



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALDA FIORINA MARIA LOSI GUEMBAROVSKI

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CXCL12* E
CXCR4 E DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE *CXCR4* EM
PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

ALDA FIORINA MARIA LOSI GUEMBAROVSKI

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *CXCL12* E
CXCR4 E DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE *CXCR4* EM
PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.
Co-orientadora: Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe.

Londrina
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G925a Guembarovski, Alda Fiorina Maria Losi.
Análise de polimorfismos nos genes CXCL12 e CXCR4 e da expressão protéica de CXCR4 em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo / Alda F. M. Losi Guembarovski. – Londrina, 2015.
75 f.: il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Mamas - Câncer - Aspectos genéticos - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Genética - Expressão - Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Watanabe, Maria Angélica Ehara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616-006.6

ALDA FIORINA MARIA LOSI GUEMBAROVSKI

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES CXCL12 E CXCR4 E
DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE CXCR4 EM PACIENTES
PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci
Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Cristina da Silva do Amaral
Herrera
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -
PUC-PR

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, por sua orientação, dedicação, profissionalismo, competência e amizade nesta etapa tão especial. Muito obrigada por tudo.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, por ter me incentivado a chegar até aqui, por todos os seus ensinamentos, pela dedicação e grande amizade. Muito obrigada pela oportunidade.

À Roberta Losi Guembarovski e Bruna Karina Banin Hirata, membros do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA, pela preciosa ajuda em todas as etapas deste trabalho. Serei sempre grata pelo que fizeram por mim.

À banca avaliadora deste trabalho, Profa. Dra. Ana Cristina da Silva do Amaral Herrera e Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino, por terem aceitado participar deste momento e por suas valiosas sugestões e contribuições.

Ao Dr. Walter Jorge Sobrinho pela grande colaboração na obtenção das amostras e dados clínicos das pacientes.

Aos médicos patologistas Dra. Dora Grimaldi, Dra. Marina Kishima e Dr. Kazuhiro Ito, pela grande ajuda e incentivo em vários momentos desta caminhada.

À técnica do Laboratório de Patologia da UEL, Lucia, que contribuiu muito na confecção das lâminas e na etapa de imunohistoquímica. Sem a sua ajuda este trabalho não teria sido realizado.

De forma especial a todos os membros do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA, coordenado pela Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela maneira como trabalham em equipe.

A todas as pacientes e controles que contribuíram com amostras e dados clínicos, o meu muito obrigada, com todo carinho e respeito.

À Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, por todo o suporte durante a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer de forma muito especial a toda a minha família. Em especial gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos ao meu marido Roberto, meus filhos Marco e Roberta, às minhas netas Laura e Bruna, à minha nora Juliana e ao meu genro Márcio, por tudo que representam pra mim. Amo vocês!!!

A todos aqueles de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho gostaria de deixar o meu muito obrigada!!!

**Dedico este trabalho aos meus filhos Marco e Roberta,
e às minhas netas Laura e Bruna,
por tudo que representam na minha vida!!!**

Guembarovski, Alda Fiorina Maria Losi. **Análise de polimorfismos nos genes CXCL12 e CXCR4 e da expressão protéica de CXCR4 em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo.** 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O câncer de mama apresenta subtipos com diferentes aspectos histológicos, manifestações clínicas e variações de resposta ao tratamento. Dentre estes subtipos, os tumores triplo-negativos (TN) são responsáveis por 10-20% dos cânceres de mama e são muito agressivos. Caracterizam-se por possuir fenótipo de receptor de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) negativos e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) negativo. No aspecto da imunologia, o eixo constituído pela C-X-C quimiocina 12 (CXCL12) e o receptor de C-X-C quimiocina 4 (CXCR4) parece desempenhar um importante papel na disseminação de tumores sólidos, incluindo o câncer de mama. O gene que codifica a quimiocina CXCL12 apresenta um polimorfismo (rs1801157) que pode ter funções regulatórias importantes pelo aumento na concentração da quimiocina. O gene que codifica para CXCR4 também apresenta uma mutação polimórfica (rs2228014) que pode aumentar a suscetibilidade ao câncer de mama e a indução de metástases. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivos analisar estes polimorfismos em pacientes com câncer de mama TN e em controles livres de neoplasia, bem como a expressão protéica de CXCR4 em tecido tumoral e normal adjacente, na busca por marcadores para a carcinogênese mamária subtipo específica. Os polimorfismos foram avaliados em 59 pacientes e 150 controles pelo método de reação em cadeia da polimerase e polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com prata. A expressão do CXCR4 foi avaliada por imunohistoquímica (IHQ) em 37 amostras de tecido incluídos em parafina. A análise estatística foi realizada pelo cálculo da *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%), e pelos testes do Qui-Quadrado de *Pearson*, exato de *Fisher* e Correlação de Spearman através do programa estatístico *SPSS* (versão 20.0). Os resultados indicaram ausência de associação significativa entre os polimorfismos rs1801157 no *CXCL12* (homozigoto para o alelo variante: OR=2,63; IC95%=0,51-13,39 e portador do alelo variante: OR=1,58; IC95%=0,83-2,99) e rs2228014 no *CXCR4* (portador do alelo variante: OR=1,89; IC95%=0,58-6,22) em relação ao câncer TN, mesmo quando foi realizada a análise combinada em ambos os genes de genótipos considerados de risco (OR=3,56; IC95%=0,77-16,44). Quando foram considerados os parâmetros prognósticos, os resultados também não foram significativos em relação ao tamanho de tumor (*CXCL12*: p=0,420; *CXCR4*: p=0,925), metástase em linfonodo (*CXCL12*: p=0,596; *CXCR4*: p=0,516) e grau histológico (*CXCL12*: p=0,192; *CXCR4*: p=0,070). A análise pela IHQ demonstrou que a expressão de CXCR4 é mais citoplasmática do que em nível de membrana e que este receptor se expressou tanto no tecido normal quanto no tumoral. Porém, sua expressão citoplasmática foi mais acentuada no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente. Assim sendo, os genes *CXCL12* e *CXCR4* não se mostraram candidatos a marcadores de suscetibilidade para o câncer de mama TN, apesar dos resultados terem indicado uma tendência ao alelo variante estar mais presente no grupo das pacientes,

especialmente quando ambos os polimorfismos foram considerados de forma simultânea. O fato de CXCR4 citoplasmático ter sido mais expresso no tecido tumoral em relação ao normal adjacente deve ser levado em consideração e reavaliado em amostras maiores de subtipos tumorais, pela importância prognóstica que pode representar.

Palavras-chave: Câncer de mama. Triplo-negativo. Polimorfismos genéticos. *CXCL12*. *CXCR4*. Suscetibilidade. Prognóstico.

Guembarovski, Alda Fiornia Maria Losi. **Analysis of *CXCL12* and *CXCR4* genetic polymorphisms and *CXCR4* protein expression in triple-negative breast cancer patients.** 2015. 72 p. Dissertation (Master's Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Breast cancer presents different histological subtypes with clinical manifestations and response to treatment variations. Among the subtypes, the triple-negative tumors (TN) account for 10-20% of breast cancers and are biologically very aggressive. The TN tumors are characterized by possessing negative estrogen receptor (ER) phenotype, negative progesterone receptor (PR) phenotype and negative overexpression of 2-human epidermal growth factor (HER2). In the aspect of immunology, the axis constituted by the C-X-C chemokine 12 (*CXCL12*) and the C-X-C receptor 4 (*CXCR4*) appears to play an important role in solid tumor dissemination, including the breast one. The gene encoding *CXCL12* presents a polymorphism (rs1801157) that may have important regulatory functions as result of increased protein concentration. The gene encoding *CXCR4* also has a polymorphic variation (rs2228014), which can increase breast cancer susceptibility and metastasis induction. Within this context, the present study aimed to analyze these polymorphisms on *CXCL12* and *CXCR4* in TN breast cancer patients and cancer-free controls, and to evaluate *CXCR4* protein expression in tumor and adjacent normal tissues, in a search for susceptibility and prognostic markers for specific subtype of breast carcinogenesis. Genetic polymorphisms were evaluated in 59 patients and 150 controls by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) followed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver nitrate staining. *CXCR4* expression was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in 37 paraffin tissue samples. Statistical analysis was carried out by Odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95%CI), and through Pearson Chi-square, Fisher and Spearman Correlation tests using SPSS statistical software (version 20.0). Case-control study indicated no significant association for *CXCL12* (homozygous for variant allele: OR = 2.63, 95% CI 0.51 to 13.39 and variant allele carrier: OR = 1.58, 95% CI 0.83 to 2.99) and *CXCR4* (variant allele carrier: OR = 1.89; 95% CI = 0.58 to 6.22) in relation to TN cancer, even when a combined analysis for risk genotypes was performed (OR = 3.56, 95% CI 0.77 to 16.44). When prognostic parameters were considered, results were not statistically significant in relation to tumor size (*CXCL12*: $p = 0.420$; *CXCR4*: $p = 0.925$) lymph node metastasis (*CXCL12*: $p = 0.596$; *CXCR4*: $p = 0.516$) and histological grade (*CXCL12*: $p = 0.192$; *CXCR4*: $p = 0.070$). IHC analysis demonstrated that *CXCR4* expression was more cytoplasmic than at the membrane level and that it was expressed in both normal and tumor tissues, but its cytoplasmic expression was most pronounced in malignant tumor. Therefore, *CXCR4* and *CXCL12* genes were not susceptibility markers to TN breast cancer, although the results have shown a tendency for genetic variants be more present in the patients group, especially when both genes have been simultaneously considered. The fact that cytoplasmic *CXCR4* was more expressed in tumor than in normal tissue must be taken into account and re-evaluated in larger samples, given its prognostic significance.

Keywords: Breast cancer. Triple-negative. Genetic polymorphisms. *CXCL12*. *CXCR4*. Susceptibility. Prognostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O eixo CXCL12/CXCR4 no processo metastático do câncer de mama. Fonte: Mukherjee and Zhao, 2013.	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de ciclagem das reações em cadeia da polimerase (PCR) para as genotipagens dos polimorfismos rs1801157 do gene CXCL12 e rs2228014 do gene CXCR4.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3' não transcrita
BRCA1	Câncer de mama 1, início precoce
BRCA2	Câncer de mama 2, início precoce
CK5	Citokeratina5
CK6	Citokeratina6
CXCL12	C-X-C quimiocina 12
CXCR4	C-X-C receptor de quimiocina4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 1
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano tipo 2
IARC	Agencia Internacional para Pesquisa sobre Câncer
IHQ	Imunohistoquímica
IC95%	Intervalo de Confiança a 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK2	Janus quinase2
KCl	Cloreto de Potássio
Ki67	Antígeno Ki67
LEAP	Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PARP	Poli ADP ribose polimerase
RE	Receptor de estrógeno
RFLP	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
RP	Receptor de progesterona
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
STAT3	Sinal de transdução e ativador de transcrição 3
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
TP53	Gene Supressor Tumoral p53 (humano)

TN	Triplo-negativo
U	Unidade
UICC	União Internacional de Controle ao Câncer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O câncer de mama	15
1.2	O câncer de mama TN	17
1.3	Quimiocina CXCL12.....	20
1.4	Receptor de quimiocina CXCR4	22
1.5	Importância do eixo CXCL12/CXCR4 no câncer de mama	24
1.6	Justificativa	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos Específicos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Aspectos Éticos e Caracterização da Amostra	29
3.2	Delineamento do Estudo.....	30
3.3	Coleta do Material Biológico e Análise Histopatológica	31
3.4	Extração de DNA genômico	32
3.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
3.6	Análise do Polimorfismo rs1801157 do Gene CXCL12	32
3.7	Análise do Polimorfismo rs2228014 do Gene CXCR4	33
3.8	Análise da Expressão de CXCR4 por IHC	34
3.9	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
5	CONCLUSÕES	58
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8.	ANEXOS	68
8.1	<i>Aprovação do Comitê de Ética</i>	69
8.2	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	72

1 INTRODUÇÃO

O câncer é sempre uma doença que se origina a partir de uma célula normal que acumulou mutações após sucessivas divisões celulares num processo de evolução clonal (Cavenee e White, 1995). Geralmente, as mutações incluem alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos ou trocas em diversos genes, a maioria dos quais relacionados ao controle e progressão do ciclo celular (Koch *et al.*, 1994).

Os tumores malignos humanos são, na sua maioria, de origem somática, resultantes da interação entre fatores genéticos e ambientais (Perera, 1997). Já cerca de 5% a 10% dos cânceres são hereditários, se originando a partir de mutações transmitidas pelas linhagens germinativas maternas ou paternas (Fearon, 1997). Assim sendo, o câncer é uma doença caracteristicamente genética e a identificação dos genes envolvidos na sua origem e progressão é de fundamental importância para a compreensão das bases da doença (Parmigiani e Camargo, 2004).

O surgimento e a progressão neoplásica são caracterizados principalmente por alterações em dois grupos de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (Chang *et al.*, 1995; Hanahan e Weinberg, 2000). Genes associados aos mecanismos de reparo são considerados como um terceiro grupo, que podem atuar direta ou indiretamente no processo de carcinogênese (Hoeijmakers, 2001), sendo, às vezes, considerados como genes supressores de tumores não clássicos.

Os proto-oncogenes são genes que atuam no controle do crescimento e da diferenciação celular (Irish e Bernstein, 1993). Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos carcinógenos, radiação ou infecções virais. A ativação para oncogenes ocorre por meio de translocações cromossômicas, ampliações gênicas, mutações pontuais ou mesmo inserções virais (Knudson, 1985), e alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula, sendo consideradas, portanto, dominantes. Como consequência, levam a uma proliferação celular anormal, podendo resultar na transformação maligna (Cooper, 1994).

Por outro lado, os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (Verma e Triantafillou, 1998). As proteínas codificadas por estes genes fazem parte das vias de sinalização celular, com diferentes efeitos biológicos como retardo da progressão do ciclo, bloqueio da diferenciação ou indução da morte celular programada por apoptose. Consequentemente, as alterações genéticas que inativam estes genes (mutações pontuais, deleções, metilação ou inserções virais) poderiam levar à proliferação

desordenada, característica das células cancerosas (Weinberg, 1991), as quais, diferentemente dos oncogenes, ocorrem de forma recessiva.

De acordo com estimativas mundiais do projeto GLOBOCAN 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer-IARC*), e da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresentou a estimativa para o ano de 2014, válida para o ano de 2015, apontando para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país (INCA, 2014).

Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (INCA, 2014).

1.1 O câncer de mama

Dentre os muitos tumores malignos, o câncer de mama é o mais comum em mulheres, com mais de um milhão de casos relatados anualmente em todo o mundo (Yuan *et al.*, 2011). Além disso, constitui a maior causa de morte por câncer no sexo feminino (Inca, 2014), o que ressalta a importância de se estudar esta doença na busca por marcadores prognósticos e terapêuticos, com o intuito de melhorar a conduta clínica nestas pacientes.

Segundo os dados do INCA para o Brasil, em 2014, foram estimados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas em 2012 na Europa Ocidental e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental (Inca, 2014).

Cerca de 98% das neoplasias malignas da mama são carcinomas, na sua grande maioria de origem nos ductos e uma pequena proporção nos lóbulos (Bergh *et al.*, 2001). Após o diagnóstico por biópsia, leva-se em consideração o estadiamento baseado no Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores

Malignos preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), dados moleculares que podem ser obtidos por imunohistoquímica (IHQ) ou testes genéticos e dados clínicos como idade, comorbidades e *status* menopausal.

