

Análise da expressão da proteína FOXP3 no microambiente tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama subtipo triplo negativo

Analysis of FOXP3 protein expression on tumor microenvironment of triple negative breast cancer patients

Leandra Fiori Lopes¹, Roberta Losi Guembarovski², Felipe Campos Almeida², Cintya Mayumi Ishibayashi³, Carlos Hiroji Hiroki², Mayara Tiemi Enokida², Patrícia Midori Murobushi Ozawa², Bruna Banin Hirata², Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Maria Angelica Ehara Watanabe²

¹Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), Ourinhos, SP

²Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR

³Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), Londrina, PR

Endereço para correspondência:

Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina
Departamento de Ciências Patológicas
E-mail: maewatuel@gmail.com

Resumo

O câncer possui uma importância inegável no cenário mundial, uma vez que é classificado como a segunda maior causa de morte no mundo todo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. A incidência dos mais variados tipos de câncer tem aumentado em todo o mundo, e isso ocorre devido ao aumento da expectativa de vida, bem como da crescente exposição da população a fatores de risco. Entre os diversos tipos de câncer, o de mama apresenta-se como um grave problema de saúde pública, sendo o segundo tipo mais frequente no mundo e o primeiro na população feminina. Tem sido demonstrado que o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente distintos e um subgrupo que tem recebido muita atenção é o subtipo triplo negativo (TN). A interação entre os tumores e seu microambiente imunológico é complexa e difícil de decifrar e nesse contexto, tem sido demonstrada a significância do fator de transcrição FOXP3 na carcinogênese, uma vez que o número de células tumorais expressando FOXP3 é um parâmetro significativo no prognóstico da doença em ambos os casos de tumores de mama, invasivo e não invasivo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise proteica do fator de transcrição FOXP3 em 38 amostras de tecidos tumorais TN, através da técnica de imunohistoquímica com anticorpo monoclonal específico para FOXP3 humano. Observou-se que a maioria das pacientes (84,21%) apresentou expressão elevada de FOXP3 predominantemente em nível citoplasmático, mas que esta elevada expressão não foi positivamente associada a nenhum parâmetro prognóstico. Assim sendo, devido ao fato do gene FOXP3 ter uma elevada expressão nas amostras TN, pode-se sugerir que ele é um candidato a futuras investigações em amostras maiores e em outros subtipos de câncer mamário.

Palavras-chave: câncer de mama, subtipo triplo negativo, imunohistoquímica.

Abstract

The cancer has an undeniable importance on the world stage, since it is ranked as the second leading cause of death worldwide, behind only cardiovascular diseases. The incidence of various cancers has increased worldwide, and this is due to the increase in life expectancy, as well as the increasing exposure of the population to risk factors. Among the different types of breast cancer presents itself as a serious public health problem, being the second most common type in the world and the first in the female population. It has been shown that breast cancer can be classified into biologically and clinically distinct subgroups and a sub-group that has received a lot of attention is the triple negative subtype (TN). The interaction between tumors and its immune microenvironment is complex and difficult to decipher, and in this context, it has been demonstrated the significance of the FOXP3 transcription factor in carcinogenesis, since the number of tumor cells expressing FOXP3 is a significant parameter in prognosis of disease in both cases of breast tumors, invasive and non-invasive. Thus, the aim of this study was to analyze the protein of FOXP3 transcription factor in 38 tumor tissues of TN breast cancer by immunohistochemistry, with specific monoclonal antibody for human FOXP3. It was observed that most patients (84,21%) showed high expression of FOXP3 protein predominantly at cytoplasmic level, but that this high expression was not positively associated with any prognostic parameter. Therefore, due to the fact of the FOXP3 gene have a high expression in TN samples it may suggest that this marker is a promising candidate for future investigations in larger samples and in other breast cancer subtypes.

