

Análise da expressão de RANK/RANKL no câncer de mama metastático e não-metastático: Revisão sistemática da literatura

Analysis of RANK/RANKL expression in metastatic and non-metastatic breast cancer: Systematic literature review

Análisis de la expresión de RANK/RANKL en cáncer de mama metastático y no metastático: Revisión sistemática de la literatura

Recebido: 25/02/2025 | Revisado: 03/03/2025 | Aceitado: 04/03/2025 | Publicado: 06/03/2025

Nathália Machado Terra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8804-3758>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: nathmachdo@gmail.com

Larissa Mota Ramos

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-6743-8826>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: larissamotaramos@gmail.com

Eduardo Chaves Ferreira Coelho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5076-9008>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: eduardoccoe@gmail.com

Renot Alves Irineu Neto

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1576-1484>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: renotalves@hotmail.com

Guilherme Fontes de Sousa Skaf Abdala

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7441-4706>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: guilhermefssa@gmail.com

Isadora Garcia de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8034-6275>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: isadora.garcia98@gmail.com

Vera Aparecida Saddi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9949-9988>
Pontifícia Universidade Católica, Brasil
E-mail: verasaddi@gmail.com

Resumo

O câncer de mama é a causa mais frequente de morte por câncer na população feminina mundial e o manejo clínico dessas pacientes representa um desafio, dada à variedade de perfis de evolução da doença. A presença de metástase à distância demonstra grande impacto na sobrevida das pacientes, sendo as metástases ósseas as mais incidentes. O sistema RANK/RANKL/OPG é identificado como uma via de sinalização envolvida na manutenção da homeostase óssea e no desenvolvimento da glândula mamária. A investigação sobre a associação entre os biomarcadores expressão de receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e da proteína ligante (RANKL) na avaliação prognóstica e preditiva do câncer de mama auxilia na discussão do uso do denosumabe na prevenção de metástases ósseas e no tratamento da doença. Este estudo objetiva apresentar uma revisão sistemática sobre a análise da expressão do RANK/RANKL no câncer de mama metastático e não-metastático. Incluíram-se oito estudos totalizando 1876 pacientes e, seis dos estudos demonstraram associações entre a ocorrência de tumores mais agressivos, potencial metastático do câncer de mama, surgimento de metástases ósseas e, principalmente, pior prognóstico em curvas de sobrevida. Os estudos incluídos nesta revisão confirmam a importância preditiva e prognóstica de RANK na avaliação de pacientes com câncer de mama, reafirmando a necessidade de estudos mais homogêneos para a utilização adequada dos protocolos terapêuticos e preventivos que usam esse marcador como alvo terapêutico.

Palavras-chave: Ligante RANK; Proteína RANK; Metástases Neoplásicas; Câncer de Mama; Prognóstico; Sobrevida.

Abstract

Breast cancer is the most frequent cause of death from cancer in the female population worldwide and the clinical management of these patients represents a challenge, given the variety of disease progression profiles. The presence of distant metastasis has a major impact on patient survival, with bone metastases being the most common. The RANK/RANKL/OPG system is identified as a signaling pathway involved in the maintenance of bone homeostasis and mammary gland development. The investigation of the association between the biomarkers expression of receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and binding protein (RANKL) in the prognostic and predictive assessment of breast cancer helps in the discussion of the use of denosumab in the prevention of bone metastases and in the treatment of the disease. This study aims to present a systematic review on the analysis of RANK/RANKL expression in metastatic and non-metastatic breast cancer. Eight studies totaling 1876 patients were included, and six of the studies demonstrated associations between the occurrence of more aggressive tumors, the metastatic potential of breast cancer, the emergence of bone metastases and, mainly, a worse prognosis in survival curves. The studies included in this review confirm the predictive and prognostic importance of RANK in the evaluation of patients with breast cancer, reaffirming the need for more homogeneous studies for the adequate use of therapeutic and preventive protocols that use this marker as a therapeutic target.

Keywords: RANK Ligand; RANK Protein; Neoplasm Metastases; Breast Cancer; Prognosis; Survival.

Resumen

El cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte por cáncer en la población femenina a nivel mundial y el manejo clínico de estos pacientes representa un desafío, dada la variedad de perfiles de progresión de la enfermedad. La presencia de metástasis a distancia tiene un impacto importante en la supervivencia del paciente, siendo las metástasis óseas las más comunes. El sistema RANK/RANKL/OPG se identifica como una vía de señalización implicada en el mantenimiento de la homeostasis ósea y el desarrollo de la glándula mamaria. La investigación de la asociación entre la expresión de biomarcadores del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) y la proteína de unión (RANKL) en la evaluación pronóstica y predictiva del cáncer de mama ayuda en la discusión sobre el uso de denosumab en la prevención de metástasis óseas y en el tratamiento de la enfermedad. Este estudio tiene como objetivo presentar una revisión sistemática sobre el análisis de la expresión de RANK/RANKL en cáncer de mama metastásico y no metastásico. Se incluyeron ocho estudios con un total de 1.876 pacientes, y seis de los estudios demostraron asociaciones entre la aparición de tumores más agresivos, el potencial metastásico del cáncer de mama, la aparición de metástasis óseas y, principalmente, un peor pronóstico en las curvas de supervivencia. Los estudios incluidos en esta revisión confirman la importancia predictiva y pronóstica de RANK en la evaluación de pacientes con cáncer de mama, reafirmando la necesidad de estudios más homogéneos para el uso adecuado de protocolos terapéuticos y preventivos que utilicen este marcador como diana terapéutica.

