



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

MARCO ANTÔNIO NASSER AGUIAR

**EXPRESSÃO DE FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B) E DE INTERLEUCINA 18
(IL-18) NO CARCINOMA INFLAMATÓRIO E CARCINOMA LOCALMENTE
AVANÇADO NÃO INFLAMATÓRIO DA MAMA**

FORTALEZA

2015

MARCO ANTÔNIO NASSER AGUIAR

**EXPRESSÃO DE NF- κ B (FATOR NUCLEAR KAPPA B) E DA INTERLEUCINA 18
(IL 18) NO CARCINOMA INFLAMATÓRIO E CARCINOMA LOCALMENTE
AVANÇADO NÃO INFLAMATÓRIO DA MAMA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A23e Aguiar, Marco Antônio Nasser.
 Expressão de fator nuclear kappa b (nf-kb) e de interleucina 18 (il-18) no carcinoma
 inflamatório e carcinoma localmente avançado não inflamatório da mama./ Marco
 Antônio Nasser Aguiar. – 2015.
 77 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
 Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas,
 Mestrado em Cirurgia, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Oncologia.
 Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
 Co-Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.
1. Carcinoma. 2. Mama. 3. NF-kappa B. 4. Interleucina-18. I. Título.

CDD 616.994

MARCO ANTÔNIO NASSER AGUIAR

**EXPRESSÃO DE NF- κ B (FATOR NUCLEAR KAPPA B) E DA INTERLEUCINA 18
(IL 18) NO CARCINOMA INFLAMATÓRIO E CARCINOMA LOCALMENTE
AVANÇADO NÃO INFLAMATÓRIO DA MAMA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Pesquisadora da Escola Cearense de Oncologia do
Instituto do Câncer do Ceará

A Deus.

Aos meus pais Renato Rocha Aguiar (*in memoriam*) e Bárbara Nasser Aguiar.

À minha esposa Marie Christine, filhas Carolina, Gabriela e Rafaela, netos Airton Neto, Isabela e Lucas e genros Airton Junior e Lauro Gondim.

A meu irmão Pedro Paulo Nasser Aguiar e cunhada Vera Lúcia Vanderley Pontes Aguiar (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Professor Titular de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC e Coordenador do Laboratório da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará, cujo apoio e orientação foram fundamentais para a realização do Estudo.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC, co-orientador e responsável pela leitura das lâminas, fotomicrografias, análise das informações e dados da Pesquisa.

À Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha, Patologista do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, pela preciosa ajuda nas reações de imunoistoquímica e posterior avaliação.

À Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong, pós-doutoranda do LAFICA e Pesquisadora da ECO/ICC pela padronização de anticorpos, e auxílio na realização da Imunoistoquímica.

Livia Maria Soares Nobre, mestrando da Farmacologia, responsável pela organização, pedido de blocos de parafina e de auxílio na confecção de lâminas.

Alceu Machado de Sousa, mestrando do Programa de pós-graduação em Morfologia e Técnico do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, pela ajuda na confecção das lâminas das amostras e imunoistoquímica.

Ao Dr. José Lima de Carvalho Rocha, Reitor do Centro Universitário Christus – UNICHRITUS, pelo incentivo e apoio na realização deste mestrado e amizade ao longo de mais de 45 anos.

Ao Professor Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela ajuda, orientação na Metodologia e gráficos.

Ao Professor Dr. Dalgimar Beserra de Menezes, Professor Adjunto do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Livre Docente de Patologia da UECE, Ex-presidente do Conselho Regional de Medicina, Ex-chefe do Setor de Patologia do Hospital Geral Fortaleza (HGF), pelas orientações e ajuda na realização do estudo em pacientes do referido Hospital.

À Professora Dra. Regia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC e diretora do Laboratório BIOPSE, pela ajuda, facilitação e liberação de amostras do arquivo do referido Laboratório.

À Dra. Luciana Rocha de Arruda, Diretora Técnica do PATHUS Laboratório pela ajuda, facilitação e liberação de amostras do arquivo do referido Laboratório.

Ao Dr. Alarico Marques Pereira Neto, Oncologista Clínico, pelas Planilhas de pacientes do ICC-Hospital Haroldo Juaçaba.

Ao Dr. Benedito Arruda Carneiro Filho, Oncologista Clínico, pela ajuda na confecção do Projeto deste estudo.

Ao estudante Matheus Rolim Mendes de Alencar do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará, estudante de Iniciação Científica da UFC, pela ajuda na coleta de importantes informações dos Prontuários e confecção de planilhas.

A todos os colaboradores do Setor de Mastologia do Hospital Geral de Fortaleza.

Ao Professor Dr. Henry Campos, Reitor da Universidade Federal do Ceará – UFC, pelo apoio na realização deste Mestrado

Carmen Suzana, secretária da vice-reitoria da Universidade Federal do Ceará – UFC

Às senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, Secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela atenção e disponibilidade para com a nossa pessoa e com todos do programa de pós-graduação *stricto sensu* em ciências médico-cirúrgicas

Aos pacientes e familiares pela gentileza de aceitarem participar desse estudo.

Manuela Cristina Silva Sales, Técnica da Imunoistoquímica do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, na execução da imunoistoquímica.

Ricardo Batista Montefusco Arraes, cirurgião oncologista do Hospital Geral de Fortaleza, no levantamento de Prontuários.

Érica Vila Real Montefusco, neuropsicóloga, professora da FANOR, pela ajuda no levantamento de artigos.

Flávio Catanhede Ximenes, Mastologista do Hospital Geral de Fortaleza, no levantamento de Prontuários.

Ao Carlos Wagner de S. Wanderley, Doutorando da Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela análise dos dados.

“ Nossa maior fraqueza está em desistir.
O caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez. ”

Thomas Edison

RESUMO

O Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) é a mais agressiva forma de câncer de mama localmente avançado. É mais frequente em mulheres jovens e evolui desfavoravelmente de forma rápida em boa parte das vezes. Ao se apresentar com sinais típicos de processos inflamatórios como hiperemia e hipertermia sua patogênese e evolução tem sido associado a possível participação de mediadores inflamatórios como citocinas (TNF- α e IL-1 β) assim como fatores de transcrição (Fator Nuclear kappa B [NF-kB]) capazes de induzi-los bem como enzimas participes de sua gênese (ciclooxigenase-2 [COX-2] e a óxido nítrico sintase induzida [iNOS]). Neste sentido, objetivou-se na presente investigação avaliar a imunoexpressão do NF-kB e da Interleucina-18 (IL-18) em amostras teciduais obtidas de CIM e de Carcinoma da Mama Localmente Avançado não inflamatório (CMLA). Hipotetizou-se que nos CIM haveria uma expressão aumentada diferencial em relação CMLA. Dados demográficos e características tumorais incluindo a resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral nas duas populações tumorais foram também motivo de avaliação e de comparação. Além disso, no presente estudo, foi avaliada a expressão através de imunoistoquímica, da IL-18 e da fração nuclear p50 do NF-kB em espécimes de CIM e de CMLA (T4b). A análise dos dados mostrou que na população estudada aproximadamente um quarto dos casos de CIM ocorrem em mulheres com até 40 anos. A sobrevida média é mais desfavorável no grupo dos CIM quando comparado ao CMLA (2,3 vs. 4,3 anos, respectivamente). Esta diferença também foi evidenciada nos subgrupos RE+, C-erbB-, e triplo negativo (2,3 vs. 4,4 anos para RE+; 2,1 vs. 4,4 anos para C-erbB2-; 2,0 vs. 3,4 para triplo negativos, respectivamente). Além disso, não foi possível detectar diferenças na expressão de NF-kB ou IL-18 nos grupos CIM ou CMLA. Em suma, na população aqui estudada um quarto dos casos de CIM aparecem em mulheres mais jovens (até 40 anos). O grupo CIM tem pior prognóstico associado a menor sobrevida quando comparado ao CMLA, como evidenciado também nos subgrupos RE+, C-erbB-, e triplo negativo. Além disso, não foi observado correlação entre a expressão de NF-kB e IL-18 nos grupos CIM e CMLA.

Palavras-Chave: Carcinoma inflamatório da mama; Carcinoma da mama localmente avançado não inflamatório; Fator nuclear kappa B (NF-kB); Interleucina-18 (IL-18)

ABSTRACT

EXPRESSION OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NF- κ B) AND INTERLEUKIN-18 (IL-18) IN INFLAMMATORY BREAST CANCER AND LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

Inflammatory Breast Cancer (IBC) is the most aggressive form of locally advanced breast cancer. It is more common in young women and unfavorably, in most of the times, evolves quickly. Presents with typical signs of inflammation such as hyperemia and hyperthermia its pathogenesis and evolution has been associated with possible participation of inflammatory mediators such as cytokines (TNF- α e IL-1 β), enzymes (cyclooxygenase-2 [COX-2] and nitric oxide synthase [iNOS]), as well as, transcription factors (Nuclear Factor kappa B [NF- κ B]) able to inducing them. In this regard, the objective of this research was to determine the NF- κ B and Interleukin-18 (IL-18) expression in tissue samples obtained from IBC and Noninflammatory Locally Advanced Breast Cancer (LABC). The Hypothesis is that IBC would presents an increased expression of these factors than LABC. Demographics data and tumor characteristics, including response to neoadjuvant chemotherapy and overall survival in both tumor populations were also used to assessment and comparison. Furthermore, in this study, we evaluated the expression of IL-18 and p50 nuclear fraction of NF- κ B by immunohistochemistry in specimens from IBC and LABC (T4b). Data analysis showed that about a quarter of cases of CIM occur in women up to 40 years. The overall survival is less in the group of CIM compared to LABC (2.3 vs. 4.3 years, respectively). This difference was also evident in the subgroups RE+, C-erbB-, and triple negative (2.3 vs. 4.4 years to ER+; 2.1 vs. 4.4 years to C-erbB2-; 2.0 vs. 3.4 for triple negative, respectively). Furthermore, it was not possible to detect differences in expression of NF- κ B or IL-18 in the CIM and LABC groups. In summary, a quarter of the IBC cases studied appear in younger women (up to 40 years). The IBC has worse prognosis associated with less survival compared to LABC, as evidenced also in subgroups RE+, C-erbB-, and triple negative. Furthermore, there was no correlation between the expression of NF- κ B and IL-18 in the IBC and LABC groups.

Keywords: Inflammatory Breast Cancer; Non-inflammatory Locally Advanced Breast Cancer; Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B); Interleukin-18 (IL-18)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Carcinoma da Mama Localmente Avançado Não Inflamatório.....	20
Figura 2 -	Carcinoma Inflamatório da Mama Primário e Secundário.....	22
Figura 3 -	Diferentes apresentações de carcinoma inflamatório das mama...	24
Figura 4 -	Sinalização da Interleucina 18 (IL-18)	34
Figura 5 -	Curva de Kaplan-Meier da sobrevida geral de pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).....	51
Figura 6 -	Curvas de sobrevida geral de Kaplan-Meier de pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA). estratificada por marcador biológico (RE, RP, CerbB-2).....	52
Figura 7-	Imunomarcacão para NF-kB em amostras de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).....	53
Figura 8-	Imunomarcacão para IL-18 em amostras de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Dados Demográficos das pacientes da Amostra.....	45
Tabela 2	-	Características dos Tumores Amostrais.....	47
Tabela 3	-	Comportamento Tumoral Frente ao Tratamento Quimioterápico neoadjuvante e sobrevida geral.....	48
Tabela 4	-	Imunomarcacão para NF-kB no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).....	52
Tabela 5	-	Associação entre a expressão de NF-kB com os marcadores moleculares (RE, RP, C-erbB2) no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).....	54
Tabela 6	-	Associação entre a expressão de NF-kB com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).....	55
Tabela 7	-	Imunomarcacão para IL-18 no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).....	56
Tabela 8	-	Imunomarcacão para IL-18 nas células tumorais e no estroma do Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).....	57
Tabela 9	-	Associação entre a expressão de IL-18 com os marcadores moleculares (RE, RP e HER2) no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).....	59
Tabela 10	-	Associação entre a expressão de IL-18 com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
bFGF	Fator Angiogenico (Basic fibroblast growth fator)
CAP	Complexo aréolo-papilar
CCR7	Receptores de Quimiocina
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
C-erb-B2 ou Her-2/neu	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
CIM	Carcinoma Inflamatório da Mama
CMLA	Carcinoma da Mama Localmente Avançado
COX-2	Ciclooxigenase-2. Enzima
CXCR4	Receptores de Quimiocina
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EUA	Estado Unidos da América
Fig	Figura
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
IBC	Câncer de Mama Inflamatório
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IFN-gama	Interferon gama
IL-1, IL-6, IL-8, IL-12	Interleucinas. Citocinas
IL18	Interleucina-18
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida. Enzima
Ki67	Proteína expressa na proliferação celular

LAFICA	Laboratório de Farmacologia e da Inflamação e do Câncer.
LIBC	Lost in inflammatory breast câncer. Gene
LNs	Linfonodos
LPS	Lipopolissacarídeos
NBD	Nemo Binding Domain
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killers
p53	Gene p53
PET-CT	Tomografia por emissão de pósitrons
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptores Hormonais
RhoC GTPase	Gene
RP	Receptor de Progesterona
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
Stem cells	Células-tronco.
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNICHRISTUS	Centro Universitário Christus
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Carcinoma da Mama Localmente Avançado	18
1.2	Carcinoma Inflamatório da mama	21
1.3	Fator Nuclear Kappa B (NF-kB)	29
1.4	Interleucina 18 (IL18)	32
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MÉTODO	40
4.1	Desenho do Estudo	40
4.1.1	<i>Amostras de Tumores de Mama</i>	40
4.2	Tamanho Amostral	40
4.2.1	<i>Imunohistoquímica</i>	40
4.3	Local da Pesquisa	41
4.4	CrITÉRIOS de Inclusão	42
4.5	CrITÉRIOS de Exclusão	42
4.6	Variáveis do Estudo	42
4.7	Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa	43
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Dados Demográficos da Amostra e Características dos Tumores	45
5.2	Imunomarcção para NF-kB e IL-18 em amostras de CIM e CMLA	52
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A - ESTADIAMENTO CLÍNICO DO CÂNCER DE MAMA	75
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO CEP DO INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ – ICC	77
	ANEXO C - APROVAÇÃO DO CEP DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA	78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo. Cerca de 1,67 milhões de novos casos dessa neoplasia ocorreram no ano de 2012, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres. Neste mesmo ano, o câncer de mama foi responsável por aproximadamente 502 mil mortes, sendo a maior causa de mortalidade por câncer em mulheres (TORRE et al., 2015).

Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, e em 2012, as maiores taxas foram observadas na Europa Ocidental (96/100 mil) e as menores na África Central e na Ásia Oriental (27/100 mil) (INCA, 2014). De acordo com dados epidemiológicos de países em desenvolvimento ou desenvolvidos, o câncer de mama destaca-se como o mais incidente tipo de câncer entre mulheres (TORRE et al., 2015).

Nos Estados Unidos (EUA), a Sociedade Americana de Câncer estima que em 2014 serão diagnosticados 1.658.370 novos casos de câncer, dos quais, 231.840 serão de câncer de mama invasivo (13,98%) e 60.290 casos de carcinoma *in situ* da mama. No mesmo período ocorreram cerca de 589.430 mortes por câncer, sendo 40.290 (6,8%) decorrentes de câncer de mama, em mulheres. Homens tem estimativa de 1% de casos de câncer de mama (SIGEL et al., 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. Destes, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama (9,92%), com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) e dos tumores de próstata (69 mil) (INCA, 2014). Já as taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil continuam em patamares elevados, não havendo registro de queda nos últimos dez anos, o que tem contrastado com o observado em países como Reino Unido, Estados Unidos e França, só para citar alguns (INCA, 2014). Provavelmente, esta alta taxa de mortalidade observada no Brasil estaria relacionada ao diagnóstico da doença já em estádios avançados.

Segundo o SIM-2011, ocorreram no Brasil 13.345 mortes por câncer de mama em 2011, sendo 120 homens e 13.225 mulheres (BRASIL. Ministério da

Saúde). Pela estimativa de 2014 do INCA, teríamos 2.060 casos novos de câncer de mama apenas no estado do Ceará (INCA, 2014).

Esses números expressivos nos fazem perceber que, esforços no sentido de desenvolver novos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer de mama são imperativos, bem como definir critérios adequados para se determinar o prognóstico e assim, a agressividade do tratamento a ser proposto ao paciente.

Alguns fatores associados ao câncer de mama já foram estudados e até hoje ainda são utilizados na predição da agressividade da doença. Características como o tamanho do tumor, o número de linfonodos axilares comprometidos, o tipo e o grau histológico, a presença de invasão angiolinfática e perineural, além da expressão de receptores hormonais (RE- Receptor de Estrógeno, PR – Receptor de Progesterona) e do C-erbB2 (HER2) são alguns dos mais usuais determinantes de prognóstico e por vezes também do tratamento utilizados na prática clínica diária.

Além disso, o surgimento de novas técnicas de biologia molecular permitiu a determinação de assinaturas genéticas do tumor. Ao analisar milhares de genes simultaneamente descortinou-se a partir daí uma nova era no estabelecimento mais fiel de fatores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica.

Pioneiramente, Perou *et al.*, em 2000, empregaram a metodologia de *microarray* para estudar 476 genes. Juntamente com Sorlie e colaboradores classificaram, do ponto de vista genômico, o câncer esporádico da mama em cinco subtipos: Luminal A e Luminal B, que expressam RE; Basal, que não expressam RE, RP e C-erbB2; Superexpressor de C-erbB2; e o epitelial normal. Estes autores verificaram que os tumores de bom prognóstico eram o Luminal A, Luminal B e o epitélio normal, ao passo que, a evolução mais desfavorável era observada nos tipos Basal e superexpressor de C-erbB2 (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE, 2001).

Em 2002 Van de Vijver *et al.* estudaram 295 casos de câncer de mama estádios I e II, axila negativa e positiva, pela técnica de *microarray* de tecido fresco, colhido e conservado em banco de tumores, analisando 70 genes selecionados entre vinte e cinco mil. Determinaram uma assinatura de bom prognóstico, com sobrevida em dez anos de 94,5% e outra de mau prognóstico com 50,6%. Esta assinatura de 70 genes, que tornou-se disponível comercialmente com o nome de *MAMMAPRINT*, permite reconhecer melhor as pacientes que requerem quimioterapia adjuvante e também, principalmente aquelas que não a necessitam (VAN DE VIJVER *et al.*, 2002).

Vários testes têm sido propostos para subestratificar os cânceres em grupos moleculares e identificar pacientes com câncer de mama de forma personalizada, identificando melhor os tumores de grau intermediário (de baixo ou alto risco) e os tumores com maior possibilidade de recorrência (PEROU *et al.*, 2000; SOTIRIOU *et al.*, 2006). A definição do perfil de expressão gênica usando microarranjos de DNA ainda é dispendiosa e metodologicamente difícil para uso rotineiro em laboratórios de anatomia patológica. Mas, a identificação de subgrupos moleculares (luminais A e B, C-erbB2 e basal) empregando imunoistoquímica é possível. Alguns testes já estão disponíveis comercialmente, como o teste preditor de subtipos tumorais de 50 genes (PAM50) (CHIA *et al.*, 2012; PRAT *et al.*, 2012.), para estratificação de tumores em bom ou mau prognóstico (teste de 70 genes) MAMMAPRINT (VAN DE VIJVER *et al.*, 2002; VAN'T VEER *et al.*, 2003) e para definir o alto ou o baixo risco de recorrência (escore de recorrência de 21 genes) Oncotype DX (PAIK, 2004), entre outros. Esses testes são altamente promissores e já são indicados por oncologistas para seleção de pacientes para quimioterapia adjuvante.

Contudo, apesar dos evidentes avanços, alguns subtipos de câncer de mama ainda persistem como sinônimos de evolução desfavorável e prognóstico ruim. Desta forma, a avaliação do perfil de expressão de determinados mediadores da resposta inflamatória, como citocinas, fatores de transcrição e expressão de genes específicos no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e no Câncer de Mama Localmente Avançado não inflamatório (CMLA), poderia auxiliar na identificação de possíveis marcadores prognósticos ou potenciais alvos terapêuticos, além de oferecer subsídios para melhor caracterizar a patogênese dos diferentes subtipos de câncer de mama.

1.1. CARCINOMA DA MAMA LOCALMENTE AVANÇADO

O câncer de mama localmente avançado refere-se aos grandes tumores operáveis (IIB, IIIA) ou tumores inoperáveis (IIIB, IIIC), incluindo o Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) (SINACHI *et al.*, 2011; LEE; NEWMAN, 2007). Tradicionalmente, a definição de câncer de mama localmente avançado consiste de pacientes com tumores maiores que 5 cm, com envolvimento da pele ou parede torácica, ou linfonodos axilares fixos aos outros ou aderidos a outras estruturas. No entanto alguns especialistas aceitam que pacientes com estágio IIB com grandes

tumores primários (T3), sem adenopatia clínica, sejam incluídos como câncer de mama localmente avançado (KUERER *et al.*, 2000; TRYFONIDIS *et al.*, 2015).

Atualmente, o câncer de mama localmente avançado ficou definido como tumores primários volumosos da parede torácica e/ou adenopatia extensa. Isto inclui T3 (> 5 cm) ou tumores T4 (fixação parede torácica ou ulceração pele e/ou satelitose) e doença N2/N3 (metástases para linfonodos axilares fixos entre eles e/ou a outras estruturas mamárias internas, metástase para os linfonodos da cadeia infraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar e metástase clinicamente aparente na cadeia mamária interna ipsilateral, na presença de metástase clinicamente positiva na região axilar) (LEE; NEWMAN, 2007). A sétima edição do sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) inclui as metástases supraclaviculares isoladas no câncer de mama localmente avançado no estágio IIIC (AJCC, 2010).

O carcinoma da mama localmente avançado pode ser dividido em doença operável e inoperável. Os pacientes com edema difuso da mama ou eritema, envolvimento da pele, tumores fixos, volumosos tumores T3 ou T4, câncer de mama com linfonodos axilares fixos a outros ou a outras estruturas ou linfonodos supraclaviculares, são definidos como carcinoma de mama localmente avançados inoperáveis inicialmente.

A cirurgia inicial está geralmente limitada a biópsia para permitir a determinação da histologia e a expressão de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e a superexpressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2 (C-erbB2) nos tecidos.

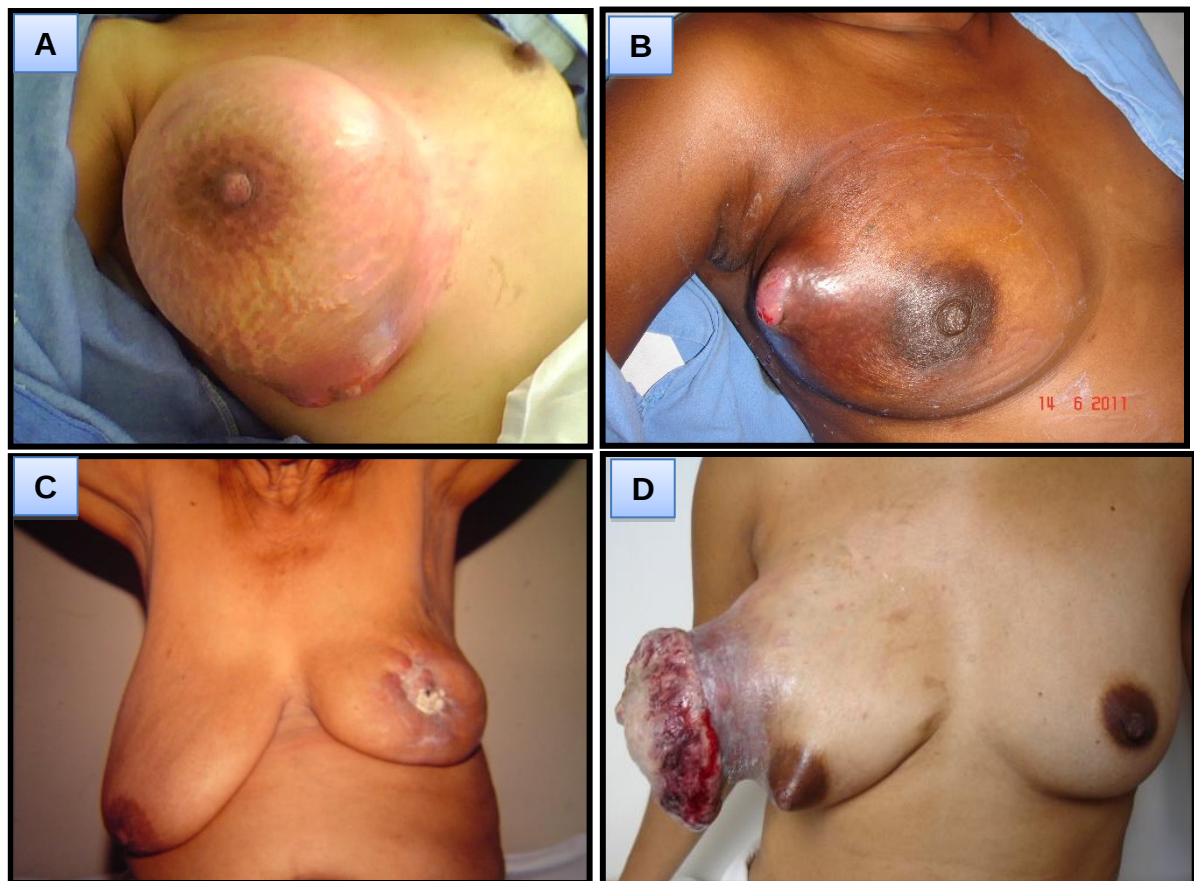
O câncer de mama localmente avançado ocorre em cerca de 20-25% das pacientes com câncer de mama em todo o mundo sendo considerado um importante problema de saúde principalmente nos países em desenvolvimento (SINACHI *et al.*, 2011; TEWARI; KRISHNAMURTHY; SUKLA, 2009; OZMEN *et al.*, 2010; EROĞLU *et al.*, 2013).

O tratamento inicial é quimioterapia e para os pacientes que respondem a esta quimioterapia neoadjuvante, o tratamento local geralmente consiste de mastectomia com linfadenectomia axilar, seguida de radioterapia em parede torácica e linfonodos regionais. A cirurgia conservadora pode ser considerada em pacientes com boa resposta parcial e resposta completa com a quimioterapia neoadjuvante.

Nas pacientes com axila clinicamente negativa, a pesquisa do linfonodo sentinela também pode ser considerada. Pacientes com linfonodo sentinela negativo antes da QT neoadjuvante, podem ser poupadas de uma dissecação axilar (MENARD *et al.*, 2009). A hormonioterapia está indicada para as pacientes com tumores com receptores de estrógeno e/ou progesterona positivos.