Keywords: breast cancer, triple negative subtype, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

A importância mundial do câncer é inquestionável, uma vez que é a segunda maior causa de mortes no mundo, seguida apenas de doenças cardiovasculares. A interação entre os tumores e seu microambiente imunológico é complexa e sua compreensão é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas⁽¹⁾.

O INCA estimou cerca de 49.240 novos casos de câncer de mama para o ano de 2010 no Brasil, com um risco estimado de 49 casos para cada 100 mil mulheres⁽²⁾.

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais e lobulares. Os ductais se desenvolvem nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores, e as pacientes que apresentam este tipo de carcinoma mamário possuem maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que o verificado nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama⁽³⁾.

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológica são classificações bastante utilizadas na clínica e são importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estágios I ao IV⁽⁴⁾.

Tem sido demonstrado que o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente significativos. Um subgrupo que tem recebido muita atenção possui fenótipo de receptor de estrogênio negativo, receptor de

progesterona negativo e fator de crescimento epidérmico humano 2-negativo, sendo denominado de triplo negativo (TN)⁽⁵⁾.

Os tumores TN são responsáveis por 10-20% de todos os cânceres de mama, e são biologicamente mais agressivos do que outros subgrupos⁽⁵⁾. Possuem um comportamento agressivo e predileção por metástase visceral, o que é responsável por seu mau prognóstico⁽⁶⁾. Normalmente demonstram também alto grau histológico e são o subtipo de câncer de mama mais comuns em portadoras de mutação em BRCA-1⁽⁷⁾. Este subtipo de câncer de mama está também associado à mutação em TP53, e estudos epidemiológicos mostram uma alta prevalência de câncer de mama TN entre as mulheres mais jovens e as de ascendência Africana⁽⁸⁾.

Estudos envolvendo câncer TN são de fundamental importância clínica frente à falta de opções terapêuticas. O significado prognóstico destes tumores permanece incerto já que o grupo é heterogêneo e o pior prognóstico parece estar confinado àqueles que expressam citoqueratinas basais ou receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)⁽⁷⁾. Para se desenvolver novas estratégias contra este subtipo tumoral, é essencial entender as vias específicas que o levam ao comportamento agressivo⁽⁵⁾.

Os mecanismos que inter-relacionam os processos inflamatórios, imunidade e câncer têm sido muito discutidos. Importantes componentes nesta integração são as citocinas produzidas pelas células ativadas do sistema imune inato ou adaptativo que estimulam o crescimento tumoral e a progressão do câncer. Além disso, mediadores solúveis produzidos pelas células cancerosas recrutam e ativam células inflamatórias que estimulam a progressão tumoral. Entretanto, as células inflamatórias também podem produzir citocinas que limitam o crescimento do tumor⁽⁹⁾. Estudos sobre os aspectos imunológicos que envolvem o microambiente tumoral do subtipo triplo negativo ainda são escassos na literatura, o que ressalta a importância de novos estudos.

O gene FOXP3 codifica uma proteína de ligação ao DNA chamado scurfín, que possui ação repressora de transcrição⁽¹⁰⁾ e é considerado importante no desenvolvimento e função das células Tregs⁽¹¹⁾. Inicialmente foi postulado que a expressão de FOXP3 era restrita aos tecidos hematopoiéticos. Apesar dos dados ainda serem escassos, a expressão de FOXP3 tem sido também observada em outros tecidos, incluindo em células tumorais humanas⁽¹²⁾. Segundo os mesmos autores, a expressão de FOXP3 não está restrita a determinados tipos específicos de tumor maligno, mas pode ser observada em muitos tipos tumorais, incluindo aqueles de origem epitelial (pulmão, mama, cólon) e não epitelial (melanomas, leucemias). Entretanto, sua função biológica bem como significado prognóstico nestas células, permanece incerto. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como proposta investigar a expressão da proteína FOXP3 no microambiente tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama subtipo triplo negativo e correlacionar esta expressão a parâmetros prognósticos das pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética institucional em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

Foram utilizadas 38 amostras de tecido tumoral provenientes de blocos de parafina de pacientes com câncer de mama triplo negativo, diagnosticadas em um laboratório de Patologia particular e no Hospital do Câncer de Londrina (HCL), ambos de Londrina, Paraná.

