

Polimorfismo genético do gene *CXCR4* em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo

Genetic polymorphism of *CXCR4* gene in triple-negative breast cancer patients

Alda Losi Guembarovski & Edna Maria Vissoci Reiche

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde - UEL

Av. Robert Koch, 60, cEp 86.038-440, Londrina, Paraná

E-mail: reiche@sercomtel.com.br

Resumo

Este estudo objetivou analisar um polimorfismo genético do gene *CXCR4* (rs2228014) em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo (TN) e controles sem a neoplasia na busca por um marcador de suscetibilidade, subtipo específico. O polimorfismo genético foi avaliado 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). Os resultados indicaram ausência de associação significativa para *CXCR4* (portador do alelo variante: OR=1,89; IC95%=0,58-6,22) em relação ao câncer TN. O gene *CXCR4* não se mostrou um candidato a marcador de suscetibilidade para o câncer de mama TN na amostra do presente estudo; entretanto, pode-se observar que a variante genética foi mais frequente no grupo caso, o que poderia indicar uma possível associação, a qual poderia ser detectada em amostras com um número maior de pacientes.

Palavras-chave: câncer de mama triplo-negativo, *CXCR4*, polimorfismo genético.

Abstract

The aim of this study was analyze the genetic polymorphism rs2228014 of *CXCR4* gene in triple-negative (TN) breast cancer patients and neoplasia-free controls, in search for susceptibility subtype-specific marker. The genetic polymorphism was evaluated in 59 patients and 150 controls by polymerase chain reaction technique followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The results indicated no significant association for *CXCR4* (variant allele carrier: OR=1.89; IC95%=0.58-6.22) in relation to TN cancer. The *CXCR4* gene was not a susceptibility marker candidate for TN breast cancer in the present study sample; however, it can be seen that the genetic

variant was more frequent in the case group, which might indicate a possible association, which could be detected in samples with a greater number of patients.

Key words: triple-negative breast cancer, CXCR4, genetic polymorphism.

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, em especial entre mulheres de descendências Africana e Hispânica ⁽¹⁾. 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 ⁽²⁾.

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 ⁽³⁾, como aqueles que expressam os receptores hormonais.

A importância do receptor CXCR4 tem sido investigada na patogênese do câncer de mama ^(4,5), 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 ⁽⁶⁾. 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) ⁽⁷⁾. Teng, Liu ⁽⁸⁾ verificaram associação deste polimorfismo com câncer oral e com indução de metástase e Cacina, Bulgurcuoglu-Kuran ⁽⁹⁾ não verificaram associação com o carcinoma endometrial. Embora estudos ^(6,10,11) 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.

Dentro deste contexto, este trabalho objetivou analisar um polimorfismo genético no *CXCR4* em pacientes com câncer de mama TN e em controles livres desta neoplasia na busca por marcadores de suscetibilidade para a carcinogênese mamária subtipo específica.

MATERIAIS E MÉTODOS

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/UUEL). No total, foram obtidas amostras de sangue e de bloco de parafina de 59 pacientes com média de idade de 53,64 ± 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 história de neoplasia de mama, de acordo com exame clínico e mamográfico 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 ± 12,23 anos.

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/UUEL 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, 2010). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o sistema tumor/nódulo/metástase (TNM) do câncer ⁽¹²⁾.

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 Clínica do Hospital do Câncer de Londrina ^(13,14).

Extração 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. O DNA de todas as amostras foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000®, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

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, 2,5µM de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase, 100ng de DNA genômico e H₂O ultrapura (*Milli-Q*) para completar o volume final de 25µL. 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 2' e por fim 72°C por 20' [8].

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. 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 *Biosaúde*, Londrina, v. 16, n. 2, 2014

genótipo homocigoto para o alelo variante (TT) apresenta uma única banda de 236 pb, a qual não sofre ação da enzima de restrição (Figura 1).

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 3 µL de xileno cianol (XC), 10 µL de cada amostra e marcador de tamanho de fragmento (100 pb) (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

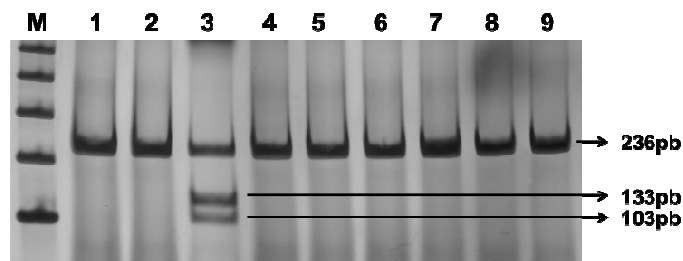


Figura 1. Perfil de PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 10% e coloração com nitrato de prata para o polimorfismo rs2228014 do gene *CXCR4*. M: marcador de tamanho de fragmento de 100pb; 1,2,4-9: homocigotos para o alelo selvagem (CC); 3: heterocigoto para o alelo variante (CT).

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.

