luminais A e B, com expressão de RE positivo. Os tumores com amplificação do HER2 representam de 15-20% das neoplasias malignas da mama e este tipo de alteração ocasiona a ativação da via de proliferação celular – RAS/RAF/MEK/ERK (PARISE et al., 2009). Os subtipos triplo negativo são caracterizados pela ausência de expressão na IHC do RE, RP e do HER2 e aparentam ser um grupo geneticamente heterogêneo. Atualmente se classifica este subgrupo em quatro tipos: luminal receptor de andrógeno, mesenquimal, *basal-like* imunossuprimido e *basal-like* imuno-ativado (BURSTEIN et al., 2015).

O câncer de mama deve ser tratado através de uma abordagem multidisciplinar, com o envolvimento do mastologista, oncologista clínico e o radio oncologista na discussão do caso. A maioria dos pacientes com diagnóstico de câncer de mama apresentam-se com doença local, sendo o tratamento baseado no estadiamento (Tabela 3). A doença diagnosticada em estágio precoce é aquela descoberta no estágio I, IIA e IIB (T2N1) e a doença localmente avançada nos estágios IIB (T3N0) e IIIA, IIIB e IIIC (AMIN et al., 2017). Aproximadamente 5% dos pacientes apresentam-se com doença metastática ao diagnóstico, sendo esta entidade clínica chamada de câncer de mama *de novo*.

Tabela 3 - Estadiamento TNM

<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Estadiamento</b>
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Qualquer T	N3	M0	IIIC
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

Fonte: AJCC Cancer Staging Manual, 8 th edition, 2017.

De forma geral, as pacientes diagnosticadas em estágio precoce são submetidas à cirurgia primária (mastectomia ou quadrantectomia), acompanhada de avaliação dos linfonodos regionais e posteriormente são avaliadas para indicação ou não de radioterapia adjuvante (VERONESI et al., 2002, BLICHERT-TOFT et. al., 2008). O tratamento adjuvante sistêmico é oferecido baseado nas características

primárias do tumor como tamanho, envolvimento linfonodal, GH, presença de marcação positiva para RE, RP e HER2 (BREWSTER et al., 2008). A hormonioterapia é indicada para os pacientes com presença de RH positivo e terapias anti-HER2 são usadas para pacientes com hiperexpressão de HER2 por IHC ou por FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) (CAMERON et al., 2017).

A quimioterapia geralmente é indicada para pacientes diagnosticadas precocemente com doença receptor hormonal (RH) positivo e fatores de alto risco: GH (grau histológico) 3, tumores  $\geq 2$  cm, envolvimento linfonodal patológico e/ou *high 21-gene recurrence score* ( $\geq 31$ ) (SPARANO et al., 2018). Para tumor triplo negativo, tende-se a indicar a quimioterapia adjuvante para pacientes com tumores  $\geq 0,5$  cm, antes da realização da radioterapia, já que geralmente é um subtipo com apresentação mais agressiva e sem outras tantas opções terapêuticas adjuvantes no cenário atual. Para os tumores HER2 positivos, tende-se a indicar quimioterapia adjuvante associada a drogas bloqueadoras do HER2 para tumores  $> 1$  cm (TOLANEY et al., 2015).

Deve-se oferecer para a maioria das pacientes com câncer de mama localmente avançado a quimioterapia neoadjuvante. O benefício deste tipo de estratégia é que geralmente se consegue uma diminuição tumoral com consequente cirurgia conservadora e pode-se testar a sensibilidade da quimioterapia *in vivo* nos pacientes. A quimioterapia neoadjuvante resulta em melhores resultados de SLD e com dados semelhantes de SG quando comparada ao tratamento adjuvante (CHEN et al., 2013). A quimioterapia neoadjuvante é indicada para pacientes com doença RH positivo com tumores avançados e para tumores triplo negativo. Para as pacientes HER2 positivo, tende-se a indicar o duplo bloqueio do HER2 com trastuzumabe e pertuzumabe, com aumento das taxas de resposta, incluindo aumento da taxa de resposta patológica completa (SWAIN et al., 2015). A hormonioterapia neoadjuvante deve ser indicada para casos selecionados, como paciente com *Status Performance* muito comprometido ou comorbidades limitantes (LOBO-CARDOSO; MAGALHÃES; FOUGO, 2017).

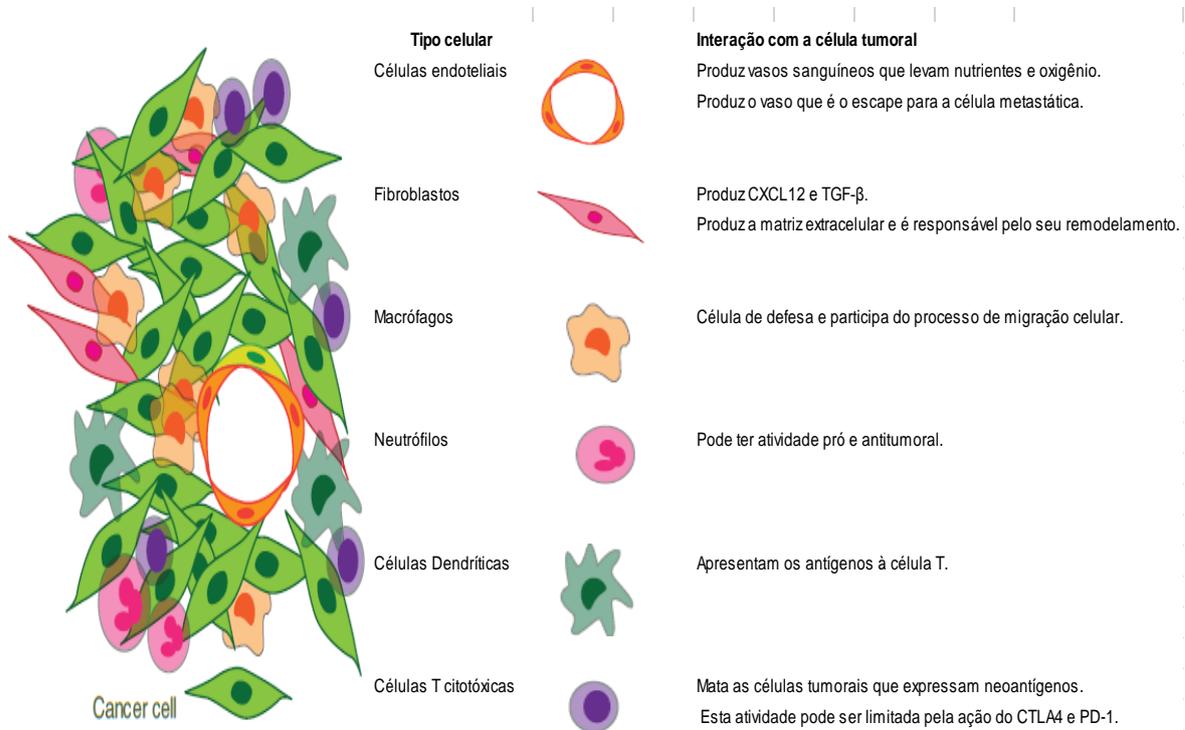
Apesar deste avanços, com melhora da acurácia dos métodos diagnósticos e das ferramentas de tratamento, muitos pacientes evoluem com um quadro clínico desfavorável e óbito. A célula tumoral pode apresentar mecanismos capazes de dominar o hospedeiro devido ativação de vias de sinalização que causam hiperproliferação, inibição da apoptose, bloqueio do reconhecimento tumoral pelas

células de defesa, aumento da angiogênese e consequente aumento da nutrição tumoral, mutação nos genes de reparo, alterações na dinâmica do microambiente tumoral e invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### 3.2 O MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral tem apresentando crescente importância devido à sua interação com a célula tumoral e o crescimento do câncer. É composto pela matriz extracelular (colágeno, elastina, proteínas de ancoragem, metaloproteinases, radicais livres) e células (fibroblastos; células endoteliais; células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos, células T e outras células particulares a cada tipo específico de tecido) (HIRATA; SAHAI, 2017). O tecido tumoral consegue se adaptar a diferentes concentrações de oxigênio, com produção anaeróbia de energia em situações de baixa concentração e estímulo à angiogênese através do HIF $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor*), que em situações de hipóxia, transmite o sinal para uma formação de novos vasos e melhor aporte de nutrientes (HARNEY et al., 2015, EALES; HOLLINSHEAD; TENNANT, 2016) (Figura 2).

Figura 2 - A célula cancerígena e as células do microambiente tumoral (CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; PD-1: Programmed death 1)



Fonte: Hirata; Sahai (2017).

Células do sistema imune inato e adaptativo são encontradas dentro do sítio tumoral. As células T CD8 são capazes de reconhecer os antígenos de células cancerígenas e degradá-las, processo conhecido como vigilância imune (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Em alguns tumores, pode ocorrer um silenciamento deste reconhecimento por meio dos mecanismos de supressão, conhecidos como os *immune checkpoints*. A célula T, através de seus receptores de membrana PD-1 (*Programmed death 1*) e CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) se liga ao B7/PD-L1 das células tumorais, respectivamente, inibindo o reconhecimento do elemento anormal, criando um ambiente de anergia imunológica. Esta situação impede o aniquilamento tumoral, fazendo com que o tumor cresça sem reconhecimento do sistema imunológico (DARVIN et al., 2018).

O microambiente pode alterar respostas a tratamentos direcionados à célula tumoral e também, devido aos mecanismos citados, ser um alvo indireto para matar a célula tumoral. Hoje estão disponíveis drogas antiangiogênicas, drogas inibidoras

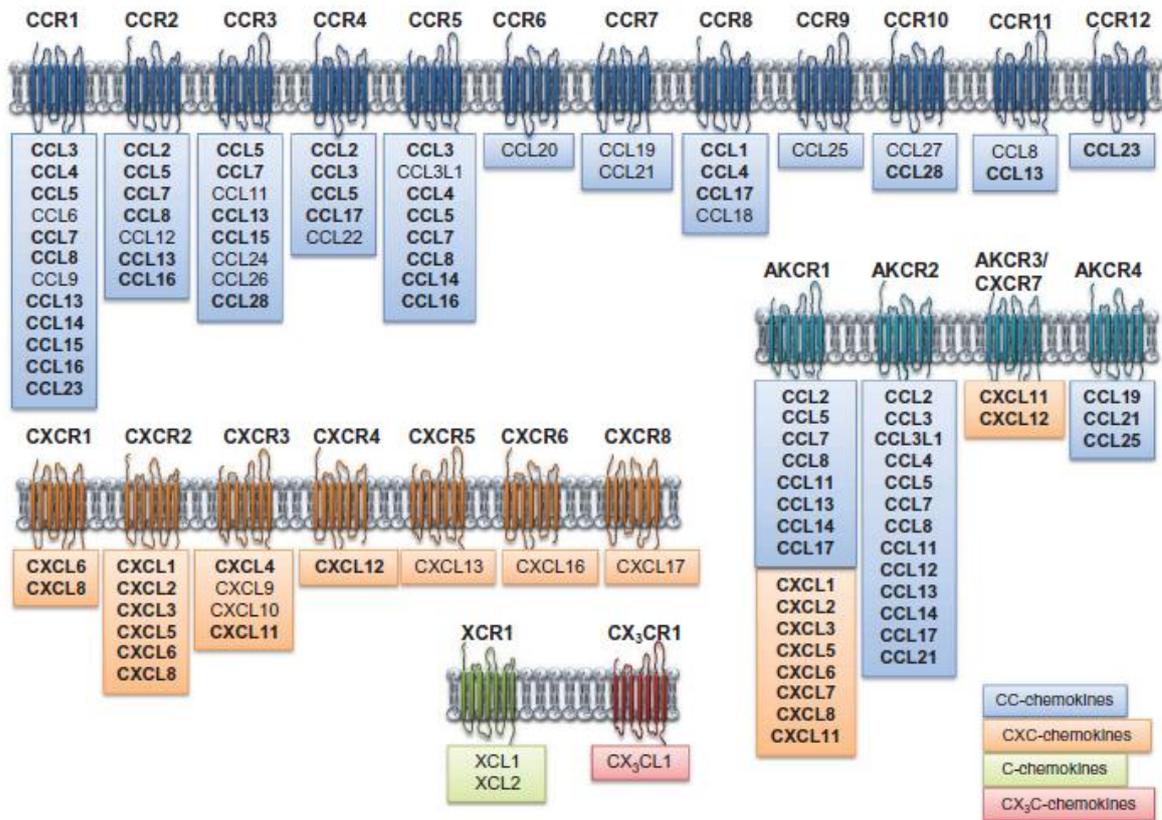
dos checkpoints imunológicos e muitos outros alvos estão sendo explorados numa tentativa de melhor tratamento da doença (HIRATA; SAHAI, 2017).