Palabras clave: Ligando RANK; Proteína RANK; Metástasis Neoplásicas; Cáncer de Mama; Pronóstico; Supervivencia.

1. Introdução

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o câncer de mama corresponde a 11,7% das neoplasias em geral e representou cerca de 2,3 milhões de casos novos, em 2020. Além disso, essa neoplasia é a causa mais frequente de morte por câncer na população feminina global, com mais de 600 mil óbitos estimados para o mesmo ano (IARC, 2020). Nos últimos anos, o câncer de mama ultrapassou o câncer de pulmão em termos de incidência, devido ao aumento dos fatores de riscos associados aos tumores da mama. As estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer) revelam, para o triênio de 2023 a 2025, 73.610 novos casos por ano, o que corresponde a 66,54 casos/100.000 brasileiras (INCA, 2023).

A classificação do câncer de mama é baseada no sistema internacional de estadiamento dos tumores, denominado sistema TNM (*American Joint Committee on Cancer* - AJCC). A partir desse sistema, é possível estimar o comportamento e o prognóstico da doença ao delimitar o estadiamento do tumor. A categorização TNM clássica considera o tamanho do tumor (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase à distância (M). Nos últimos anos, a AJCC também incluiu marcadores moleculares na avaliação prognóstica do câncer de mama, considerando os receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP), fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) e fator de proliferação celular (Ki67) à classificação anterior, o que possibilita maior abrangência no estadiamento e classificação dos tumores (Hortobagyi et al., 2017).

O manejo clínico de pacientes com câncer de mama representa um desafio no Brasil e no mundo, pois a doença exibe apresentações particulares, uma variedade de subtipos histológicos com perfis moleculares distintos, comportamentos biológicos imprevisíveis e vários fatores de risco, que incluem fatores modificáveis, como estilo de vida, amamentação, terapias hormonais, tabagismo e obesidade, e fatores não modificáveis, como sexo feminino, idade avançada, mutações genéticas, menarca precoce, menopausa tardia e história familiar de câncer de mama (Buitrago et al., 2011).

Sob o ponto de vista histológico, o osso é uma estrutura dinâmica, formada por células especializadas em gerar matriz óssea (osteoblastos), amadurecer se fixando em lacunas para tornar a sua constituição rígida (osteócitos) e realizar a absorção óssea (osteoclastos). As células ósseas, tão particulares, garantem a homeostasia do tecido ósseo por meio do equilíbrio de quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação do osso (Silva et al., 2011).

A homeostase do osso é mantida por mecanismos moleculares que regem a sua funcionalidade e que podem ser alterados quando expostos a condições patológicas. Dentre tais sistemas moleculares, destaca-se o ativador do receptor de fator nuclear- κ B (RANK), seu ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), sendo estas as moléculas protagonistas na manutenção da atividade óssea (Silva et al., 2011).

Além da homeostase óssea, o sistema RANK/RANKL/OPG é identificado como uma via de sinalização crítica envolvida em vários mecanismos, dos quais recebe destaque o desenvolvimento da glândula mamária. O efeito proliferativo no epitélio mamário sugere o envolvimento dessas moléculas na iniciação do câncer de mama e na progressão metastática (Infante et al., 2019; Abreu et al., 2022).

A classe de fármacos dos bifosfonatos e o denosumabe (anticorpo monoclonal humano recombinante) foi desenvolvida com uma das indicações de uso sendo o tratamento ou a prevenção das metástases ósseas, dada à associação entre o câncer de mama e a via de reabsorção óssea (Infante et al., 2019). Os bifosfonatos reduzem a taxa de remodelação óssea, atuando principalmente via apoptose induzida de osteoclastos maduros, formando complexos com cálcio na matriz óssea, que são liberados lentamente conforme o osso sofre reabsorção. Já o denosumabe inibe diretamente o RANKL, o primeiro sinal na reabsorção óssea (Rang et al., 2016).

Além disso, inibidores de aromatase são medicações frequentemente prescritas às pacientes com câncer de mama hormonal positivo. Esses medicamentos reduzem a produção de estrogênio, o que pode levar a diminuição da densidade mineral óssea e aumentar o risco de fraturas. Para mitigar esse efeito colateral, é comum a utilização de medicamentos que interferem na via RANK/RANKL, como o denosumabe. Assim, o uso do denosumabe pode estar relacionado tanto a um subtratamento quanto a um supertratamento nas pacientes com câncer de mama (Saad et al., 2002).

A prescrição de altas doses dessas medicações associadas à quimioterapia em pacientes com câncer de mama metastático tornou-se uma alternativa de tratamento. Entretanto, ainda não está claro se tais medicações são capazes de prevenir o desenvolvimento de metástases ósseas e a recorrência da doença na fase adjuvante do tratamento do câncer de mama (Infante et al., 2019). O uso frequente dos bifosfonatos e do denosumabe acompanha complicações e efeitos adversos, como distúrbios gastrointestinais, hipocalcemia, redução da função renal e osteonecrose de mandíbula (Pfizner et al., 2014; Rang et al., 2016). Nesse sentido, o uso dessas medicações depende do estudo de marcadores que não são devidamente abordados na literatura.

O objetivo desta pesquisa é investigar, por meio de uma revisão sistemática da literatura, a associação entre a expressão de RANK/RANKL no câncer de mama e o aparecimento de metástases ósseas pode fornecer evidências importantes para o diagnóstico precoce de metástases ósseas, bem como justificar o uso do denosumabe e dos bifosfonatos na sua prevenção e no seu tratamento.