O sistema TNM classifica as pacientes portadoras de carcinoma invasor em quatro estádios denominados: estágio I, II, III e IV. Pacientes em estágio I e II são consideradas portadoras de doença em fase inicial. No estágio III, de um modo geral, trata-se de doença localmente avançada e a doença em estágio IV apresenta metástase à distância e é considerada muito mais grave que nos demais estádios(Sobin *et al.*, 2009).

Nos últimos 40 anos, a sobrevida das pacientes com esta neoplasia vem aumentando nos países desenvolvidos e, atualmente, é de 85% em cinco anos, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60%(Inca, 2014).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como idade, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário, definida como a razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama. A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam até os 50 anos. Após essa idade, o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença.A história familiar está associada a um aumento no risco de cerca de duas a três vezes para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Alterações em alguns genes, principalmente *BRCA1*(câncer de mama1, início precoce) e *BRCA2* (câncer de mama 2, início precoce), aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, embora essas mutações sejam raras e contribuam para uma parcela mínima dos casos(Inca, 2014).

Sendo o câncer de mama uma doença extremamente heterogênea, com base nos dados moleculares, costuma-se dividir o carcinoma invasor em 4 principais subtipos, com curso clínico distinto e diferenciada resposta ao tratamento. Esta classificação considera o *status* dos receptores hormonais, a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e o marcador de proliferação celular Ki67, sendo que este último pode ser substituído pelo grau tumoral para diferenciação dos subtipos luminal A e B no caso da sua não disponibilização de forma confiável(Goldhirsch *et al.*, 2011). Os 4 subtipos são Luminal A, de melhor prognóstico, definido como receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) positivo, HER2 não superexpresso e Ki67 baixo (<14%). Luminal B possui prognóstico intermediário, com RE e/ou RP positivo e Ki67 alto (>14%). Não luminal

apresenta HER2 superexpresso e receptores hormonais negativos e por fim o subtipo triplo-negativo (TN) que possui receptores hormonais negativos e HER2 não superexpresso (Goldhirsch *et al.*, 2011), sendo recentemente um subtipo tumoral muito estudado por diferentes grupos de pesquisa, uma vez que não possui uma estratégia terapêutica específica e bem delineada, com as pacientes evoluindo, muitas vezes, para um quadro de metástase à distância.

1.2 O câncer de mama TN

Segundo Fernandes e Katz (2009), nos tempos atuais da oncologia mamária, não é possível discutir questões terapêuticas e prognósticas na ausência de estudos imunohistoquímicos que envolvam os receptores hormonais RE e RP e a análise do oncogene HER2. E dentro deste contexto, desde a incorporação desse padrão de análise na rotina clínica, a expressão tumor TN vem sendo extensamente utilizada para caracterizar os tumores que não apresentam positividade para nenhuma dessas moléculas de superfície, quando avaliadas pela técnica de IHQ. Assim sendo, o câncer de mama TN se caracteriza por possuir fenótipo de RE negativo (RE-), RP negativo (RP-) e pela ausência da superexpressão do oncogene HER2, sendo, portanto, denominado rotineiramente desta maneira (Kurebayashi, 2009).

Os tumores TN são responsáveis por 10-20% de todos os cânceres de mama e são, biologicamente, mais agressivos do que outros subgrupos (Kurebayashi, 2009), como aqueles que expressam os receptores hormonais.

Epidemiologicamente acometem com maior frequência pacientes jovens, antes da menopausa, e de ascendência americana africana (Sleeman *et al.*, 2006).

Possuem uma predileção por metástase visceral, favorecendo seu mau prognóstico (Maegawa e Tang, 2010). Normalmente demonstram alto grau histológico e são o subtipo de câncer de mama mais comum em portadoras de mutação no gene *BRCA1* (Dawson *et al.*, 2009).

Estão também associados a mutações no gene Supressor Tumoral p53 humano (*TP53*) (Carotenuto *et al.*, 2010), o que poderia possuir relevância terapêutica por modular a resposta a agentes quimioterápicos que atuam mediante indução de apoptose por dano direto ao DNA, como a ciclofosfamida (Fernandes e Katz, 2009).

O significado prognóstico permanece incerto nestes tumores e são considerados como um grupo extremamente heterogêneo. O pior prognóstico parece estar relacionado àqueles tumores que expressam as citoqueratinas basais ou o

receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Dawson *et al.*, 2009). Terapias específicas, com drogas alvo, como as terapias endócrinas e anti-HER2, não se aplicam a este subgrupo (Kurebayashi, 2009), o que acaba por dificultar o delineamento terapêutico e contribuir para um pior prognóstico.

Apesar da falta de terapias específicas, os tumores TN são aparentemente sensíveis as antraciclinas e aos taxanos (Maegawa e Tang, 2010), porém apresentam recidiva relativamente precoce (Carotenuto *et al.*, 2010). Segundo Fernandes e Katz (2009), nos tumores TN existiria uma maior importância para o uso das platinas, uma vez que estas neoplasias apresentam tendência à hipoatividade das vias de reparo ligadas ao gene *BRCA1*, como já relatado, o que favoreceria a atividade citotóxica destes agentes. Entretanto, de um modo geral, devido à expressão diminuída dos receptores hormonais e do HER2 ser negativo, o tratamento não cirúrgico para pacientes com câncer TN tem sido confinado à quimioterapia e radioterapia convencionais (Carey *et al.*, 2010), o que acaba contribuindo para um menor sucesso clínico em relação aos demais subtipos do câncer de mama.

De Ruijter *et al.* (2011) também ressaltam o fato dos tumores TN estarem associados a mutações na via relacionada ao gene *BRCA1*, enquanto que mutações que não estão ligadas a esta via poderiam ocorrer apenas como resultado da instabilidade genômica decorrente do processo tumoral levando a subtipos não TN do câncer de mama. Ainda em relação à terapia, os autores discutem que drogas alvo como os inibidores de Poli ADP ribose polimerase (PARP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), podem representar interessantes opções terapêuticas futuras, as quais ainda necessitam de avaliação em estudos de nível clínico.

Segundo De Ruijter *et al.* (2011), de um modo geral, os tumores TN apresentam alta recorrência e baixas taxas de sobrevida. Além disso, os autores discutem a relação entre os tumores TN e aqueles denominados de Basal Like (BL) ou basalóides e colocam que estas duas entidades compartilham certas similaridades, mas, claramente, não podem ser consideradas como um subgrupo único do câncer de mama. A denominação basalóide se refere a características genotípicas destes tumores, sendo que estas neoplasias apresentam grande complexidade quando comparadas a outros subtipos do câncer de mama, sugerindo a presença de importante instabilidade genética neste subgrupo (Fernandes e Katz, 2009).

Ainda em relação à sobreposição dos tumores TN com aqueles classificados como basalóides, de acordo com o trabalho de revisão realizado por estes mesmos autores, em vista do impacto terapêutico e prognóstico que a caracterização do perfil de expressão genética trouxe e da dificuldade técnica que existe em se aplicar esses

métodos na prática anatomopatológica diária, grande esforço tem sido realizado com o intuito de se identificar características morfológicas e imunofenotípicas que permitam prever os achados genéticos.

Assim, os tumores basalóides são aqueles que expressam genes de células basais/mioepiteliais normais, os quais favorecem a proliferação celular, a supressão da apoptose, além de favorecerem a migração e a invasão tecidual, com características de alta agressividade. A maioria destes tumores corresponde, histologicamente, a carcinomas ductais invasivos pouco diferenciados, mas fração não desprezível é formada por tumores tubulares mistos, metaplásicos, medulares ou ainda ditos glândula salivar símile. A forma mais adequada de se identificar tumores basalóides pela IHQ é o método validado por Nielsen *et al.* (2004) que se baseia na ausência de expressão de RE e HER2, acompanhada da expressão do EGFR e das citoqueratinas 5 (CK5) e 6 (CK6). No referido estudo acima, este perfil foi capaz de identificar, quando comparado ao perfil gênico, os tumores basalóides com uma sensibilidade de 76% e especificidade de 100%. Assim sendo, de um modo geral, a grande dificuldade na conciliação dos critérios de definição entre tumores TN e aqueles basalóides, consiste no fato de que o primeiro grupo é definido segundo o perfil de IHQ e o segundo, de acordo com o perfil de expressão gênica (Fernandes e Katz, 2009).

Jiao *et al.* (2014) em sua revisão sobre o câncer TN, concluíram que sua patogênese é, até o presente momento desconhecida. Apesar disso, que os dados clínicos mostram que fatores como raça, idade, status pré menopausal, uso de contraceptivos orais, alto grau histológico e estágio avançado da doença, estão independentemente associados a estes tumores. Ainda que, como não existem terapias específicas para estas pacientes até o presente momento, um grande número de pesquisadores vem trabalhando na busca de respostas em nível gênico, relacionado aos receptores, vias de sinalização, dentre outros, e que já existem alguns marcadores prognósticos interessantes, como o EGFR. Assim, devido à alta incidência da doença, os autores discutem que é desejado que estudos clínicos em larga escala sejam conduzidos num futuro próximo, na busca de uma melhora na conduta com as pacientes com esse tipo de câncer.

Atualmente, as pacientes portadoras de tumores TN apresentam um conjunto de fatores que levam a considerar que esse tipo de doença seja mais grave do que aquelas que se manifestam nas demais pacientes com câncer de mama, pois além de serem portadoras de subtipo mais agressivo da neoplasia, não se beneficiam de tratamentos dirigidos aos alvos moleculares altamente efetivos, como o trastuzumabe (anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2), para os tumores HER2 positivos, ou

as terapêuticas hormonais, utilizadas no tratamento dos tumores que expressam RE e RP. Além disso, as células desses tumores apresentam maior tropismo por órgãos sólidos, sendo a ocorrência de metástases ósseas, muitas vezes, problema secundário nesta doença. Esse maior tropismo por envolvimento visceral, como pulmões e fígado, acompanha-se de maior incidência de metástases cerebrais, o que pode ser importante para delinear estratégias terapêuticas futuras (Fernandes e Katz, 2009), as quais constituem motivo de intensa investigação atual, dada a falta de sucesso terapêutico, na busca por novas moléculas que possam num futuro próximo, melhorar a conduta clínica das pacientes portadoras desta neoplasia agressiva.

Dentre estas moléculas de interesse clínico encontram-se as quimiocinas e seus receptores, os quais vêm sendo intensamente estudados na atualidade por diferentes grupos de pesquisa, tanto no contexto de doenças infecciosas, autoimunes, como também no câncer.

1.3 Quimiocina CXCL12

Poucos campos de estudo da imunologia apresentaram evolução tão acentuada quanto o das quimiocinas. Estas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (Lindley e Kunkel, 1993). Constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos e apresentam similaridade com as citocinas, bem como diferenças claras. São proteínas secretórias produzidas constitutivamente ou após indução por leucócitos e células teciduais e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto, as quimiocinas são moléculas menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores em sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G (Baggiolini, 2001).

Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com resíduos de cisteína conservados (Baggiolini *et al.*, 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma sequência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas respectivamente como α e β quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC) na região aminoterminal. As cisteínas formam pontes dissulfeto, o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm a conformação da região aminoterminal, o que é essencial para exercer sua atividade biológica (Baggiolini, 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores tornou-se necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene (Pelus *et al.*, 2002).

Os efeitos das quimiocinas estendem-se muito além da atração de leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicam que as mesmas participam na organogênese, angiogênese, mobilidade de células tronco, recirculação dos leucócitos, regulação e desenvolvimento imunológico e hematopoiético (Sarafi *et al.*, 1997; Luster, 1998; Chensue *et al.*, 2001; Pelus *et al.*, 2002; Barbieri *et al.*, 2010).

Na última década, as quimiocinas ganharam destaque científico, uma vez que também desempenham funções cruciais no desenvolvimento de diferentes doenças e processos patológicos, incluindo a inflamação, doenças autoimunes, doenças infecciosas como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e a síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) e no câncer, particularmente na regulação do processo de metástase (Zlotnik, 2006).

O fator 1 derivado de células estromais (SDF-1 ou CXCL12) é um membro da família das quimiocinas CXC produzido por vários tecidos, incluindo a medula óssea (MO) e o timo, e se liga aos receptores CXC 4 (CXCR4) (Bleul *et al.*, 1996) e CXC 7 (CXCR7) (Burns *et al.*, 2006). Esta quimiocina foi clonada a partir de uma linhagem celular derivada do estroma da MO e identificada como um fator de estimulação do crescimento de células pré-B (Imai *et al.*, 1999; Glodek *et al.*, 2007). Na MO a CXCL12 é produzida principalmente pelos osteoblastos que revestem o endóstio e atua regulando a migração das células hematopoiéticas. É expressa por diversos tipos celulares, como osteoblastos imaturos e células endoteliais no interior da medula, bem como por células epiteliais em diversos órgãos (Neiva *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010). Possui duas isoformas principais, α e β (Tashiro *et al.*, 1993) derivadas de dois *splicing* alternativos presentes em um único gene, *CXCL12*, localizado no cromossomo 10 humano. A isoforma α é secretada principalmente pelas células do estroma da MO e por células endoteliais e é encontrada em quase todos os órgãos. A isoforma β é mais resistente à degradação, estimula a angiogênese e está presente em órgãos altamente vascularizados tais como fígado, baço e rim (Janowski, 2009).

Estudos sugerem que esta quimiocina possui um papel chave no *homing* de células tronco e de células progenitoras hematopoiéticas, atuando como um modulador do crescimento e da sobrevivência celular (Lataillade *et al.*, 2002).

O sequenciamento do gene CXCL12 (*Gen Bank* L36033) revelou um polimorfismo genético (rs1801157) no segmento conservado da região 3' não transcrita (3'UTR) que consiste da troca de Guanina (G) para Adenina (A) na posição 801, também conhecido como G801A, cujo alelo variante parece ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de CXCL12 (Winkler *et al.*, 1998). Teng *et al.* (2009) investigaram este polimorfismo em pacientes com câncer oral e verificaram que, na população de Taiwan, o alelo variante A pode ser considerado um fator que aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral. Em outro estudo, Cacina *et al.* (2012) não verificaram associação significativa com carcinoma endometrial. Razmkhah *et al.* (2005) avaliaram a suscetibilidade de mulheres iranianas ao câncer de mama em relação ao polimorfismo rs1801157 e observaram uma maior frequência do alelo A nas pacientes, sugerindo, desta forma, que o possível aumento na produção de CXCL12 pelas portadoras do alelo variante poderia provocar um desequilíbrio na regulação do ciclo celular levando à transformação e subsequente formação do tumor.

Outros trabalhos também têm indicado que a quimiocina CXCL12 parece desempenhar um papel na patogênese do câncer de mama (De Oliveira Cavassin *et al.*, 2004; De Oliveira *et al.*, 2009). Dentro deste contexto, a migração das células tumorais metastáticas possui muita semelhança com o tráfego de leucócitos. Sendo o câncer de mama um tumor com potencial metastático elevado, tem sido relatado que suas células malignas podem ser direcionadas através da circulação sanguínea para órgãos distantes que expressam quimiocinas como CXCL12. Desta forma, as células tumorais invadem estes órgãos possibilitando a origem de tumores secundários (Muller *et al.*, 2001). Neste contexto, elevados níveis desta proteína parecem promover sobrevivência celular, proliferação, angiogênese e metástase no câncer de mama, o que aponta para a importância de seu estudo em pacientes portadoras desta neoplasia, especialmente quando associada ao seu receptor específico.

1.4 Receptor de quimiocina CXCR4

Para cada família de quimiocinas descrita, existem receptores respectivos, acoplados à proteína G e que medeiam suas funções junto às células-alvo. A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor; contudo, os receptores CC ligam-se somente as quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente as quimiocinas CXC (Zlotnik,

2006). O receptor CXCR4 se liga especificamente à quimiocina CXCL12 e foi demonstrado que esta interação desempenha um importante papel no crescimento e na invasão tumoral (Muller *et al.*, 2001).