Neste contexto, para este estudo foram selecionadas pacientes diagnosticados com dois perfis clinicamente distintos de Carcinoma de Mama Localmente Avançado: do tipo não inflamatório e os do tipo inflamatório da mama. Vide casos de carcinoma de mama localmente avançado não inflamatório na Figura 1.

Figura 1 – Carcinoma da Mama Localmente Avançado Não Inflamatório.



A) Carcinoma localmente avançado na mama direita com infecção secundária em paciente de 22 anos. **B)** Carcinoma localmente avançado na mama direita com infecção secundária. **C)** Carcinoma localmente avançado na mama esquerda com infiltração do complexo aréolo-papilar e retração. **D)** Carcinoma localmente avançado na mama esquerda com infecção secundária. Fonte: Arquivos pessoais do autor e do Prof. Dr. Ronaldo A. Ribeiro

1.2. CARCINOMA INFLAMATÓRIO DA MAMA

Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) é raro e o mais agressivo câncer de mama localmente avançado, com um prognóstico pobre (YAMAUCHI *et al.*, 2012). Apesar da melhora da sobrevida e resultados do câncer de mama nos últimos 20 anos, pacientes com CIM continuam a ter um prognóstico ruim, com uma sobrevida em cinco anos de 30% a 40%, enquanto as taxas comparáveis para pacientes com câncer de mama não inflamatório são de 70% a 80% (SUTHERLAND *et al.*, 2010).

Devido a sua rápida progressão, o diagnóstico preciso e o tratamento agressivo podem melhorar a resposta quando iniciado precocemente. Infelizmente o CIM tem, em certas circunstâncias, sido confundido com um processo infeccioso mamário (mastite), sendo medicado com antibióticos, resultando muitas vezes, em atrasos no diagnóstico e tratamento.

O comportamento agressivo do CIM junto com as inúmeras evidências acumuladas acerca de suas características epidemiológicas e biomoleculares, tem dado suporte a hipótese de que o CIM pode, de fato, ser uma entidade biologicamente distinta, mais do que um subtipo do espectro dos cânceres localmente avançados de mama (ROBERTSON *et al.*, 2010).

Neste contexto torna-se importante distinguir duas distintas variantes clínicas de CIM, primário e secundário, que tem sido comumente citadas na literatura. O termo “CIM primário” é usado para descrever o desenvolvimento de um carcinoma inflamatório em uma mama previamente normal. Em contraste o “CIM secundário” descreve o surgimento de alterações inflamatórias cutâneas que mimetizam um CIM primário, tanto numa mama que já tenha apresentado um câncer de mama não inflamatório ou na parede torácica após uma mastectomia por um carcinoma não inflamatório (ROBERTSON *et al.*, 2010) (Vide ilustrações na figura 2).

Estes tumores têm sido chamados de “inflamatório” porque a mama frequentemente apresenta-se com sinais que normalmente são observados em processos inflamatórios tais como hiperemia e hipertermia e mais raramente edema (MERAJVER, 2004). Em termos de patogênese, os sinais de inflamação têm sido atribuídos à presença maciça de êmbolos tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos da derme (ROBERTSON *et al.*, 2010).

Uma das mais frequentemente alterações associadas ao CIM é o eritema, que pode estar presente em toda a mama ou em parte dela, pelo menos 1/3,

segundo critérios recentes. Tal hiperemia pode se apresentar em diferentes graus em termos de intensidade e extensão. O mesmo pode ser dito da hipertermia e também do edema, dois outros sinais associados ao CIM. Neste sentido, podemos ter um CIM acompanhando uma mama aumentada de volume, edemaciada, quente e completamente hiperemiada (figura 2 painel A).

Figura 2 - Carcinoma Inflamatório da Mama Primário e Secundário.



A) Carcinoma inflamatório primário da mama esquerda com hiperemia. **B)** Carcinoma inflamatório secundário do plastrão mamário esquerdo. **C)** Carcinoma inflamatório primário bilateral com retração do Complexo Aréolapilar (CAP). **D)** Carcinoma inflamatório primário bilateral das mamas, com hiperemia, edema e tumor palpável. Fonte: Arquivos pessoais do autor e do Prof. Dr. Ronaldo A. Ribeiro

Por outro lado, podemos observar um CIM associado a uma mama apenas avermelhada e um pouco quente, sem sequer se observar aumento do volume ou até mesmo massa tumoral palpável (Figura 3 D e E).

Ainda podemos observar um CIM com uma sutil hiperemia e hipertermia associadas a outros sinais de comprometimento local avançado, tais como pele em casca de laranja e/ou retração papilar (Fig 3 F e G).

Variações na apresentação dos CIM tem sido descritas em diferentes populações, até mesmo no mesmo país. Há dados indicando que as mulheres afroamericanas apresentam CIM com aumento de volume da mama e com pele em casca de laranja, com mínima hiperemia ou até mesmo indetectável eritema, contribuindo para a dificuldade e atraso no diagnóstico. As mesmas também

apresentam carcinoma inflamatório em uma idade mais jovem do que as caucasianas. Nesta situação deve-se enfatizar que a descrição dos sintomas clínicos, associado a rapidez de alterações na mama e na pele são fatores determinantes a dar suporte para o diagnóstico clínico de CIM (ROBERTSON *et al.*, 2010) (Figura 3).

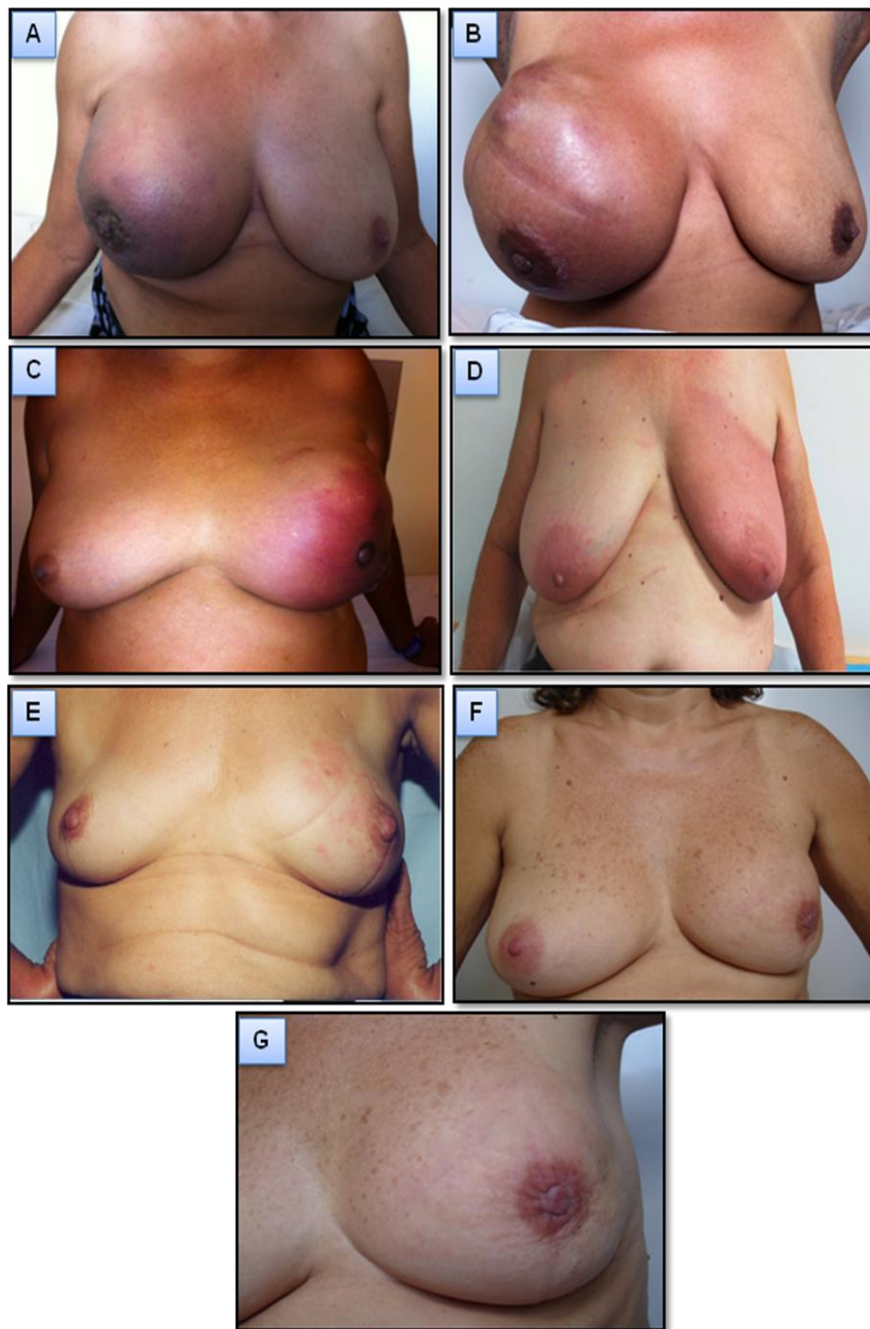
O CIM é diagnosticado principalmente em mulheres mais jovens, em comparação com outros tipos de câncer de mama. Alguns estudos têm demonstrado inclusive uma associação entre um histórico familiar de câncer de mama e carcinoma inflamatório, no entanto, estudos adicionais parecem ser necessários para confirmar tal associação (ANDERSON *et al.*, 2005).

Segundo dados do programa Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) do National Cancer Institute, nos Estados Unidos, a incidência de CIM por 100.000 mulheres/ano aumentou de 2,0 entre 1988-1990 para 2,5 ($P < 0,001$) entre 1997-1999, representando então 2% a 5% de todos os casos de câncer de mama (HANCE *et al.*, 2005).

Historicamente registre-se que as primeiras publicações sobre CIM foram de Sir Charles Bell (Bell C, 1816) e o termo Carcinoma Inflamatório da Mama foi introduzido por Lee e Tannebaum em 1924 (LEE; TANNENBAUM, 1924), permanecendo ao longo do tempo. Desde esta época, dado a possibilidade de se confundir carcinoma inflamatório com uma infecção bacteriana local, como uma mastite, é importante observar que o CIM não é um processo inflamatório verdadeiro e geralmente não está associado com sintomas tais como febre, dor localizada ou leucocitose (WALSHE; SWAIN, 2005). Como referido anteriormente, este equívoco poderá retardar o diagnóstico e tratamento, levando a graves consequências.

Os primeiros critérios diagnósticos de CIM foram estabelecidos por Haagensen em 1956 e incluíram eritema difuso, edema envolvendo pelo menos dois terços da mama, pele em casca de laranja, dor, endurecimento, calor, aumento das mamas, e palpação difusa do tumor (HAAGENSEN, 1971). De lá para cá houve uma verdadeira mudança na rigidez desses critérios, de forma que hoje admite-se o diagnóstico de CIM mesmo sem a presença de todos os sinais acima descritos, conforme veremos logo mais.

Figura 3 – Diferentes apresentações de carcinoma inflamatório das mamas.



A, B e C: Casos de Carcinoma Inflamatório das Mamas com Hiperemia e tumor palpável. **D e E:** Casos de Carcinoma Inflamatório Mama com hiperemia sem tumor palpável. **F e G:** Casos de Carcinoma Inflamatório Mama com hiperemia discreta, edema e casca de laranja
 Fonte: Arquivos do autor e do Prof. Dr. Ronaldo A. Ribeiro

As diferenças nos critérios diagnósticos podem ser as responsáveis pelas aparentes diferenças em incidência relatadas em distintas localizações geográficas. A mais curta expectativa de vida no Norte da África comparado com a Europa e América do Norte, resulta de uma alta proporção de câncer de mama ocorrendo em mulheres jovens no continente africano, que apresentam uma maior proporção de

câncer de mama agressivo, resultado das características biológicas destes tumores nestas mulheres jovens (YAMAUCHI *et al.*, 2012).

A característica histopatológica clássica, a infiltração maciça dos linfáticos da derme por êmbolos de células neoplásicas, é confirmada em menos de 75% dos casos (SUTHERLAND *et al.*, 2010).

Cerca de 30% das pacientes apresentam doença metastática ao diagnóstico (Sutherland *et al.*, 2010) e a frequência de envolvimento de linfonodos axilares e supraclaviculares em diferentes estudos de pacientes com carcinoma inflamatório pode variar de 60% a 85% (DE LA GARZA-SALAZAR, 2013).

Sabe-se que, em alguns casos, há uma maior dificuldade na detecção desses tumores por exames de imagem ou exame físico. A mamografia, exame recomendado como *screening*, em casos de tumores inflamatórios pode evidenciar apenas aumento difuso da densidade da mama (HANCE *et al.*, 2005). Em estudo retrospectivo em pacientes com carcinomas inflamatórios da mama confirmado, demonstrou que um tumor primário foi achado em somente 15% dos casos, e o sinal radiológico observado mais comum foi a distorção trabecular (YAMAUCHI *et al.*, 2012). O carcinoma inflamatório pode desenvolver-se entre mamografias e progredir rapidamente.