### 3.3 O MICROAMBIENTE TUMORAL: QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4

O processo de crescimento tumoral e início do processo da metástase é criticamente dependente da relação da célula tumoral com o estroma. Fibroblastos associados ao câncer (FACs) têm mostrado influência neste mecanismo por meio da produção de quimiocinas que induzem a angiogênese e que facilitam a migração celular (MÜLLER et al., 2001).

Quimiocinas são peptídeos que participam do controle da movimentação celular, do processo de adesão celular e proliferação durante a embriogênese e da restauração celular após um dano. A família das quimiocinas inclui aproximadamente 50 peptídeos classificados segundo o número e espaços conservados das cisteínas N-terminais, divididas em quatro classes: C, CC, CXC e CX3R, seguidas pelo sufixo L para os ligantes (BACHELERIE et al., 2014). Os quimiorreceptores são estruturalmente e funcionalmente acoplados à superfamília dos Receptores Ligados à Proteína G e também são divididos em 4 classes: CR, CCR, CXCR E CX3R e conservam a sequência DRYLAIV no final do domínio transmembrana III, essencial para o acoplamento da proteína G e para a ativação de vias intracelulares (HARALDSEN; ROT, 2006). As quimiocinas e seus receptores não estão restritas a leucócitos, mas estendem-se também a células não-hematopoiéticas, incluindo, por exemplo, neurônios e células da glia, sendo essenciais ao desenvolvimento dos mamíferos, atuando no processo da organogênese. Entretanto, as quimiocinas e seus receptores podem estar hiperexpressos em células tumorais, afetando os processos de proliferação, sobrevivência e invasividade (ROSTÈNE et al., 2011).

Figura 3 - Interação entre quimiocinas (CC, CXC, C e CX<sub>3</sub>C) e seus receptores (CCR e CXCR – receptores convencionais e AKCR – receptor atípico).



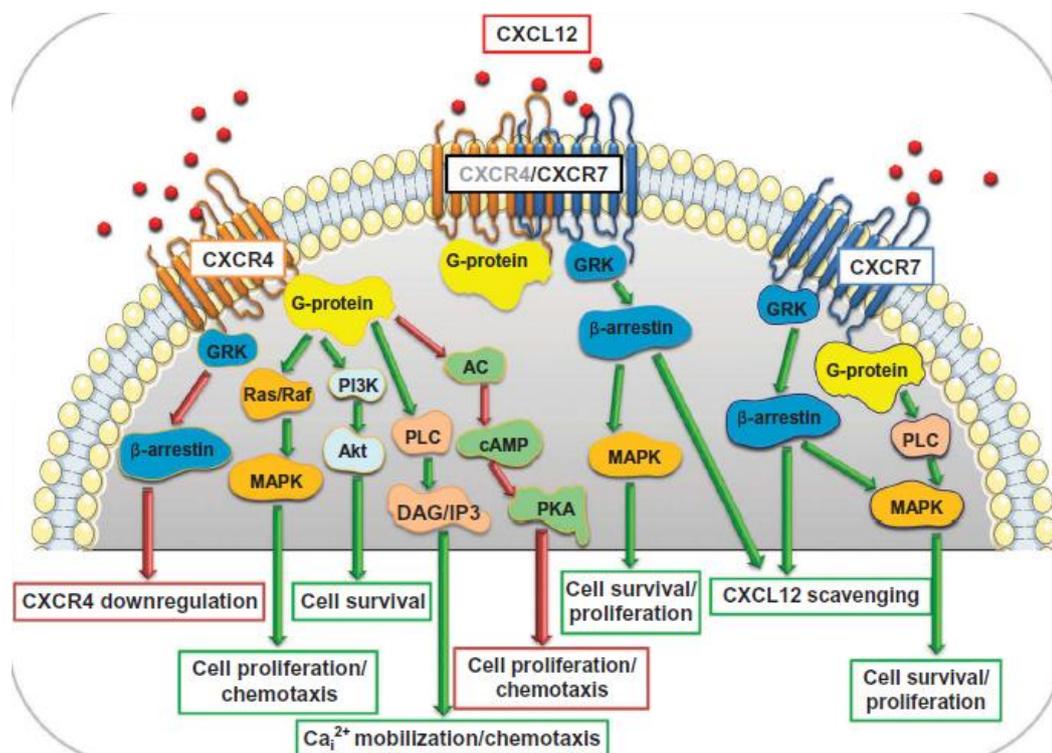
Fonte: Barbieri et al. (2016).

A quimiocina CXCL12/SDF1, é codificada por um gene no cromossomo 10, sendo amplamente expressa em tecidos normais e tumorais, atuando através de dois receptores: CXCR4 e CXCR7. O CXCL12 existe em seis ou mais isoformas combinadas ( $\alpha$  /  $\beta$  /  $\gamma$  /  $\delta$  /  $\epsilon$  /  $\phi$ ), compartilhando os três primeiros éxons, mas possuindo comprimento diferente dentro do quarto éxon. O CXCL12 $\alpha$  e  $\beta$  são as isoformas mais frequentes, exibindo distribuição tecidual generalizada semelhante: fígado, baço, pâncreas, no estroma da medula óssea, entre outros órgãos. O CXCL12 $\alpha$  é rapidamente degradado por proteólise no sangue, enquanto a isoforma  $\beta$  é mais resistente à degradação sanguínea, sendo um poderoso estimulador da neoangiogênese (JANOWSKI, 2009). O CXCL12 $\gamma$ , expresso principalmente no coração e no cérebro, é caracterizado pela adição de um aminoácido longo e carregado positivamente que facilita uma forte ligação ao CXCR4, participando ativamente dos processos de migração celular (YU et al., 2006).

O CXCR4, codificado por um gene localizado no cromossomo 2, também conhecido como FUSIN ou NPY3R, é o receptor da membrana plasmática do CXCL12 e modula várias vias intracelulares (Figura 4). A sinalização do CXCR4 depende das subunidades  $G_i\alpha$  e  $\beta\gamma$  de Proteínas G triméricas: a via  $G_i\alpha$  leva à redução de AMPc por inibição Adenilato Ciclase e ativa as vias JAK/STAT e PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B e tirosina quinase dependente de  $Ca^{2+}$  PYK2; já a via  $\beta\gamma$  leva à ativação dependente de fosfolipase C, diacilglicerol e IP3, mobilizando  $Ca^{2+}$  das reservas intracelulares e conduzindo à ativação da cascata RAS/RAF/ERK (MASSA et al., 2006). O CXCR4 é regulado pelo desacoplamento da Proteína G, ativado por fosforilação. O receptor fosforilado é ligado por  $\beta$ -arrestinas, que medeiam sua dessensibilização e consequente endocitose, resultando na ativação de quinases ERK1/2 e p38 MAP (SUN et al., 2002).

Figura 4 - Expressão de CXCR4 e CXCR7 na membrana e suas ligações à proteína G e ativação de vias de proliferação intracelulares

**Legenda:** CXCL12: (C-X-C motif) ligand 12; CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; TGF- $\beta$ 1: Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ 1; IL-4: Interleucina 4, IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$



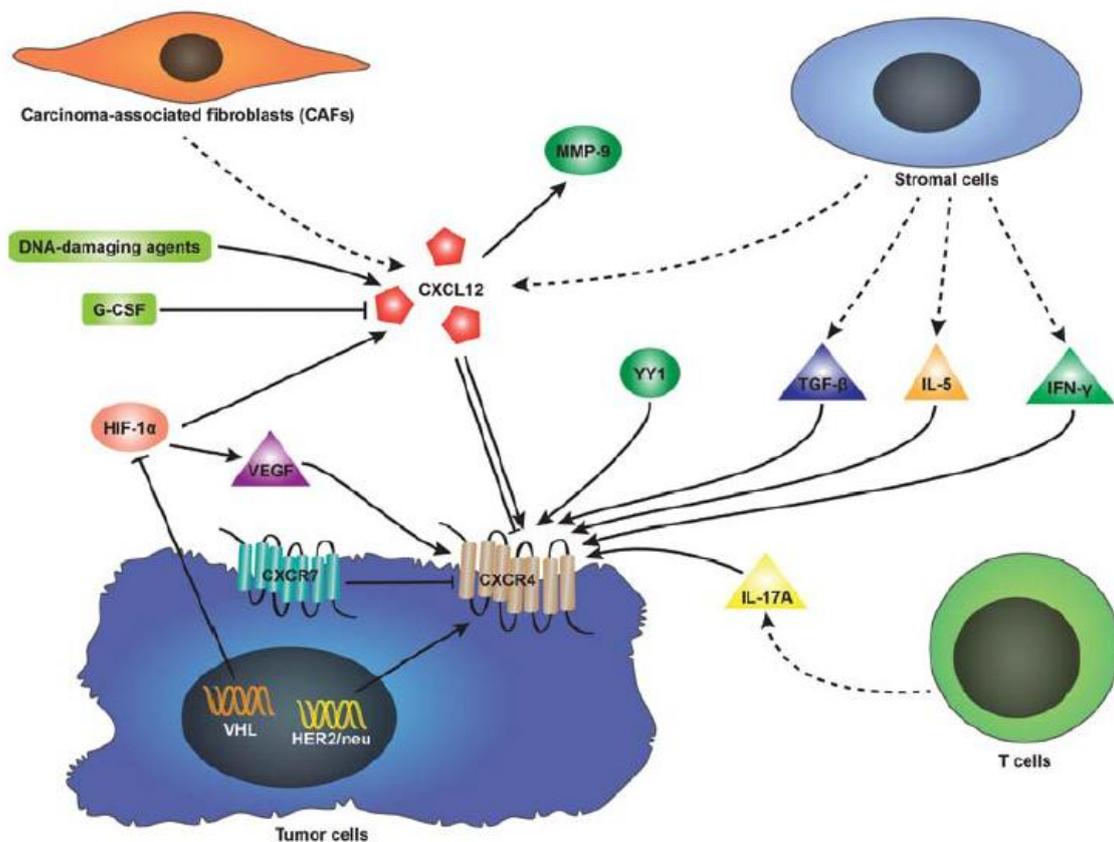
Fonte: Barbieri et al. (2016).