O CXCR4 é expresso em uma grande variedade de tecidos, incluindo os sistemas imune e nervoso central, e pode mediar a migração de leucócitos e progenitores hematopoiéticos em resposta à CXCL12. No sistema imune, ele é altamente expresso em monócitos, células B e células T virgens no sangue periférico, bem como em células progenitoras hematopoiéticas na MO (Zou *et al.*, 1998). Assim, o receptor CXCR4 é um dos vários receptores de quimiocinas definidos pela sua capacidade de induzir a migração de células segundo um gradiente citocina quimiotático.

O gene que codifica para o CXCR4 está localizado no cromossomo 2q2 e um polimorfismo de base única, uma troca de Citosina (C) para Timina (T), foi descrito no códon 138 (Petersen *et al.*, 2005). Teng *et al.* (2009) investigaram esse polimorfismo genético em pacientes com câncer oral e verificaram que a presença de pelo menos um alelo variante está associada ao estadiamento IV e indução de metástase. Em outro estudo, Cacina *et al.* (2012) não verificaram associação entre o mesmo polimorfismo de CXCR4 e o carcinoma endometrial.

Desde seu descobrimento, o CXCR4 vem sendo implicado na disseminação de tumores malignos a partir do sítio primário, migração transendotelial de células tumorais, bem como *homing* de células cancerígenas precursoras, sendo visto como um marcador em vários tipos de tumores malignos (Epstein, 2004). Adicionalmente, sua expressão tem sido descrita como um marcador prognóstico em vários tipos de câncer, como o de mama (Burger e Kipps, 2006). Por meio da análise de sua expressão em cortes de tecido glandular mamário normal e tumoral por IHQ, foi observado aumento de expressão de CXCR4 nas células neoplásicas, ao passo que nas células normais não houve expressão deste receptor (Muller *et al.*, 2001).

É sabido que as metástases representam um risco fatal em relação aos tumores primários. Diante desse quadro, novas pesquisas apontam no sentido de evitar esses mecanismos, tentando, por exemplo, interferir na interação entre receptores celulares e quimiocinas (Ali e Lazennec, 2007). Neste contexto, tem sido investigada a importância de CXCR4 na patogênese do câncer de mama (Do Val Carneiro *et al.*, 2009; Oda *et al.*, 2012) e muito tem sido discutido com relação ao seu possível papel no processo metastático destas neoplasias. O CXCR4 atua facilitando a disseminação tumoral em cada um dos eventos do processo, incluindo aderência das células tumorais ao endotélio, extravasamento para os vasos sanguíneos, colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra

resposta do hospedeiro pela ativação de vias de sobrevivência celular. Células de câncer de mama expressam níveis elevados de CXCR4 funcionais, os quais podem direcionar a quimiotaxia e respostas invasivas (Muller *et al.*, 2001). Além disso, células metastáticas mostram forte expressão deste receptor, sendo este aumento associado a uma baixa sobrevida das pacientes (Luker e Luker, 2006).

Holland *et al.* (2006) analisaram a expressão de CXCR4 em diversas linhagens celulares a fim de investigar sua relação com o potencial invasivo de células transformadas e sugeriram que sua expressão por células epiteliais de câncer de mama está correlacionada com o potencial invasivo destas células. Os autores apontam também para a existência de mecanismos de regulação distintos durante a ativação de CXCR4, os quais podem ser dependentes do tipo celular, sugerindo que sua função é regulada por processos celulares específicos, como a diferenciação e transformação. Portanto, a expressão de CXCR4 pode ser um marcador adequado do potencial metastático. Segundo eles, é provável que haja um mecanismo específico para prevenir a ativação deste receptor em células não invasivas, o qual é potencialmente alterado durante o processo de progressão celular para fenótipo de metástase.

Dados mais recentes (Zhang *et al.*, 2012) afirmam que este marcador possui expressão aumentada em subtipos moleculares do câncer de mama, principalmente aqueles de fenótipo basalóide, além de mostrarem associações positivas com parâmetros prognósticos das pacientes.

Adicionalmente, essas moléculas podem constituir alvos terapêuticos promissores por possibilitarem a limitação ou o impedimento da angiogênese ou de metástases. Foi demonstrado em modelo experimental de linfoma não-Hodgkin humano (NHL) que a neutralização do receptor CXCR4 aumenta a apoptose e diminui a proliferação celular (Bertolini *et al.*, 2002). Além disso, os antagonistas direcionados aos receptores de quimiocinas e seus ligantes podem atuar isoladamente ou como adjuvantes aos agentes quimioterápicos (Ali e Lazennec, 2007).

Um grande número de pequenas moléculas ou peptídeos inibitórios de receptores de quimiocinas (a maioria tendo o CXCR4 como alvo) tem apresentado efeitos sobre o crescimento tumoral em modelos animais. A utilização de antagonistas de receptores de quimiocinas no tratamento de tumores metastáticos baseia-se no fato de haver um aumento na expressão desses receptores por tumores na presença de hipóxia ou de outro estresse celular e na dependência destes receptores para a sobrevivência. Uma vez ativados, protegem as células tumorais contra diversos ativadores de apoptose; porém, a inibição destes receptores pode deixar as células tumorais vulneráveis a diversos tratamentos antitumorais (Kakinuma e Hwang, 2006).

Entretanto, os eventos moleculares envolvidos na ativação do receptor CXCR4 ainda não estão estabelecidos e os dados da literatura são controversos, o que ressalta a importância de estudos adicionais, frente ao seu potencial como marcador clínico para o câncer mamário.

1.5 Importância do eixo CXCL12/CXCR4 no câncer de mama

A interação entre as moléculas CXCL12/CXCR4 participa da modulação da resposta imune, induzindo a apoptose de células T CD8⁺ mediada por macrófagos e também do desenvolvimento embrionário (Koizumi *et al.*, 2007). Foi demonstrado que esta interação quimiocina/receptor desempenha um importante papel no crescimento e na invasão tumoral maligna (Muller *et al.*, 2001). O eixo CXCL12/CXCR4 participa da fisiopatologia de várias doenças e pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando a disseminação de diversos tipos de tumores malignos, incluindo leucemia, câncer de próstata, de cérebro e de mama (Balkwill, 2004; Kakinuma e Hwang, 2006).

A sobrevida de pacientes com câncer de mama está altamente associada ao processo metastático e diminui de 90% para 20% quando as mesmas ocorrem. O mecanismo preciso que leva a este processo permanece como um dos menos compreendidos dentro da patogênese do câncer. Entretanto, de um modo geral, é conhecido por ser o resultado de diversos passos sequenciais que se iniciam quando células do tumor primário sobrevivem na circulação e se adaptam em locais distantes facilitando a proliferação celular e a formação de tumores macroscópicos secundários. A capacidade de metastizar para muitos sítios anatômicos torna o câncer de mama em seu estágio avançado um desafio para a medicina dos dias atuais (Mukherjee e Zhao, 2013); sendo assim, a pesquisa que envolve marcadores associados a este processo é de grande relevância clínica para esta neoplasia.

Os tumores de mama possuem uma preferência para metastizar para os linfonodos axilares, ossos e pulmões, os quais secretam altos níveis da quimiocina CXCL12. Neste contexto, já se sabe que as quimiocinas possuem um papel na determinação da metástase e que estão altamente expressas nos tecidos onde preferencialmente as metástases ocorrem nesta neoplasia. Assim, CXCR4 e seu ligante específico CXCL12 parecem possuir um papel crítico no processo metastático do câncer de mama e o bloqueio desta interação poderia diminuir a migração das células neoplásicas para órgãos alvo, diminuindo o potencial metastático destes

tumores (Epstein, 2004). De um modo geral, CXCL12 atua como quimioatratante que dirigiria células que expressam CXCR4 para sítios secundários, contribuindo para a disseminação de células malignas e formação de novos tumores (Mukherjee e Zhao, 2013) (Figura 1).

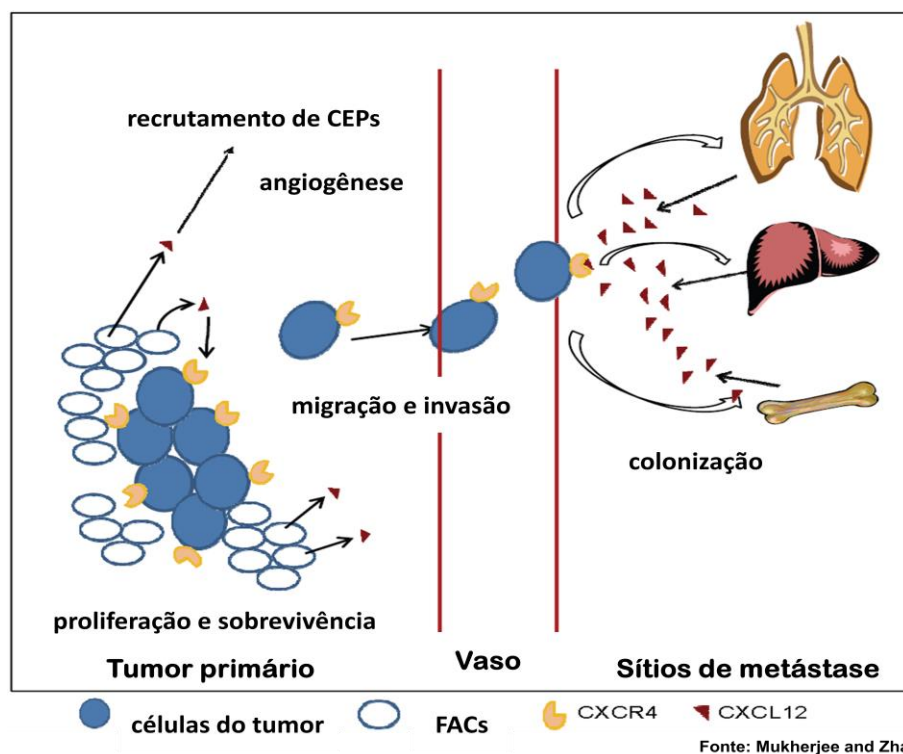


Figura 1. O eixo CXCL12/CXCR4 no processo metastático do câncer de mama. CXCL12 secretado pelos fibroblastos associados às células tumorais (FACs) liga-se ao receptor CXCR4 expresso na superfície das células tumorais, levando à ativação de vias proliferativas intracelulares que aumentam o crescimento tumoral. Adicionalmente, CXCL12 recruta células endoteliais progenitoras (CEPs) da medula óssea para o tumor, aumentando a angiogênese, o que também contribui para o crescimento tumoral. A ligação CXCL12/CXCR4 leva ainda a migração de células tumorais que expressam CXCR4 para além do tumor primário em resposta a um gradiente de concentração do CXCL12. Fonte: Mukherjee and Zhao, 2013.

Interessantemente, CXCR4 pode atuar juntamente ao sinal de transdução e ativador de transcrição 3 (STAT3) no processo metastático do câncer de mama (Liu *et al.*, 2014). Foi verificado por estes autores que o tratamento com CXCL12 aumenta a expressão de p-STAT-3 e que o antagonista de CXCR4, AMD3100 e o antagonista da Janus quinase2 (JAK2), AG490, inibem o aumento da fosforilação da STAT3 induzida pela CXCL12. Os autores mostraram também que o CXCL12 promoveu uma ligação direta da JAK2 ao CXCR4 e sugeriram que a ativação da via JAK2/STAT3 pela sinalização do eixo CXCL12/CXCR4 pode ser uma estratégia terapêutica para o tratamento do câncer de mama.

Adicionalmente, vias de sinalização ativadas pelo eixo CXCL12/CXCR4 podem conferir uma vantagem de crescimento às células tumorais tanto em sítios primários como em sítios metastáticos (Helbig *et al.*, 2003). É possível que o eixo

CXCL12/CXCR4 possa representar um alvo para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos para o câncer de mama (Burger e Kipps, 2006), ressaltando a importância de um maior entendimento a cerca dos mecanismos moleculares que envolvem estas moléculas e suas influências sobre o câncer.

1.6 Justificativa

Sabendo-se que o câncer de mama é um tumor de alta incidência e relevância clínica no Brasil e no mundo, e frente à crescente importância dos subtipos desta neoplasia, que carecem de terapia específica e efetiva, e ao fato de muitas das pacientes evoluírem para um quadro de recidiva local e metástase, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido projetos que incluem a análise de diferentes marcadores moleculares em pacientes portadoras de tumores de mama, incluindo aqueles que pertencem a subtipos específicos, como os tumores TN.

Além disso, o conhecimento a cerca das moléculas envolvidas nos diferentes estágios do câncer de mama é fundamental para a elaboração de estratégias de intervenção efetivas. Diante desse quadro, novas pesquisas apontam no sentido de bloquear a interação entre receptores celulares e quimiocinas, já que essas moléculas podem ser alvos terapêuticos por possibilitarem a limitação da angiogênese e das metástases. Antagonistas direcionados aos receptores de quimiocinas e seus ligantes podem atuar isoladamente ou como adjuvantes aos agentes quimioterápicos (Ali e Lazennec, 2007).

Dentro deste contexto, frente à importância do eixo CXCL12/CXCR4 na patogênese do câncer de mama, especialmente no que diz respeito ao processo metastático e como potencial alvo terapêutico futuro, a proposta do presente estudo foi investigar se polimorfismos nestes genes, bem como a expressão protéica de CXCR4, apresentam implicações na suscetibilidade ou prognóstico do câncer de mama, subtipo TN.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar polimorfismos nos genes *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs22280145) em pacientes com câncer de mama TN e em controles livres de neoplasia, bem como avaliar a expressão protéica de CXCR4 nos tecidos tumorais e normais adjacentes das pacientes, na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para a carcinogênese mamária, subtipo específica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as frequências genótípicas e/ou alélicas dos polimorfismos rs1801157 e rs22280145 dos genes *CXCL12* e *CXCR4*, respectivamente, em pacientes com câncer de mama TN e controles livres da doença;
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar as distribuições genótípicas e/ou alélicas entre pacientes com câncer de mama TN e controles livres da doença;
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar a distribuição do conjunto de genótipos considerados de risco (*CXCL12* + *CXCR4*) entre os dois grupos;
- Avaliar a expressão proteica, por IHC, do CXCR4 no tecido mamário tumoral e normal adjacente;
- Descrever os dados clinicopatológicos das pacientes (tamanho de tumor, presença ou não de metástase em linfonodo e grau histológico);
- Avaliar a distribuição das frequências genótípicas e/ou alélicas para os polimorfismos avaliados em relação aos parâmetros clinicopatológicos obtidos das pacientes;
- Identificar possíveis correlações e/ou associações entre os polimorfismos genéticos avaliados, os dados clinicopatológicos das pacientes e a expressão protéica de CXCR4, na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico associados à carcinogênese mamária, subtipo específica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos e Caracterização da Amostra

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/CAAE:17123113.4.0000.5231) (Anexo 1).

No Hospital do Câncer de Londrina e na Unidade Básica de Saúde (UBS) Orlando Sestari, Bairro União da Vitória, Londrina, Paraná, foram realizadas as entrevistas com cada participante do estudo, pacientes com câncer de mama TN e controles livres da neoplasia, que receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material (Anexo 2).

Em função da raridade deste subtipo de neoplasia, adicionalmente, foram obtidas a partir de um levantamento retrospectivo de cinco anos, amostras de tecido mamário embebido em parafina de pacientes com câncer de mama TN e os respectivos dados clinicopatológicos. Essas amostras foram selecionadas no Setor de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

No total foram obtidas 59 amostras de pacientes com média de idade de 53,64 ($\pm 10,84$) anos, com diagnóstico clínico e histopatológico confirmado de câncer de mamado tipo TN. Assim, os critérios de inclusão da amostra caso foram ser do sexo feminino e ter câncer de mama subtipo TN.