Em dezembro de 2008, um painel internacional de especialistas com experiência em carcinoma inflamatório, reuniu-se em Houston, Texas, para desenvolver um consenso sobre esta doença. O painel era formado por oncologistas clínicos, radioterapeutas, cirurgiões, radiologistas e patologistas, com a participação de representantes de organizações de defesa dos pacientes. Reconhecendo as deficiências no diagnóstico e tratamento, junto com falta de ensaios clínicos adequados, os membros do painel desenvolveram o primeiro consenso, baseados nos conhecimentos pessoais e cuidadosa revisão de dados publicados e atualizados de carcinoma inflamatório, tanto para diagnóstico como tratamento. Os mesmos concordaram que o diagnóstico permanecia clínico com uma confirmação patológica de carcinoma invasivo e, quando uma biópsia de pele fosse realizada e mostrasse êmbolos tumorais linfovasculares na derme, isto seria patognomônico mas não seria requerido para o diagnóstico.

Embora investigações radiológicas de rotina das mamas sejam recomendadas, o painel acordou que atualmente os dados não são suficientes para definir nenhum sinal radiológico para carcinoma inflamatório e, portanto, não deve

fazer parte dos critérios diagnósticos. Segundo o mesmo painel, os critérios mínimos requeridos para o diagnóstico de carcinoma inflamatório da mama são os seguintes:

1. História de aparecimento rápido de eritema, edema e/ou pele em casca de laranja, e/ou mama quente, com ou sem tumor palpável;
2. História de achatamento, crostas ou retração da papila pode estar presente;
3. Pacientes podem ter uma história de diagnóstico de mastite que não respondeu a antibióticos por uma semana;
4. Duração da história de não mais que 6 meses;
5. Exame clínico mostrando eritema ocupando no mínimo 1/3 da mama;
6. Exame clínico pode revelar tumor palpável subjacente com ou sem linfonodos locoregionais palpáveis, com ou sem anormalidades em papila;
7. Confirmação patológica de carcinoma invasivo em biópsia de fragmento da mama;
8. Recomendação de obter biópsia de pele adequada para documentar êmbolos tumorais linfovasculares na derme (DAWOOD, 2011).

O mesmo painel recomenda que toda mulher com suspeita de CIM deva ser submetida a uma mamografia com ultrassonografia das mamas e linfonodos regionais. Ressonância Magnética das mamas de rotina não é recomendada e o uso da mesma está indicada em lesões mamárias não detectadas pela mamografia e ultrassonografia. Todas deverão ser submetidas a Tomografias e Cintilografia Óssea. Os dados não são suficientes para recomendar PET-CT de rotina para estadiamento de mulheres com CIM (DAWOOD, 2011).

Como o tratamento inicial do CIM é quimioterapia neoadjuvante, e existe a possibilidade de uma resposta patológica completa, é indispensável uma boa amostragem de tecido tumoral que confirme a presença de carcinoma invasivo e permita determinar o subtipo histológico, grau histológico, receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e *status* de C-erbB2, que são marcadores prognósticos e preditivos de resposta (DAWOOD *et al*, 2011). Entre as

características dos carcinomas inflamatórios, uma proporção significativa tende a ter grau tumoral elevado, receptores hormonais negativos, maior expressão de p53, Ki67 elevado e C-erbB2 (HER-2) superexpresso, comparado a outros tipos de câncer de mama (HANCE *et al.*, 2005; BONNIER *et al.*, 1995).

Em relação a uma maior frequência de *status* dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) negativos em CIM, alguns estudos relatam que até 83% destes tumores apresentam RE negativo (Harvey HA, 1982; DAWOOD *et al.*, 2011). A falta de expressão de RE e RP está associado a um pior prognóstico e a uma menor sobrevida global.

Guérin *et al.* (1990) observaram que, embora o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (C-erbB2) não seja específico para o carcinoma inflamatório, cerca de 60% dos mesmos tem o C-erbB2 superexpresso (GUÉRIN *et al.*, 1990). Apesar deste marcador molecular estar associado com um pior prognóstico em câncer de mama, em uma análise de mais de 2.000 casos de pacientes com carcinoma inflamatório, Dawood *et al.* (2011) encontraram uma sobrevida favorecendo as pacientes com tumores C-erbB2 positivo versus aquelas com tumores C-erbB2 negativo, mas com *p* estatístico apenas limítrofe (ZELL *et al.*, 2009). O papel de C-erbB2 no CIM ainda está por ser definido.

As mutações do p53, que ocorrem em 20% a 50% dos casos de câncer da mama humano, (MOLL; RIOU; LEVINE, 1992), apresentam uma maior expressão nos CIM e estão associados com uma fraca sobrevida global. (GONZALEZ-ÂNGULO *et al.*, 2004). Os Receptores de Quimiocina CXCR4 e CCR7, expressos em carcinomas inflamatórios, também têm sido associadas a uma pobre sobrevida global (CABIOGLU *et al.*, 2007). Quanto às citocinas, os carcinomas inflamatórios tendem a produzir alguns marcadores inflamatórios, tais como o INF- γ , IL-1, e IL-12. Por outro lado, linhagens celulares tumorais de CIM produzem Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), IL-6 e IL-8, citocinas que estão envolvidas na superexpressão de RhoC GTPase, que está especificamente associada com carcinoma inflamatório (VAN GOLEN KL, 2000).

Os genes RhoC GTPase e LIBC (*Lost in Inflammatory Breast Cancer*), que contribuem para o fenótipo agressivo do carcinoma inflamatório, foram comparados com câncer de mama não inflamatório estágio III. O RhoC estava superexpresso em 90% das amostras de carcinoma inflamatório contra 36% dos carcinomas não inflamatórios e LIBC estava com expressão diminuída em 80% versus 21%

respectivamente. Gene RhoC GTPase é um oncogene que resulta em fenótipo altamente invasivo semelhante ao visto no carcinoma inflamatório e o LIBC (*Lost in Inflammatory Breast Cancer*) age como um supressor de tumor na mama (VAN GOLEN *et al.*, 2000). A expressão de RhoC GTPase parece ser modificado pelo LIBC, e estes genes podem atuar em conjunto para causar o carcinoma inflamatório da mama (KLEER *et al.*, 2004).

Outros estudos sobre a patogênese do carcinoma inflamatório também sugerem uma contribuição importante da angiogênese por células-tronco, mas não esclarecem os mediadores envolvidos neste processo (VERMEULEN *et al.*, 2010).

Sabemos que a obstrução linfática maciça na pele ao impedir a drenagem do excesso de líquido intersticial normal pode explicar o espessamento cutâneo e a formação de edema no carcinoma inflamatório, mas não conhecemos os mediadores responsáveis por estes fenômenos vasculares. Devido à cronicidade do processo neoplásico e tendo como referencial a fisiopatologia dos processos inflamatórios crônicos, sugere-se que o extravasamento de líquido no interstício e resultante edema seja mediado por citocinas como TNF- α , IL-1 e IFN- γ (KUMAR *et al.*, 2005).

O componente inflamatório nesta entidade suporta a hipótese que ocorra uma interface entre o processo de carcinogênese e mecanismos de inflamação que favoreçam o desenvolvimento e talvez a agressividade do CIM. O foco da maioria dos estudos sobre a patogênese do carcinoma mamário tem sido os mecanismos de crescimento e proliferação do epitélio ductal relegando a um segundo plano a contribuição de células presentes no microambiente tumoral como macrófagos e linfócitos. Estas células presentes no estroma mamário devem desempenhar um papel importante através da secreção de citocinas e outros mediadores celulares que certamente interferem com o crescimento celular e o processo de carcinogênese iniciado no epitélio mamário.

Desta forma, consideramos que o estudo da expressão do fator de transcrição NF- κ B e da IL-18, poderá trazer importantes contribuições para o limitado conhecimento da patogênese do Carcinoma Inflamatório da Mama.

1.3 Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

O Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) representa uma família de fatores de transcrição encontrados em praticamente todas as células animais. Desde sua descoberta por Sen e Baltimore, em 1986, muito foi descoberto sobre os seus mecanismos de ativação, os seus genes alvos e a sua função em uma variedade de doenças humanas, incluindo as relacionadas com a inflamação, asma, aterosclerose, AIDS, choque séptico, artrite e câncer (GARG e AGGARWAL, 2002).

O NF- κ B participa da resposta inflamatória, desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção e protege as células de sofrer apoptose em resposta ao estresse celular. Consistente com este papel, a regulação incorreta de NF- κ B tem sido ligada ao câncer, a doenças inflamatórias e auto-imunes, choque séptico, infecção viral e também ao desenvolvimento imunitário impróprio (GUILIANI et al., 2001; BAKER et al., 2011). O mesmo ainda está envolvido na resposta celular a estímulos como o estresse, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL, citocinas e antígenos virais e bacterianos (GILMORE, 1999).

No citoplasma ele é inativo porque está ligado ao seu inibidor (I κ B). Após um estímulo adequado, o I κ B é fosforilado, liberando o NF- κ B. O NF- κ B, liberado da inibição do I κ B, é translocado para o núcleo onde promove a transcrição de genes (HAYDEN et al, 2004). Na sepse, o estímulo com LPS (Lipopolissacarídeos) fosforila o I κ B e promove a translocação do NF- κ B para o núcleo onde ele vai estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (DOYLE and O'NEILL, 2006; LI et al., 2009). Em alguns tipos de câncer, estímulos cancerígenos fosforilam o I κ B e estimulam a translocação do NF- κ B para o núcleo onde ele induz a produção de oncogenes (DOLCET et al., 2005).

Com base no papel fundamental da NF- κ B na proliferação epitelial mamária, arquitetura e ramificação durante o desenvolvimento pós-natal precoce não foi surpreendente ver que a ativação constitutiva de NF- κ B, encontrada em várias linhagens de células tumorais de mama, apresentasse consequências profundas na iniciação e progressão do câncer de mama (ZUBAIR e FRIERI, 2013) . NF- κ B está principalmente ativado em tumores com receptores de estrogênio negativo (ER negativo) e C-erbB2 positivo (AHMED et al., 2006). Um bloqueio na ativação do NF-

κ B, com o peptídeo *NEMO-binding domain* (NBD), inibidor seletivo do I kappa B-Quinase (IKK), bloqueou a ativação de NF- κ B e a proliferação celular por induzir apoptose apenas nas células em proliferação. Sendo assim, os autores concluíram que a inibição da atividade do NF- κ B, desponta como um potencial alvo terapêutico para as subclasses distintas de câncer de mama especialmente ER-negativo (BIWAS et al., 2004).

Uma abordagem genética em que a via de ativação do NF- κ B é inibida, mostrou que a interferência com esta via aumenta a latência e diminui a carga tumoral. Estes resultados estão de acordo com os dados que mostram o papel essencial do NF- κ B para a indução e manutenção da transição epitélio-mesênquimal (EMT), um processo que controla a progressão do câncer de mama. De acordo com os autores, estes dados fortemente sugerem que o NF- κ B regula a progressão do tumor da mama (CHARIOT et al, 2011).

As células-tronco do câncer de mama são peças chave na perpetuação da existência do tumor e na resistência ao tratamento e recaída. As vias moleculares necessárias para sua manutenção começam a ser elucidadas e entre elas, está o fator de transcrição NF- κ B, que é conhecido por desempenhar um papel crítico na sobrevivência celular, proliferação, inflamação e imunidade. Como fator de transcrição necessário para a produção de citocinas e quimiocinas, NF- κ B foi definido como uma peça essencial na relação entre a inflamação, iniciação e progressão oncogênica. Com efeito, as moléculas inflamatórias, tais como IL-6 fornecem sinais de crescimento que promovem a proliferação de células malignas, demonstrando como crítico é o NF- κ B neste processo (CHARIOT et al, 2011).

Estudos recentes sugerem que o NF- κ B epitélio mamário regula as células-tronco do câncer de mama em um modelo de tumorigenesis dependente de C-erbB2. Uma característica frequentemente encontrada na maioria dos tumores de câncer de mama é a ativação do NF- κ B. A ativação desregulada do NF- κ B resulta na localização nuclear persistente de proteínas tais como p50, p52, p65, cREL e RelB, quais levam à ruptura do equilíbrio entre a proliferação celular e morte através da regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas (CHARIOT, 2011).

Recentemente, a expressão gênica de perfis de câncer de mama inflamatório e não inflamatórios indicou que a via NF- κ B é potencialmente importante para o

fenótipo do câncer de mama inflamatório (VAN LAERE *et al.*, 2005). Além disso, a expressão de todos os genes alvos do NF- κ B estavam significativamente mais elevados nos carcinomas inflamatórios quando comparados com os não inflamatórios (VAN LAERE *et al.*, 2005).

O cancer inflamatório da mama apresenta um fenótipo especial e novos alvos moleculares são necessários para melhorar o tratamento desta doença rápida e fatal. Dado o papel dos genes relacionados com o NF- κ B na proliferação celular, invasão, angiogênese e inflamação, Lerebours *et al.*, (2008), postularam que estes genes possam estar desregulados no carcinoma inflamatório. Os mesmos autores verificaram que 35 (58%) dos 60 genes estudados e relacionados com o NF- κ B, estavam significativamente desregulados no carcinoma inflamatório quando comparados com os carcinomas não inflamatório. Concluíram que a via NF- κ B parece desempenhar um papel importante no carcinoma inflamatório, possivelmente contribuindo para o fenótipo incomum e mais agressivo de câncer de mama (LEREBOURS *et al.*, 2008).