2. Metodologia

2.1 Desenho Do Estudo

Realizou-se uma pesquisa de natureza quantitativa em relação à quantidade de artigos selecionados e, qualitativa em relação à discussão sobre esses artigos (Pereira et al., 2018)

Esta revisão sistemática foi baseada nas diretrizes metodológicas do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Page, 2021). A questão norteadora do estudo foi estabelecida por meio de uma sigla definida como PICO (Santos, 2007), ou seja, População, Intervenção/Exposição, Comparação e “Outcome”, pelo qual “População” corresponde a pacientes com câncer de mama, com e sem metástases ósseas; “Intervenção/Exposição” corresponde à avaliação imuno-histoquímica de RANK/RANKL em tumores de mama de pacientes com e sem metástases ósseas; “Comparação” corresponde aos pacientes com câncer de mama não-metastático; e “Outcome” corresponde à detecção de uma associação significativa entre a expressão de RANK/RANKL no tumor e o desenvolvimento de metástases ósseas em pacientes com câncer de mama. A questão norteadora do presente estudo consiste em: “Existe associação entre a expressão de RANK/RANKL e o desenvolvimento de metástases ósseas em pacientes com câncer de mama?”. Esta revisão sistemática foi registrada no *International Prospective Register of Ongoing Systematic Reviews* (PROSPERO) sob o número de protocolo: CRD42022354993.

2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os artigos selecionados e incluídos nesta revisão sistemática obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: estudos que investigaram a expressão de RANK/RANKL no câncer de mama; estudos que investigaram a associação entre a expressão de RANK/RANKL e o desenvolvimento de metástase no câncer de mama; estudos realizados em humanos; estudos em português, inglês, espanhol e francês; estudos totalmente disponíveis no bancos de dados (PubMed/Medline); estudos primários e descritivos; artigos que apresentem metodologia descrita de forma clara; estudos com objetivos consistentes em relação à metodologia e aos resultados apresentados; estudos de coorte que investigaram a expressão de RANK/RANKL por meio de imuno-histoquímica em câncer de mama.

Critérios de exclusão: revisão sistemática, revisão narrativa, relato de caso, metanálise e estudos que não se enquadram nos critérios de inclusão descritos.

2.3 Estratégias de Busca

A busca de referências bibliográficas foi feita no *National Library of Medicine* (PubMed), usando os descritores incluídos nos *Medical Subject Headings* (termos MeSH): “RANK AND/OR RANKL expression AND breast cancer”. A busca dos estudos foi realizada em 10 de junho de 2022.

2.4 Extração de Dados

Inicialmente, foram lidos os títulos e os resumos dos artigos encontrados. Em seguida, os estudos pré-selecionados foram lidos na íntegra. Dos estudos selecionados, foram extraídas as seguintes informações: autores e ano de publicação, país de estudo, condições comparadas, tamanho da amostra no grupo de casos e controles, método de imuno-histoquímica usado, kit comercial utilizado na imuno-histoquímica, anticorpos utilizados, cut-off ou ponto de corte da quantificação de RANK/RANKL e o tempo de desfecho avaliado.

2.5 Análise dos Dados

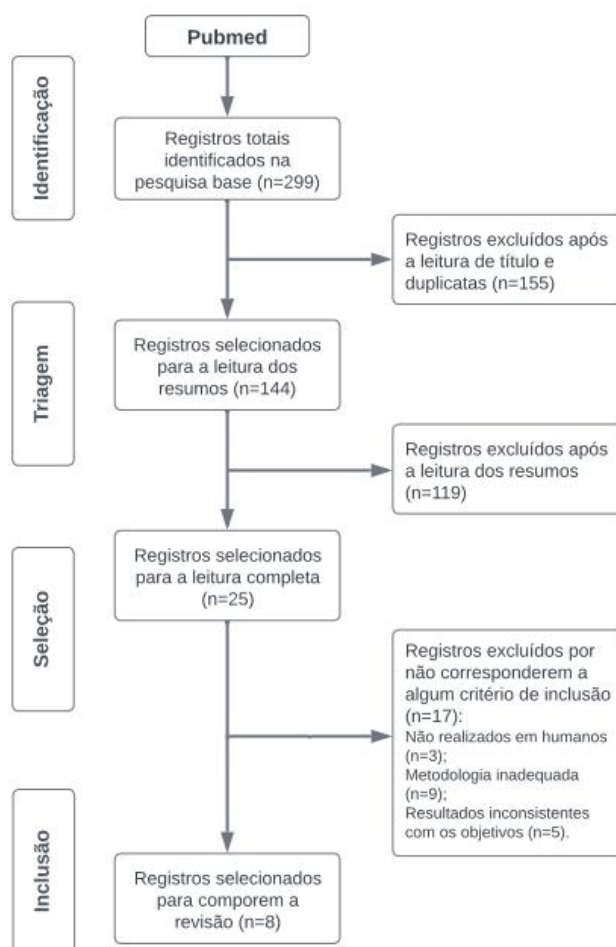
Os dados obtidos foram apresentados em tabelas e analisados por estatística descritiva. As proporções e valores médios das variáveis obtidas foram extraídos e apresentados em quadros e tabelas.

3. Resultados

3.1 Estudos Incluídos

Utilizando como estratégia de busca dos termos no banco de dados PubMed/Medline, foram encontrados 299 estudos. Após leitura dos títulos, 155 resumos foram selecionados para leitura, e desses, 25 estudos que avaliaram a associação entre RANK e/ou RANKL e o surgimento de metástases ósseas foram selecionados para a leitura completa e detalhada. A leitura dos estudos na íntegra resultou na exclusão de 17 estudos que não contemplaram os critérios propostos. Nesta etapa, oito estudos foram selecionados para comporem a revisão sistemática. A Figura 1 demonstra o processo de seleção dos estudos.