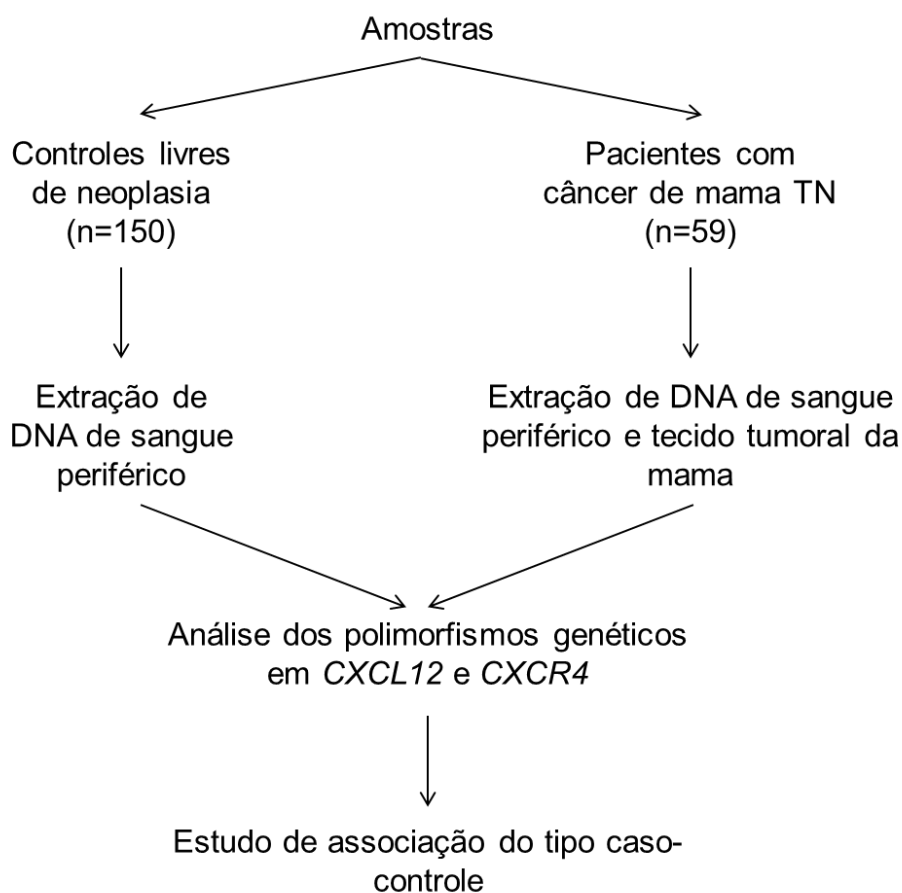
Como grupo controle foram coletadas 150 amostras de sangue de mulheres com média de idade de 43,61 ($\pm 12,23$) anos, que tiveram como critério de inclusão não possuir história de neoplasia de mama atual ou anterior, de acordo com exame clínico e de mamografia atualizados para o momento da coleta e sem histórico de câncer de mama na família. Como parâmetro de pareamento, as amostras controles foram coletadas na mesma região (Londrina, PR) das pacientes e procurou-se obter amostras de faixa etária próxima em relação ao grupo caso.

A etnia euro-descendente foi predominante tanto nas pacientes como controles, como era esperado para uma amostra obtida na região norte do Paraná, de colonização predominantemente européia (Arruda *et al.*, 1998).

3.2 Delineamento do Estudo

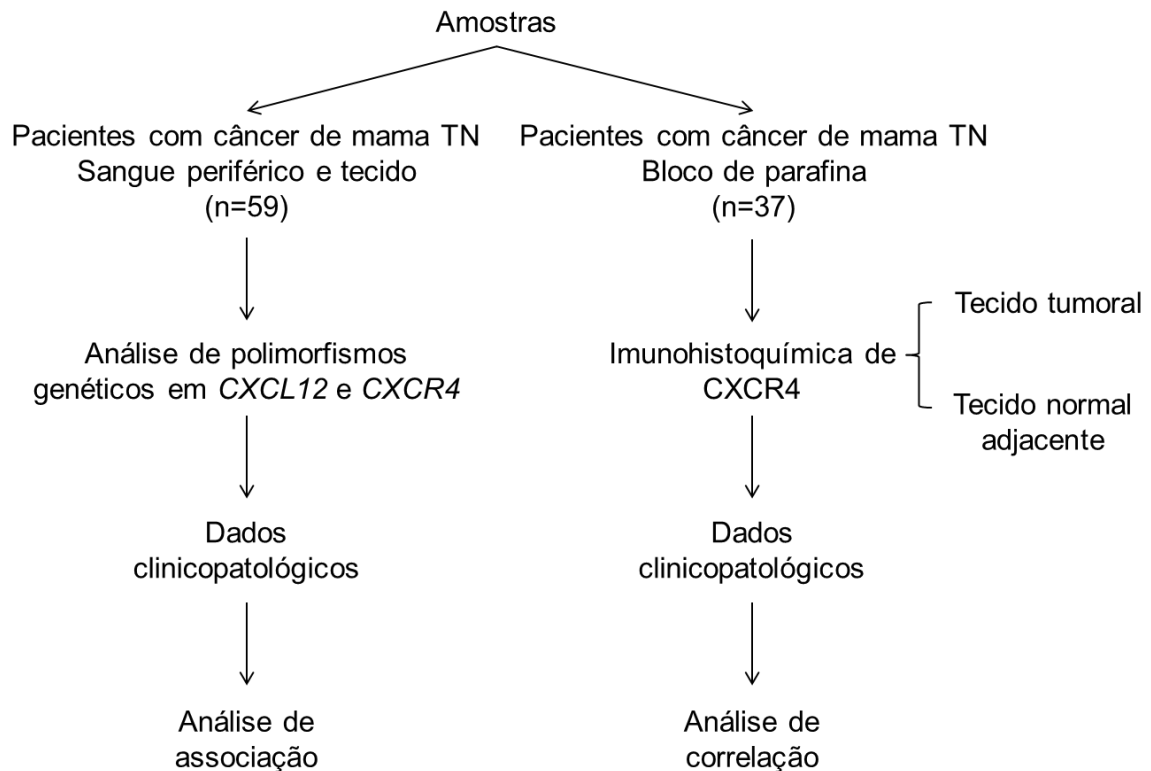
Delineamento 1 do estudo:

Na primeira etapa do presente trabalho, foi realizado um estudo de associação do tipo caso-controle para comparar a presença dos dois polimorfismos propostos (rs1801157 para o *CXCL12* e rs22280145 para o *CXCR4*) entre os grupos (pacientes e controles), na busca por marcadores associados a uma maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama TN.



Delineamento 2 do estudo:

Paralelamente, foi realizado um estudo transversal para avaliar a possível associação entre os polimorfismos genéticos propostos e/ou a expressão de CXCR4 por IHC em relação aos fatores prognósticos: tamanho do tumor, metástase em linfonodos e grau histológico.



3.3 Coleta do Material Biológico e Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi realizada com coloração por hematoxilina-eosina (HE) de rotina, para confirmação do diagnóstico de câncer de mama. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO, 2012). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema TNM (tumor/nódulo/metástase) do câncer (Sobin *et al.*, 2009).

A análise IHC para os marcadores HER2, RE e RP, utilizada para caracterizar o fenótipo TN das amostras, foi realizada como rotina clínica no Laboratório de

Patologia Clínica do Hospital do Câncer de Londrina, seguindo um protocolo padrão baseado em (Hammond *et al.*, 2010; Wolff *et al.*, 2013), modificado.

3.4 Extração de DNA genômico

O DNA genômico proveniente de células do sangue periférico das pacientes e controles foi extraído a partir de 200 µL do sangue total, coletado com EDTA como anticoagulante, utilizando-se o método de coluna de resina (Kit de Extração Mini Spin Plus, BioPur, Curitiba, Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 50µL do tampão fornecido e estocado a -20°C para posterior utilização nos métodos de biologia molecular.

O DNA genômico proveniente das amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina foi extraído utilizando-se o método de coluna de resina (innuPREP DNA Mini Kit, AnalytikJena AG, Jena, Alemanha), também segundo as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 20µL do tampão fornecido e estocado a -20°C para posterior utilização nos métodos de biologia molecular.

Todas as amostras de DNA obtidas (provenientes de sangue ou parafina) foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop 2000®, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O grau de pureza em relação à contaminação por proteínas foi avaliado pela razão entre as absorbâncias nos comprimentos de 260 nm e 280 nm.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O método de PCR foi utilizado para a detecção das variantes alélicas polimórficas nos genes *CXCL12* e *CXCR4* nas 59 amostras de pacientes e nas 150 amostras de controles. Todas as genotipagens foram realizadas no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP), da Universidade Estadual de Londrina, na presença de controles negativos para avaliação de contaminação dos reagentes e marcadores de tamanho de fragmentos para confirmação dos tamanhos dos produtos de PCR esperados.

3.6 Análise do Polimorfismo rs1801157 do Gene *CXCL12*

Para a determinação do polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL12*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: *Forward*: 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' e *Reverse*: 5'-CCTGAGAGTCCTTTTGCGGG-3', seguindo as etapas de ciclagem descritas na tabela 1. Após a amplificação do fragmento de interesse, foi realizada uma digestão enzimática utilizando-se 5U da endonuclease de restrição *MspI* (Promega Corporation, Madison, EUA) e 10 µL do produto de PCR. Os tubos foram incubados por 4 horas a 37°C e os resultados foram observados pela clivagem ou não do fragmento original de 293 pares de bases (pb).

O sítio de clivagem da enzima *MspI* encontra-se na seguinte sequência:



Quando o indivíduo possui uma troca de nucleotídeo G por A, a enzima não reconhece seu sítio de ligação e o fragmento permanece intacto. Sendo assim, o indivíduo homocigoto selvagem sofre clivagem do fragmento de 293 pb em 2 bandas: uma contendo 193 pb e 100 pb. O indivíduo heterocigoto apresenta 3 bandas: 293 pb, 193 pb e 100 pb. O indivíduo que possui o polimorfismo em homocigose apresenta uma única banda de 293 pb, a qual não sofre ação da enzima de restrição.

3.7 Análise do Polimorfismo rs2228014 do Gene *CXCR4*

Para a determinação do polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*, foram utilizados os protocolos descritos previamente (Teng *et al.*, 2009), com os oligonucleotídeos iniciadores: *Forward*: 5'-AACTTCCTATGCAAGGCAGT-3' e *Reverse*: 5'-TATCTGTCATCTGCCTCACT-3', seguindo as etapas de ciclagem descritas na tabela 1.

Após a amplificação do fragmento de interesse, foi realizada uma digestão enzimática utilizando-se 2U da endonuclease de restrição *BclI* (New England Biolabs, New England, UK) e 10 µL do produto de PCR. Os tubos foram incubados por 4 horas a 37°C e os resultados foram observados pela clivagem ou não do fragmento original de 236 pb.

O sítio de clivagem da enzima *BclI* encontra-se na seguinte sequência:



Quando o indivíduo possui uma troca de nucleotídeo C por T, a enzima não reconhece seu sítio de ligação e o fragmento permanece intacto. Sendo assim, o indivíduo homocigoto selvagem sofre clivagem do fragmento de 236 pb em 2 bandas: uma contendo 133 pb e 103 pb. O indivíduo heterocigoto apresenta 3 bandas: 236 pb, 133 pb e 103pb. O indivíduo que possui o polimorfismo em homocigose apresenta uma única banda de 236pb, a qual não sofre ação da enzima de restrição.

Tabela 1. Protocolo de ciclagem das reações em cadeia da polimerase (PCR) para as genotipagens dos polimorfismos rs1801157 do gene CXCL12 e rs2228014 do gene CXCR4.

rs1801157 (CXCL12)			rs2228014 (CXCR4)		
T °C	Tempo	Ciclos	T °C	Tempo	Ciclos
	Estágio 1			Estágio 1	
94°C	5'	1 ciclo	94°C	5'	1 ciclo
	Estágio 2			Estágio 2	
94°C	1'	40 ciclos	94°C	45"	
60°C	1'		60°C	1'	35 ciclos
72°C	1'		72°C	75"	
	Estágio 3			Estágio 3	
72°C	10'	1 ciclo	72°C	10'	1 ciclo

T °C: temperatura

Todos os produtos de PCR, bem como os produtos de clivagem, para ambos os genes, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, utilizando-se o tampão de carregamento Tris-Acetato-EDTA (TAE) numa voltagem de, aproximadamente, 100 V por cerca de 2 horas, utilizando 3µL de xileno cianol (XC), 10 µL de cada amostra e um marcador de tamanho de fragmento de 100pb para confirmação dos tamanhos dos produtos esperados (*Ladder* 100 bp, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

3.8 Análise da Expressão de CXCR4 por IHC

Amostras de tecido normal e tumoral de 37 pacientes fixadas em formalina e embebidas em parafina foram cortadas com uma espessura de 4µm, as quais foram fixadas em lâmina silanizada (Starfrost, Knittel, Alemanha). As amostras foram aquecidas a 56°C, desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool. A recuperação

antigênica foi realizada utilizando tampão de ácido cítrico (1,8mM) e citrato de sódio hidratado (8,2mM) para posterior adição do anticorpo primário.

O anticorpo primário utilizado para detecção do receptor CXCR4 foi um anticorpo de camundongo anti-CXCR4 (CD184) humano purificado (clone *polyclonal*; eBioscience, San Diego, CA, EUA), em uma diluição de 1:100, previamente estabelecida após testes com diferentes diluições (1:800; 1:600; 1:400; 1:200; 1:100), até obter-se um padrão de coloração limpo, sem *background* e que se assemelhasse aqueles observados na literatura.

O anticorpo secundário (Mouse/Rabbit Immunodetector HRP/DAB, Bio SB INC, Santa Barbara, CA, USA) foi adicionado, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina e a lamínula foi fixada utilizando-se balsamo do Canadá.

Foram realizados controles de especificidade do anticorpo primário, em amostras positivas e sem a adição do mesmo. A marcação para CXCR4 foi avaliada no tecido tumoral e normal adjacente. A análise foi realizada em microscópio óptico (Eclipse-E200, Nikon, Japão), por patologista especializado e de forma semi-quantitativa. O protocolo para análise deste marcador foi estabelecido no próprio Laboratório. Para a marcação em tecido tumoral e normal adjacente considerou-se: 0=não marcado; += pouco marcado; ++= moderadamente marcado; +++= fortemente marcado.

3.9 Análise Estatística

A análise do estudo de associação foi realizada pelo cálculo da *OddsRatio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC95%), com o auxílio do programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 6.00 for Windows (*Graph Pad Software*, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com), como estimativa do risco relativo.

Os testes do Qui-Quadrado de Pearson, exato de Fisher e correlação de Spearman foram utilizados na comparação entre os parâmetros prognósticos com os resultados da IHQ e em relação aos diferentes genótipos, pelo programa estatístico SPSS (versão 20.0) Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Para os genes *CXCL12* e *CXCR4*, onde os três genótipos podem ser identificados, ou seja, homozigoto prevalente, heterozigoto e homozigoto raro, a significância estatística das frequências genotípicas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 3x2. A análise conjunta de genótipos considerados de risco (*CXCL12* + *CXCR4*) foi realizada por meio de tabelas de

contingência 2x2, considerando-se as combinações genóticas de indivíduos portadores dos dois alelos variantes, simultaneamente, seja em homozigose ou em heterozigose.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, o qual será submetido à publicação no periódico *Clinical and Experimental Medicine*, com fator de impacto 2,8.