Análise imunohistoquímica

Foram utilizados cortes histológicos de 5µm de tecido tumoral de mama embebidos em parafina. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 56°C, desparafinizadas em xilol e reidratadas em banhos seriados com concentrações crescentes de alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato e depois foi adicionado anticorpo monoclonal anti FOXP3 humano numa diluição específica e apropriada (1/25). As lâminas foram estabilizadas a temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas com PBS (tampão salina fosfato) antes da adição do anticorpo secundário IgG biotilado anti coelho (Bio SB). Então, foi adicionado o conjugado peroxidase-estreptoavidina e uma solução (cromógeno DAB +/- tampão substrato DAB) (Sigma-Alrich, USA). A contra-coloração foi realizada utilizando hematoxilina de Gill's e as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. Foram realizados controles para verificar a especificidade do anticorpo primário. As análises foram feitas por pelo menos dois patologistas em análises independentes.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS Statistics 20.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). O valor de p considerado significativo foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a idade média das pacientes foi de 56 anos. Embora para algumas pacientes as características clínico-patológicas específicas não estavam disponíveis, foi observado que 97% das pacientes tiveram grau nuclear em estágios II ou III, 40,7% delas tinham envolvimento linfonodal e o tamanho médio dos tumores foi de 2,7 cm.

Tabela 1. Parâmetros clínicos das amostras de tumor de mama TN

	<1,5	9
Tamanho do tumor	1,5 – 3,0	18
	>3,0	9
Envolvimento do linfonodo	Negativo	16
	Positivo	11
Grau nuclear	I	1
	II	12
	III	21
	IV	0
FOXP3 IHC	1+	6
	2+	14
	3+	18
Faixa etária	<50 anos	10
	50 - 60 anos	9
	>60 anos	13

Neste estudo, pela técnica de imunohistoquímica, foi observada uma forte marcação protéica (duas ou três cruzes) para o gene FOXP3 em 84,21% das pacientes analisadas, sendo que esta marcação foi predominantemente citoplasmática. De acordo com dados da literatura, a localização citoplasmática da proteína FOXP3 tem sido observada em células tumorais humanas de vários tecidos^(12,13), incluindo câncer de mama⁽¹⁴⁾ e linhagem de adenocarcinoma da mama (MCF7)⁽¹²⁾. De acordo com Triulzi et al.⁽¹⁵⁾, em muitos tumores mamários, a marcação de FOXP3 é predominantemente observada no citoplasma, apesar de que tanto marcação citoplasmática quanto nuclear estão presentes em algumas amostras, e poucas amostras ainda mostram uma marcação exclusivamente nuclear. Na amostra de TN do presente estudo, também foi observado que a maior parte das amostras tiveram marcação do FOXP3 no citoplasma (duas ou três cruzes), apesar de que algumas amostras apresentaram concomitantemente expressão nuclear e/ou perinuclear (Figura 1).

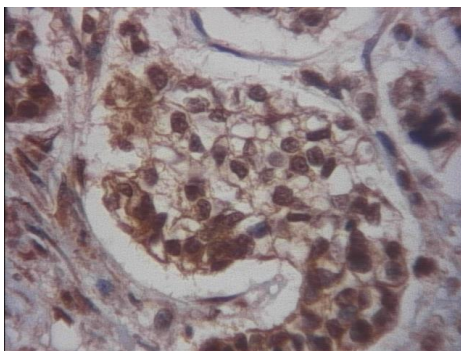


Figura 1. Expressão de FOXP3 em amostras de tecido de câncer de mama triplo negativo (aumento 400x). A) Expressão citoplasmática e nuclear de FOXP3 em células tumorais.