Devido ao seu papel em uma ampla variedade de doenças, o NF- κ B tornou-se um dos principais alvos para o desenvolvimento de drogas (GARG A, AGGARWAL, 2002). A ativação do NF- κ B pode suprimir a apoptose, promovendo assim quimioresistência e tumorigênese. A maioria dos agentes quimiopreventivos parecem suprimir a activação do NF- κ B, através da inibição de membros da via de sinalização do NF- κ B. Estes agentes quimiopreventivos também sensibilizam os tumores a agentes quimioterapêuticos através da anulação da ativação do NF- κ B. Em geral, estas observações sugerem que o NF- κ B é um alvo ideal para quimioprevenção e quimiossensibilização (BHARTI; AGGARWAL, 2002)

No câncer da mama com receptor de estrogênio negativo (ER negativo) a falta de terapia alvo é um grande obstáculo. Como dito anteriormente, NF- κ B ativado foi detectado principalmente em tumores ER negativos e C-erbB2 positivo (86%). Estes resultados corroboram a hipótese de que certas células do câncer da mama dependem do NF- κ B para a proliferação descontrolada e ao mesmo tempo evitar a apoptose, assim, o NF- κ B desponta como um potencial alvo terapêutico para câncer da mama ER negativo (BISWAS *et al.*, 2004).

Vários estudos abordaram a identificação de inibidores de NF- κ B como agentes terapêuticos para o câncer. Uma vez que a ativação de NF- κ B é o resultado

de uma via de sinalização de múltiplos passos , estes compostos podem atingir diferentes pontos do processo de sinalização. Por exemplo, alguns anti-inflamatórios podem inibir o NF- κ B através da interferência com a atividade de membros do complexo IKK (IKK α , IKK β ou IKK γ). Outras substâncias como a curcumina, trans-resveratrol ou parthenolide são compostos naturais que têm demonstrado inibir a ubiquitinação e a fosforilação do I κ B α . Uma outra maneira de se aproximar da inibição de NF- κ B é alvejar o processo de degradação de proteassoma. Inibidores de proteassoma evitam a activação do NF- κ B, através do bloqueio da degradação de I κ Bs , NF- κ B1/p105 ou NF- κ B2/p100 (CSAKI et al, 2009; GAMBLE et al., 2012).

Como demonstrado nesta revisão, há muita evidência apontando para um papel da ativação do NF- κ B, no desenvolvimento e progressão tumoral, mas também em quimio e rádio resistência, e até mesmo na terapia do câncer. Desta forma, a avaliação da expressão do NF- κ B em amostras de câncer de mama inflamatório e não inflamatório poderá oferecer subsídios para potenciais intervenções terapêuticas relacionadas a modulação destas vias.

1.4 Interleucina 18 (IL-18)

A indução e regulação da resposta imune envolve múltiplas interações entre células como linfócitos, monócitos, células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), entre outras. Muitas dessas interações são mediadas por fatores solúveis chamados citocinas. Estas desempenham várias funções, mas estão principalmente envolvidas na regulação da resposta inflamatória e no reparo tecidual (KUMAR, et al. 2010).

As citocinas compreendem um grande grupo de proteínas as quais possuem características e funções específicas no organismo. Por exemplo, a Interleucina 12 (IL-12) é secretada por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T auxiliares do tipo TH1. É responsável por aumentar a secreção de IFN- γ pelas células NK (natural killers) e pelos linfócitos T auxiliares (CD4). A IL-18 potencializa as ações da IL-12 e também estimula a produção de IFN- γ . Mas na ausência de IL-12, a IL-18 reforça a ativação da via TH2 (ABBAS et al. 2008).

A interleucina-18, também conhecida como fator indutor de IFN- γ , é uma proteína que, em seres humanos, é considerada uma citocina pró-inflamatória (OKAMURA *et al.*, 1995; NOLAN; GRAVES; WALDMANN, 1998). É bem conhecido que a caspase-1 (ou enzima conversora de interleucina-1 β) é responsável pela ativação de IL-1 α , IL-1 β e IL-18 durante a resposta inflamatória induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (CREAGH *et al.*, 2003). A caspase-1 cliva (ativação proteolítica) a pró-IL-18, forma inativa dessa citocina, liberando a forma ativa, IL-18 (THORNBERRY *et al.*, 1992) (vide Fig. 4).

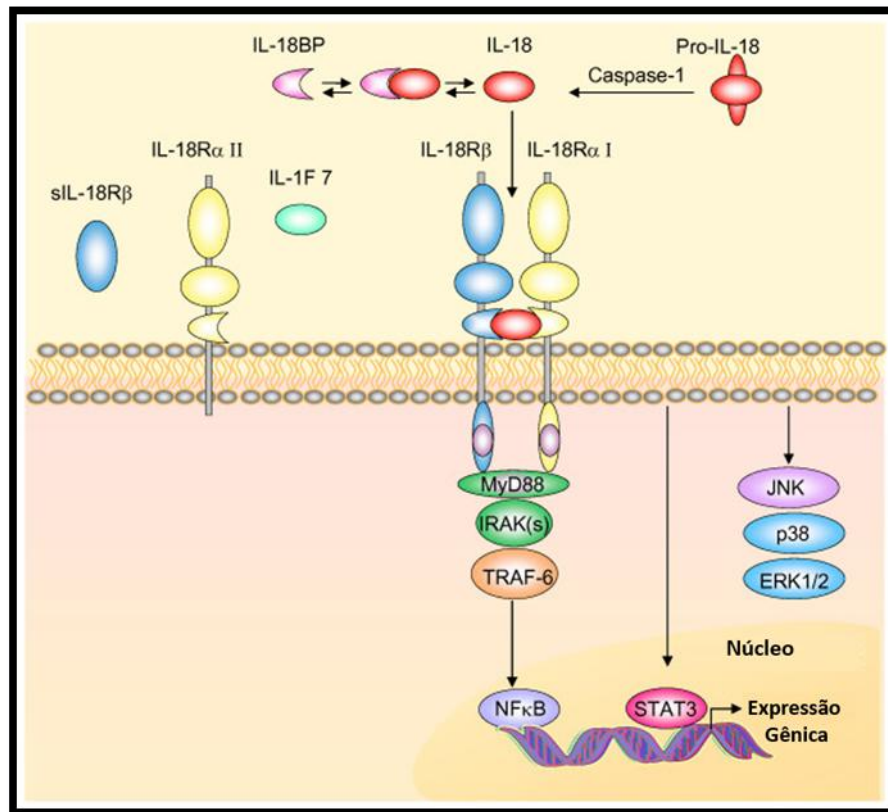
A IL-18 é uma citocina com capacidade de induzir respostas de padrão Th1 e Th2 dependendo do contexto imunológico. A IL-18 exerce ações características de outras citocinas pró-inflamatórias (vide Fig. 4), como o aumento da expressão de moléculas de adesão, da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e produção de quimiocinas (DINARELLO, 2006).

Nos últimos anos, o campo da imunologia tumoral aumentou significativamente e os seus limites, nunca muito claros, tornaram-se menos distintos. Embora o sistema imunitário desempenhe um papel importante no controle do crescimento tumoral, tornou-se também evidente que o crescimento tumoral também pode ser promovido pela resposta imune. Um bom exemplo que ilustra a função ambígua do sistema imune na progressão tumoral é representado pela interleucina 18 (IL-18) (PALMA *et al.* 2013).

Nicolini e colaboradores (2006) relataram que os níveis séricos elevados de IL-18 foram encontrados em pacientes com câncer de mama em comparação com os controles e os valores foram maiores naqueles que estavam em estágios avançados da doença. Além disso, maiores níveis séricos de IL-18 foram observados em pacientes com metástases quando comparados aos sem metástases.

Além disso a expressão elevada de IL-18 em linhas de células resistentes à doxorrubicina e tecidos de tumores da mama foi validado e seu papel na resistência à doxorrubicina foi posteriormente confirmada por experiências de viabilidade das células na presença ou ausência desta proteína (YAO L *et al.*, 2011).

Figura 4 – Sinalização da Interleucina-18 (IL-18).



A IL-18 ativa é produzida e secretada após clivagem proteolítica do precursor inativo pro-IL18 pela ação da caspase-1. A ação da IL-18 pode ser regulada pela proteína ligante da IL-18 (IL-18bp) que se liga a IL-18 com alta afinidade e inibe sua função. A IL-18 livre se liga a receptores de superfície celular específicos, tais como, IL-18Rα e a IL-18Rβ. A interação de IL-18 com o IL-18Rα estabiliza a interação com a IL-18Rβ, e posteriormente com a proteína adaptadora MyD88 via domínio TIR. Este inicia a via de sinalização que leva a translocação nuclear do NF-κB. Isoforma Solúvel da Subunidade β do Receptor de IL-18 (sIL-18Rβ), Subunidade α II do Receptor de IL-18 (IL-18RαII), Regulador negativo de IL-18 – Interleucina-1F7 (IL-1F7), Proteína Ligante da IL-18 (IL-18BP), Interleucina-18 (IL-18), Subunidade β do Receptor de IL-18 (IL-18Rβ), Subunidade α I do Receptor de IL-18 (IL-18RαI), Enzima Conversora de Interleucina-1β (Caspase-1), Precursor Inativo da IL-18 (Pro-IL-18), Fator 88 de Diferenciação Mielóide (MyD88), Isoforma Solúvel da Quinase Associada ao Receptor da IL-1 (IRAKs), Fator 6 Relacionado ao Receptor de TNF (TRAF-6), Fator de Transcrição Nuclear κB (NF-κB), Transdutor de sinal e ativador de Transcrição 3 (STAT3), Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) JNK, p38, ERK1/2. Fonte: Alboni *et al.* (2010).

Em outro estudo, Srabović *et al.* (2011) comprovaram que a IL-18 estava presente no câncer de mama, no tecido circundante sem alterações dos mesmos pacientes e no tecido da mama de pacientes com tumores benignos e outras doenças benignas da mama. A expressão dessa citocina foi significativamente maior no tecido tumoral do câncer de mama, em comparação com a sua expressão em tecido circundante, sem alterações, dos mesmos pacientes. A expressão de IL-18 não foi significativamente mais elevada em tumores de câncer de mama em comparação com a sua expressão em tecido mamário dos pacientes com doenças

benignas da mama. Não houve correlação significativa entre a expressão de IL-18 e o *status* de linfonodos, e entre a expressão IL-18 e os fatores fisiopatológicos. Estes resultados sugerem um possível envolvimento de IL-18 em complexos mecanismos de carcinogênese mamária (SRABOVIĆ *et al.*, 2011). Apesar da IL-18 ser capaz de estimular células natural killer (NK), auxiliar na polarização de células T auxiliares para o perfil tipo Th1 e assim auxiliar na eliminação de células infectadas por vírus, como também, na de células cancerígenas de forma eficaz. No microambiente tumoral suas funções podem ser ambíguas, uma vez que, a IL-18 também é capaz de induzir a angiogênese, a migração/metástase, proliferação e escape imunológico (PARK *et al.*, 2007).

Desta forma, levando em consideração a ambiguidade da IL-18, a avaliação dos níveis de expressão dessa citocina no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e no Câncer de Mama Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA) podem fornecer importantes informações a respeito da complexa patogênese dos subtipos de câncer de mama estudados.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de, quando confrontado com outros cânceres de mama localmente avançados, o CIM se apresentar clinicamente de forma distinta, sua patogênese ainda não se encontra completamente estabelecida. Adicionalmente o CIM não tem critérios diagnósticos moleculares ainda completamente definidos e da mesma forma não se tem um tratamento específico definido. Portanto, há uma forte necessidade de um avanço clínico e científico desta doença.

A agressividade do CIM decorre de sua rápida recidiva locoregional e o surgimento de metástases à distância. Por isso, esta doença é um excelente modelo para compreender a biologia das metástases, a transição epitelial-mesenquimal, células tronco, microambiente tumoral, etc. Além disso, a vermelhidão difusa associada a hipertermia local, comumente vistos em processos inflamatórios, tem permitido especular que os processos inflamatórios, e imunológicos estejam envolvidos em sua patogênese.

Contudo, apesar da presença de sinais clássicos de inflamação no CIM, a contribuição de mediadores pró-inflamatórios como a do fator de transcrição NF- κ B e da citocina IL-18 ainda não está claramente demonstrada. Desta forma, a compreensão dos processos biológicos envolvidos no CIM certamente trará contribuições para o tratamento mais direcionado desta patologia e possivelmente ajudará no melhor entendimento da patogênese de outros cânceres de mama localmente avançados.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (Fator NF- κ B) e da Interleucina-18 (IL-18), em amostras humanas de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma de Mama Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os dados demográficos como idade ao diagnóstico e histórico familiar do grupo CIM comparando com o grupo CMLA.
- Avaliar as características tumorais como tipo histológico e o *status* dos marcadores moleculares (RE, RP, C-erbB2), nas duas populações estudadas.
- Investigar o comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico neoadjuvante do grupo CIM comparando com o grupo CMLA.
- Avaliar a sobrevida geral nas duas populações de carcinoma mamário estudadas.
- Analisar as curvas de sobrevidas nas duas populações de CIM e CMLA de acordo com os marcadores moleculares (RE, RP, C-erbB2).
- Avaliar a correlação entre a expressão do Fator de Transcrição NF- κ B com os marcadores moleculares (RE, RP, C-erbB2), o tipo de resposta ao tratamento neoadjuvante e a sobrevida.
- Investigar a correlação entre a expressão da IL-18 com os marcadores moleculares (RE, RP, C-erbB2), o tipo de resposta ao tratamento neoadjuvante e a sobrevida.