Receptor CXCR4 como possível marcador prognóstico para o câncer de mama triplo-negativo

Alda Losi Guembarovski^{1,2}, Roberta Losi Guembarovski³, Bruna Karina Banin Hirata³, Patrícia Midori M. Ozawa³, Glauco A. Vitiello³, Karen Mayumi Suzuki³, Mayara Tiemi Enokida³, Wlateral Jorge Sobrinho⁴, Maria Angelica Ehara Watanabe³ e Edna Maria Vissoci Reiche²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná;

²Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná;

³Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

⁴Clínica de Mastologia, GinecoMed, Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

Este estudo objetivou analisar polimorfismos genéticos em *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs2228014) em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo (TN) e controles sem a neoplasia, bem como a expressão proteica de CXCR4, na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico, subtipo específico. Os polimorfismos foram avaliados em 59 pacientes e 150 controles pela técnica de reação em cadeia da polimerase seguida do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). A expressão de CXCR4 foi avaliada por imunohistoquímica (IHQ) em 37 amostras de tecido mamário incluídas em parafina. Os resultados indicaram ausência de associação significativa para *CXCL12* [homozigoto variante: *odds ratio* (OR)=2,63; intervalo de confiança (IC) 95%=0,51-13,39] e portador do alelo variante: OR=1,58; IC95%=0,83-2,99) e *CXCR4* (portador do alelo variante: OR=1,89; IC95%=0,58-6,22) em relação ao câncer TN, mesmo na análise combinada dos dois genes (OR=3,56; IC95%=0,77-16,44). Os genótipos também não apresentaram associação significativa em relação aos parâmetros prognósticos: tamanho do tumor (*CXCL12*: p=0,420; *CXCR4*: p=0,925), metástase em linfonodo (*CXCL12*: p=0,596; *CXCR4*: p=0,516) e grau histológico (*CXCL12*: p=0,192; *CXCR4*: p=0,070). A IHQ demonstrou que a expressão de CXCR4 ocorreu mais no citoplasma e foi maior nas células tumorais comparada ao tecido normal

adjacente. O fato de CXCR4 citoplasmático ter se apresentado mais expresso nas células tumorais em relação ao tecido normal adjacente deve ser levado em consideração e reavaliado em um maior número de amostras TN, pela importância prognóstica que pode representar.

Palavras chaves: câncer de mama triplo-negativo, *CXCL12*, *CXCR4*, polimorfismo genético, prognóstico.

1. Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum e a segunda causa de morte por câncer em mulheres com idade entre 40 e 55 anos, especialmente naquelas de ascendência americana africana ou hispânica. Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o Brasil, em 2014, foram estimados 57.120 novos casos, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do país. Além disso, cerca de 1,67 milhões de novos casos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (1).

Dentre os subtipos do câncer de mama, aquele denominado triplo-negativo (TN) se caracteriza por possuir fenótipo de receptor de estrógeno (RE) negativo, receptor de progesterona (RP) negativo e pela ausência da superexpressão do oncogene *Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2)*. O câncer de mama TN é responsável por 10-20% de todos os cânceres de mama e é biologicamente mais agressivo do que outros subgrupos (2), como aqueles que expressam os receptores hormonais. Epidemiologicamente acomete em maior frequência pacientes jovens, antes da menopausa(3); possui predileção por metástase visceral, o que favorece um pior prognóstico (4); normalmente demonstra alto grau histológico e é o subtipo mais comum em portadoras de mutação no gene *Câncer de Mama 1* de início precoce (*BRCA1*)(5).

As células do câncer de mama têm a habilidade de se localizar em uma variedade de tecidos ao longo do corpo; entretanto, a habilidade destas células sobreviverem na maioria dos tecidos diferentes do mamário é limitada. Linfonodos, ossos, fígado, pulmão e cérebro fornecem um favorável microambiente para a sobrevivência das células do câncer de mama (6). Moléculas quimioatraentes específicas e vias de sinalização que promovem migração podem influenciar na formação de

tumores em locais distantes, tais como a superfamília das quimiocinas e seus receptores (7).

O fator 1 derivado de células estromais (SDF1 ou CXCL12) é um membro da família das quimiocinas C-X-C o qual é produzido por vários tecidos, incluindo a medula óssea (MO) e o timo e liga-se aos receptores de quimiocina C-X-C 4 (CXCR4) (8) e C-X-C 7 (CXCR7) (9). Esta quimiocina é expressa por diversos tipos celulares, como osteoblastos imaturos e células endoteliais no interior da MO, bem como por células epiteliais em diversos órgãos (10, 11). Além de ser importante na migração celular, parece desempenhar um papel na patogênese de tumores malignos, como no câncer de mama (12, 13). O sequenciamento do gene *CXCL12* (*Gen Bank* L36033) revelou um polimorfismo (rs1801157) na região 3' não codificadora (3'UTR), (posição 801 G>A), cujo alelo variante parece ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração da proteína (14). Neste contexto, elevados níveis desta proteína parecem promover sobrevivência celular, proliferação, angiogênese e metástase, o que aponta para a importância de seu estudo em pacientes portadoras de câncer de mama.

A importância do receptor CXCR4 tem sido investigada na patogênese do câncer de mama (15, 16), e muito vem sendo discutido com relação ao seu possível papel no processo metastático desta neoplasia. Células do câncer de mama expressam elevados níveis de CXCR4, os quais podem direcionar a quimiotaxia e respostas invasivas (17). Além disso, células metastáticas também mostram forte expressão deste receptor, o que vem sendo associado a uma baixa sobrevivência das pacientes com esta neoplasia (18). Outros dados (19) afirmam ainda que este receptor apresenta expressão aumentada em subtipos moleculares do câncer de mama, como o basal-like, além de mostrar associações positivas com parâmetros prognósticos das pacientes.

Foi descrito um polimorfismo de base única (rs2228014) no códon 138 do gene *CXCR4* que consiste em uma troca de citocina (C) para timina (T) (20). Teng, Liu (21) verificaram associação deste polimorfismo com câncer oral e com indução de metástase, mas Cacina, Bulgurcuoglu-Kuran (22) não verificaram associação com o carcinoma endometrial. Embora estudos (17-19) descrevam o CXCR4 como um candidato interessante a marcador tumoral, especialmente no processo metastático, os dados ainda são controversos, o que ressalta a importância de estudos adicionais, frente ao seu potencial clínico no câncer mamário subtipo específico.

A ligação da quimiocina CXCL12 ao CXCR4 desencadeia ativação de diferentes vias de sinalização que podem resultar em uma variedade de respostas, tais

como quimiotaxia, sobrevivência celular e/ou proliferação, aumento do cálcio intracelular e transcrição gênica (23). Assim, o eixo CXCL12/CXCR4 está envolvido em vários aspectos da progressão tumoral, incluindo angiogênese, metástase e sobrevivência (17).

Dentro deste contexto, este trabalho objetivou analisar polimorfismos genéticos no eixo *CXCL12/CXCR4* em pacientes com câncer de mama TN e em controles livres desta neoplasia, bem como avaliar a expressão proteica de CXCR4 em tecido tumoral e normal adjacente na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para a carcinogênese mamária subtipo específica.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos Éticos e Caracterização da Amostra

Este estudo foi cadastrado na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/CAAE:17123113.4.0000.5231). As entrevistas com pacientes e mulheres saudáveis (controles) foram realizadas no Hospital do Câncer de Londrina e na Unidade Básica de Saúde (UBS) Orlando Sestari, Bairro União da Vitória, Londrina, Paraná, respectivamente. Todas as participantes receberam as devidas informações sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para posterior coleta do material.

Adicionalmente, a partir de um levantamento retrospectivo de cinco anos, foram obtidas amostras de tecido mamário, incluído em parafina, de pacientes com câncer de mama TN provenientes de Londrina e região, Paraná, e os respectivos dados clínicos e patológicos. Essas amostras foram selecionadas no Setor de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL). Todas as amostras de tecido foram obtidas a partir de pacientes livres de tratamento quimioterápico adjuvante ou neoadjuvante.

No total, foram obtidas amostras de sangue e de tecido embebidos em parafina, totalizando 59 pacientes com média de idade de $53,64 \pm 10,84$ anos, com diagnóstico clínico e histopatológico confirmado de câncer de mama TN.

Como grupo controle foram coletadas 150 amostras de sangue de mulheres provenientes da mesma região geográfica das pacientes, sem neoplasia de mama de acordo com exame clínico e mamografia atualizados para o momento da coleta, e sem histórico de câncer de mama familiar. A média da idade do grupo controle foi de $43,61 \pm 12,23$ anos.

2.2 Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi realizada com coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) de acordo com os procedimentos padronizados no Setor de Patologia do HU/UEL para confirmação do diagnóstico. Foram obtidos os dados relativos ao tamanho tumoral, comprometimento de linfonodo axilar e grau histológico de todas as pacientes. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema tumor/nódulo/metástase (TNM) do câncer (24).

O grau de diferenciação histológica pode ser classificado em I, II ou III, onde o grau III corresponde ao tecido menos diferenciado e mais semelhante às células tronco, indicando, portanto, pior prognóstico. Essa classificação é baseada nos níveis de pleomorfismos nucleares, formação glandular/tubular e índice mitótico (25). Tamanho do tumor e envolvimento de linfonodos, dentre outros parâmetros, também influenciam no prognóstico e na probabilidade de resposta às terapias sistêmicas (26, 27).

A análise IHQ para os marcadores HER2, RE e RP utilizada para caracterizar o fenótipo TN das amostras foi realizada de acordo com os procedimentos padronizados no Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de Londrina baseado em protocolos padrões (28, 29), com modificações.

2.3 Extrações de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL do sangue total utilizando coluna de resina (Kit de Extração Mini Spin Plus, BioPur, Curitiba, Paraná, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 50µL do tampão fornecido e estocado a -20°C. Das amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, o DNA foi extraído com coluna de resina (innuPREP DNA Mini Kit (AnalytikJena AG, Jena, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 20µL do tampão fornecido e estocado a -20°C. Os DNAs de todas as amostras foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop 2000®, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

2.4 Análise do Polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL12*

Para a análise do polimorfismo rs1801157 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: *Forward*: 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' e *Reverse*: 5'-CCTGAGAGTCCTTTTGCGGG-3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (*Gen Bank* accession number L36033). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada nas seguintes condições: 10% de PCR *Buffer*, 50 mM de MgCl₂, 1,25 mM de DNTP, 2,5 μM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase, 100ng de DNA genômico e H₂O ultrapura (*Milli-Q*) para completar o volume final de 25 μL. O protocolo de ciclagem utilizado na PCR foi 94°C por 5', 40 ciclos de 94°C por 1', 60°C por 1', 72°C por 1' e por fim 72°C por 10'.

Após a amplificação, 10 μL do produto de PCR foram submetidos à digestão enzimática utilizando-se 5U da endonuclease de restrição *MspI* (Promega Corporation, Madison, EUA), com incubação por 4 horas a 37°C. Os genótipos foram identificados pelo polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) em que o genótipo homocigoto sem o alelo variante (GG) sofre clivagem do fragmento de 293 pares de bases (pb) em 2 bandas: uma contendo 193 pb e 100 pb; o genótipo heterocigoto para o alelo variante (GA) apresenta 3 bandas: 293 pb, 193 pb e 100 pb e o genótipo homocigoto para o alelo variante (AA) apresenta uma única banda de 293 pb, a qual não sofre ação da enzima de restrição (Figura 1).

2.5 Análise do Polimorfismo rs2228014 do Gene *CXCR4*

Para a análise do polimorfismo rs2228014 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: *Forward*: 5'-AACTTCCTATGCAAGGCAGT-3' e *Reverse*: 5'-TATCTGTCATCTGCCTCACT-3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 10% de PCR *Buffer*, 50 mM de MgCl₂, 1,25 mM de DNTP, 2,5 μM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase, 100ng de DNA genômico e H₂O ultrapura (*Milli-Q*) para completar o volume final de 25 μL. O protocolo de ciclagem utilizado na PCR foi: 94°C por 5', 35 ciclos de 94°C por 45", 60°C por 1', 72°C por 75" e por fim 72°C por 10'(21).

Após a amplificação, 10 μL do produto de PCR foram submetidos à digestão enzimática utilizando-se 2U da endonuclease de restrição *BclI* (New England Biolabs, New England, UK), com incubação por 4 horas a 37°C. Quando a variante alélica está presente, uma troca de citosina (C) por timina (T) na posição 3952 do códon de iniciação elimina o sítio de restrição (30). Desta forma, os genótipos foram

identificados por RFLP em que o genótipo homocigoto para o alelo selvagem (CC) sofre clivagem do fragmento de 236 pb em 2 bandas: uma contendo 133 pb e 103 pb; o genótipo heterocigoto para o alelo variante (CT) apresenta 3 bandas: 236 pb, 133 pb e 103pb e o genótipo homocigoto para o alelo variante (TT) (não observado no presente estudo) apresenta uma única banda de 236 pb, a qual não sofre ação da enzima de restrição (Figura 2).

Todos os produtos de PCR e clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, utilizando-se o tampão de carregamento Tris-Acetato-EDTA (TAE) numa voltagem de aproximadamente 100 V por cerca de 2 horas, utilizando 3µL de xileno cianol (XC), 10 µL de cada amostra e marcador de tamanho de fragmento(100 pb) (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

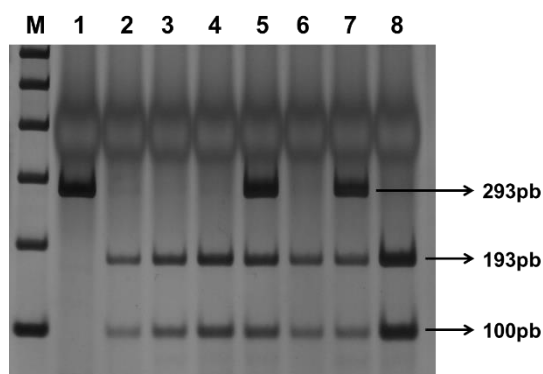


Figura 1. Perfil de PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata para o polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL12*. M: *marcador de tamanho de fragmento de 100pb* 1: homocigoto para o alelo variante (AA); 2,3,4,6 e 8: homocigotos para o alo selvagem (GG); 5 e 7: heterocigotos para o alelo variante (GA).

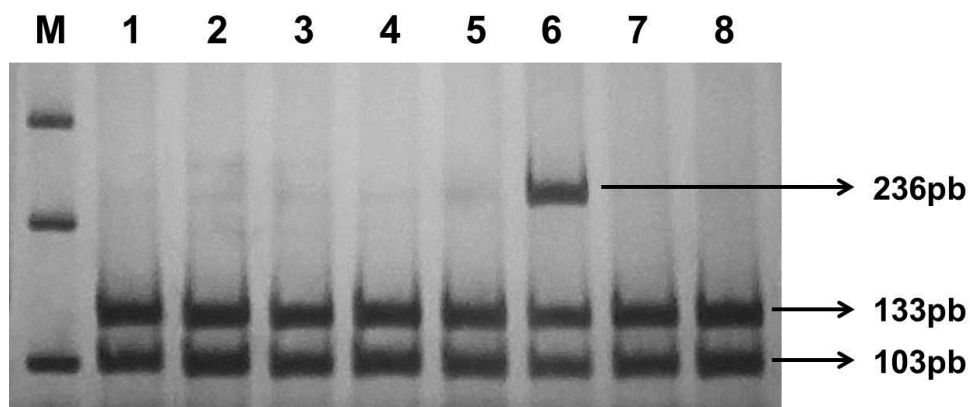


Figura 2. Perfil de PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*. M: *marcador de tamanho de fragmento de 100pb*; 1-5, 7, 8: homocigotos para o alelo selvagem (CC); 6: heterocigoto para o alelo variante (CT).