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos.



Fonte: Dados da Pesquisa.

3.2 Características dos Estudos Incluídos

Todos os estudos incluídos são caracterizados como estudos de coorte retrospectiva, o que denota a carência de estudos prospectivos acerca dos biomarcadores RANK e RANKL no câncer de mama. Os oito estudos foram desenvolvidos em hospitais, universidades e institutos de pesquisa, sendo dois na China (Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2015), um na Bélgica (Azim et al., 2015), um na Alemanha (Pfitzner et al., 2014), dois na Itália (Ibrahim et al., 2011; Santini et al., 2011), um na Coreia do Sul (Park et al., 2014) e um nos Estados Unidos (Li et al., 2015). No total, 1876 pacientes com câncer de

mama foram avaliadas. o número de participantes por estudo variou de 30 (Ibrahim et al., 2011) a 177 (Park et al., 2014), e o número de controles por estudo variou de 10 (Ibrahim, et al., 2011) a 514 (Pfitzner et al., 2014).

Os artigos incluídos foram publicados no período de 2011 a 2016. As características dos estudos, incluindo autores e ano de publicação, país de estudo, condições comparadas, tamanho da amostra no grupo de casos e controles, método de imuno-histoquímica, kit comercial utilizado na imuno-histoquímica, tipo de tecido utilizado na análise imuno-histoquímica, *cut-off* ou ponto de corte da quantificação de RANK e/ou RANKL e o tempo de desfecho avaliado são descritos na Tabela 1.

Com relação às condições comparadas, os estudos demonstraram muita heterogeneidade, sendo que um estudo classificou as pacientes com câncer de mama grávidas e os controles como as pacientes com câncer de mama não grávidas (Azim et al., 2015), um estudo classificou as pacientes de acordo com os níveis de expressão de RANK, com alta e baixa expressão (Pfitzner et al., 2014), quatro estudos compararam pacientes com expressão positiva e pacientes com expressão negativa de RANK (Zhang et al., 2015; Santini et al., 2011; Zhang et al., 2012; Park et al., 2014) e dois estudos compararam pacientes com câncer de mama metastático e não-metastático (Ibrahim et al., 2011; Li, et al., 2015).

Quanto ao método usado na análise de expressão de RANK, quatro estudos utilizaram o método de imuno-histoquímica automatizado (Azim et al., 2015; Pfitzner et al., 2014; Park et al., 2014; Zhang et al., 2015) e quatro usaram o método manual (Ibrahim et al., 2011; Li et al., 2015; Santini et al., 2011; Zhang et al., 2012). Os kits de imuno-histoquímica usados nos diferentes estudos incluíram o *LSAB System Universal Kit*, Dako em quatro estudos (Azim et al., 2015; Pfitzner et al., 2014; Ibrahim et al., 2011; Santini et al., 2011), dois estudos utilizaram o Kit *UltraSensitive SP*; (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2012), um estudo utilizou o Kit *DAKO EnVisionp* (K4003, DAKO) (Park et al., 2014) e um estudo não informou o kit utilizado (Li et al., 2015).

Tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (FFPE) foram montados em lâminas individuais e analisados em quatro estudos (Azim et al., 2015; Zhang et al., 2015; Ibrahim et al., 2011; Zhang et al., 2012) e outros quatro estudos usaram cortes organizados em *microarrays* de tecido (Santini et al., 2011; Li et al., 2015; Pfitzner et al., 2014; Park et al., 2014).

Com relação aos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica, dois estudos utilizaram anticorpos do *Amgen* (RANK N-1H8) (Azim et al., 2015; Pfitzner et al., 2014), cinco estudos usaram os anticorpos da *Santa Cruz Biotechnology* para RANK (RANK rabbit anti-RANK; N-20) (Li et al., 2015; Zhang et al., 2012; Ibrahim et al., 2011; Park et al., 2014) e um estudo utilizou o anticorpo *Clone 80707 R&D Systems* para RANK (Santini et al., 2011).

Diferentes *cut-off* ou escores de marcação foram usados para designar os casos positivos para expressão de RANK. Embora os pontos de corte estabelecidos pelos estudos sejam diferentes, de maneira geral, foram calculados considerando o número de células com marcação positiva no citoplasma e/ou na membrana e a intensidade de marcação (Santini et al., 2011; Azim et al., 2015; Pfitzner et al., 2014; Ibrahim et al., 2011; Park et al., 2014; Zhang et al., 2012; Li et al., 2015), segundo descrito na Tabela 1. Nesta revisão usaremos o termo hiperexpressão para designar os casos com expressão positiva ou aumentando de RANK.

Quanto ao desfecho avaliado pelos estudos, diferentes parâmetros foram considerados, como a sobrevida global, sobrevida livre de doença, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de metástases ósseas. O maior tempo de desfecho avaliado foi de 14 anos (Azim et al., 2015), o menor tempo de desfecho foi de três anos (Ibrahim et al., 2011). Um estudo não especificou o tempo de desfecho avaliado (Santini et al., 2011).

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos.