Material e Método

4 MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

4.1.1 Amostras de tumores de mama

Amostras dos arquivos de tumores de carcinoma inflamatório de mama (grupo 1) e carcinoma de mama localmente avançado não inflamatório (grupo 2) foram obtidas através de colaboração estabelecida entre o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), Universidade Federal do Ceará, Serviço de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (ICC), Hospital Geral de Fortaleza (HGF), Laboratório Biopse, Laboratório Pathus, e do Centro de Especialidades Médicas no período de 2012-2015. A grande maioria das amostras foi procedente do Instituto do Cancer do Ceará.

4.2 Tamanho amostral

Baseado em projetos de pesquisa em câncer de mama através desta colaboração foram obtidas: 75 amostras de CIM (ICC: 60 amostras; HGF: 8 amostras; Centro de Especialidades Médicas: 7 amostras) e 60 amostras de CMLA (ICC e HGF: 55 amostras; Centro de Especialidades Médicas: 5 amostras) somando um total de 135 casos de CIM e CMLA. Destes, foram estudados 75 espécimes de carcinoma inflamatório e 60 de carcinoma de mama localmente avançado não-inflamatório (T4b).

4.2.1 Imunoistoquímica

O ensaio de imunoistoquímica para NF-kB p50 (sequencia de localização nuclear) e IL-18 foi realizado pelo Sistema Automatizado Autostainer da Dako (Dako, Inc, Carpinteria, CA) em cortes de tecidos (5 µm) fixados com formalina, incluídos em parafina e montados em lâminas de microscopia silanizadas (tratadas com poli-L-Lisina). Para a realização do ensaio, os cortes foram desparafinizados com xilol e hidratados com gradientes de álcool. Após a recuperação do epitopo induzida por calor - HIER (PT-Link a

96°C por 20 min) utilizando o tampão de recuperação antigênica – EnVision FLEX target retrieval solution (DAKO, Corporation, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com uma incubação por 15 min com EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent. Os cortes foram em seguida incubados por 2 h com o anticorpo primário de coelho anti-NF-κB (Santa Cruz Biotechnology; 1:200) ou anti-IL-18 (Sigma Aldrich; 1:400) diluídos em diluente do EnVision. As amostras foram lavadas 3 vezes com tampão TBS. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, o EnVision + HRP anti-coelho (DAKO, Corporation, Carpinteria, CA, USA). Para visualização da reação, as lâminas foram incubadas com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - DAKO). Adicionalmente, o controle positivo para o NFκB foi realizado em cortes de carcinoma de cólon, como indicado pelo fabricante do anticorpo. O controle positivo da IL-18 foi obtido em seções de apêndice, que cora fortemente a referida citocina. O controle negativo da reação foi processado simultaneamente como descrito anteriormente com a exceção de que este não foi incubado com o anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS/BSA 5%. Ao final, realizou-se a contracoloração com hematoxilina de Harris e os cortes foram desidratados com graduações crescentes de álcool etílico e xilol, seguido da cobertura dos cortes com lamínula. A coloração foi analisada de forma semi-quantitativa por meio de escores, como a seguir: (METEOGLU I et al. 2008; SRABOVIĆ N. et al. 2011). O critério de positividade para o NFκB e para IL-18 foi a imunomarcação das células tumorais:

0 = reação negativa (expressão nula);

1+ (reação discreta)

2+ (reação moderada)

3+ (reação forte).

4.3 Local da Pesquisa

Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), Serviço de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará e Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

4.4 Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico de Carcinoma Inflamatório de Mama (CIM) e Carcinoma de Mama Localmente Avançado Não Inflamatório:

- Com amostras satisfatórias, fixadas adequadamente, com dimensões mínimas para estudo, para avaliação imunoistoquímica de NF-kB (Fator Nuclear Kappa B) e Interleucina 18 (IL-18)
- Com estudo imunoistoquímico previamente realizado de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. C-erbB2 (HER2/neu)

4.5 Critérios de exclusão

Pacientes com diagnóstico de Carcinoma Inflamatório de Mama (CIM) e Carcinoma de Mama Localmente Avançado Não Inflamatório:

- Com estadiamento IV (com metástase) ao diagnóstico.
- Com amostras sem material suficiente, dimensões inadequadas e fixadas de modo inadequado para avaliação imunoistoquímica de NF-kB (Fator Nuclear Kappa B) e a Interleucina-18 (IL-18).
- Sem estudo prévio imunoistoquímico de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. C-erbB2 (HER2/neu)

4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Foi feita coleta dos seguintes Dados:

- Idade
- Tipo Histológico
- Estadiamento dos Tumores: T4d e T4b
- Receptores de Estrógeno (RE)
- Receptores de Progesterona (RP)
- Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2. C-erbB2 (HER2/neu)
- NF-kB

- Interleucina 18 (IL-18)
- Sobrevida
- História familiar
- Resposta clínica e patológica
- Recidiva local e a distância

4.7 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

Foi apresentado requerimento para aprovação da pesquisa junto ao Comitê de Ética e Pesquisa – CEP do Instituto do Câncer do Ceará – ICC, protocolizado sob o número 073/2008 e aprovado em reunião de 27 de novembro de 2008, dentro das normas legais que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, de acordo com a Resolução nº 251/97

Foi apresentado outro requerimento para aprovação da pesquisa junto ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza – CEP/HGF dia 26 de janeiro de 2012, protocolizado sob o nº 290201/12 e aprovado em reunião de 29 de fevereiro de 2012.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva de todas as variáveis, utilizando frequências absoluta e relativa para variáveis categóricas e média, desvio padrão, mínimo e máximo para as variáveis contínuas. Os cruzamentos entre variáveis categóricas foi realizado utilizando os testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Para cada cruzamento também foram calculadas razões de chance e seu intervalo de confiança de 95%. Foram calculadas curvas de sobrevivência para a sobrevida das pacientes. As curvas foram confrontadas com variáveis (RE, RP, C-erbB2 e triplo negativo) através do teste de igualdade de distribuições de sobrevivência (teste Log-Rank). A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6.01 e o SPSS Statistics 22.0.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Dados Demográficos da Amostra e Características dos Tumores Amostrais

Como pode ser observado na Tabela 1. não há diferença estatística entre os grupos CIM e CMLA com relação a prevalência dos subtipos de câncer de mama de acordo com as faixas etárias ($p=0,335$) a média de idade observada nos grupos CIM e CMLA foi de 49 e 51 anos respectivamente. Contudo, em mulheres com até 40 anos foi observado uma razão de chance quase três vezes maior de apresentar CIM, uma vez que, cerca de 25% dos CIM foram diagnosticados em pacientes com até 40 anos contrastando com os 14,3% observados no CMLA na mesma faixa etária. Nas demais faixas etárias não foram observadas diferenças dignas de notas nas duas populações estudadas. Em relação a presença de história familiar de câncer de mama não foram identificadas diferenças nos grupos CIM vs. CMLA (34,5% para e 31,5%, respectivamente).

Tabela 1. Dados Demográficos das Pacientes da Amostra.

Dados Demográficos	CIM	CMLA	RC (IC 95%)	Valor p
	n (%)			
Idade ao diagnóstico (anos)				
Até 40	15 (24,6)	8 (14,3)	2,81 (0,61 - 12,97)	0,335**
41 a 50	19 (31,1)	19 (33,9)	1,5 (0,36 - 6,18)	
51 a 60	12 (19,7)	17 (30,4)	1,06 (0,24 - 4,58)	
61 a 70	11 (18,0)	6 (10,7)	2,75 (0,55 - 13,75)	
> 70	4 (6,6)	6 (10,7)	1,00	
Desconhecido	14	4	-	
Histórico Familiar de câncer				
Sim	20 (34,5)	17 (31,5)	1,15 (0,52 - 2,52)	0,736*
Não	38 (65,5)	37 (68,5)	1,00	
Desconhecido	17	6	-	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado - CIM (n=75) e CMLA (n=60)

Na tabela 2. estão apresentadas as características dos espécimes tumorais. De acordo com dados obtidos pode-se constatar que os tumores não diferem entre si em todos os parâmetros avaliados. Na análise do tipo histológico, constatamos que a grande maioria dos casos apresenta-se como Carcinomas Ductais Invasivos (CDI) que correspondem a 85,3% dos casos nos CIM e 90,0% nos CMLA. Além de uma distribuição semelhante entre os graus histológicos, aproximadamente 90% dos tumores CIM e CMLA apresentam-se como grau 2 e 3. Em relação ao *status* de receptores hormonais também não foram observadas diferenças significativas entre as duas populações tumorais analisadas. Para o receptor de estrógeno (RE) observou-se positividade em aproximadamente 50% nas duas populações. Para o receptor de progesterona (RP) foi observada positividade em aproximadamente 40% para CIM e 43% para CMLA. Também em relação ao *status* positivo do C-erbB2 não foram observadas diferenças, uma vez que, o grupo CIM apresentou 32,7% e o grupo CMLA 28,6%. A negatividade para C-erbB2 (escores 0-1) ocorreu em 67,3% no grupo CIM e 71,4% no CMLA. Diferente do esperado, não observamos diferença significativa em relação a presença de tumores triplo negativos nas duas populações (33,3% no grupo CIM vs. 28,6% do grupo CMLA).

Na tabela 3. estão evidenciados aspectos relacionados ao comportamento tumoral frente ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, assim como, a evolução tumoral determinante da sobrevida geral. Como pode ser visto, em relação a resposta ao tratamento neoadjuvante, resposta patológica e recidiva, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Contudo, a análise dos dados mostrou uma razão de chance 2,25 vezes maior para o grupo CIM progredir na doença em relação ao CMLA (16,4% do CIM vs. 10,9% do CMLA). Apesar de não significativa, a razão de chance do paciente com CIM apresentar recidiva é quase duas vezes maior quando comparada ao grupo CMLA. Coerentemente, a análise da sobrevida geral mostrou que os pacientes diagnosticados com CIM significativamente ($p < 0,001$) sobrevivem menos do que pacientes com CMLA. A razão de chance do paciente diagnosticado com CIM morrer em até 2 anos a partir do diagnóstico é 14,4 vezes superior a do paciente com CMLA. Até 5 anos do diagnóstico essa relação se mantém alta, uma vez que, a razão de chance de morrer por CIM é 6,61 vezes superior a de morrer por CMLA.

Tabela 2. Características dos Tumores Amostrais.

Características do Tumor	CIM	CMLA	RC (IC 95%)	Valor p
	n (%)			
Estadiamento ao Diagnóstico				
IIIC	6 (9,8)	0 (0,0)	-	-
IIIB	55 (90,2)	56 (100)	-	
Desconhecido	14	4		
Tipo histológico				
CDI	64 (85,3)	54 (90)	-	-
CLI	2 (2,7)	3 (5)	-	
Outros	9 (12)	3 (5)	-	
Desconhecido	-	-	-	
Grau Histológico				
1	2 (5,7)	3 (9,1)	-	
2	16 (45,7)	15 (45,5)	-	-
3	17 (48,6)	15 (45,5)	-	
Desconhecido	40	27	-	
Status RE				
Positivo	28 (49,1)	27 (48,2)	1,04 (0,5 - 2,17)	0,923*
Negativo	29 (50,9)	29 (51,8)	1,00	
Desconhecido	18	4	-	
Status RP				
Positivo	22 (40)	24 (43,6)	1,16 (0,54 - 2,48)	0,699*
Negativo	33 (60)	31 (56,4)	1,00	
Desconhecido	20	5	-	
Status C-erbB2				
Positivo	18 (32,7)	16 (28,6)	1,22 (0,54 - 2,73)	0,635*
Negativo	37 (67,3)	40 (71,4)	1,00	
Desconhecido	20	4	-	
Tumor triplo negativo				
Sim	19 (33,3)	16 (28,6)	1,25 (0,56 - 2,78)	0,584*
Não	38 (66,7)	40 (71,4)	1,00	
Desconhecido	18	4	-	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado - CIM (n=75) e CMLA (n=60), Carcinomas Ductais Invasivos (CDI), Carcinomas Lobulares Invasivos (CLI), Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. C-erbB2 (HER2/neu).

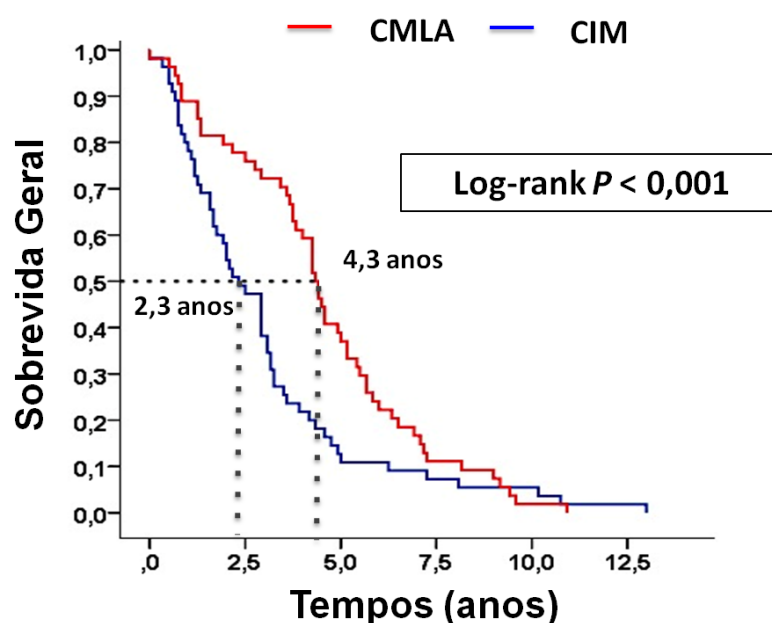
Tabela 3. Comportamento Tumoral Frente ao Tratamento Quimioterápico neoadjuvante e sobrevida geral.