2.6 Análise da Expressão de CXCR4 por Imunohistoquímica

Amostras de tecido mamário tumoral TN e normal fixadas em formalina e embebidas em parafina obtidas de 37 das pacientes foram seccionadas com espessura de $4\mu\text{m}$ e fixadas em lâmina silanizada (Starfrost, Knittel, Alemanha). As amostras foram aquecidas a 56°C , desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão de ácido cítrico 1,8mM e citrato de sódio di-hidratado 8,2mM para posterior tratamento com anticorpo primário.

O anticorpo primário utilizado consistiu de um anticorpo de camundongo anti-CXCR4 (CD184) humano purificado (clone *polyclonal*; eBioscience, San Diego, CA, EUA), em uma diluição de 1:100. O anticorpo secundário (Mouse/Rabbit Immuno detector HRP/DAB, Bio SB INC, Santa Barbara, CA, USA) foi adicionado, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina e a lamínula foi fixada utilizando-se balsamo do Canadá.

Foram realizados controles de especificidade do anticorpo primário em amostras positivas onde o mesmo foi substituído por tampão fosfato-bicarbonato-salina (PBS). A marcação para CXCR4 foi avaliada em tecido tumoral e normal adjacente. A leitura foi realizada em microscópio óptico (Eclipse-E200, Nikon, Japão) por patologista especializado. O protocolo para análise foi estabelecido no próprio Laboratório de Pesquisa. Para a marcação considerou-se: 0=ausência de marcação; +=pouco marcado; ++=moderadamente marcado; +++=fortemente marcado.

2.7 Análise Estatística

A análise do estudo de associação foi realizada pelo cálculo da *Odds Ratio* (OR), com Intervalo de Confiança a 95% (IC95%), com o auxílio do programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 6.00 for Windows (*Graph Pad Software*, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com), como estimativa do risco relativo.

Os testes do Qui-Quadrado de Pearson, exato de Fisher e correlação de Spearman foram utilizados na comparação entre os parâmetros prognósticos com os resultados da IHQ e em relação aos diferentes genótipos, pelo programa estatístico SPSS (versão 20.0) Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados

3.1 Caracterização da Amostra em Relação aos Parâmetros Prognósticos

A média de idade das pacientes inseridas neste estudo foi de $53,64 \pm 10,84$ anos.

Das 59 pacientes inseridas no estudo, 46 (77,96%) eram portadoras de tumor de alto grau histológico (grau III), 29 (49,15%) tiveram metástase para linfonodos axilares e 28 (47,46%) apresentaram tumor maior que 3cm (Tabela 2).

3.2 Análise do Estudo de Associação Caso-Controle para *CXCL12* e *CXCR4*

O estudo de associação caso-controle foi realizado comparando-se a presença dos polimorfismos nos genes *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs2228014) entre 59 pacientes e 150 controles.

Para o polimorfismo do gene *CXCL12*, 37 (62,71%) pacientes apresentaram o genótipo homocigoto para o alelo selvagem (GG), 19 (32,20%) apresentaram o genótipo heterocigoto para o alelo variante (GA) e 3 (5,08%) apresentaram o alelo variante em homocigose (AA). Já no grupo controle, 109(72,67%) apresentaram o genótipo homocigoto para o alelo selvagem (GG), 38 (25,33%)apresentaram o genótipo heterocigoto para o alelo variante (GA) e 3 (2%) apresentaram o alelo variante em homocigose (AA). A frequência dos alelos G e A foi de 78,8% e 21,2%, respectivamente, nas pacientes; e de 85,3% e 14,7%, respectivamente, no grupo controle.

Em relação ao gene *CXCR4*, 54 (91,53%) das pacientes apresentaram genótipo homocigoto para o alelo selvagem (CC) e 5 (8,47%) apresentaram o genótipo heterocigoto para o alelo variante (CT). No grupo controle, 143 (95,33%) apresentaram perfil genotípico em homocigose para o alelo selvagem (CC) e 7(4,67%) tiveram o genótipo heterocigotopara o alelo variante (CT). Tanto no grupo de pacientes como no de controles, o genótipo em homocigose para o alelo variante (TT) não foi observado. A frequência dos alelos C e T foi de 95,8% e 4,2%, respectivamente, nas pacientes; e de 97,7% e 2,3%, respectivamente, no grupo controle. Estes resultados não indicaram associações significativas entre a presença das variantes polimórficas de forma isolada e a suscetibilidade ao câncer de mama

TN, tanto em relação aos genótipos quanto aos portadores dos alelos considerados de risco ($p > 0,05$), como demonstrado na Tabela 1.

Adicionalmente, das 59 amostras provenientes de mulheres diagnosticadas com neoplasia mamária, quatro (6,78%) apresentaram o polimorfismo nos dois genes simultaneamente (*CXCL12* e *CXCR4*), pelo menos em heterozigose para o alelo variante (GA ou AA + CT). Já no grupo controle, esta dupla variação genética foi observada em três (2%) dos indivíduos. Quando os genótipos considerados de risco foram avaliados de forma combinada, também não foram observadas associações significativas (OR=3,56; IC95%= 0,77-16,44; $p=0,08$).

3.3 Comparação entre a presença dos polimorfismos genéticos e os parâmetros de prognóstico das pacientes com câncer de mama TN

A Tabela 2 apresenta a caracterização das pacientes em relação aos parâmetros de prognóstico, bem como os resultados obtidos pela comparação entre estes e os diferentes genótipos avaliados. Não foram observadas diferenças significativas para os genótipos de *CXCL12* ou *CXCR4* em relação a tamanho do tumor (*CXCL12*: $p=0,420$; *CXCR4*: $p=0,925$), metástase em linfonodo (*CXCL12*: $p=0,596$; *CXCR4*: $p=0,516$) e grau histológico (*CXCL12*: $p=0,192$; *CXCR4*: $p=0,070$).

Tabela 1. Estudo de associação caso-controle entre os polimorfismos nos genes *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs2228014) e a presença de câncer de mama TN

	Genótipo	Controle n=150 (%)	Pacientes n=59 (%)	OR	IC95%	Valor de p
<i>CXCL12</i>	GG	109 (72,67)	37 (62,71)	1	---	---
	AA	3 (2,0)	3 (5,01)	2,63	0,51 - 13,39	0,23
	GA+AA	41 (27,33)	22 (37,29)	1,58	0,83 - 2,99	0,16
	Alelo G	256 (85,3)	93 (78,8)	1	---	---
	Alelo A	44 (14,7)	25 (21,2)	1,56	0,91 – 2,70	0,11
<i>CXCR4</i>	CC	143 (95,33)	54 (91,53)	1	---	---
	CT	7 (4,67)	5 (8,47)	1,89	0,58 – 6,22	0,29
	Alelo C	293 (97,7)	113 (95,8)	1	---	---
	Alelo T	7(2,3)	5 (4,2)	1,85	0,58 – 5,97	0,29

OR:OddsRatio; IC: intervalo de confiança. Teste Exato de Fisher

GG: genótipo em homozigose para o alelo selvagem G; AA: genótipo em homozigose para o alelo variante A;

Alelo G: alelo selvagem para o polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL12*; Alelo A: alelo variante para o polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL12*;

CC:genótipo em homozigose para o alelo selvagem C; CT: genótipo em heterozigose para o alelo variante T;

Alelo C: alelo selvagem para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*; Alelo T: alelo variante para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*.

Tabela 2. Caracterização da amostra de pacientes portadoras de câncer de mama TN (n=59) em relação aos parâmetros prognósticos e análise comparativa dos mesmos em relação aos polimorfismos em *CXCL 12* (rs1801157) e *CXCR4* (2228014)

		Número de indivíduos (n=59) n(%)	<i>CXCL 12</i>		<i>CXCR4</i>	
			GG n (%)	GA+AA n (%)	CC n (%)	CT n (%)
Tamanho do tumor	0 – 1,5cm	9 (15,25)	5 (55,55)	4 (44,45)	8 (88,89)	1 (11,11)
	1,5 – 3,0cm	22 (37,29)	12 (54,55)	10 (45,45)	20 (90,91)	2 (9,09)
	> 3,0cm	28(47,46)	20 (71,43)	8 (28,57)	26 (92,86)	2 (7,04)
	Valor de <i>p</i>		<i>p</i> =0,420		<i>p</i> =0,925	
Acometimento de linfonodos	Presente	29 (49,15)	17 (58,62)	12 (41,38)	27 (93,10)	2(6,90)
	Ausente	30 (50,85)	20 (66,67)	10 (33,33)	27(90,0)	3 (10,0)
	Valor de <i>p</i>		<i>p</i> =0,596		<i>p</i> =0,516	
Grau histológico	I	1 (1,69)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
	II	12 (20,34)	5 (41,67)	7 (58,32)	9 (75,0)	3 (25,0)
	III	46 (77,97)	31 (67,39)	15 (32,61)	44 (95,65)	2 (4,35)
	Valor de <i>p</i>		<i>p</i> =0,192		<i>p</i> =0,07	

n – Número de indivíduos; χ^2 de Pearson. GG: genótipo em homozigose para o alelo selvagem G; AA: genótipo em homozigose para o alelo variante A; Alelo G: alelo selvagem para o polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL 12*; Alelo A: alelo variante para o polimorfismo rs1801157 do gene *CXCL 12*; CC: genótipo em homozigose para o alelo selvagem C; CT: genótipo em homozigose para o alelo variante T; Alelo C: alelo selvagem para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*; Alelo T: alelo variante para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*

3.4 Análise da expressão de CXCR4 por IHQ

A expressão protéica de CXCR4 foi mais acentuada no citoplasma (++ ou +++) do que na membrana celular (+ ou 0). A expressão citoplasmática de CXCR4 encontrou-se presente em todas as amostras analisadas, sendo visivelmente mais acentuada no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente, na maior parte das amostras, no entanto, as mesmas não mostraram correlação significativa ($r=0,023$; $p=0,891$) (Figura 3).

Quando a marcação citoplasmática do tecido tumoral foi correlacionada com os parâmetros prognósticos, não foram observados resultados significativos em relação a: tamanho do tumor ($r=0,021$; $p=0,903$), acometimento de linfonodos ($r=0,031$; $p=0,872$) e grau histológico ($r=0,149$; $p=0,408$).

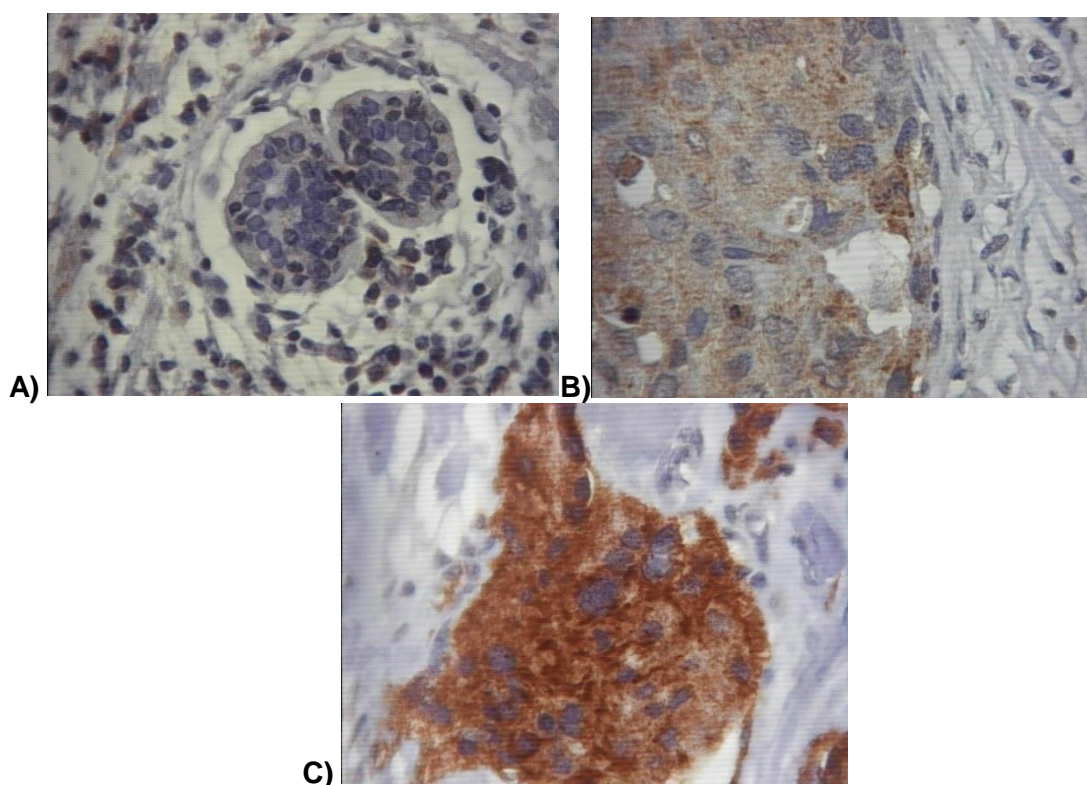


Figura 3. Perfil de expressão de CXCR4 em amostras de tecido mamário de mulheres com câncer de mama triplo negativo avaliado por imunohistoquímica. A: tecido normal negativo para CXCR4; B: tecido tumoral moderadamente marcado para CXCR4 (++); C: tecido tumoral fortemente marcado para CXCR4 (+++) (aumento de 400x).

4. Discussão

Os principais resultados do presente estudo foram ausência de associação entre os polimorfismos genéticos do eixo *CXCL12/CXCR4* (rs1801157 e rs2228014, respectivamente), com a suscetibilidade ao câncer de mama TN e parâmetros de prognóstico desta neoplasia. Do mesmo modo, a expressão do *CXCR4* não foi associada com os parâmetros prognósticos, mas se mostrou mais acentuada no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente, além de ter sido mais citoplasmática do que em nível de membrana.

A média de idade das pacientes inseridas neste estudo foi acima do que seria esperado ($53,64 \pm 10,84$ anos), uma vez que câncer TN acomete mulheres de idade mais jovem, na faixa etária de 30-40 anos, quando comparado aos tumores que apresentam positividade para os receptores hormonais RE ou RP. Das 59 pacientes, 77,96% eram portadoras de tumor grau III, 49,15% tiveram metástase para linfonodos axilares e 47,46% apresentaram tumor maior que 3cm. Assim, observamos que a maior parte das pacientes do presente estudo apresentou parâmetros de mau prognóstico, o que constitui uma característica dos tumores TN, os quais, adicionalmente apresentam predileção por metástase visceral, favorecendo ainda mais seu pior prognóstico (4).

Nos últimos anos, houve um grande crescimento no número de marcadores moleculares que têm sido avaliados para a detecção de células tumorais disseminadas, principalmente por meio de técnicas baseadas em ácidos nucleicos (31) e dentre estes marcadores, encontram-se as quimiocinas e seus receptores. A interação entre a quimiocina *CXCL12* e seu receptor *CXCR4* está envolvida na fisiopatologia de várias doenças e tem sido relatado que esta interação pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando a disseminação do câncer de mama (32, 33). Dupont, Gentien (34) observaram que em amostras de câncer de mama agressivo, o gene *CXCR4* era constitutivamente expresso e seus resultados forneceram evidências do papel do eixo de sinalização *CXCL12/CXCR4* na regulação da invasão e metástase cerebral.