REFERÊNCIA	SANTINI ET AL., 2011	IBRAHIM ET AL., 2011	ZHANG ET AL., 2012	PARK ET AL., 2014	PFITZNER ET AL., 2014	AZIM ET AL., 2015	ZHANG ET AL., 2015	LI ET AL., 2016
PAÍS DE ESTUDO	Itália	Itália	China	Coréia do Sul	Alemanha	Bélgica	China	Estados Unidos
CONDIÇÕES COMPARADAS	P = Pacientes com CA de mama RANK-positivo; C = Pacientes com CA de mama RANK-negativo	P = Pacientes com CA de mama com metástases; C = Pacientes sem evidência de doença	P = Pacientes com CA de mama RANK-positivo; C = Pacientes com CA de mama RANK-negativo	P = Pacientes com CA de mama RANK-positivo; C = Pacientes com CA de mama RANK-negativo	P = Pacientes com CA de mama e alta expressão de RANK; C = Pacientes com CA de mama e baixa expressão de RANK	P = Pacientes com CA de mama grávidas; C = Pacientes com CA de mama não grávidas	P = Pacientes com CA de mama RANK-positivo; C = Pacientes com CA de mama RANK-negativo	P = Pacientes com CA de mama metastático; C = Pacientes com CA de mama não-metastático
TAMANHO DA AMOSTRA (P=PACIENTES; C=CONTROLES)	P = 93 C = 202	P = 30 C = 10	P = 48 C = 54	P = 177 C = 94	P = 87 C = 514	P = 65 C = 130	P = 154 C = 146	P = 62 C = 10
MÉTODO DA IMUNOHISTOQUÍMICA	Manual	Manual	Manual	Automatizado	Automatizado	Automatizado	Automatizado	Manual
KIT IMUNOHISTOQUÍMICA	Kit LSAB2 (Dakocytomation)	LSAB System Universal Kit, Dako	Kit UltraSensitive SP; MaixinBio, Xangai, China	DAKO EnVision ^h (K4003, DAKO)	LSAB System Universal Kit, Dako	LSAB System Universal Kit, Dako	Kit UltraSensitive SP; Maixin-Bio, Shanghai, China	Não informado
TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	Microarrays de tecido e FFPE	FFPE	FFPE	Microarrays de tecido e FFPE	Microarrays de tecido e FFPE	FFPE	FFPE	Microarrays de tecido e FFPE
ANTICORPOS UTILIZADOS (IHQ)	RANK (mouse monoclonal antibody; Clone 80707, R&D Systems, Inc.)	RANK (Santa Cruz N-20 - Goat polyclonal)	RANK (Santa Cruz Biotechnology)	RANK (Santa Cruz Biotechnology)	RANK (N-1H8; Amgen)	RANK (N-1H8; Amgen)	RANK (Santa Cruz Biotechnology; rabbit anti-RANK)	RANK (clone H-300, 1:100; Santa Cruz Biotechnology)

CUT OFF / PONTO DE CORTE	Ponto de corte (positivo)							
	Cut off aleatório. Porcentagem de células tumorais positivas: ponto de corte = 50%. Intensidade da coloração: ponto de corte 2+ e 3+ em mais de 50% das células (ausente (0), positiva, mas menos (+1), semelhante (2+) ou mais (3+) intensa do que o tecido de controle interno)	Cut off aleatório. Positivo = coloração forte em 30% das células ou coloração moderada em 60% das células	Ponto de corte positivo ≥ 2 . Intensidade da coloração (negativo = 0, fraco = 1, moderado = 2, forte = 3) x porcentagem de células tumorais positivas (<10% = 0, 10%–50% = 1, >50% = 2)	> 2. Intensidade da coloração: 0 (sem coloração); 1 (amarela clara; coloração fraca); 2 (marrom; coloração moderada); e 3 (marrom escuro; coloração forte) + porcentagem de imunomarcacão positiva: 0 (< 1%); 1 (1–24%); 2 (25–49%); 3 (50–74%); e 4 (75–100%)	Escore H: Ponto de corte = 8,5	Escore H: Ponto de corte = 8,5	Ponto de corte positivo ≥ 2 . Intensidade da coloração (negativo = 0, fraco = 1, moderado = 2, forte = 3) x porcentagem de células tumorais positivas (<10% = 0, 10%–50% = 1, >50% = 2)	Escore H (Intervalo de 0 a 300). Intensidade da coloração (negativo (0), fraco (1+), moderado (2+) e forte (3+) x Porcentagem de células tumorais envolvidas
TEMPO DE DESFECHO AVALIADO	Sem tempo determinado	3 anos	11 anos	5 anos	4 anos e 5 meses	14 anos	13 anos	7 anos

Fonte: Dados da Pesquisa.

3.3 Variáveis Investigadas e Associações Detectadas nos Estudos Incluídos

Os estudos incluídos investigaram associações entre a expressão de RANK e/ou RANKL e os parâmetros prognósticos clássicos do câncer de mama. Maiores correlações significativas foram descritas em relação ao ligante RANK, assim, os resultados descritos a seguir e na Tabela 2, contemplam associações investigadas entre a expressão de RANK e os parâmetros clínico-patológicos e prognósticos.

A hiperexpressão de RANK se mostrou associada a piora dos parâmetros prognósticos relevantes do câncer de mama, demonstrada pelas curvas de Kaplan-Meier. Com relação à sobrevida global, três estudos apresentaram associação entre redução da sobrevida global e a hiperexpressão de RANK (Li et al., 2015; Santini et al., 2011; Pfizner et al., 2014). Quanto à sobrevida livre de doença, quatro dos oito estudos incluídos relataram associação com a hiperexpressão de RANK (Santini et al., 2011; Pfizner et al., 2014; Park et al., 2014; Li et al., 2015).