O CXCL12/SDF-1 liga-se ao CXCR4 e este processo ativa a proliferação celular tumoral, a angiogênese, a migração celular e metástase. O CXCR4 é altamente expresso em vários tipos de células tumorais, como, por exemplo, aquelas provenientes do câncer de mama, ovário, próstata, pulmão, leucemia e melanoma. O CXCL12 é preferencialmente expresso em tecidos hepáticos, pulmonares e linfonodos, estando presentes no estroma produzido por fibroblastos e células mesenquimais (MÜLLER et al., 2001). A expressão de CXCR4 tem sido identificada como um fator preditivo de mau prognóstico em pacientes portadores de melanoma e gliomas (SCALA et al., 2005; BIAN et al., 2007).

Células metastáticas do câncer de mama requerem diminuição da adesão celular, com perda da polarização epitelial e maior capacidade de mobilização como as células da matriz extracelular, com isto adquirindo a capacidade de migração, invasão e metástase, processo chamado de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) (KALLURI; WEINBERG, 2009). O melhor entendimento destes mecanismos podem levar a terapias antimetástases. Os fibroblastos são as células mais encontradas no estroma e são associados ao crescimento celular por estimulação parácrina e os Fibroblastos Associados ao Câncer (FACs) são mais eficientes do que os fibroblastos normais nesta função. Os FACs secretam vários fatores de crescimento, incluindo Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), que é um forte sinal extracelular para a ocorrência da EMT e o CXCL12/SDF-1, quimiocina que participa da EMT de células tumorais (KOJIMA et al., 2010; AL-ANSARI et al., 2012) (Figura 5). Os FACs apresentam outras atribuições, sendo responsáveis pela produção da composição não-celular do tumor, síntese de metaloproteinases e remodelamento do microambiente tumoral (GIANNONI et al., 2010).

Figura 5 - Interação entre o CXCL12 de células estromais e FACs e com o CXCR4 da célula tumoral, influenciada pelo TGF- $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$  e outros estimuladores da proliferação celular

Legenda: CXCL12: (C-X-C motif) ligand 12; CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; TGF- $\beta$ 1: Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ 1; IL-4: Interleucina 4, IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$



Fonte: LIAO et al. (2013).

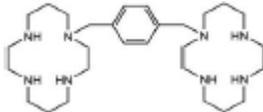
Yu et al. (2014) avaliaram o estroma de tecidos de câncer de mama para investigar a atuação dos FACs neste ambiente. Os fibroblastos do estroma apresentaram coloração positiva para o marcador mesenquimal vimentina e coloração negativa para o marcador epitelial E-caderina, mostrando a perda das características do tecido epitelial de origem e em particular, expressaram também o  $\alpha$ -SMA e a citocina CXCL12. Estes resultados indicaram que os fibroblastos isolados e cultivados *in vitro* a partir de tecidos de câncer de mama mantiveram as características de FACs. Neste estudo, observou-se também que as habilidades de migração e invasão de células estimuladas pelos FACs foram revertidas adicionando

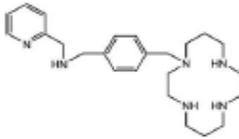
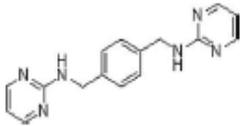
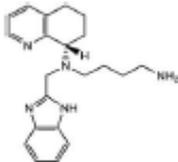
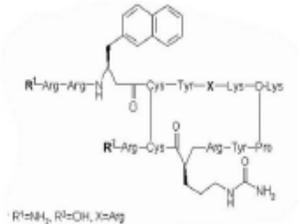
anticorpo anti-TGF- $\beta$ 1, indicando que o TGF- $\beta$ 1 secretado pelos FACs é um potente regulador para a ativação da EMT em fenótipo em células de câncer de mama com diferentes características (YU et al., 2014).

Em estudo publicado por Chung et al. (2017), foram isolados FACs, células tumorais de câncer de mama e células de metástases cerebrais e desenvolvido um modelo tridimensional para as interações do estudo. Baseado em análises gênicas e de IHC, observou-se que a expressão dos níveis de quimiocinas CXCL16 (C-X-C motif ligand 16) e CXCL12 foram maiores em FACs de metástases cerebrais em que de tumores mamários primários ou no tecido normal. Os FACs presentes no tecido cerebral foram mais capazes de atrair células do câncer de mama que os fibroblastos presentes no tumor mamário ou no tecido da mama normal. O bloqueio do CXCL12 e da dimerização ao seu ligante CXCL16 pode resultar em inibição da migração decorrente de agregados de FACs em metástases cerebrais, reforçando o papel do controle do microambiente tumoral no tratamento do câncer (CHUNG et al., 2017).

A relevância biológica do CXCL-12/SDF-1 e seus receptores não está envolvida somente no desenvolvimento e metástases do tumores hematológicos e sólidos, mas também em várias doenças humanas como a Artrite Reumatóide, Fibrose Pulmonar, Lúpus Eritematoso Sistêmico, injúrias isquêmicas e infecciosas. Vários antagonistas do CXCR4 foram desenvolvidos e estão sendo estudados em ensaios clínicos ou foram aprovados como tratamento. Os inibidores de CXCR4 podem ser classificados em três classes principais: antagonistas de pequenas moléculas, que apresentam semelhança estrutural com o CXCR4, por exemplo, o AMD3100 e seus análogos; os peptídeos/peptidomiméticos, o antagonista da 14-mer T140 é o "protótipo" do polipeptídeo e os anticorpos antagonistas do CXCR4 (BARBIERI et al., 2016) (Tabela 4).

Tabela 4 - Exemplos de drogas antagonistas do CXCR4 com suas indicações e propriedades

Composto	Estruturas	Indicações	Propriedades
AMD3100		FDA para TMO	Antagonista do CXCR4 e do CXCR7 alostérico

		HIV	Via de administração: SC
		LLC	EC <sub>50</sub> : 33 nM
		Glioblastoma	
		Neuroblastoma	
AMD3465		Câncer de mama	Sem biodisponibilidade oral
			EC <sub>50</sub> : 9-18 nM
MSX-122		Tumor sólido	Antagonista do CXCR4
			Via de administração: oral
			EC <sub>50</sub> : 10 nM
AMD11070		HIV, melanoma	Biodisponibilidade oral em animais
			EC <sub>50</sub> : 12,5 nM
Peptídeo antagonista do CXCR4 - T140		Câncer de mama	EC <sub>50</sub> : 2,4 nM
		LLC	
		MM	

---

Fonte: Barbieri et al. (2016).

Legenda: FDA: Food and Drug Administration, TMO: Transplante de medula óssea, HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana, LLC: Leucemia linfocítica crônica, MM: Mieloma múltiplo, SC: subcutâneo, EC<sub>50</sub>: concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo.

Vale ressaltar, contudo, que mesmo já estando disponíveis inibidores do CXCR4, o real papel da relação do CXCL12 com o seu receptor CXCR4 ainda permanece incerta nos variados tipos de câncer. Samarendra et al. (2017) realizaram uma metanálise de 38 estudos, com um total de 5.807 pacientes, que avaliaram a expressão de CXCL12 no tecido e no plasma de vários tipos de tumores para tentar verificar o valor prognóstico deste marcador. Neste estudo, a SG e a sobrevida livre de recorrência (SLR) em pacientes com alta expressão de CXCL12 foram HR 1,39 (IC 95% 1,17 – 1,65,  $p = 0,0002$ ) e 1,12 (95% IC 0,82–1,53,  $p = 0,48$ ), respectivamente, mas com heterogeneidade significativa entre os estudos. Na análise de subgrupo por tipo de câncer, a alta expressão de CXCL12 foi associada à redução da SG em pacientes com câncer de esôfago (HR 2,08; IC 95% 1,31-3,33,  $p = 0,002$ ), pâncreas (HR 1,54; IC 95% 1,21–1,97,  $p = 0,0005$ ) e câncer de pulmão (HR 1,37; IC 95% 1,08-1,75,  $p = 0,01$ ), enquanto que em pacientes com câncer de mama, a alta expressão de CXCL12 conferiu uma melhor SG (HR 0,5; IC 95%: 0,38-0,66,  $p = 0,00001$ ). A causa de diferentes resultados da alta expressão de CXCL12 em câncer de mama comparada aos tumores de esôfago, pâncreas e pulmão permanece incerta e pode decorrer destes outros tipos de neoplasias serem mais agressivas que o câncer de mama, com a alta expressão de CXCL12 sendo associada a uma maior invasão e mortalidade. Acredita-se também que ocorra um *downregulation* do CXCL12 no câncer de mama, estando; portanto, esta quimiocina pode ser mais expressa neste tipo tumoral (SAMARENDRA et al., 2017).

Mirisola et al. (2009) estudaram a presença do CXCL12 e do CXCR4 em 100 amostras de tecidos de câncer de mama por IHC e por duas bases de dados por *microarray gene expression*. A análise estatística multivariada dos resultados de coloração para CXCL12 revelou uma correlação significativa entre SLD ( $p = 0,002$ ) para os pacientes com alta expressão de CXCL12. Quando relacionou-se a SLD às variantes clínicas, houve relação entre o tamanho do tumor ( $p = 0,001$ ) e acometimento linfonodal ( $p = 0,005$ ). Ou seja, quanto menor o tumor e presença de linfonodos negativos, maior foi a expressão do CXCL12; e o tipo do local de marcação do CXCL12: centro ( $p = 0,001$ ) e estroma ( $p = 0,02$ ) também influenciou a marcação positiva. Quando se avaliou a SG, manteve-se o benefício da alta expressão do CXCL12 em relação ao tamanho do tumor ( $p = 0,02$ ), presença de RP ( $p = 0,004$ ) e marcação central do CXCL12 ( $p = 0,001$ ) e estromal ( $p = 0,005$ ). O padrão de expressão do CXCR4 não está associado a aumento de SLD na análise.

Análise multivariada revela que a expressão de CXCL12 é um forte marcador prognóstico independente e propõe-se que a saturação do receptor através da produção autócrina de CXCL12 reduz a quimiotaxia do CXCL12 para a liberação de tecidos alvo de metástase (MIRISOLA et al., 2009).

ZHI-DONG et al. (2014) investigou 52 pacientes com diagnóstico confirmado de CDI de mama que foram submetidas à quadrantectomia ou à mastectomia, sem quimio ou radioterapia prévias e pesquisou a presença de CXCL12 por IHC e por *Western Blot*. As análises deste estudo mostraram que pacientes com a ausência da expressão do CXCL12 obtiveram uma taxa de SG em 5 anos significativamente menor do que aqueles com expressão positiva de CXCL12 ( $p < 0,01$ ). A expressão negativa de CXCL12 também foi relacionada a um maior tamanho tumoral, presença de metástases linfonodais, maior estadiamento TNM e tumores HER2 negativo. Adicionalmente, demonstrou-se que a regulação positiva da expressão de CXCL12 por infecção com um adenovírus contendo um vetor CXCL12 inibiu significativamente o crescimento celular e reduziu a migração de células de câncer de mama. Estes dados sugerem que o CXCL12 desempenha um papel importante no crescimento e invasão celular no câncer de mama e parece ser um potencial marcador prognóstico da doença (ZHI-DONG et al., 2014).