Baseado nestes dados, o eixo de sinalização *CXCL12/CXCR4* também foi sugerido como marcadores assinatura de metástase, os quais mereceriam mais estudos. Assim, polimorfismos nos genes *CXCL12* (rs1801157) e *CXCR4* (rs2228014) foram investigados neste trabalho na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para o câncer de mama TN. Na análise do estudo de associação observou-se que não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos tanto na análise isolada (Tabela 1), como quando os genótipos foram avaliados de forma combinada para os dois genes.

Muitos estudos têm investigado a associação entre o polimorfismo rs1801157 do *CXCL12* e o câncer de mama. Contudo, muitos destes não reconheceram este polimorfismo como um marcador de suscetibilidade para esta neoplasia e também para outros tumores malignos como mieloma múltiplo, câncer coloretal, câncer cervical e carcinomas de bexiga (13, 35-38). Associações entre a presença do alelo variante A e o desenvolvimento tumoral ou a progressão para estágios mais avançados do processo tumoral também não têm sido verificadas (13, 39, 40). Em nosso grupo de pesquisa, de Oliveira, Guembarovski (41) também não observaram diferença quando compararam o genótipo homocigoto para o alelo selvagem (GG) com portadoras de genótipos com o alelo variante A entre pacientes com câncer de mama em geral e mulheres livres de neoplasia, de modo que os dados obtidos no presente estudo corroboram os previamente publicados. Já contrário à maioria dos estudos, Razmkhah, Talei (42) relataram associação entre este mesmo polimorfismo e maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama.

Em relação ao polimorfismo rs2228014 do *CXCR4*, Kucukgergin, Isman (43) relataram que mutações neste gene podem contribuir para a disseminação do câncer de mama quando estudaram uma população turca. Já Lee, Kuo (44) verificaram que pacientes com câncer de pulmão e portadores do genótipo TT possuem uma tendência à doença avançada e pior prognóstico, e que indivíduos com esse mesmo genótipo possuem risco 2,5 vezes maior de desenvolver carcinoma endometrial (22). Adicionalmente, indivíduos portadores do alelo T também apresentaram significativamente alto risco para carcinoma de células renais (45). Vale ressaltar que o alelo T é de pouca ocorrência na população, fazendo com que o genótipo homocigoto TT seja muito raro(30). Portanto, a ausência do genótipo TT na amostra do presente trabalho, tanto no grupo das pacientes como no grupo controle, está de acordo com a frequência esperada para este alelo e genótipo. A única análise possível para este gene foi levando-se em consideração o portador do genótipo em heterozigose CT (OR=1,89; IC95%=0,58-6,22) que não apresentou associação significativa com a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer TN.

Um dado interessante em relação ao presente estudo é que se pode observar uma tendência dos alelos variantes serem detectados com maior frequência no grupo das pacientes TN, tanto para *CXCL12* como para *CXCR4*, mas especialmente na análise simultânea para os dois genes (OR=3,56; p=0,08), o que poderia indicar uma tendência de existência de associação, a qual poderia ser demonstrada quando um maior número de amostras deste mesmo subtipo tumoral fosse analisado.

Adicionalmente, quando a presença dos polimorfismos foi comparada com os parâmetros prognósticos, não foram observadas significâncias estatísticas para *CXCL12* ou *CXCR4* em relação ao tamanho do tumor, metástase em linfonodo e grau histológico,

indicando que os marcadores genéticos avaliados parecem não influenciar no agravamento e progressão da doença, pelo menos em relação a estes parâmetros, e na amostra do presente estudo. Em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa, um polimorfismo no gene *FOXP3* (rs3761548), marcador relacionado ao sistema imune, apresentou associação positiva com a suscetibilidade ao câncer de mama TN, mas também não se mostrou correlacionado aos parâmetros de prognóstico avaliados (46).de Oliveira, Guembarovski (47) também não observaram correlação entre genótipos de *CXCL12* (rs1801157) e características clinicopatológicas de pacientes com câncer de mama, como idade, *status* hormonais RE e RP, acometimento de linfonodos, histologia do tumor e estágio clínico da neoplasia (I a IV). Essa avaliação em relação aos parâmetros de prognóstico é muito importante, uma vez que marcadores tumorais podem atuar em diferentes etapas do processo de carcinogênese, desde a suscetibilidade até a resposta terapêutica, passando pelo prognóstico e evolução das neoplasias.

As quimiocinas possuem um papel no processo da metástase e estão altamente expressas nos tecidos onde, preferencialmente, as mesmas ocorrem no câncer de mama. Além disso, algumas células neoplásicas da mama expressam receptores de quimiocina, como o CXCR4. Assim sendo, o bloqueio da interação entre a quimiocina e seu receptor específico, como no caso do eixo *CXCL12/CXCR4*, poderia diminuir a migração de células mamárias neoplásicas para órgãos alvo, como linfonodos e pulmão, diminuindo o potencial metastático desta neoplasia (48).

No presente estudo, foi investigada a expressão proteica do receptor CXCR4 por IHQ em amostras de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes TN e foi observado que o mesmo se expressa em ambos os tecidos, porém com mais intensidade no tecido tumoral. Além disso, que esta expressão é mais citoplasmática do que em nível de membrana (Figura 3). Tem sido descrito em células MCF-7 que o receptor CXCR4 localiza-se na superfície celular em células não estimuladas, mas após exposição a *CXCL12*, por exemplo, é rapidamente internalizado com o intuito de transduzir sinais e induzir seus efeitos biológicos (49), o que poderia ser uma das explicações para sua maior expressão citoplasmática e não em nível de membrana, observada neste estudo.

Foi demonstrado ainda que o tecido mamário normal expressa níveis mais baixos de CXCR4 do o tecido tumoral e que o nível de expressão está correlacionado com a mortalidade associada à metástase (50). Chen, Du (51) analisaram a expressão de CXCR4 por IHQ em 175 casos de tumores de mama, incluindo 75 casos de TN, e verificaram que este receptor foi mais expresso nos tumores TN do que em outros subtipos (71% para TN vs 44% para HER2 positivo e 37% para o subtipo luminal). Os dados indicam que CXCR4 parece exercer uma maior função em pacientes do subtipo TN, sugerindo que a análise deste marcador pode melhorar a eficácia da terapia nestas pacientes. Segundo Sivrikoz,

Doganay (52) os subtipos *basal-like* e HER2 expressam marcação para CXCR4 mais frequentemente do que os outros subtipos. Embora no presente trabalho não tenham sido avaliados outros subtipos, nossos dados também mostraram marcação citoplasmática mais intensa para CXCR4 no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente, porém as mesmas não se mostraram correlacionadas.

Chu, Panu (53) postularam ainda que o nível elevado de CXCR4 é um indicativo de prognóstico ruim em pacientes com câncer TN. Os autores verificaram que as pacientes cujos tumores tinham elevada expressão de CXCR4 tinham uma incidência significativamente maior de recorrência e morte relacionada ao câncer. Yu, Wang (54), utilizando marcação por IHQ, mostraram que houve forte associação entre a expressão de CXCR4 e grau histológico em pacientes TN, de modo que este marcador poderia ser um preditor de mau prognóstico neste subtipo tumoral. Ainda, de acordo com Sivrikoz, Doganay (52) há uma relação positiva entre envolvimento de linfonodos e marcação de CXCR4 nestes subtipos. Frente à ampla discussão que a literatura apresenta indicando CXCR4 como marcador associado ao processo de metástase, era esperado observar uma correlação entre a marcação tumoral deste receptor e o acometimento de linfonodos. Entretanto, no presente estudo, quando a marcação tumoral de CXCR4 foi correlacionada com parâmetros prognósticos, não foram observadas correlações significativas.

Os polimorfismos genéticos rs1801157 no *CXCL12* e rs2228014 no *CXCR4* não se mostraram candidatos a marcadores de suscetibilidade para o câncer de mama TN; entretanto, pode-se observar que os alelos variantes foram mais presentes no grupo das pacientes, principalmente na análise agrupada, o que poderia indicar uma possível associação. Os marcadores também não se mostraram associados aos parâmetros prognósticos, o que indica que os mesmos parecem não contribuir de forma significativa para o agravamento da doença. Em relação à expressão do receptor CXCR4, vale ressaltar que o fato do mesmo estar mais expresso no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente pode ser um indicativo de importância prognóstica, a qual deve ser explorada em amostras maiores, principalmente de tumores TN, devido ao fato deste receptor, no futuro, poder constituir um marcador relevante para este subgrupo tumoral, dada sua carência de marcadores para aplicação clínica e, principalmente, terapêutica.

5. Referências

1. INCA. Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2014.
2. Kurebayashi J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer*. 2009;16(4):275-80. Epub 2009/05/02.

3. Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast cancer research : BCR*. 2006;8(1):R7. Epub 2006/01/19.
4. Maegawa RO, Tang SC. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. *Cancer investigation*. 2010;28(8):878-83. Epub 2010/09/16.
5. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*. 2009;45 Suppl 1:27-40. Epub 2009/09/25.
6. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast disease*. 2006;26:75-85. Epub 2007/05/03.
7. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clinical & experimental metastasis*. 2010;27(2):97-105. Epub 2008/09/25.
8. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(3):1101-9. Epub 1996/09/01.
9. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(9):2201-13. Epub 2006/08/31.
10. Neiva K, Sun YX, Taichman RS. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2005;38(10):1449-54. Epub 2005/09/21.
11. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer metastasis reviews*. 2010;29(4):709-22. Epub 2010/09/15.
12. de Oliveira Cavassin GG, De Lucca FL, Delgado Andre N, Covas DT, Pelegrinelli Fungaro MH, Voltarelli JC, et al. Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil. *Blood cells, molecules & diseases*. 2004;33(1):90-3. Epub 2004/06/30.
13. de Oliveira KB, Oda JM, Voltarelli JC, Nasser TF, Ono MA, Fujita TC, et al. CXCL12 rs1801157 polymorphism in patients with breast cancer, Hodgkin's lymphoma, and non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2009;23(6):387-93. Epub 2009/11/21.
14. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)*. *Science*. 1998;279(5349):389-93. Epub 1998/02/07.
15. do Val Carneiro JL, Nixdorf SL, Mantovani MS, da Silva do Amaral Herrera AC, Aoki MN, Amarante MK, et al. Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2009;135(8):997-1004. Epub 2009/01/07.
16. Oda JM, de Oliveira KB, Guembarovski RL, de Lima KW, da Silva do Amaral Herrera AC, Guembarovski AL, et al. TGF-beta polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. *Molecular biology reports*. 2012;39(12):10131-7. Epub 2012/09/04.
17. Muller A, Homey B, Soto H, Ge NF, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-6.
18. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*. 2006;238(1):30-41.

19. Zhang M, Liu HX, Teng XD, Wang HB, Cui J, Jia SS, et al. The Differences in CXCR4 Protein Expression Are Significant for the Five Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Ultrastruct Pathol.* 2012;36(6):381-6.
20. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, Bergeron J, Laten A, Gold B, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF-1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune.* 2005;40(5):6.
21. Teng YH, Liu TH, Tseng HC, Chung TT, Yeh CM, Li YC, et al. Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. *Head & neck.* 2009;31(10):1282-8. Epub 2009/04/18.
22. Cacina C, Bulgurcuoglu-Kuran S, Iyibozkurt AC, Yaylim-Eraltan I, Cakmakoglu B. Genetic variants of SDF-1 and CXCR4 genes in endometrial carcinoma. *Molecular biology reports.* 2012;39(2):1225-9. Epub 2011/05/25.
23. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):2927-31. Epub 2010/05/21.
24. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours 2009.
25. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2009;133(10):1515-38. Epub 2009/10/02.
26. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer.* 2001;37(5):591-6. Epub 2001/04/06.
27. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(12):2716-25. Epub 2005/04/20.
28. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2013;31(31):3997-4013. Epub 2013/10/09.
29. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerly KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2010;134(7):e48-72. Epub 2010/07/01.
30. Martin MP, Carrington M, Dean M, O'Brien SJ, Sheppard HW, Wegner SA, et al. CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association.* 1998;19(4):430. Epub 1998/12/02.
31. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related cancer.* 2006;13(4):1033-67. Epub 2006/12/13.
32. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *Journal of leukocyte biology.* 2006;79(4):639-51. Epub 2006/02/16.
33. Salvatore P, Pagliarulo C, Colicchio R, Napoli C. CXCR4-CXCL12-dependent inflammatory network and endothelial progenitors. *Current medicinal chemistry.* 2010;17(27):3019-29. Epub 2010/07/16.
34. Dupont VN, Gentien D, Oberkampf M, De Rycke Y, Blin N. A gene expression signature associated with metastatic cells in effusions of breast carcinoma patients. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2007;121(5):1036-46. Epub 2007/04/24.

35. Pemberton NC, Paneesha S, Hiller L, Starczynski J, Hooper L, Pepper C, et al. The SDF-1 G > A polymorphism at position 801 plays no role in multiple myeloma but may contribute to an inferior cause-specific survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 2006;47(7):1239-44.
36. Dimberg J, Hugander A, Lofgren S, Wagsater D. Polymorphism and circulating levels of the chemokine CXCL12 in colorectal cancer patients. *Int J Mol Med*. 2007;19(1):11-5.
37. Maley SN, Schwartz SM, Johnson LG, Malkki M, Du Q, Daling JR, et al. Genetic variation in CXCL12 and risk of cervical carcinoma: a population-based case-control study. *Int J Immunogenet*. 2009;36(6):367-75. Epub 2009/10/01.
38. Vazquez-Lavista LG, Lima G, Gabilondo F, Llorente L. Genetic association of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)-2518 polymorphism in Mexican patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2009;74(2):414-8. Epub 2009/08/04.
39. Kruszyna L, Lianeri M, Rubis B, Knula H, Rybczynska M, Grodecka-Gazdecka S, et al. CXCL12-3' G801A polymorphism is not a risk factor for breast cancer. *DNA and Cell Biology*. 2010;29(8):5.
40. Hassan S, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M. Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived marker predictive of distant metastasis in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):446-54. Epub 2008/01/29.
41. de Oliveira KB, Guembarovski RL, Oda JM, Mantovani MS, Carrera CM, Reiche EM, et al. CXCL12 rs1801157 polymorphism and expression in peripheral blood from breast cancer patients. *Cytokine*. 2011;55(2):260-5. Epub 2011/05/20.
42. Razmkhah M, Talei AR, Doroudchi M, Khalili-Azad T, Ghaderi A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. *Cancer Lett*. 2005;225(2):261-6. Epub 2005/06/28.
43. Kucukgergin C, Isman FK, Dasedemir S, Cakmakoglu B, Sanli O, Gokkusu C, et al. The role of chemokine and chemokine receptor gene variants on the susceptibility and clinicopathological characteristics of bladder cancer. *Gene*. 2012;511(1):7-11. Epub 2012/09/18.
44. Lee YL, Kuo WH, Lin CW, Chen W, Cheng WE, Chen SC, et al. Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;73(2):147-52. Epub 2011/02/05.
45. Cai C, Wang LH, Dong Q, Wu ZJ, Li MY, Sun YH. Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma. *Tissue antigens*. 2013;82(3):165-70. Epub 2013/09/17.
46. Lopes LF, Guembarovski RL, Guembarovski AL, Kishima MO, Campos CZ, Oda JM, et al. FOXP3 transcription factor: a candidate marker for susceptibility and prognosis in triple negative breast cancer. *BioMed research international*. 2014;2014:341654. Epub 2014/05/31.
47. de Oliveira KB, Guembarovski RL, Guembarovski A, Herrera ACDD, Sobrinho WJ, Ariza CB, et al. CXCL12, CXCR4 and IFN gamma genes expression: implications for proinflammatory microenvironment of breast cancer. *Clin Exp Med*. 2013;13(3):211-9.
48. Epstein RJ. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):901-9.
49. Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell and tissue research*. 2014;357(1):253-66. Epub 2014/04/29.
50. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-6. Epub 2001/03/10.
51. Chen HW, Du CW, Wei XL, Khoo US, Zhang GJ. Cytoplasmic CXCR4 high-expression exhibits distinct poor clinicopathological characteristics and predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Current molecular medicine*. 2013;13(3):410-6. Epub 2013/01/22.