A hiperexpressão do receptor esteve ainda diretamente relacionada a diferentes parâmetros clínico-patológicos. A hiperexpressão de RANK foi correlacionada com o status linfonodal positivo em um estudo (Santini et al., 2011). A correlação também foi positiva quanto ao grau histológico elevado em três dos estudos incluídos (Pfizner et al., 2014; Azim et al., 2015; Santini et al., 2011). Quanto ao status de receptor hormonal negativo, três estudos demonstraram associação com a hiperexpressão de RANK (Pfizner et al., 2014; Azim et al., 2015; Li et al., 2015). A presença de metástases à distância também foi correlacionada positivamente com a hiperexpressão de RANK em um estudo (Li et al., 2015), destacando a hiperexpressão de RANK e o aparecimento de metástases cerebrais. Quando analisado o aparecimento de metástases ósseas, dois estudos demonstram associação com a hiperexpressão de RANK (Zhang et al., 2012; Santini et al., 2011).

Tabela 2 - Principais variáveis investigadas e associações demonstradas pelos estudos.

Autor & Ano De Publicação	Variáveis E Desfechos Avaliados	Associações Encontradas
Santini et al., 2011	Estudo retrospectivo que avaliou, em 295 casos de câncer de mama primário, a expressão de RNAm em relação a RANK/RANKL/OPG e fatores clínico-patológicos e prognósticos. RANK elegido para o estudo imuno-histoquímica para avaliação do status nodal, metástases ósseas e sobrevida câncer-específica.	Avaliação por imuno-histoquímica evidenciou associação significativa da expressão de RANK em relação ao status nodal ($p=0,029$), surgimento de metástases ósseas ($p=0,037$) e sobrevida câncer-específica ($p=0,034$).
Ibrahim et al., 2011	Estudo retrospectivo que avaliou, por imuno-histoquímica, RANK e CXCR4 no surgimento de metástases ósseas. Avaliou 40 casos de câncer de mama, sendo 20 com metástases ósseas, 10 com metástase visceral e 10 sem metástase.	O estudo investigou a combinação da expressão de RANK e CXCR4, em relação ao surgimento de metástases ósseas. Porém, em análise multivariada, não foi comprovada a associação independente de RANK em relação ao surgimento de metástases ósseas.
Zhang et al., 2012	Estudo retrospectivo que avaliou RANK, a partir da imuno-histoquímica, 102 casos de câncer de mama metastático, sendo 62 casos metástases ósseas e 40 metástases viscerais. Expressão de RANK avaliada em relação aos parâmetros clínico-patológicos e em relação à sobrevida livre de progressão, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de metástases ósseas.	Associação entre expressão de RANK e idade precoce de surgimento da doença ($p=0,004$) e menor sobrevida livre de progressão ($p=0,01$). Na população total com metástase à distância, comprovou-se associação entre a expressão de RANK e menor sobrevida livre de progressão ($p=0,023$) e sobrevida câncer-específica ($p=0,001$). Nos pacientes com metástases ósseas, a expressão de RANK foi associada a menor sobrevida câncer-específica ($p<0,001$) e sobrevida livre de metástases ósseas ($p=0,003$).
Park et al., 2014	Estudo retrospectivo que avaliou 185 pacientes com câncer de mama primário, a partir de imuno-histoquímica de microarrays de tecido. Avaliou os parâmetros clínico-patológicos, sobrevida livre de metástases ósseas, sobrevida livre de doença e sobrevida global, em relação à expressão de RANK/RANKL/OPG.	As curvas de Kaplan-Meier evidenciaram a associação entre a expressão de RANK e menor sobrevida livre de doença, em análise univariada ($p=0,04$) e em análise multivariada ($p=0,02$).

Pfitzner et al., 2014	Estudo retrospectivo que avaliou 601 amostras de câncer de mama primário, a partir de imuno-histoquímica. Avaliou parâmetros clínico-patológicos, sobrevida global e sobrevida livre de doença.	Expressão de RANK associada com idade precoce ($p=0,008$), grau histológico ($p=0,026$) e status de receptor hormonal ($p<0,001$), em análise multivariada. Expressão de RANK associada a menor sobrevida livre de doença ($p=0,038$) e menor sobrevida global ($p=0,011$), em análise univariada. Porém, essas associações não foram comprovadas em análise multivariada. Na análise multivariada, para desfecho de sobrevida global, os dois fatores prognósticos importantes foram status nodal ($p=0,015$) e status de receptor hormonal negativo ($p=0,024$), enquanto para desfecho de sobrevida livre de doença, destaca-se apenas o status nodal ($p=0,03$).
Azim et al., 2015	Estudo retrospectivo que avaliou, a partir da imuno-histoquímica, 195 pacientes com câncer de mama primário, sendo 65 diagnosticadas durante a gravidez. Avaliou parâmetros clínico-patológicos e sobrevida livre de doença, com a marcação de RANK em tumores e tecidos normais adjacentes.	Houve associação significativa entre a expressão de RANK e status hormonal triplo negativo ($p<0,001$) e grau de diferenciação ($p<0,0001$), em análise univariada e multivariada.
Zhang et al., 2015	Estudo retrospectivo que avaliou, a partir da imuno-histoquímica, 300 amostras de pacientes com câncer de mama. Avaliou expressão de RANK de forma isolada e em combinação com o Cbl-b em relação a parâmetros clínico-patológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida câncer-específica.	As curvas de Kaplan-Meier não evidenciaram associações significativas entre a expressão de RANK e os desfechos de sobrevida.
Li et al., 2016	Estudo retrospectivo que avaliou, a partir da imuno-histoquímica, 62 casos de câncer de mama metastático. Avaliou a expressão de RANK em relação aos parâmetros clínico-patológicos, sobrevida global e sobrevida livre de doença.	Em análise univariada, houve associação significativa entre a expressão de RANK e tumores triplo negativos ($p=0,049$) e desenvolvimento de metástases cerebrais ($p=0,01$). As curvas de Kaplan-Meier, em análise univariada e multivariada, evidenciaram que a expressão de RANK foi associada significativamente com menor sobrevida global ($p=0,0085$) e menor sobrevida livre de doença ($p=0,0451$).