Um outro estudo avaliou as expressões de mRNA do CXCL12, do CXCR4 e do CXCR7 em 115 amostras primárias de pacientes, que não foram submetidas a tratamento prévio para o câncer de mama e de linfonodos regionais por Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR). Os níveis de expressão de CXCR4 e CXCR7 em tecidos de câncer de mama foram significativamente maiores do que em tecidos normais adjacentes ( $p = 0,002$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), enquanto o nível de expressão de CXCL12 em tecidos de câncer de mama não diferiu daquele em tecidos normais adjacentes ( $p = 0,156$ ). Além disso, o CXCL12 exibiu diferenças significativas na expressão entre o tumor primário e tumor metastático linfonodal, sendo mais frequente no tumor metastático ( $p = 0,039$ ). As expressões de CXCR4 e CXCR7 no tumor metastático também foram maiores, embora não tenha sido observada diferença significativa ( $p = 0,067$  e  $p = 0,054$ , respectivamente). A análise de sobrevida revelou que os pacientes com alta expressão de CXCR4 e CXCR7 tiveram uma menor sobrevida em comparação com aqueles com baixa expressão e a presença de CXCL12, de CXCR4 e de CXCR7 foram fatores prognósticos independentes para SG, sendo estes marcadores

potenciais sinalizadores de propagação tumoral do câncer de mama, podendo atuar como fatores preditivos que afetam significativamente o prognóstico (WU et al., 2015).

Em metanálise realizada por Liu et al. (2017) contendo 8 estudos totalizando 2.205 pacientes com câncer de mama, a alta expressão de CXCL12, avaliada tanto por IHC quanto por expressão de RNA, foi associada a melhor SLD (HR 0,76; IC 95% 0,68 – 0,86,  $p < .0001$ ). Contudo, a relação com a SG só apresentou significância estatística na análise por IHC (HR 0,66, IC 95% 0,49 – 0,87,  $p = 0.004$ ). Observou-se também que a alta expressão de CXCL12 foi associada à presença de RE (OR 1,92, IC 95% 1,08 – 3,45,  $p = 0,03$ ), presença de HER2 negativo (OR 2,64, IC 95% 1,06 – 6,59,  $p = 0.04$ ) e menor tamanho tumoral (OR 2,49, IC 95% 1,47 – 4,22,  $p = 0.0007$ ), não sendo evidenciado correlação com outras variáveis (LIU et al., 2018).

Investigar o papel da relação da expressão do CXCL12 e do CXCR4 em pacientes com câncer de mama é de fundamental importância para tentativa de esclarecer melhor os mecanismos de invasão e metástase e consequente disseminação tumoral e possíveis vias de terapia-alvo, além de definir o real papel preditivo e prognóstico destes marcadores. O nosso estudo, objetiva vir a somar dados à literatura mundial e tentar descrever também a biologia tumoral e do seu microambiente em amostras de pacientes diagnosticadas em um serviço local, sendo representativo da realidade da nossa população acometida por câncer de mama.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

É um estudo de coorte retrospectiva que teve como objetivo avaliar a expressão de CXCL12 e CXCR4 por IHC em amostras de pacientes portadoras de CDI de mama do HC-UFPE obtidas de 2011 a 2014 e correlacioná-las com SG, com SLD e com variáveis clínicas, histológicas da doença e tratamento realizado.

As informações foram coletadas a partir dos prontuários dos pacientes elegíveis do Hospital das Clínicas – HC/UFPE e incluíram dados sobre características clínicas e histopatológicas do material obtido. As variáveis analisadas foram idade, tamanho tumoral, acometimento linfonodal, estadiamento (*AJCC 8<sup>th</sup> edition*), subtipo histológico, infiltrado inflamatório tumoral, IAL, IPN, expressão de CXCL12, expressão de CXCR4, realização e modalidades de tratamento quimioterápico, realização de radioterapia, administração de hormonioterapia e o tipo da medicação utilizada. Foram avaliados os sítios de metástases, as datas de progressão da doença, as datas de óbito ou do último seguimento.

### 4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram analisadas amostras de pacientes com idade maior ou igual 18 anos e diagnóstico de CDI de mama obtidas no HC-UFPE e acompanhados no serviço de Mastologia e Oncologia Clínica de janeiro de 2011 a dezembro de 2014, as quais foram doadas por pacientes que consentiram em participar da pesquisa, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os pacientes podiam ter sido submetidos a tratamento neoadjuvante.

Foram excluídos do estudo os pacientes que realizaram tratamento em outro serviço, que tinham prontuários com ausência de dados (variáveis clínicas, dados de histopatológico, informações sobre o tratamento e datas de desfecho) e com tecidos inadequados para a análise.

### 4.3 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Utilizou-se blocos de parafina de tumores malignos de mama (N = 22). As amostras cujos tecidos apresentaram artefatos de autólise ou sinais de processamento inapropriados foram excluídas do procedimento. Os blocos de qualidade satisfatória foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida, foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em micro-ondas (300 W de potência) por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas em solução com metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% (v/v) por 30 min, a 25°C, seguida de solução de bloqueador protéico Boster Biological Technology (BBT) por 1 h a 25°C. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário diluído em PBS (Tampão fosfato-salino) por 18 h a 4°C. O excesso do anticorpo foi retirado com dois banhos do tampão PBS. Logo após, os tecidos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (BBT) e revelados com o substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina 3,3'). Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante de anticorpo e para controle negativo, o anticorpo foi substituído por PBS. Foram usados para testes controle, amostras de pacientes com tecido prostático e mamário normais e mamário com patologias benignas e amostras sem exposição ao anticorpo primário.

Foram utilizados dois anticorpos para avaliação das amostras: (a) O anticorpo anti-CXCL12 é um anticorpo policlonal de coelho para detecção do CXCL12 que pode ser usado para teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, WB e IHC, medindo 100 µg/vial, da marca BBT, Pleasanton, Califórnia (CA), Estados Unidos da América (EUA). Utilizado na concentração 0.5-1µg/ml. O tecido foi bloqueado com 10% de soro de cabra e incubado com 1 µg /ml de anticorpo anti-CXCL12 durante a noite a 4 °C. Utilizou-se IgG de cabra anticoelho biotilada como anticorpo secundário e incubou-se durante 30 minutos a 37° C. A seção de tecido foi desenvolvida usando o SABC (Complexo de estreptavidina-biotina) (nº de catálogo SA1022) com DAB como cromógeno. (b) O anti-CXCR4 é um anticorpo policlonal de coelho para detecção do CXCR4 que pode ser usado para teste WB e IHC, medindo 100 µg/vial, da marca BBT, Pleasanton, CA, EUA. Utilizado na concentração 0.5-1µg/ml. A recuperação do antígeno mediada pelo calor foi realizada em tampão citrato (pH 6, solução de recuperação de epítomos) por 20 minutos. O tecido foi bloqueado com 10% de soro de cabra e incubado com 1 µg /ml de anticorpo de

coelho anti-CXCR4 durante a noite a 4 ° C. Utilizou-se IgG de cabra anticoelho biotinizada como anticorpo secundário e incubou-se durante 30 minutos a 37°C. A seção de tecido foi desenvolvida usando o SABC (nº de catálogo SA1022) com DAB como cromógeno.

#### 4.4 ANÁLISE DE IMAGENS

As análises de imagens foram realizadas no microscópio óptico com câmera digital (Nikon) acoplada, inicialmente em menor aumento, seguindo-se aos aumentos subsequentes. As preparações histológicas são consideradas positivas na marcação de 10%-20% na contagem de células por campo (1 cm<sup>2</sup>) (LOPES et al., 2005, PEDROSO et al., 2008).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos e demais variáveis categóricas clínicas foram analisadas através do uso de técnicas de estatística descritiva. As variáveis clínicas e patológicas foram relacionadas através de modelo de regressão logística e de análise de probabilidades, sendo escolhido para a análise o Modelo de Logit:  $A(x'\beta) - \frac{\varepsilon^{x'\beta}}{1 + \varepsilon^{x'\beta}}$ , o qual permite avaliar o efeito multiplicativo de uma única variável sobre as outras, através do pacote estatístico Stata, versão 13.

A SG e a SLD foram analisadas através do método de Kaplan-Meier e as curvas foram comparadas utilizando o teste de Log-rank entre os pacientes CXCL12 positivo e negativo e CXCR4 positivo e negativo. A significância estatística foi considerada  $p < 0,05$  para os testes bicaudados. As análises de sobrevida foram realizadas com o auxílio do programa SPSS, versão 20.

#### 4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi realizado de acordo com o protocolo das diretrizes de (Boas Práticas Clínicas da Conferência Internacional de Harmonização) ICH GCP e as leis e requisitos regulatórios locais aplicáveis seguindo a resolução nº 466/2012. O

protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 82425617.4.0000.5207) e as amostras foram cedidas mediante assinatura do TCLE.

## 5 RESULTADOS

A amostra foi formada por 22 pacientes do sexo feminino com CDI, com mediana de idade ao diagnóstico de 56,8 anos (menor idade: 34, maior idade: 84). Aproximadamente dois terços dos pacientes incluídos no estudo apresentavam tumores >2 cm e acometimento de linfonodos axilares por doença neoplásica, representando uma doença localmente avançada ao diagnóstico pelo estadiamento (AJCC, 8<sup>th</sup> edition). A maioria das biópsias mamárias analisadas apresentou grau histológico 2 ou 3 (Tabela 1). Quando se avaliou o tecido peritumoral, observou-se um predomínio de infiltrado inflamatório nas amostras; contudo, aproximadamente um terço dos pacientes cursou com presença de IAL no tecido e a IPN não foi vista em nenhum caso. A classificação por subtipo histológico evidenciou aproximadamente 56% dos pacientes com doença com perfil imunohistoquímico com RH positivo e HER2 negativo, 17% com amplificação do HER2 e 21% de tumores triplo negativo, conforme Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Dados clínicos das pacientes incluídas no estudo

<b>Variável</b>	<b>N (%)</b>
<b>Tamanho do tumor (mm)</b>	
0-20	5 (22,72)
21-50	8 (36,36)
>51	9 (40,90)
<b>Comprometimento Linfonodal</b>	
0	7 (31,81)
N1 (1 a 3 linfonodos)	7 (31,81)
N2 (4 a 9 linfonodos)	5 (22,72)
N3 (10 ou mais linfonodos)	2 (9,09)
Não abordado	1 (4,54)
<b>Estadiamento – AJCC</b>	
IA	4 (18,18)
IB	0
IIA	3 (13,63)
IIB	5 (22,72)

IIIA	5 (22,72)
IIIB	3 (13,63)
IIIC	2 (9,09)
IV	0

**Grau Histológico**

1	3 (13,63)
2	9 (40,90)
3	9 (40,90)
Não informado	1 (4,54)

**Infiltrado Inflamatório**

Ausente	5 (22,72)
Presente	17 (77,27)

**Invasão Angiolinfática**

Ausente	16 (72,72)
Presente	6 (27,28)

**Invasão Perineural**

Ausente	22 (100)
Presente	0

---

\* Estadiamento TNM de acordo com a *8th edition of the AJCC cancer staging manual*; N: número de pacientes; NI: número de linfonodos acometidos; NI: não informado.