RESULTADOS

Análise do Estudo de Associação Caso-Controlle para CXCR4

O estudo de associação caso-controlle foi realizado comparando-se a presença do polimorfismo no gene *CXCR4* (rs2228014) entre 59 pacientes e 150 controles.

Assim, 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 heterocigoto para 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 associação significativa entre a presença da variante polimórfica e a suscetibilidade ao câncer de mama TN.

Tabela 1. Estudo de associação caso-controle entre o polimorfismo no gene *CXCR4* (rs2228014) e a presença de câncer de mama triplo negativo

	Genótipo	Controle n=150 (%)	Pacientes n=59 (%)	OR	IC95%	Valor de p
<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

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*.

DISCUSSÃO

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.

Existe uma intensa interação entre as células tumorais e as moléculas que participam da sinalização intercelular, como as quimiocinas⁽¹⁵⁾. Muitos estudos têm enfatizado o envolvimento destas e de seus receptores na progressão do câncer de mama. Esta interação pode afetar muitas funções celulares, incluindo sobrevivência, adesão, invasão e proliferação, bem como regular os níveis de quimiocinas circulantes⁽¹⁶⁾.

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^(17,18). Dupont, Gentien⁽¹⁹⁾ 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.

Dentro deste contexto, um polimorfismo no gene *CXCR4* (rs2228014) foi investigado neste trabalho na busca por marcadores de suscetibilidade para o câncer de mama TN. Na análise do estudo de associação observou-se que não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos (Tabela 1).

Kucukgergin, Isman⁽²⁰⁾ relataram que mutações neste gene podem contribuir para a disseminação do câncer de mama quando estudaram uma população turca. Já Lee, Kuo [21] 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 [9]. Adicionalmente, indivíduos portadores do alelo T também apresentaram significativamente alto risco para carcinoma de células renais⁽¹⁾. Vale ressaltar que o alelo T é de pouca ocorrência na população, fazendo com que o genótipo homozigoto TT seja muito raro⁽²³⁾. 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

Biosáude, Londrina, v. 16, n. 2, 2014

(OR=1,89; IC95%=0,58-6,22) que não apresentou associação significativa com a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer TN.

O polimorfismo genético rs2228014 no *CXCR4* não se mostrou candidato a marcador de suscetibilidade para o câncer de mama TN. Entretanto, um dado interessante em relação ao presente estudo é que se pode observar uma tendência do alelo variante ser detectado com maior frequência no grupo das pacientes TN, o que poderia indicar uma existência de associação, a qual poderia ser demonstrada quando um maior número de amostras deste mesmo subtipo tumoral fosse analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Hinton, C.V., S. Avraham, and H.K. Avraham, Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clin Exp Metastasis*, 27(2): p. 97-105.2010.
- 2.INCA, Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil, C.-g.d.p.e. vigilância, Editor 2014: Rio de Janeiro. p. 124.
- 3.Kurebayashi, J., Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast Cancer*, 16(4): p. 275-80.2009.
- 4.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*, 135(8): p. 997-1004.2009.
- 5.Oda, J.M., et al., TGF-beta polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. *Mol Biol Rep*, 39(12): p. 10131-7.2012.
- 6.Muller, A., et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824): p. 50-56.2001.
- 7.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*, 40(5): p. 6.2005.
- 8.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*, 31(10): p. 1282-8.2009.
- 9.Cacina, C., et al., Genetic variants of SDF-1 and CXCR4 genes in endometrial carcinoma. *Mol Biol Rep*, 39(2): p. 1225-9.2012.
- 10.Luker, K.E. and G.D. Luker, Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Letters*, 238(1): p. 30-41.2006.
- 11.Zhang, M., et al., The Differences in CXCR4 Protein Expression Are Significant for the Five Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Ultrastructural Pathology*, 36(6): p. 381-386.2012.

- 12.Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, TNM classification of malignant tumours 2009.
- 13.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*, 31(31): p. 3997-4013.2013.
- 14.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*, 134(7): p. e48-72.2010.
- 15.Ben-Baruch, A., The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*, 25(3): p. 357-71.2006.
- 16.Fulton, A.M., The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer. *Curr Oncol Rep*, 11(2): p. 125-31.2009.
- 17.Kakinuma, T. and S.T. Hwang, Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol*, 79(4): p. 639-51.2006.
- 18.Salvatore, P., et al., CXCR4-CXCL12-dependent inflammatory network and endothelial progenitors. *Curr Med Chem*, 17(27): p. 3019-29.2010.
- 19.Dupont, V.N., et al., A gene expression signature associated with metastatic cells in effusions of breast carcinoma patients. *Int J Cancer*, 121(5): p. 1036-46.2007.
- 20.Kucukgergin, C., et al., The role of chemokine and chemokine receptor gene variants on the susceptibility and clinicopathological characteristics of bladder cancer. *Gene*, 511(1): p. 7-11.2012.
- 21.Lee, Y.L., 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*, 73(2): p. 147-52.2011.
- 22.Cai, C., et al., Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma. *Tissue Antigens*, 82(3): p. 165-70.2013.
- 23.Martin, M.P., et al., CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 19(4): p. 430.1998.