52. Sivrikoz ON, Doganay L, Sivrikoz UK, Karaarslan S, Sanal SM. DISTRIBUTION OF CXCR4 AND gamma-CATENIN EXPRESSION PATTERN IN BREAST CANCER SUBTYPES AND THEIR RELATIONSHIP TO AXILLARY NODAL INVOLVEMENT. *Pol J Pathol*. 2013;64(4):253-9.
53. Chu QD, Panu L, Holm NT, Li BD, Johnson LW, Zhang S. High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome. *The Journal of surgical research*. 2010;159(2):689-95. Epub 2009/06/09.
54. Yu S, Wang X, Liu G, Zhu X, Chen Y. High level of CXCR4 in triple-negative breast cancer specimens associated with a poor clinical outcome. *Acta medica Okayama*. 2013;67(6):369-75. Epub 2013/12/21.

5 CONCLUSÕES

- O estudo caso-controle não indicou associações significativas entre a presença das variantes polimórficas rs1801157 no gene *CXCL12* ou rs2228014 no gene *CXCR4* e a suscetibilidade ao câncer de mama TN quando os genótipos ou alelos foram analisados individualmente;

- Quando os genótipos ou alelos considerados de risco foram analisados de forma agrupada para os dois polimorfismos genéticos, os resultados também não indicaram associações significativas;

- Também não foram observadas associações significativas quando os genótipos considerados de risco foram avaliados em relação aos parâmetros prognósticos das pacientes: tamanho de tumor, presença de metástase em linfonodo e grau histológico;

- Em relação à expressão protéica de *CXCR4*, foi observado que o mesmo se expressa tanto no tecido normal adjacente quanto nas células tumorais e que sua expressão é maior no citoplasma do que ao nível de membrana;

- Observou-se que a expressão citoplasmática de *CXCR4* encontra-se presente em todas as amostras analisadas, sendo mais acentuada no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes *CXCL12* e *CXCR4* não se mostraram candidatos a marcadores de suscetibilidade para o câncer de mama TN na amostra do presente estudo; entretanto, pode-se observar que as variantes genéticas foram mais frequentes no grupo caso, principalmente na análise agrupada para os dois genes, o que poderia indicar uma possível associação, a qual poderia ser detectada em amostras com um número maior de pacientes.

Adicionalmente, ressalta-se que a presente amostra foi composta por um subtipo de tumor mamário, o que a torna mais homogênea e, portanto, mais confiável.

Os marcadores analisados também não se mostraram positivamente associados aos parâmetros prognósticos, o que ressalta que os mesmos parecem não contribuir de forma significativa para o agravamento da doença, pelo menos neste subtipo de tumor da mama, e levando-se em conta a presente amostra.

Em relação ao receptor *CXCR4*, vale ressaltar que o fato do mesmo estar mais expresso no tecido tumoral em relação ao tecido normal adjacente pode ser um indicativo de importância prognóstica, a qual deve ser explorada em amostras maiores de subtipos tumorais da mama, principalmente de TN, dada sua carência de marcadores para aplicação clínica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.; LAZENNEC, G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3-4, p. 401-420, Dec 2007. ISSN 0167-7659. Disponível em: <<Go to ISI>://000250879600005 >.

ARRUDA, V. R. et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin Genet**, v. 54, n. 3, p. 210-4, Sep 1998. ISSN 0009-9163 (Print)

0009-9163 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788723>>.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug 2001. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489059>>.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 675-705, 1997. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143704>>.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-50, Jul 2004. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229479>>.

BARBIERI, F.; BAJETTO, A.; FLORIO, T. Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target. **J Oncol**, v. 2010, p. 426956, 2010. ISSN 1687-8469 (Electronic)

1687-8469 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049170>>.

BERGH, J. et al. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. **Acta Oncol**, v. 40, n. 2-3, p. 253-81, 2001. ISSN 0284-186X (Print)

0284-186X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441936>>.

BERTOLINI, F. et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 11, p. 3106-12, Jun 1 2002. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036921>>.

BLEUL, C. C. et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). **J Exp Med**, v. 184, n. 3, p. 1101-9, Sep 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9064327>>.

BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1761-1767, Mar 1 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://000235632700012 >.

BURNS, J. M. et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. **J Exp Med**, v. 203, n. 9, p. 2201-13, Sep 4 2006. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940167>>.

CACINA, C. et al. Genetic variants of SDF-1 and CXCR4 genes in endometrial carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 1225-9, Feb 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607621>>.

CAREY, L. et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 12, p. 683-92, Dec 2010. ISSN 1759-4782 (Electronic)

1759-4774 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877296>>.

CAROTENUTO, P. et al. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 1, p. 17-34, 2010. ISSN 1045-4403 (Print)

1045-4403 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20528735>>.

CAVENEY, W. K.; WHITE, R. L. The genetic basis of cancer. **Sci Am**, v. 272, n. 3, p. 72-9, Mar 1995. ISSN 0036-8733 (Print)

0036-8733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7871410>>.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **J Clin Oncol**, v. 13, n. 4, p. 1009-22, Apr 1995. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707100>>.

CHENSUE, S. W. et al. Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. **J Exp Med**, v. 193, n. 5, p. 573-84, Mar 5 2001. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238588>>.

COOPER, G. M. **Elements of human cancer**. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1.ed. 1994.

DAWSON, S. J.; PROVENZANO, E.; CALDAS, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. **Eur J Cancer**, v. 45 Suppl 1, p. 27-40, Sep 2009. ISSN 1879-0852 (Electronic)

0959-8049 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775602>>.

DE OLIVEIRA CAVASSIN, G. G. et al. Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil. **Blood Cells Mol Dis**, v. 33, n. 1, p. 90-3, Jul-Aug 2004. ISSN 1079-9796 (Print)

1079-9796 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223017>>.

DE OLIVEIRA, K. B. et al. CXCL12 rs1801157 polymorphism in patients with breast cancer, Hodgkin's lymphoma, and non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Lab Anal**, v. 23, n. 6, p. 387-93, 2009. ISSN 1098-2825 (Electronic)

0887-8013 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927352>>.

DE RUIJTER, T. C. et al. Characteristics of triple-negative breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 137, n. 2, p. 183-92, Feb 2011. ISSN 1432-1335 (Electronic)

0171-5216 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069385>>.

DO VAL CARNEIRO, J. L. et al. Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 135, n. 8, p. 997-1004, Aug 2009. ISSN 1432-1335 (Electronic)

0171-5216 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125297>>.

EPSTEIN, R. J. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 901-909, Nov 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<Go to ISI>://000224815700016 >.

FEARON, E. R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1043-50, Nov 7 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353177>>.

FERNANDES, G. S. C.; KATZ, A. Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 19, n. 2, p. 7, 2009.

GLODEK, A. M. et al. Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. **Leukemia**, v. 21, n. 8, p. 1723-32, Aug 2007. ISSN 0887-6924 (Print)

0887-6924 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568820>>.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-47, Aug 2011. ISSN 1569-8041 (Electronic)

0923-7534 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709140>>.

HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch Pathol Lab Med**, v. 134, n. 7, p. e48-72, Jul 2010. ISSN 1543-2165 (Electronic)

0003-9985 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20586616>>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>>.

HELBIG, G. et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21631-8, Jun 13 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690099>>.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-74, May 17 2001. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357144>>.

HOLLAND, J. D. et al. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 8, p. 4117-4124, Apr 15 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<Go to ISI>://000236843200023 >.

IMAI, K. et al. Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. **Br J Haematol**, v. 106, n. 4, p. 905-11, Sep 1999. ISSN 0007-1048 (Print)

0007-1048 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519991>>.

INCA. **Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil**. VIGILÂNCIA, C.-G. D. P. E. Rio de Janeiro: 124 p. 2014.

IRISH, J. C.; BERNSTEIN, A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v. 103, n. 1 Pt 1, p. 42-52, Jan 1993. ISSN 0023-852X (Print)

0023-852X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421418>>.

JANOWSKI, M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. **Cell Adh Migr**, v. 3, n. 3, p. 243-9, Jul-Sep 2009. ISSN 1933-6926 (Electronic)

1933-6918 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287206>>.

JIAO, Q. L. et al. The latest progress in research on triple negative breast cancer (TNBC): risk factors, possible therapeutic targets and prognostic markers. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6, n. 9, p. 1329-1335, Sep 2014. ISSN 2072-1439. Disponível em: <<Go to ISI>://000342340800043 >.

KAKINUMA, T.; HWANG, S. T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 4, p. 639-51, Apr 2006. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478915>>.

KNUDSON, A. G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res**, v. 45, p. 1437-1443, 1985.

KOCH, W. J. et al. Direct Evidence That G(I)-Coupled Receptor Stimulation of Mitogen-Activated Protein-Kinase Is Mediated by G(Beta-Gamma) Activation of P21(Ras). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 26, p. 12706-12710, Dec 20 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://A1994PY29400073 >.

KOIZUMI, K. et al. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. **Cancer Sci**, v. 98, n. 11, p. 1652-8, Nov 2007. ISSN 1349-7006 (Electronic)

1347-9032 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894551>>.

KUREBAYASHI, J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. **Breast Cancer**, v. 16, n. 4, p. 275-80, 2009. ISSN 1880-4233 (Electronic)

1340-6868 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19408071>>.

LATAILLADE, J. J. et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. **Blood**, v. 99, n. 4, p. 1117-29, Feb 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830456>>.

LINDLEY, I. J. D. W. J.; KUNKEL, S. L. Nomenclature announcement-the chemokines. **Immunol Today**, v. 14, p. 24, 1993.

LIU, X. et al. Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer. **Oncol Rep**, v. 32, n. 6, p. 2760-8, Dec 2014. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310198>>.

LUKER, K. E.; LUKER, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 238, n. 1, p. 30-41, Jul 8 2006. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<Go to ISI>://000238931400003 >.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, n. 7, p. 436-45, Feb 12 1998. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459648>>.

MAEGAWA, R. O.; TANG, S. C. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. **Cancer Invest**, v. 28, n. 8, p. 878-83, Oct 2010. ISSN 1532-4192 (Electronic)

0735-7907 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839950>>.

MUKHERJEE, D.; ZHAO, J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. **Am J Cancer Res**, v. 3, n. 1, p. 46-57, 2013. ISSN 2156-6976 (Electronic)

2156-6976 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359227>>.

MULLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-56, Mar 1 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://000167194300037 >.

NEIVA, K.; SUN, Y. X.; TAICHMAN, R. S. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 10, p. 1449-54, Oct 2005. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16172737>>.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5367-5374, Aug 15 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<Go to ISI>://000223454600011 >.

ODA, J. M. et al. TGF-beta polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 12, p. 10131-7, Dec 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941282>>.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. **O genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. (org.). Oncologia Molecular. . São Paulo: Editora Atheneu: 3-11 p. 2004.**

PELUS, L. M. et al. Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 43, n. 3, p. 257-75, Sep 2002. ISSN 1040-8428 (Print)

1040-8428 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270782>>.

PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1068-73, Nov 7 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353182>>.

PETERSEN, D. C. et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF-1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. **J Acquir Immune**, v. 40, n. 5, p. 6, 2005.

RAZMKHAH, M. et al. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. **Cancer Letters**, v. 225, n. 2, p. 261-6, Jul 28 2005. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15978329>>.

SARAFI, M. N. et al. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J Exp Med**, v. 185, n. 1, p. 99-109, Jan 6 1997. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996246>>.

SLEEMAN, K. E. et al. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 1, p. R7, 2006. ISSN 1465-542X (Electronic)

1465-5411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417656>>.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours. 2009.**

SUN, X. et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 709-22, Dec 2010. ISSN 1573-7233 (Electronic)

0167-7659 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839032>>.

TASHIRO, K. et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. **Science**, v. 261, n. 5121, p. 600-3, Jul 30 1993. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8342023>>.

TENG, Y. H. et al. Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. **Head Neck**, v. 31, n. 10, p. 1282-8, Oct 2009. ISSN 1097-0347 (Electronic)

1043-3074 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373784>>.

VERMA, R. S.; TRIANTAFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 100, n. 1, p. 88-90, Jan 1 1998. ISSN 0165-4608 (Print)

0165-4608 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406588>>.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1138-46, Nov 22 1991. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659741>>.

WINKLER, C. et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-93, Jan 16 1998. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430590>>.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, Nov 1 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101045>>.

YUAN, W. et al. Evidence on the association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 125, n. 2, p. 467-72, Jan 2011. ISSN 1573-7217 (Electronic)

0167-6806 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526805>>.

ZHANG, M. et al. The Differences in CXCR4 Protein Expression Are Significant for the Five Molecular Subtypes of Breast Cancer. **Ultrastructural Pathology**, v. 36, n. 6, p. 381-386, Dec 2012. ISSN 0191-3123. Disponível em: <<Go to ISI>://000313293100003 >.

ZLOTNIK, A. Chemokines and cancer. **Int J Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2026-9, Nov 1 2006. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16671092>>.

ZOU, Y. R. et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 595-9, Jun 11 1998. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634238>>.

8. ANEXOS

8.1 Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	189/2013
CAAE:	17123113.4.0000.5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Maria Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 30 de setembro de 2013.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina





Original

DECLARAÇÃO

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
Depto. Ciências Patológicas

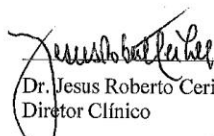
Prezada,

O Instituto de Câncer de Londrina declara para os devidos fins, que é colaborador no Projeto de Pesquisa sob o tema "Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer", que se encontra em fase de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL.

Neste Projeto será realizada a obtenção de amostra de sangue, tecido e blocos de parafina de pacientes portadores de tumores mamários, de intestino e colon bem como a realização de consultas aos prontuários, na busca por informações clínicas e histopatológicas que possam ser correlacionadas aos dados obtidos com as pesquisas básicas. Nenhuma intervenção terapêutica será realizada pelos pesquisadores e todos os sujeitos de pesquisa assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de qualquer procedimento do Estudo.

O referido estudo terá início somente após parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sendo o que tínhamos, agradecemos

 08.09.13
Dr. Jesus Roberto Ceribelli
Diretor Clínico
Dr. Jesus Roberto Ceribelli
DIRETOR CLÍNICO - CRM/PR 5784
Hospital do Câncer de Londrina



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DIRETORIA SUPERINTENDENTE

PARECER PROCESSO 12901 . 2013 . 87

À Pesquisadora

Maria Angélica Ehara Watanabe

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título "ESTUDO DE MARCADORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS, MOLECULARES E IMUNOLÓGICOS EM CÂNCER" apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental - Centro de Ciências Biológicas/UEL;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo;

Considerando que o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU/UEL para posterior operacionalização, atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa;

Vimos informar que **somos de parecer favorável à sua realização, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.**

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, que essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria Superintendente, para ciência e divulgação.

Em 29/05/2013.

Prof. Dra. Margarida de Fátima Fernandes Carvalho
Diretora Superintendente do HU

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipos de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida(o) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

As amostras de sangue e tecido obtidas serão utilizadas para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^a. Dr^a Maria AngelicaEhara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490

Pesquisador Responsável

RG::_____

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. **Concordo em participar voluntariamente desse estudo, como participante do grupo controle saudável**, sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do doador (ou responsável): _____