Fonte: Resultado da pesquisa.

O grupo estudado apresentou uma maioria de pacientes com doença localmente avançada, por isso utilizou-se de outras opções adjuvantes de tratamento complementares à cirurgia, como a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia, quando indicado. Aproximadamente 40% dos pacientes realizou tratamento adjuvante e 25%, neoadjuvante. Os principais esquemas quimioterápicos prescritos, tanto na adjuvância quanto na neoadjuvância, foram baseados em antracíclicos e taxanos, com ou sem a inclusão do trastuzumabe, baseado na indicação da droga para tumores HER2 positivos. Quase metade dos pacientes necessitou de radioterapia adjuvante e a hormonioterapia mais empregada foi o tamoxifeno (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão por IHC e classificação por subtipo histológico

<b>Expressão IHC e subtipo histológico</b>	
<b>Expressão IHC</b>	<b>N (%)</b>
<b>Expressão de Receptor de Estrógeno</b>	
Positivo	14 (63,64)
Negativo	7 (31,81)
Não informado	1 (4,54)
<b>Expressão de Receptor de Progesterona</b>	
Positivo	13 (59,10)
Negativo	8 (36,36)
Não informado	1 (4,54)
<b>Expressão de HER2</b>	
Positivo	4 (18,18)
Negativo	17 (77,27)
Não informado	1 (4,54)
<b>Subtipo</b>	
Luminal A	5 (22,72)
Luminal B	4 (18,18)
RH positivo HER2 negativo Sem Ki67	3 (13,63)
Superexpressão de HER2	2 (9,09)
Luminal HER2	2 (9,09)
Triplo Negativo	5 (22,72)
Não informado	1 (4,54)

\* N: número de pacientes, RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona, HER-2, human epidermal growth factor receptor-2; NI: não informado; Ki67: índice de proliferação.

Fonte: Resultado da pesquisa.

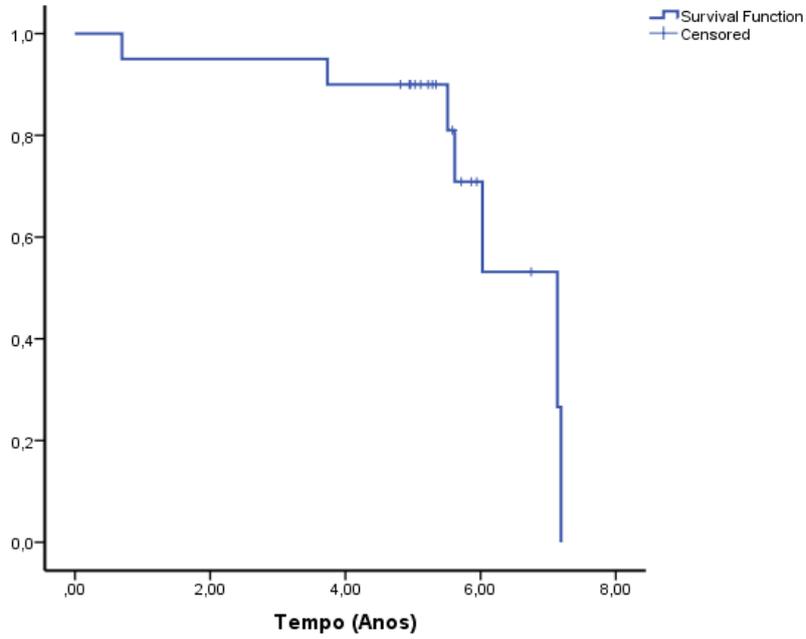
Quase um terço dos pacientes apresentou recidiva de doença durante o seguimento clínico, sendo os principais sítios de recorrência: ossos, mama (plastrão) e linfonodos locorregionais; seguido por recidiva pleural, pulmonar, hepática e cerebral (Tabela 7). Para a população global, a SLD mediana foi de 7,13 anos (IC 95% 5,73 – 8,53) e a SG não foi alcançada até o momento, conforme Figura 6 e 7, respectivamente.

Tabela 7 - Tratamento realizado e desfecho

<b>Tratamento realizado e desfecho</b>	<b>N %</b>
<b>Quimioterapia</b>	
Adjuvante	8 (36,36)
Neoadjuvante	6 (27,28)
Paliativa	1 (4,54)
Não	4 (18,18)
NI	3 (13,63)
<b>Radioterapia</b>	
Sim	10 (45,46)
Não	8 (36,36)
NI	4 (18,18)
<b>Hormonioterapia</b>	
Tamoxifeno	7 (31,81)
Inibidor de Aromatase	6 (27,28)
Não se aplica	7 (31,81)
NI	2 (9,09)
<b>Progressão de doença</b>	
Sim	6 (27,28)
Não	13 (59,10)
NI	3 (13,63)
<b>Sítios de Metástase</b>	
Mama	2
Pulmão	1
Fígado	1
Pleura	1
Ossos	3
Linfonodos	2
Sistema Nervoso Central	1

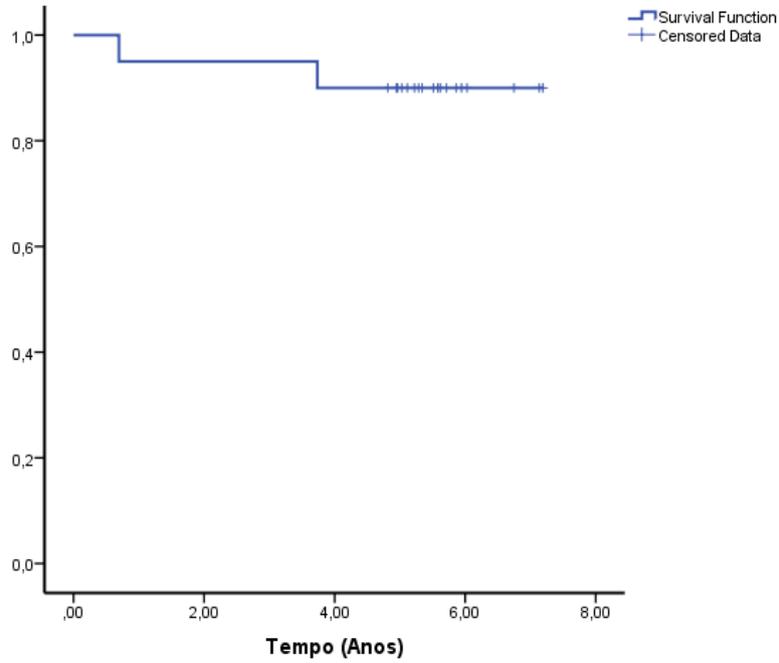
\* NI: não informado

Figura 6 - Sobrevida livre de doença (SLD) na população do estudo.



\* SLD - Mediana 7,13 anos. (IC 95% 5,73 – 8,53)

Figura 7 - Sobrevida global (SG) na população do estudo.



\* SG – Não alcançada

A expressão do CXCR4 por IHC foi positiva em aproximadamente um quinto da amostra e foi predominantemente citoplasmática (Figura 8). A marcação do CXCL12 por IHC foi evidenciada em aproximadamente um terço da população estudada e foi predominantemente citoplasmática e com presença mais relevante no componente estromal, ocorrendo também marcação nuclear e na membrana plasmática (Figura 9) (Tabela 8).

Tabela 8 - Expressão IHC de CXCR4 e CXCL12

<b>Expressão de CXCR4</b>	<b>N (%)</b>
Positiva	5 (22,72)
Negativa	17 (77,27)
<b>Expressão de CXCL12</b>	
Positiva	6 (27,28)
Negativa	16 (72,72)

\* CXCR4: : C-X-C chemokine receptor type 4; CXCL12: C-X-C motif ligand 12

Fonte: Resultado da pesquisa.

Figura 8 - Padrão da marcação imunohistoquímica de amostras de mama com anticorpo anti-CXCR4. (A) Tecido mamário normal (aumento 400x). (B e C) Carcinoma Ductal in situ - CDIS (aumentos de 100x e 400x, respectivamente). (D) Carcinoma Ductal Invasivo - CDI (aumento de 100x) e (E e F) com evidência para a marcação celular citoplasmática (aumento de 400x).