Ladoire et al.⁽¹⁶⁾ realizaram um estudo com células de câncer de mama HER2 positivas, as quais apresentaram expressão de FOXP3 em 57% das pacientes, indicando que diferentes subtipos de câncer de mama podem ter expressão diferenciada, com implicações prognósticas específicas. Outros estudos observaram células tumorais FOXP3 positivas em 57% de amostras de câncer de mama HER2+⁽¹⁶⁾ e em 66%⁽¹⁴⁾ de amostras de parafina mamárias, indicando que nossa amostra especificamente de tumores TN demonstrou uma alta expressão desse fator de transcrição, com possíveis implicações a serem avaliadas em amostras maiores.

Adicionalmente, dados recentes sugerem que a expressão de FOXP3 nas células tumorais pode ser um fator prognóstico independente para metástase à distância no câncer de mama⁽¹⁴⁾. Um fato relevante do presente estudo é que em pacientes que apresentavam linfonodo livre de neoplasia, também foi observada expressão protéica forte de FOXP3, sendo a maioria com uma intensidade elevada de sinal (três cruces), porém este resultado não apresentou significância estatística ($p = 0,14$). Ainda, os parâmetros prognósticos tamanho de tumor e grau nuclear foram igualmente distribuídos entre as pacientes de acordo com a marcação da proteína FOXP3 por imuno-histoquímica ($p = 0,42$ e $p = 0,12$), respectivamente.

Evidências experimentais mostram que o FOXP3 atua regulando negativamente a expressão do oncogene HER2 e outros genes dessa via de sinalização. Neste contexto, nossos resultados a respeito da expressão protéica de FOXP3 estão de acordo, uma vez que foi observada uma expressão aumentada deste fator de transcrição em pacientes do subtipo triplo negativo, que são exatamente negativas para expressão elevada de HER2 por imunohistoquímica.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, devido ao fato do gene *FOXP3* ter uma elevada expressão nas células tumorais, pode-se dizer que este fator de transcrição é um candidato a futuras investigações em amostras maiores e em outros subtipos de câncer mamário.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, PROPPG-UEL, CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Cremer I, Fisson S, Damotte D, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C. Immune Infiltration in Human Cancer: Prognostic Significance and Disease Control. *Curr Top Microbiol*, 344:1-24, 2011.
2. INCA (2011) Estimate 2012: Cancer Incidence in Brazil. Ministério da Saúde. INCA, Rio de Janeiro.
3. Ketterhagen JP, Quackenbush SR, Haushalter RA. Tumor Histology as a Prognostic Determinant in Carcinoma of the Breast. *Surg Gynecol Obstet*, 158:120-123, 1984.
4. Sobin LH, Wittekind CH (2002) TNM Classification of Malignant Tumours., vol 6° ed. New York: John Wiley & Sons, INC.
5. Kurebayashi J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer*, 16:275-280, 2009.
6. Maegawa RO, Tang SC. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. *Cancer investigation*, 28:878-883, 2010.
7. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*, 45 Suppl 1:27-40, 2009.
8. Carotenuto P, Roma C, Rachiglio AM, Botti G, D'Alessio A, Normanno N. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20:17-34, 2010.
9. Lin WW, Karin MJ. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Clin Invest*, 117(5):1175-1183, 2007.
10. Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation*, 112:1437-1443, 2003.
11. Eastell T, Hinks A, Thomson W. SNPs in the FOXP3 gene region show no association with Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Caucasian population. *Rheumatology (Oxford)*, 46:1263-1265, 2007.
12. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, Gourgoulis KI, Germeis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of translational medicine*, 6:19, 2008.
13. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B, Grutzmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Kloppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer research*, 67:8344-8350, 2007.

14. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27:1746-1752, 2009.
15. Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, Casalini P. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. *Journal of cellular physiology*, 228:30-35, 2013.
16. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rebe C, Chalmin F, Vincent J, Bruchard M, Chauffert B, Martin F, Fumoleau P, Ghiringhelli F. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast cancer research and treatment*, 125:65-72, 2011.