Resposta ao Tratamento	CIM	CMLA	RC (IC 95%)	Valor p
N (%)				
Resposta Clínica a QT				
Resposta Completa	7 (12,7)	11 (20)	0,95 (0,2 – 4,64)	0,568*
Resposta Parcial	35 (63,6)	32 (58,2)	1,64 (0,42 – 6,35)	
Doença Estável	4 (7,3)	6 (10,9)	1,00	
Progressão de Doença	9 (16,4)	6 (10,9)	2,25 (0,44 – 11,52)	
Desconhecido	24	5	-	
Resposta patológica a QT				
Sim	8 (15,7)	8 (15,7)	1 (0,34 - 2,91)	1,000*
Não	43 (84,3)	43 (84,3)	1,00	
Desconhecido	24	9	-	
Recidiva				
Sim	27 (54,0)	20 (39,2)	1,82 (0,83 - 4,01)	0,136*
Não	23 (46,0)	31 (60,8)	1,00	
Desconhecido	25	9	-	
Sobrevida				
Até 2 anos	25 (45,5)	11 (20,4)	14,4 (3,52 – 58,91)	<0,001**
2 a 5 anos	24 (43,5)	23 (42,6)	6,61 (1,72 – 25,37)	
5 a 10 anos	3 (5,5)	19 (35,2)	1,00	
Mais que 10 anos	3 (5,5)	1 (1,9)	19 (1,45 -248,25)	
Desconhecido	20	6	-	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado ** Teste Exato de Fisher CIM (n=61) e CMLA (n=56).

Embora na nossa amostragem não tenhamos observado diferenças com relação a recidivas locoregionais e/ou a distância, as mulheres com CIM claramente sobreviveram menos, de forma que, em 2 anos 45,5% delas já haviam morrido vs. 20,4% do grupo CMLA ($p=0,0002$). Até 5 anos 99,6% das portadoras de CIM já haviam morrido ao passo que no grupo das CMLA esse percentual foi de 63,0%. As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dessas duas populações estão apresentadas na figura 5.

Figura 5. Curva de Kaplan-Meier da sobrevida geral de pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).



	N	Sobrevida Média	Sobrevida (%)		Valor p
			5a	10a	
CIM	55	2,333	12,3	2,7	< 0,001
CMLA	54	4,333	33,6	3,3	

Análise de Kaplan-Meier *log-rank $p < 0,05$, Deconhecido CIM=20, CMLA=6 - Total CIM=75, CMLA=6

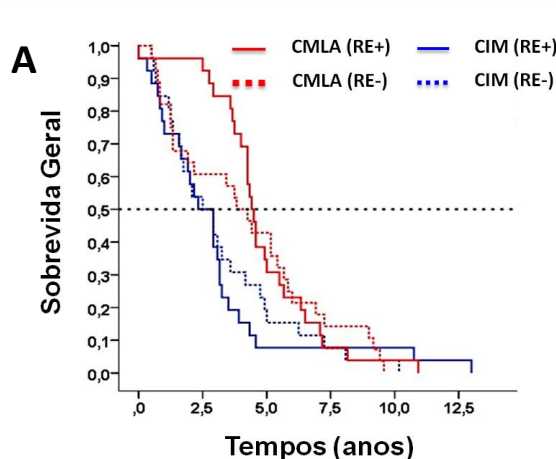
A análise das curvas de sobrevida geral dos pacientes com CIM ou CMLA estratificadas de acordo com os marcadores moleculares (ER, PR, C-erbB2 e triplo negativo) são apresentadas na figura 6. No painel A é possível observar que os pacientes CMLA que são positivos para o receptor de estrógeno (RE+) sobrevivem significativamente mais tempo quando comparado ao grupo CIM também positivos para este receptor (RE+). Em média 50% dos pacientes CMLA (RE+) sobrevivem 4,4 anos diferentemente dos CIM (RE+) cuja a sobrevida média foi de apenas 2,3 anos ($p=0,006$).

No painel B, podemos observar que a expressão do Receptor de Progesterona (PR) não apresenta diferença significativa em relação a sobrevida geral nas duas populações estudadas ($p>0,05$).

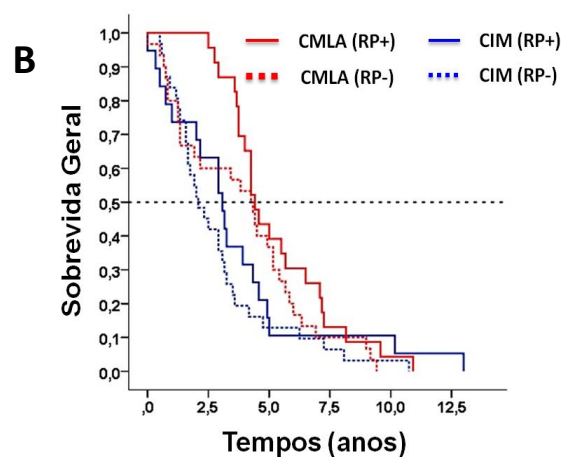
A análise das curvas de sobrevida geral dos pacientes CIM ou CMLA positivos e negativos para o C-erbB2, demonstrada no painel C da figura 6 revelou que os pacientes com CIM que são negativos para C-erbB2 (-) apresentam pior prognóstico quando comparados aos do grupo CMLA. Em média 50% dos pacientes CMLA C-erbB2 (-) sobrevivem 4,4 anos diferentemente dos C-erbB2 (-) do grupo CIM cuja sobrevida média foi de apenas 2,1 anos ($p<0,001$).

Coerentemente, podemos observar no painel D da figura 6. que pacientes CIM triplo negativos também apresentam o pior desfecho quando comparados ao grupo CMLA. De maneira notável a sobrevida média de pacientes CIM triplo negativo é de apenas 2 anos enquanto que nos pacientes CMLA também triplo negativos a sobrevida média é de 3,4 anos ($p=0,049$).

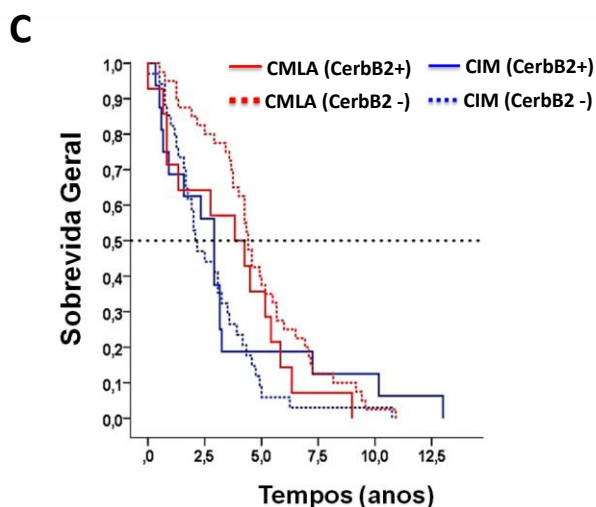
Figura 6. Curvas de sobrevida geral de Kaplan-Meier de pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA). estratificada por marcador biológico (RE, RP, CerbB-2).



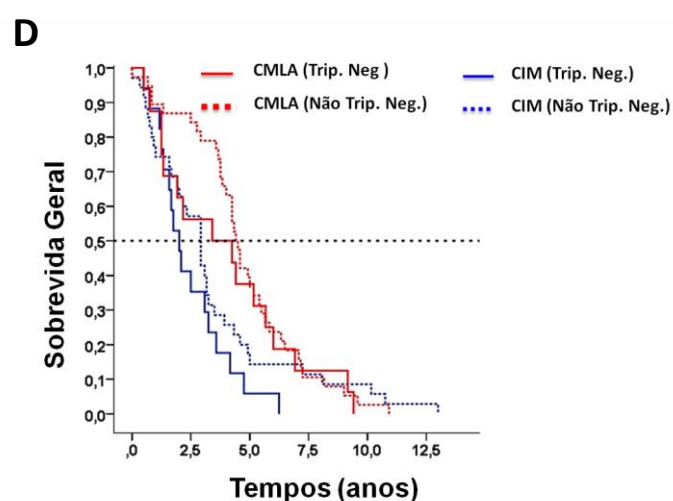
Status RE		N	Sobrevida Média	p
RE +	CIM	26	2,3	0,006
	CMLA	26	4,4*	
RE -	CIM	26	2,5	0,292
	CMLA	28	3,8	



Status RP		N	Sobrevida Média	p
RP +	CIM	19	3,1	0,137
	CMLA	23	4,4	
RP -	CIM	31	2,1	0,193
	CMLA	30	4,3	



Status RP		N	Sobrevida Média	p
CerbB2 +	CIM	16	2,9	0,934
	CMLA	14	3,8	
CerbB2 -	CIM	34	2,1	<0,001
	CMLA	40	4,4*	



Status RP		N	Sobrevida Média	p
Trip. Neg.	CIM	17	2,0	0,049
	CMLA	16	3,4*	
Não Trip. Neg.	CIM	35	2,9	0,105
	CMLA	38	4,4	

Painel A – Pacientes CIM ou CMLA positivos ou negativos para receptor de estrogênio (RE); Painel B - Pacientes CIM ou CMLA positivos ou negativos para receptor de progesterona (RP); Pacientes CIM e CMLA positivos ou negativos para receptor C-erbB2 (HER2); Pacientes CIM e CMLA triplo negativos ou não, Kaplan-Meier *log-rank $p < 0,05$.

5.2 Imunomarcção para NF-kB e IL-18 em amostras de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).

No que diz respeito aos resultados de imunoistoquímica para NF-kB, conforme demonstrado na tabela 4, foi evidenciada imunomarcção positiva (escore 2-3) em 13 (46,4%) dos casos de CIM dos 28 avaliados. Já para os CMLA, foi observada imunomarcção positiva (escore 2-3) em apenas 8 (36,3%) dos casos de CMLA dos 22 avaliados. Quando comparados os dois grupos, não foi observada diferença significativa entre os mesmos ($p>0,05$). A figura 7 apresenta fotomicrográficas representativas da imunomarcção para NF-kB. As cabeças de seta indicam a expressão de NF-kB presentes no tecido tumoral.

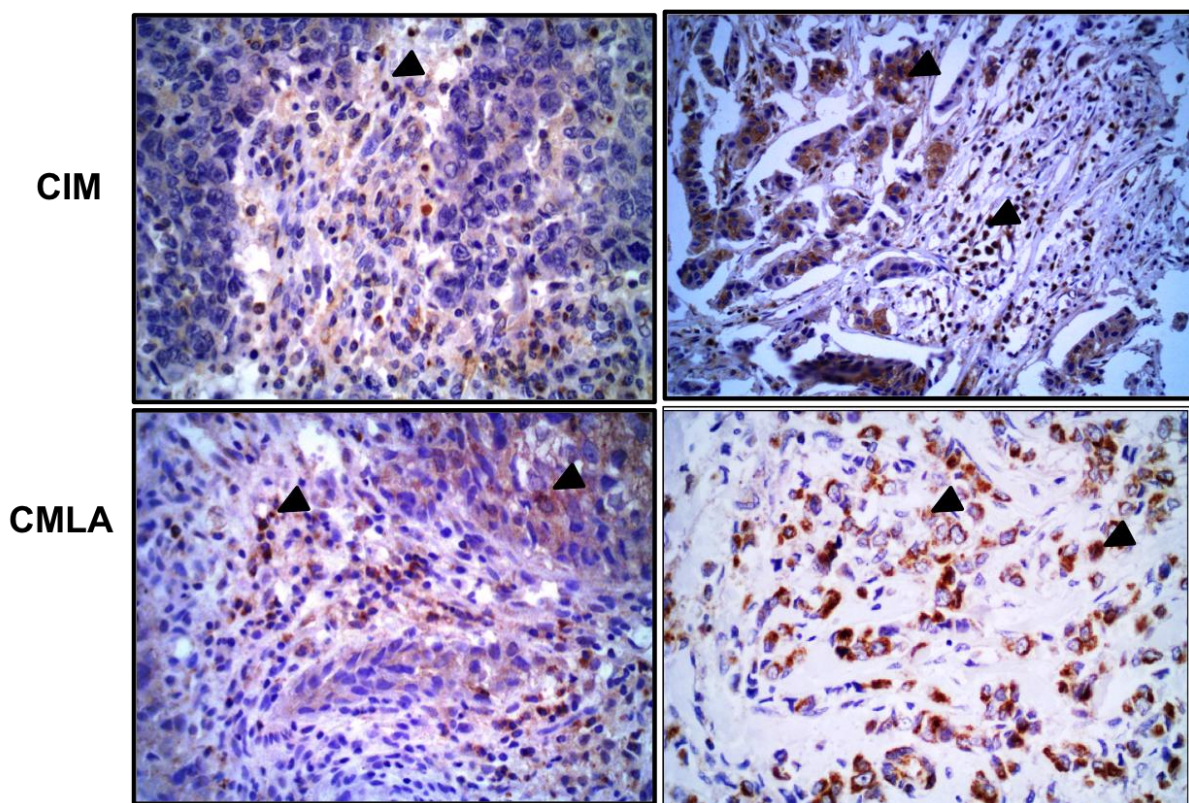
Além disso, a relação entre a expressão do NF-kB com os marcadores moleculares (RE, PR, C-erbB2 e Triplo Negativo), resposta a quimioterapia neoadjuvante e sobrevida geral para os diferentes subtipos de câncer de mama CIM e CMLA foi avaliada mediante testes estatístico de associação. Contudo, não foi possível estabelecer nenhum perfil de relação entre as variáveis estudadas (vide tabelas 5 e 6).