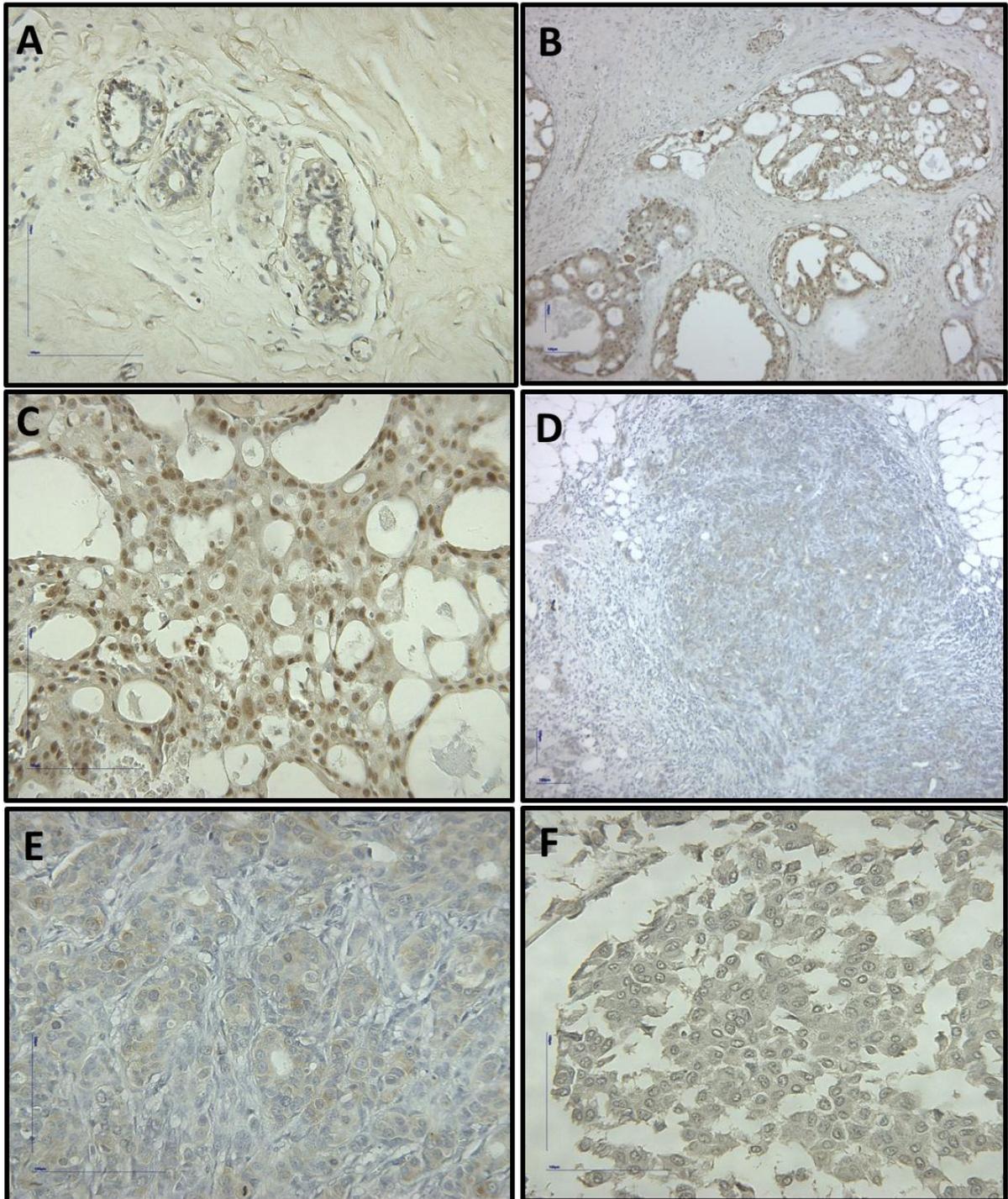
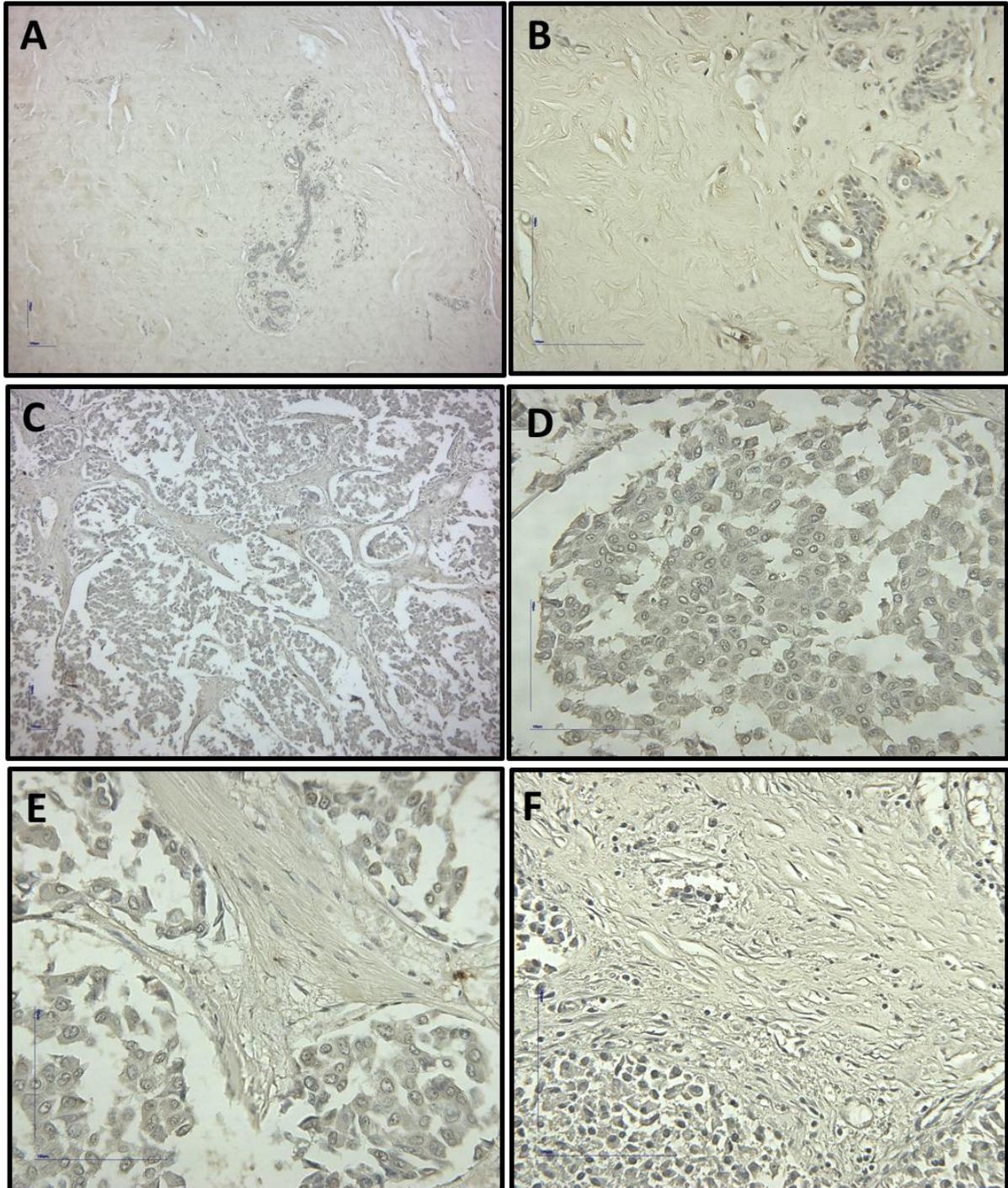


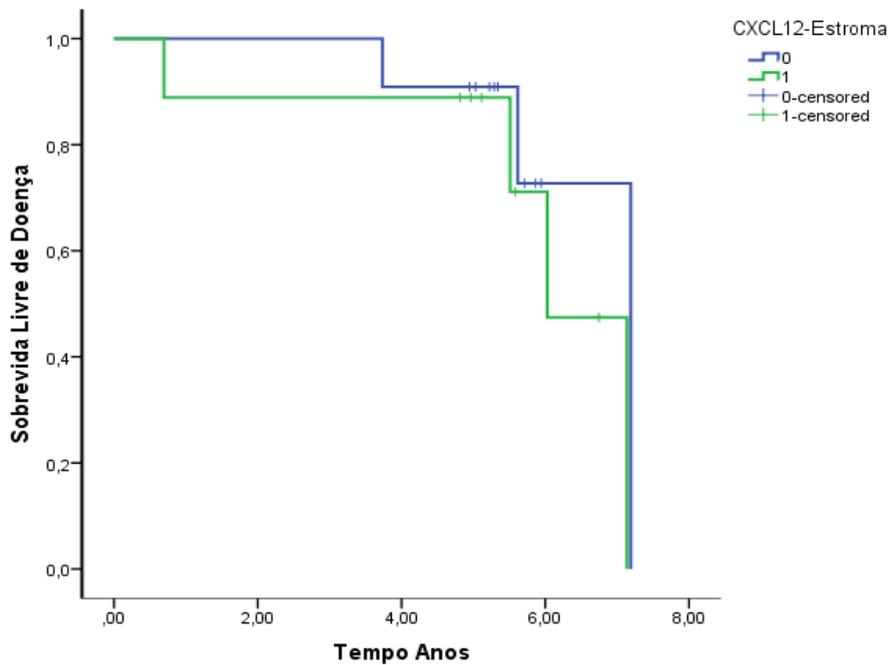
Figura 9 - Padrão da marcação imunohistoquímica de amostras de mama com anticorpo anti-CXCL12. (A e B) Tecido mamário normal (aumentos de 100x e 400x, respectivamente) demonstrando positividade no estroma o componente celular. (C) Carcinoma Ductal Invasivo - CDI (aumento de 100x) e (D, E e F) evidenciando a marcação citoplasmática das células tumorais e estroma em amostras com CDI (aumento de 400x).



A ausência da expressão do CXCL12 foi associada a uma maior SLD 0,481 (IC 95% 0,08 – 2,72), sem significância estatística ( $p = 0,408$ ) (Figura 10). A presença da expressão do CXCR4 foi relacionada a uma maior SLD, com OR 1,7 (IC 95% 0,18 – 16,42), sem significância estatística ( $p = 0,643$ ) (Figura 11). Estas análises provavelmente foram limitadas pelo tamanho reduzido da amostra.

Figura 10 - Sobrevida livre da doença (SLD) relacionada à expressão de CXCL12.

**Legenda:** linha azul: ausência de expressão, linha verde: presença de expressão.



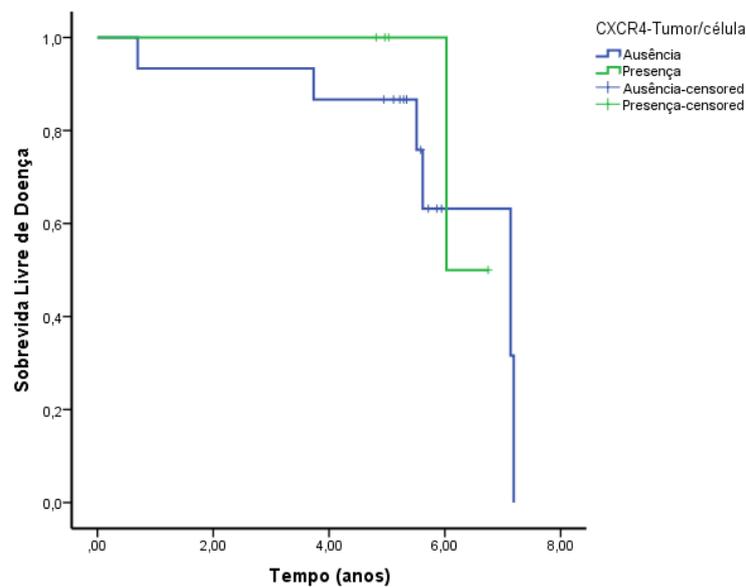
\* HR: 0,481 (IC 95% 0,08 – 2).  $p = 0,408$

Figura 11 - Sobrevida livre da doença (SLD) relacionada à expressão de CXCR4

Legenda: azul: ausência de expressão, verde: presença de expressão

\* HR 1,7 (IC 95% 0,18 – 16,42)  $p = 0,643$

A correlação entre as variáveis clínico-patológicas pelo método de Logit com



a expressão de CXCL12 estromal, CXCL12 celular e CXCR4, demonstrou associação entre a expressão de CXCL12 estromal com o GH, a IAL e a quimioterapia realizada e associação entre a expressão de CXCR4 com o GH. Ao se analisar o componente celular do CXCL12, não houve associação estatisticamente significativa com nenhuma outra variável analisada, conforme tabela 9.

Tabela 9 - Correlação entre a expressão de CXCL12 celular e estromal e CXCR4 com variáveis clínicas nos pacientes da amostra pelo método de Logit.

Variáveis	CXCL12 celular		CXCL12 estromal		CXCR 4	
	P- valor	(95% IC)	P- valor	(95% IC)	P- valor	(95% IC)
Tamanho tumoral	0,45	(-6,01 - 2,69)	0,75	(-3,38 - 4,64)	0,14	(-3,97 - 2,78)
Comprometimento linfonodal	0,22	(-7,65 - 1,76)	0,25	(-4,38 - 16,44)		
Estadiamento	0,14	(-1,15 - 7,76)	0,26	(- 12,65 - 3,50)	0,57	(-1,27 - 2,29)
Grau histológico	0,45	(-5,35 - 2,40)	< 0,001	(-28,58 - -10,13)	0,003	(-6,52 - -1,37)
Infiltrado inflamatório	0,95	(-3,59 - 3,40)	0,11	(-1,28 - 11,19)	0,62	(- 3,79 - -2,26)
Invasão angiolímfática	0,14	(-0,97 - 6,53)	< 0,001	(28,33 - 52,98)	0,26	(-1,0 - 3,70)
Subtipo histológico	0,08	(-0,13 - 1,82)	0,67	(-9,47 - 1,46)	0,99	(-1,17 - 1,19)
Quimioterapia	0,33	(- 5,87 - 1,99)	< 0,001	(-25,56 - 14,34)		

\* CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; CXCL12: C-X-C motif ligand 12

Pelos resultados obtidos na análise, a não expressão de CXCL12 estromal associou-se a presença de GHs mais elevados. Após a realização do teste de robutez, houve a confirmação da correlação, a qual foi observada para os GHs 1, 2 e 3. Quando se avaliou o CXCR4, a não expressão do receptor para quimiocina foi influenciada pelo GH, porém após aplicação do teste de robutez, esta relação estatisticamente significativa só foi evidenciada para o GH 1 (Tabela 10).