Fonte: Dados da Pesquisa.

4. Discussão

O objetivo inicial deste estudo foi avaliar a associação entre a expressão de RANK e RANKL e o aparecimento de metástases ósseas em carcinomas de mama. Uma vez que somente poucos dos estudos selecionados relataram esse tipo específico de associação, outras correlações relevantes entre a hiperexpressão de RANK e aspectos clínico-patológicos e prognósticos no câncer de mama foram investigadas. Em relação ao prognóstico dos tumores avaliados, a hiperexpressão de RANK foi associada à menor sobrevida livre de doença em quatro estudos (Pfitzner et al., 2014; Santini et al., 2011; Park et al., 2014; Li et al., 2015) e menor sobrevida global em três estudos (Santini et al., 2011; Pfitzner et al., 2014; Li et al., 2015). Todas essas características em conjunto traduzem o pior prognóstico dos tumores que apresentam hiperexpressão de RANK, dados de extrema importância para a predição da doença.

Quanto ao comprometimento metastático linfonodal, a associação com a hiperexpressão de RANK foi evidenciada em dois estudos (Santini et al., 2011; Pfitzner et al., 2014), e quanto a metástases à distância em um estudo (Santini et al., 2011). Em pacientes com metástases à distância, a hiperexpressão de RANK foi associada com menores taxas de sobrevida câncer-específica e menor sobrevida livre de progressão (Zhang et al., 2012), enquanto um estudo demonstrou associação entre a hiperexpressão de RANK e o desenvolvimento de metástases cerebrais (Li et al., 2015). Apesar da heterogeneidade dos estudos em relação aos objetivos investigados, os resultados desta revisão fornecem evidências importantes acerca da hiperexpressão de RANK e o potencial metastático do câncer de mama.

A hiperexpressão de RANK também foi associada à ausência de receptores hormonais (Pfitzner, et al., 2014), ao fenótipo triplo negativo (Li et al., 2015; Azim et al., 2015) e ao grau histológico mais elevado, ou seja, aos tumores pouco

diferenciados, em três estudos (Santini et al., 2011; Pfitzner et al., 2014; Azim et al., 2015). De maneira geral, a hiperexpressão de RANK esteve associada a tumores mais agressivos, na maioria dos estudos.

Por meio da busca em bancos de dados da literatura e nos registros do PROSPERO, nenhuma revisão sistemática sobre o papel dos marcadores RANK e RANKL na previsão de metástases e no prognóstico do câncer de mama foi encontrada. Os resultados desta revisão de literatura confirmam a importância prognóstica da expressão de RANK em relação aos fatores clínico-patológicos, como status nodal, tipo molecular, grau histológico, metástase à distância e metástase óssea e em relação aos fatores prognósticos, como sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de metástase óssea.

Uma revisão recente descreveu os mecanismos moleculares que ligam o sistema RANKL/RANK/OPG à tumorigênese mamária, destacando evidências pré-clínicas e clínicas para a eficácia potencial da inibição de RANKL como estratégia de prevenção e terapia adjuvante no câncer de mama. De acordo com o estudo, o sistema RANKL/RANK/OPG é fundamental para a regulação da diferenciação/ativação de osteoclastos e liberação de cálcio do esqueleto. Ademais, ressalta que esses marcadores também apresentam funções essenciais na fisiologia da glândula mamária e na proliferação epitelial estimulada por hormônios durante a gravidez (Infante et al., 2019).

Dados sugerem que a progesterona induz a expressão de RANKL mamário em camundongos e humanos e que o RANKL controla a proliferação celular no epitélio mamário em condições fisiológicas associadas a níveis séricos mais elevados de progesterona, como a fase lútea do ciclo menstrual e na gravidez. Assim, o sistema RANKL/RANK pode ser considerado um importante mediador da proliferação de células epiteliais mamárias coordenada pela progesterona, contribuindo potencialmente para o início e a progressão do câncer de mama (Infante et al., 2019; Abreu et al., 2022).

A expressão de RANKL, RANK e OPG já foi demonstrada em linhagens celulares de câncer de mama e em cânceres de mama primários humanos e a desregulação do sistema RANKL/RANK/OPG é documentada na doença óssea metastática, uma vez que a inibição de RANKL, por meio do anticorpo monoclonal humano bloqueador de RANKL (denosumabe) representa uma opção terapêutica bem estabelecida para prevenir eventos relacionados ao esqueleto em doença óssea metastática e perda óssea induzida por terapia adjuvante no câncer de mama. Apesar da grande quantidade de conhecimento existente, o papel específico do sistema RANKL/RANK/OPG na tumorigênese mamária ainda carece de esclarecimentos (Infante et al., 2019; Abreu et al., 2022).

Nossa revisão sistemática utilizou critérios de inclusão rigorosos, avaliou quantidade considerável de estudos (cerca de 295 estudos) e grande casuística sobre o tema (1.876 pacientes). Além disso, todos os estudos fizeram a avaliação da expressão de RANK por meio de imuno-histoquímica. Contudo, devido à heterogeneidade dos estudos em relação aos métodos empregados, além da distinção dos pontos de corte atribuídos à definição de hiperexpressão do marcador, optamos por não ponderar os resultados e realizar uma metanálise, sendo esta a principal limitação do estudo.