Tabela 10 - Correlação entre o grau histológico e o a expressão do CXCL12 estromal e do CXCR4

Grau histológico	CXCL12 estromal		CXCR4	
	P- valor	(95% IC)	P- valor	(95% IC)
1	< 0,001	(0,87 – 1,0)	< 0,001	(0,65 - 1,10)
2	< 0,001	(0,35 – 0,72)	0,07	(- 0,03 - 0,70)
3	< 0,001	(0,14 – 0,30)	0,32	(- 0,02 - 0,63)

\* CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4; CXCL12: C-X-C motif ligand 12

A positividade da expressão CXCL12 estromal apresentou correlação estatisticamente significativa com a presença de IAL, podendo-se inferir a importância do microambiente tumoral na regulação do processo invasão e metástase. Talvez exista a necessidade da integridade da expressão do CXCL12 do fibroblasto para a ocorrência da migração celular iniciada pelo processo da IAL.

A realização de quimioterapia de qualquer tipo influenciou a não expressão do CXCL12 estromal com significância estatística. Foi feito uma análise isolada do papel da quimioterapia neoadjuvante em relação à expressão de CXCL12 estromal e observou-se persistência deste achado (IC 95% 0,10 – 0,39,  $p = 0,001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes do estudo foi diagnosticada na meia-idade, similar à literatura em que a maioria das pacientes com câncer de mama tem o diagnóstico estabelecido na pós-menopausa. A maior parte da amostra recebeu o diagnóstico de CDI de mama localmente avançado, representando a realidade de um serviço público brasileiro especializado no tratamento de câncer, cujo grupo populacional atendido nestes setores apresenta grande dificuldade de acesso aos métodos de investigação, com determinação do diagnóstico, muitas vezes, em fases mais avançadas da doença. O prognóstico da doença é influenciado pelo estadiamento, com taxas de sobrevida em 5 anos de 95, 85, 70, 52, 48 e 18% para doença I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, respectivamente (NEWMAN, 2009).

O tamanho tumoral é definido como o maior diâmetro do tumor primário da mama e é reconhecido como um importante fator prognóstico negativo. Em coorte do SEER com 24.740 pacientes, as taxas de sobrevida em 5 anos foram de 91% para T < 2 cm, 80% para T de 2 a 5 cm e 63% para T > 5 cm (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989). O tamanho tumoral é correlacionado com o envolvimento linfonodal, mas ambos são fatores prognósticos independentes. A presença de metástase em linfonodos também reflete uma menor sobrevida em 5 anos de 85% quando comparado aos pacientes sem doença axilar com 99% (SIEGEL et al., 2017). A presença de doença metastática ao diagnóstico representa o pior fator prognóstico.

No nosso estudo foi observado uma maior presença de tumores com GHs 2 e 3 e quando foi realizada a correlação desta variável com a expressão de CXCL12 estromal, CXCL12 celular e receptor CXCR4, houve uma correlação significativamente estatística entre todos os GHs com o CXCL12 estromal e entre o GH 1 e o CXCR4, como descrito anteriormente. Quanto mais elevado o GH, menor foi a expressão de CXCL12. O GH em câncer de mama é avaliado pelo sistema de gradação Elston-Ellis, o qual avalia os graus de diferenciação tumoral pela percentagem de formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Os CDIs são divididos em 3 graus baseados nestes achados: bem diferenciados/G1 (Pontuação 3, 4 ou 5) com ninhos sólidos de glândulas, núcleo uniforme e poucas mitoses; moderadamente diferenciados/G2 (Pontuação 6 ou 7) com ninhos sólidos de glândulas infiltrando o tecido tumoral, moderado pleomorfismo nuclear e

moderada atividade mitótica; e pobremente diferenciados/G3 (Pontuação 8 ou 9) com ausência de componentes glandular, núcleo atípico e alta atividade mitótica (ELSTON; ELLIS, 2002).

Um estudo brasileiro realizado por Guembarovski et al. (2018) avaliou amostras de tumores de mama triplo negativo e foi observada uma correlação positiva com o GH e a expressão membranar de CXCR4 nas células tumorais ( $p = 0,036$ ), negativa com metastases linfonodais ( $p = 0,036$ ) e nenhuma outra associação com outras variáveis clínicas. A marcação de CXCR4 foi detectada mais intensamente no citoplasma do que na membrana citoplasmática e mais expressa no tumor do que no tecido normal, porém sem significância estatística ( $p = 0,07$ ). Na nossa análise, a marcação do CXCR4 foi predominantemente citoplasmática. Guembarovski et al. (2018) evidenciou também uma correlação negativa entre a expressão de CXCL12 e o Ki67 ( $p = 0,006$ ), a qual nos permite realizar uma comparação indireta entre o Ki67 e o GH, já que ambos representam em valores elevados, uma maior desdiferenciação celular e células em rápida divisão mitótica. Em nossos dados, após a realização dos testes de robutez, GH influenciou a negatividade da expressão de CXCL12, com significância estatística.

A presença de IAL em câncer de mama parece ser um indicador de mau prognóstico, principalmente em tumores de alto grau. Em um estudo de coorte com 1.704 pacientes que não receberam tratamento sistêmico, a IAL foi um fator independente de risco para recorrência local e morte (PINDER et al., 1994). Contudo, hoje se acredita que a IAL seja apenas um dos fatores que devem ser levados em consideração e deve ser associada a outras variáveis clínicas de mau prognóstico para melhor definição de desfechos desfavoráveis (EJLERTSEN et al., 2009). O nosso estudo evidenciou uma correlação positiva com significância estatística entre a positividade do CXCL12 estromal e IAL, indo de encontro à hipótese de que subtipos histológicos mais agressivos negativam a expressão de CXCL12. Entretanto, salientamos que esta marcação foi evidenciada no componente do estroma tumoral, sinalizando a importância da interação microambiente-célula cancerígena e que a IAL isoladamente não é capaz de determinar o prognóstico da doença.

Quando se avaliou os subtipos câncer de mama, houve uma prevalência similar à literatura, com presença de aproximadamente 56% de doença RH positiva, HER2 negativo, 17% de tumores HER2 positivo e 21% de tumores triplo negativo.

Não foi estabelecida correlação entre a expressão de CXCL12 e de CXCR4 com a presença ou ausência de RE, do RP e do HER2 isoladamente. Quando se isolou os subtipos baseados na classificação IHC, também não houve associação.

Nosso estudo evidenciou que a realização de quimioterapia foi relacionada à negatividade da expressão de CXCL12 com significância estatística, provavelmente relacionado à amostra conter uma maioria de tumores localmente avançados e mais agressivos. A análise isolada do papel da quimioterapia neoadjuvante foi realizada para tentar verificar qual a importância do tratamento oncológico na modulação do componente estromal do CXCL12 e observou-se a persistência da correlação inversamente proporcional, ou seja, o CXCL12 estromal permaneceu não expresso e a quimioterapia neoadjuvante pode não ter alterado a dinâmica do microambiente tumoral, mas para uma melhor avaliação desta hipótese, seria necessária a avaliação da expressão da quimiocina antes e após o tratamento. No estudo de Mirisola et al. (2009), a quimioterapia não alterou a expressão de CXCL12.

Na nossa análise, a mediana de SLD foi de 7,13 anos (IC 95% 5,73 – 8,53) e a SG não foi alcançada até o momento. Apesar da doença localmente avançada, os dados de sobrevida são animadores e este fato pode ser justificado pela melhora nas terapêuticas disponíveis para a doença, contudo são necessários estudos com um número maior de pacientes para melhor verificação destes desfechos quando estudamos populações com câncer de mama. LV et al. (2014) não observou associação entre a expressão de CXCL12 e a presença de RE e RP, mas verificou uma maior expressão de CXCL12 em tumores HER2 positivos ( $p < 0,01$ ) (LV et al., 2014).

Quando houve a estratificação da expressão de CXCL12 e CXCR4 para o cálculo da SLD, a ausência da expressão do CXCL12 foi associada a uma maior SLD HR 0,481 (IC 95% 0,08 – 2,72,  $p = 0,408$ ), sem significância estatística e a presença da expressão do CXCR4 foi relacionada a uma maior SLD, com HR 1,7 (IC 95% 0,18 – 16,42,  $p = 0,643$ ), sem significância estatística, com estas análises limitadas pelo tamanho reduzido da amostra. De acordo com Mirisola et al. (2009), a alta expressão de CXCL12 foi associada melhor SLD, mesmo após a análise multivariada, tanto em subgrupo RE positivo: HR 0,81 (IC 95% 0,69 – 0,96,  $p = 0,015$ ) quanto RE negativo: HR 0,85 (IC 95% 0,74 – 0,98,  $p = 0,002$ ). As presenças RE e RP não foram relacionadas à SLD e à SG na amostra e a expressão de CXCR4 não apresentou significância estatística quando associada à SLD e SG

(MIRISOLA et al., 2009). Infelizmente o tamanho reduzido da amostra prejudicou a estratificação destas variáveis e as suas relações com a SLD.

A elevada expressão de CXCL12 tem sido relacionada a um melhor prognóstico em pacientes com câncer de mama (MIRISOLA et al., 2009, SAMARENDRA et al., 2017, LIU et al., 2018). O papel da relação CXCL12/CXCR4 tem uma atividade que favorece o crescimento tumoral com modulação do microambiente, mas não necessariamente relacionado ao estímulo do surgimento de metástases. CXCL12 é expresso por células cancerígenas, células normais, fibroblastos e células endoteliais. A nossa análise observou uma predominância citoplasmática do componente estromal do CXCL12, semelhante ao estudo de Mirisola et al. (2009). Um estudo americano publicado em 2008 verificou que a reexpressão do CXCL12 autócrino em células tumorais foi associada a uma diminuição de metástases e que provavelmente os tecidos mamários normais conseguem manter íntegra a expressão do CXCL12 por silenciamento epigenético do CXCL12 através da metilação do DNA (WENDT, COOPER, DWINELL, 2008). Acredita-se que a expressão de CXCL12 pelo estroma tumoral tem uma ação parácrina e que a saturação do receptor com a ligação ao CXCR4 pode ter uma resposta no sinal quimiotático, não respondendo aos estímulos externos (MIRISOLA et al., 2009).

Nosso trabalho conseguiu evidenciar a perda da expressão do CXCL12 em pacientes com tumores com GHs mais elevados e demonstrar uma correlação positiva entre a expressão de CXCL12 com a IAL. Conseguiu-se observar também que a realização da quimioterapia neoadjuvante não foi capaz de modificar a atividade do microambiente tumoral, com persistência da negatividade da expressão após realização do tratamento. A ausência de expressão de CXCL12 foi relacionada a uma maior SLD, porém sem significância estatística e a expressão do CXCR4 foi relacionada a uma maior SLD, sem significância estatística. A SG não foi alcançada no grupo estudado e a SLD, apesar da maioria dos pacientes apresentarem doença localmente avançada, foi de 7,13 anos. As principais limitações do nosso estudo são aquelas relacionadas aos dados de estudos retrospectivos, ao pequeno número da amostra e à impossibilidade de realização da pesquisa da expressão do CXCL12 e do CXCR4 nos sítios de metástases e previamente ao tratamento. Manter estudos que busquem o conhecimento da interação entre a célula tumoral e o microambiente

pode melhorar o entendimento do processo de evolução da metástase e proporcionar novas estratégias terapêuticas.

## 7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram avaliadas as expressões, por meio de imunohistoquímica, da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em amostras de câncer de mama, diagnosticadas como CDI. A expressão do CXCR4 foi positiva em aproximadamente um quinto da amostra, sendo predominantemente citoplasmática, já a marcação do CXCL12 foi evidenciada em aproximadamente um terço da população estudada, com predomínio no citoplasma e mais relevante no componente estromal. A não expressão do CXCL12 estromal associou-se a presença de GHs mais elevados. Após a realização do teste de robutez, houve a confirmação da correlação, a qual foi observada para os GHs 1, 2 e 3, enquanto que a não expressão do CXCR4, só apresentou relação estatisticamente significativa com o GH 1.

A expressão de CXCL12 estromal apresentou relação diretamente proporcional à IAL, ressaltando-se o valor do microambiente tumoral na modulação do processo de migração celular. Houve uma relação estatisticamente significativa em a realização da quimioterapia neoadjuvante e a ausência de expressão do CXCL12 estromal, podendo o tratamento não ter tido a capacidade de modificar o estroma peritumoral, porém para melhor análise desta situação, teria sido importante a avaliação da expressão do receptor antes e após o tratamento.

Para a população global do estudo, a SLD mediana foi de 7,13 anos (IC 95% 5,73 – 8,53) e a SG não foi alcançada até o momento, com recidiva em um terço dos pacientes durante o seguimento. Após a estratificação pela expressão de CXCL12 e CXCR4 para o cálculo da SLD, a ausência da expressão do CXCL12 foi associada a uma maior SLD HR 0,481 (IC 95% 0,08 – 2,72,  $p = 0,408$ ), sem significância estatística e a presença da expressão do CXCR4 foi relacionada a uma maior SLD, com HR 1,7 (IC 95% 0,18 – 16,42,  $p = 0,643$ ), sem significância estatística, com estas análises limitadas pelo tamanho reduzido da amostra.

As principais limitações do nosso estudo são aquelas relacionadas aos dados de estudos retrospectivos, ao pequeno número da amostra e à impossibilidade de realização da pesquisa da expressão do CXCL12 e do CXCR4 nos sítios de metástases e previamente ao tratamento. Sugerimos estudos prospectivos para melhor avaliação da evolução do comportamento da quimiocinas durante o tratamento e seu real papel na conexão entre a célula tumoral e o microambiente.

## 7.1 PERSPECTIVAS

Este estudo pretende seguir analisando novos casos de pacientes com Carcinoma Ductal Invasivo de mama para aumento do número de amostras e realizar marcação nas lâminas com colágeno, através da Coloração de Gomori, para avaliar mais informações sobre a relação do microambiente-célula tumoral.

## REFERÊNCIAS

AL-ANSARI, M. M. *et al.* p16 INK4A Represses the paracrine tumor-promoting effects of breast stromal fibroblasts. **Oncogene**, v. 32, n. 18, p. 2356, 2013.

AMIN, Mahul B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017.

BACHELERIE, F. *et al.* Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 71P-79, 2013.

BARBIERI, Federica *et al.* Drug design strategies focusing on the CXCR4/CXCR7/CXCL12 pathway in leukemia and lymphoma. **Expert opinion on drug discovery**, v. 11, n. 11, p. 1093-1109, 2016.

BERRY, Donald A. *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1784-1792, 2005.

BIAN, Xiu-wu *et al.* Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. **Neurosurgery**, v. 61, n. 3, p. 570-579, 2007.

BLICHERT-TOFT, Mogens *et al.* Long-term results of breast conserving surgery vs. mastectomy for early stage invasive breast cancer: 20-year follow-up of the Danish randomized DBCG-82TM protocol. **Acta oncologica**, v. 47, n. 4, p. 672-681, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. **Estimativa 2018**: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em:  
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2017.

BREWSTER, Abenaa M. *et al.* Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 16, p. 1179-1183, 2008.

BURSTEIN, Matthew D. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688-1698, 2015.

CAMERON, David *et al.* 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1195-1205, 2017.

CARTER, Christine L.; ALLEN, Carol; HENSON, Donald E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-187, 1989.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC *et al.* Vital signs: racial disparities in breast cancer severity--United States, 2005-2009. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 61, n. 45, p. 922, 2012.

CHEN, Xiaosong *et al.* Superior outcome after neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, anthracycline, and cyclophosphamide versus docetaxel plus cyclophosphamide: results from the NATT trial in triple negative or HER2 positive breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 142, n. 3, p. 549-558, 2013.

CHUNG, Brile *et al.* Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. **NPJ Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.

COLDITZ, Graham A.; ROSNER, Bernard. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. **American journal of epidemiology**, v. 152, n. 10, p. 950-964, 2000.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER *et al.* Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **The Lancet oncology**, v. 13, n. 11, p. 1141-1151, 2012.

COUCH, Fergus J.; NATHANSON, Katherine L.; OFFIT, Kenneth. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1466-1470, 2014.

DARVIN, Pramod *et al.* Immune checkpoint inhibitors: Recent progress and potential biomarkers. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 12, p. 165, 2018.

DE GELDER, Rianne *et al.* The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy. **International journal of cancer**, v. 137, n. 1, p. 165-172, 2015.

EALLES, K. L.; HOLLINSHEAD, K. E. R.; TENNANT, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e190, 2016.

EJLERTSEN, Bent *et al.* Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 729-735, 2009.

ELSTON, Christopher W.; ELLIS, Ian O. 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. CW Elston & IO Ellis. **Histopathology** 1991; 19; 403-410: AUTHOR COMMENTARY. **Histopathology**, v. 41, n. 3a, p. 151-151, 2002.

GIANNONI, Elisa *et al.* Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. **Cancer research**, v. 70, n. 17, p. 6945-6956, 2010.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GUEMBAROVSKI, Alda Losi *et al.* CXCL12 chemokine and CXCR4 receptor: association with susceptibility and prognostic markers in triple negative breast cancer. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 741-750, 2018.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARALDSEN, Guttorm; ROT, Antal. Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines. **European journal of immunology**, v. 36, n. 7, p. 1659-1661, 2006.

HARNEY, Allison S. *et al.* Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA. **Cancer discovery**, v. 5, n. 9, p. 932-943, 2015.

HELLQUIST, Barbro Numan *et al.* Effectiveness of population-based service screening with mammography for women ages 40 to 49 years: evaluation of the Swedish Mammography Screening in Young Women (SCRY) cohort. **Cancer**, v. 117, n. 4, p. 714-722, 2011.

HIRATA, Eishu; SAHAI, Erik. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 7, p. a026781, 2017.

UNIÃO PARA O INTERNATIONAL CANCER CONTROL. ICC. Disponível em: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>. Acesso em: 14 jul. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Atlas da Mortalidade**. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em: 11/09/2018.

JANOWSKI, Miroslaw. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. **Cell adhesion & migration**, v. 3, n. 3, p. 243-249, 2009.

KALLURI, Raghu; WEINBERG, Robert A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

KOHLER, Betsy A. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, 2015.

KOJIMA, Yasushi *et al.* Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 20009-20014, 2010.

LAUBY-SECRETAN, Béatrice *et al.* Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.

LIU, Heyang *et al.* Prognostic and clinicopathological value of CXCL12/SDF1 expression in breast cancer: A meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, 2018.

LOPES, Fernanda Ferreira *et al.* Análise imuno-histoquímica das citoqueratinas em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 6, p. 425-30, 2005.

LOBO-CARDOSO, Raquel; MAGALHÃES, André Torres; FOUGO, José Luís. Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer patients. **Porto Biomedical Journal**, v. 2, n. 5, p. 170-173, 2017.

LU, Hsiao-Mei *et al.* Association of breast and ovarian cancers with predisposition genes identified by large-scale sequencing. **JAMA oncology**, v. 5, n. 1, p. 51-57, 2019.

MASSA, Alessandro *et al.* SDF-1 controls pituitary cell proliferation through the activation of ERK1/2 and the Ca<sup>2+</sup>-dependent, cytosolic tyrosine kinase Pyk2. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1090, n. 1, p. 385-398, 2006.

MIRISOLA, Valentina *et al.* CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 14, p. 2579-2587, 2009.

MÜLLER, Anja *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50, 2001.

NEWMAN, Lisa A. Epidemiology of locally advanced breast cancer. In: **Seminars in radiation oncology**. WB Saunders, 2009. p. 195-203.

NICHOLS, Hazel B. *et al.* Breast cancer risk after recent childbirth: a pooled analysis of 15 prospective studies. **Annals of internal medicine**, v. 170, n. 1, p. 22-30, 2019.

PARISE, Carol A. *et al.* Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999–2004. **The breast journal**, v. 15, n. 6, p. 593-602, 2009.

PEDROSO, Pedro MO *et al.* Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesq. Vet. Bras**, v. 28, n. 12, p. 627-632, 2008.

PINDER, S. E. *et al.* Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 24, n. 1, p. 41-47, 1994.

RICHARDSON, Lisa C. Patterns and trends in age-specific black-white differences in breast cancer incidence and mortality—United States, 1999–2014. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.

- RITTE, Rebecca *et al.* Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and-negative breast cancer: A cohort study. **International journal of cancer**, v. 132, n. 11, p. 2619-2629, 2013.
- ROSNER, Bernard; COLDITZ, Graham A.; WILLETT, Walter C. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. **American journal of epidemiology**, v. 139, n. 8, p. 819-835, 1994.
- ROSTÈNE, William *et al.* Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 32, n. 1, p. 10-24, 2011.
- SAMARENDRA, Harsh *et al.* A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis. **British journal of cancer**, v. 117, n. 1, p. 124, 2017.
- SCALA, Stefania *et al.* Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1835-1841, 2005.
- SENKUS, E. *et al.* Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, v. 26, n. suppl\_5, p. v8-v30, 2015.
- SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 3, p. 177-193, 2017.
- SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2019.
- SPARANO, Joseph A. *et al.* Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 2, p. 111-121, 2018.
- SUN, Yue *et al.*  $\beta$ -Arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49212-49219, 2002.
- SWAIN, Sandra M. *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 8, p. 724-734, 2015.
- TOLANEY, Sara M. *et al.* Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 134-141, 2015.
- VERONESI, Umberto *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 16, p. 1227-1232, 2002.

WENDT, M. K.; COOPER, A. N.; DWINELL, M. B. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. **Oncogene**, v. 27, n. 10, p. 1461, 2008.

WU, Wei *et al.* Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 13217, 2015.

YU, Lan *et al.* Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene**, v. 374, p. 174-179, 2006.

YU, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. **British journal of cancer**, v. 110, n. 3, p. 724, 2014.

ZHI-DONG, LV *et al.* CXCL12 chemokine expression suppresses human breast cancer growth and metastasis in vitro and in vivo. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 10, p. 6671, 2014.