Entre os oito estudos incluídos, compreendendo 1.876 pacientes com câncer de mama, seis estudos foram capazes de demonstrar associação significativa entre a expressão de RANK e os diferentes parâmetros clínico-patológicos e prognósticos, confirmando a importância do biomarcador na avaliação prognóstica da doença (Santini et al., 2011; Zhang et al., 2015; Park et al., 2014; Pfitzner et al., 2014; Azim et al., 2015; Li et al., 2015).

Estudos anteriores investigaram o uso do denosumabe na prevenção e tratamento do câncer de mama metastático. Uma revisão sistemática, realizada por Kiesel, et al. (2016), evidenciou que o denosumabe diminui a formação de lesões osteolíticas e prolongou a sobrevida global. Entretanto, o uso dessa medicação é acompanhado de complicações e efeitos adversos e ainda não está claro se são realmente capazes de prevenir o desenvolvimento de metástases ósseas e a recorrência da doença na fase adjuvante do tratamento do câncer de mama (Kiesel et al., 2016).

A disponibilidade atual de fármacos que inibem diretamente a via molecular RANK/RANKL/OPG torna possível o estabelecimento de condições clínicas como pré-requisitos para seu uso e, com maiores esclarecimentos científicos, seria

possível a orientação concreta para a prescrição desses medicamentos às pacientes que realmente se beneficiariam. Ao estabelecer o receptor RANK como uma molécula preditiva de resposta ou prognóstica, as investigações podem indagar as vantagens quanto ao uso dessas medicações como preventivas à piora do quadro clínico ou como terapêuticas nos casos em que já houve avanço da doença e a hiperexpressão de RANK já foi estabelecida.

Para avançar as pesquisas sobre o assunto e definir com maior acurácia científica a fisiopatologia molecular da via RANK/RANKL/OPG em relação ao prognóstico do câncer de mama, são necessários estudos com amostras mais homogêneas, métodos e técnicas da imuno-histoquímica padronizados, estabelecimento de pontos de corte confiáveis em relação à hiperexpressão de RANK e a utilização dos parâmetros clínicos padronizados pela AJCC para o estadiamento do câncer de mama.

Com base nesta revisão sistemática da literatura, é possível concluir que a investigação precoce dessa via molecular nas pacientes com câncer de mama pode trazer vantagens relevantes em relação à avaliação prognóstica e terapêutica da doença. O supertratamento ou subtratamento de pacientes com câncer de mama metastático e não-metastático seriam evitados com a utilização devida dos protocolos terapêuticos existentes e com a possibilidade do surgimento de novas medicações. Assim, novos estudos são necessários para consolidar a importância dos marcadores biomoleculares RANK e RANKL na predição de resposta ou na avaliação prognóstica do câncer de mama.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesta revisão sistemática da literatura é possível concluir que a hiperexpressão de RANK é um importante marcador prognóstico no câncer de mama, uma vez que aparece associado ao fenótipo triplo-negativo, aos tumores de alto grau, ao aparecimento de metástases linfonodais e à distância, à sobrevida global e à sobrevida livre de doença.

Entretanto, estudos clínicos mais homogêneos em relação ao desenho metodológico, ao método de análise da expressão do marcador e à definição de ponto de corte para definição de hiperexpressão devem ser conduzidos a fim de confirmar essas associações e a importância prognóstica e preditiva dos biomarcadores da via RANK/RANKL no câncer de mama.

Referências

- Abreu, C., et al. (2022). Exploring new pathways in endocrine-resistant breast cancer. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, 3, 337–361.
- Azim, H. A., et al. (2015). RANK-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy. *Breast Cancer Research*, 17(1).
- Buitrago, F., et al. (2011). Fatores prognósticos em câncer de mama. *Comunicação em Ciências da Saúde*, 69–81.
- Hortobagyi, G. N., et al. (2017). *AJCC cancer staging manual*. Springer International Publishing.
- Ibrahim, T., et al. (2011). Role of RANK, RANKL, OPG, and CXCR4 tissue markers in predicting bone metastases in breast cancer patients. *Clinical Breast Cancer*, 11(6), 369–375.
- Infante, M., et al. (2019). RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: Involvement in breast cancer and clinical perspectives. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2023). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. INCA.
- International Agency for Research on Cancer. (2020). *Cancer today*. WHO.
- Kiesel, L., & Kohl, A. (2016). Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. *Maturitas*, 86, 10–16.
- Li, R., et al. (2015). The RANK pathway in advanced breast cancer: Does Src play a role? Disponível em: <http://www.r-project.org>.

Mamédio, C., et al. (n.d.). The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. Disponível em: www.eerp.usp.br/rlae. Acessado em 7 de junho de 2023.

Page, M. et al. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *PMJ*. 372 (71). doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>. Park, H. S., et al. (2014). Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 807–812.

Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free e-book]. Editora UAB/NTE/UFSM.

Pfützner, B. M., et al. (2014). RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 145(2), 307–315.

Rang, H. P., et al. (2016). *Rang & Dale: Farmacologia* (8ª ed.). Editora Elsevier.

Santini, D., et al. (2011). Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One*, 6(4).

Santos, C. M. C. (2007). A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 15 (3). <https://doi.org/10.1590/S0104-11692007000300023>.

Silva, I., & Branco, J. C. (2011). Rank/Rankl/Opg: literature review. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 36(3), 209–218.

Zhang, L., et al. (2012). Receptor activator for nuclear factor κ B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. *Journal of Clinical Pathology*, 65(1), 36–40.

Zhang, L., et al. (2015). The E3 ubiquitin ligase Cbl-b improves the prognosis of RANK positive breast cancer patients by inhibiting RANKL-induced cell migration and metastasis. *Oncotarget*, 6(26), 22918–22933.