Tabela 4. Imunomarcção para NF-kB no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).

Imunomarcção	Escore		Valor p
	0-1	2-3	
CIM	15 (53,5%)	13 (46,4%)	0,474*
CMLA	14 (63,6%)	8 (36,3%)	

* Teste Qui-quadrado

Figura 7. Imunomarcção para NF-kB em amostras de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).



Fotomicrografias representativas da expressão de NF-kB em amostras de CIM e CMLA, aumento 400 x. As cabeças de seta indicam a expressão de NF-kB presentes no tecido tumoral.

Tabela 5. Associação entre a expressão de NF- κ B com os marcadores moleculares (RE, RP e C-erbB2) no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).

	NF-κB		RC (IC 95%)	Valor p
	Negativo	Positivo		
	(0-1)	(2-3)		
Status RE				
Positivo	11 (39,3%)	12 (63,2%)	1,00	0,108*
Negativo	17 (60,7%)	7 (36,8%)	2,65 (0,8 - 8,81)	
Status RP				
Positivo	10 (35,7%)	9 (47,4%)	1,00	0,424*
Negativo	18 (64,3%)	10 (52,6%)	1,62 (0,49 - 5,31)	
Status C-erbB2				
Positivo	6 (21,4%)	8 (42,1%)	1,00	0,128*
Negativo	22 (78,6%)	11 (57,9%)	2,67 (0,74 - 9,61)	
Triplo negativo				
Sim	12 (42,9%)	5 (26,3%)	2,1 (0,59 - 7,45)	0,247*
Não	16 (57,1%)	14 (73,7%)	1,00	
Razão de Chance (RC). * Teste Qui-quadrado				

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado

Tabela 6. Associação entre a expressão de NF-κB com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).

	NF-κB		RC (IC 95%)	Valor p
	Negativo	Positivo		
	(0-1)	(2-3)		
Resposta clínica QT				
Resposta Parcial	18 (64,3%)	9 (47,4%)	6 (0,54 - 66,17)	0,403**
Resposta Completa	5 (17,9%)	5 (26,3%)	3 (0,23 - 39,61)	
Doença Estável	1 (3,6%)	3 (15,8%)	1,00	
Progressão de Doença	4 (14,3%)	2 10,5%)	6 (0,35 - 101,57)	
Resposta patológica QT				
Sim	4 (16,0%)	4 (23,5%)	1,00	0,694**
Não	21 (84,0%)	13 (76,5%)	1,62 (0,34 - 7,6)	
Recidiva				
Sim	8 (32,0%)	7 (41,2%)	1,00	0,542*
Não	17 (68,0%)	10 (58,8%)	1,49 (0,41 - 5,35)	
Sobrevida				
Até 2 anos	7 (25,9%)	6 (30%)	1,17 (0,12 - 10,99)	0,973**
2 a 5 anos	11 (40,7%)	7 (35%)	1,57 (0,18 - 13,86)	
5 a 10 anos	7 (25,9%)	5 (25%)	1,4 (0,14 - 13,57)	
Mais que 10 anos	2 (7,4%)	2 (10%)	1,00	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado ** Teste Exato de Fisher

Na tabela 7. quanto ao local de expressão de IL-18 pode-se observar que imunomarcação positiva (escore 2-3) para esta citocina, nos casos de CIM, está presente significativamente no estroma tumoral ($p=0,004$). No grupo CMLA foi observado resultado semelhante quanto a localização da IL-18, entre os casos positivos (escore 2-3), foi observada evidente marcação no tecido estromal ($p<0,001$).

Tabela 7. Imunomarcação para IL-18 no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).

Imunomarcação		Escore		Valor p
		0-1	2-3	
CIM	Cel. tumorais	29 (100%)	0 (0%)	0,004**
	Cel. Estroma	21 (75%)	8 (25%)	
CMLA	Cel. tumorais	28 (96,5%)	1 (3,5%)	<0,001**
	Cel. Estroma	12 (50%)	12 (50%)	

** Teste Exato de Fisher

Conforme a tabela 8. quando comparados os dois grupos, não foi possível identificar diferenças significativas em relação a expressão de IL-18 nas células tumorais ou no estroma das duas populações estudadas. Entretanto, embora não significativo ($p=0,093$), observa-se um maior percentual de imunomarcação de IL-18 no estroma tumoral para os CMLA 12 de 24 casos (50% dos casos) vs. CIM 8 de 29 casos (27,6% dos casos) ($p>0,05$).

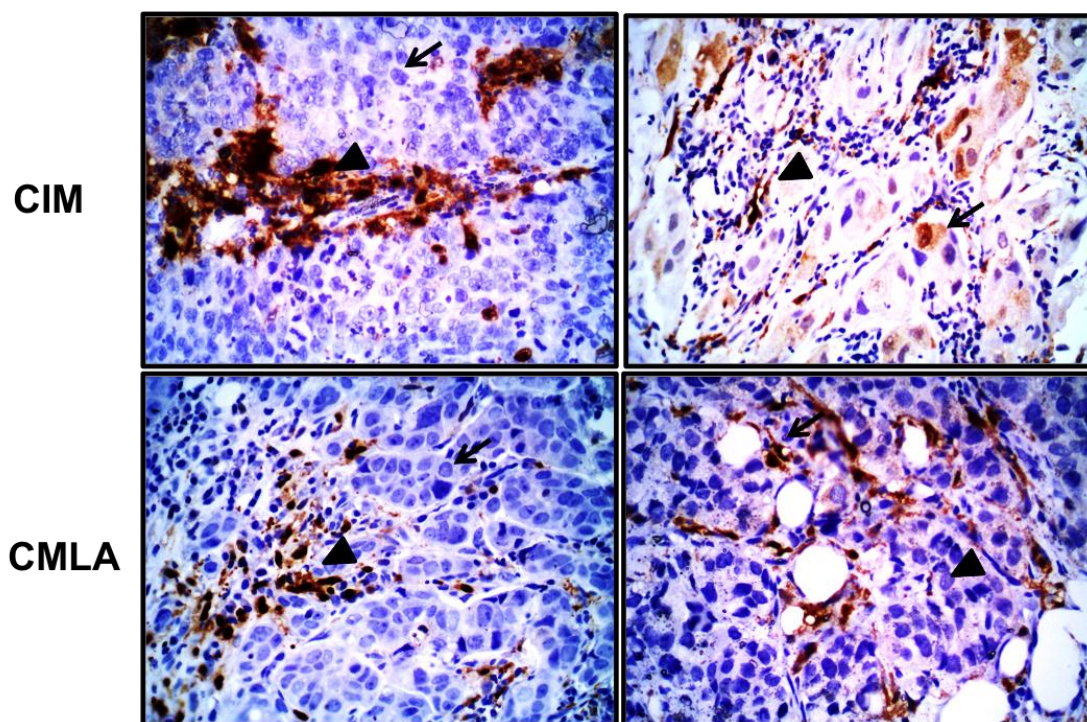
Tabela 8. Imunomarcacão para IL-18 nas células tumorais e no estroma do Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).

Imunomarcacão		Escore		Valor p
		0-1	2-3	
Cel. Tumorais	CIM	29 (100%)	0 (0%)	0,31*
	CMLA	28 (96,5%)	1 (3,5%)	
Cel. Estroma	CIM	21 (72,4%)	8 (27,6%)	0,093*
	CMLA	12 (50%)	12 (50%)	

* Teste Qui-quadrado

Na figura 8 pode-se observar fotomicrográficas representativas da imunomarcacão para IL-18 nas amostras de CIM e CMLA. A seta indica a expressão de IL-18 nas células tumorais e as cabeças de seta indicam a expressão de IL-18 nas células do estroma tumoral.

Figura 8. Imunomarcacão para IL-18 em amostras de Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) do Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).



Fotomicrografias representativas da expressão de IL-18 em amostras de CIM e CMLA, aumento 400 x. A seta indica a expressão de IL-18 nas células tumorais e as cabeças de seta indicam a expressão de IL-18 nas células do estroma tumoral.

Além disso, a relação entre a expressão de IL-18 com os marcadores moleculares (RE, PR, C-erbB2), resposta a quimioterapia neoadjuvante e sobrevida geral para os diferentes subtipos de câncer de mama CIM e CMLA foi avaliada mediante testes estatístico de associação. Contudo, não foi possível estabelecer nenhum perfil de relação entre as variáveis estudadas (vide tabelas 9 e 10). Entretanto, curiosamente pode-se observar na tabela 10, que a positividade para IL-18 (escore 2-3) parece estar relacionada com resposta clínica completa e parcial a soma das porcentagem chega a 90% dos casos (18 dos 20 casos positivos para IL-18) vs. 70,4% dos negativos (escore 0-1), mas a análise estatística o valor de p foi apenas limítrofe ($p=0,061$)

Tabela 9. Associação entre a expressão de IL-18 com os marcadores moleculares (RE, RP e HER2) no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não inflamatório (CMLA).

	IL-18		RC (IC 95%)	Valor p
	Negativo	Positivo		
	(0-1)	(2-3)		
Status RE				
Positivo	12 (48%)	9 (45%)	1,13 (0,35 - 3,67)	0,841*
Negativo	13 (50,9%)	11 (55%)	1,00	
Status RP				
Positivo	10 (40%)	8 (40%)	1 (0,3 - 3,32)	1,000**
Negativo	15 (60%)	12 (60%)	1,00	
Status C-erbB2				
Positivo	8 (32%)	6 (30%)	1,1 (0,31 - 3,92)	0,885*
Negativo	17 (68%)	14 (70%)	1,00	
Triplo Negativo				
Sim	7 (28%)	9 (45%)	2,1 (0,61 - 7,27)	0,236*
Não	18 (72%)	11 (55%)	1,00	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado ** Teste Exato de Fisher

Tabela 10. Associação entre a expressão de IL-18 com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral no Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e Carcinoma Localmente Avançado Não Inflamatório (CMLA).

	IL-18		RC (IC 95%)	Valor p
	Negativo	Positivo		
	(0-1)	(2-3)		
Resposta clínica QT				
Resposta Completa	3 (11,1%)	6 (30%)	0,5 (0,05-5,51)	0,061**
Resposta Parcial	16 (59,3%)	12 (60%)	1,33 (0,16 – 10,87)	
Doença Estável	2 (7,4%)	2 (10%)	1,00	
Progressão de Doença	6 (22,2%)	-	-	
Resposta patológica QT				
Sim	4 (16%)	4 (23,5%)	1,00	0,694**
Não	21 (84%)	13 (76,5%)	1,62 (0,34 - 7,6)	
Recidiva				
Sim	12 (50%)	7 (38,9)	1,57 (0,45 - 5,43)	0,474*
Não	12 (50%)	11 (61,1%)	1,00	
Sobrevida				
Até 2 anos	10 (38,5%)	4 (20%)	2,81 (0,63 - 12,61)	0,210**
2 a 5 anos	8 (30,8%)	9 (45%)	1,00	
5 a 10 anos	8 (30,8%)	5 (25%)	1,8 (0,41 - 7,81)	
Mais que 10 anos	0 (0%)	-	-	

Razão de Chance (RC), * Teste Qui-quadrado ** Teste Exato de Fisher

Discussão

6. DISCUSSÃO

Na presente investigação foram avaliadas a imunoexpressão do fator de transcrição NF-kB e da citocina IL-18 em amostras teciduais obtidas de Carcinomas Inflamatórios da Mama (CIM) as quais foram confrontadas com a imunomarcagem de amostras de Carcinomas da Mama Localmente Avançado não inflamatório (CMLA). Partiu-se da premissa de que o NF-kB, que é um fator de transcrição para a maioria das citocinas pró-inflamatórias conhecidas incluindo-se TNF- α , IL-1, IL-8, IL-6 e a própria IL-18, pudessem estar superexpressas nos CIM e em menor extensão nos CMLA. A mesma hipótese foi levantada em relação à expressão de IL-18. Outro objetivo a permear o presente estudo seria avaliar a correlação entre os achados imunoistoquímicos associados a expressão de NF-kB e IL-18 com a presença de biomarcadores clássicos do câncer de mama (RE, RP, C-erbB2) e adicionalmente, confrontá-los com os dados associados ao comportamento tumoral em resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante e a sobrevida geral.

A análise dos dados demográficos aqui apresentados, mostrou que não há diferença entre os grupos CIM e CMLA com relação a prevalência dos subtipos de câncer de mama de acordo com as faixas etárias. A média de idade observada nos grupos CIM e CMLA foi de 49 e 51 anos respectivamente. Contudo, em mulheres com até 40 anos foi observado uma razão de chance quase três vezes maior de apresentar CIM, uma vez que, cerca de 25% dos CIM foram diagnosticados em pacientes com até 40 anos contrastando com os 14,3% observados no CMLA na mesma faixa etária.

De acordo com a literatura, comparado aos outros tipos de câncer de mama, o CIM tende a ser diagnosticado em pacientes mais jovens, média de 59 anos comparado com 66 anos para os outros tipos de câncer de mama (Up to Date, 2015). Em uma série de 74 pacientes com CIM relatadas pelo SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) demonstrou-se uma média de idade ao diagnóstico que também não difere entre os grupos apesar de ser mais alta do que a observada no presente estudo, 57,2 anos para CIM e 57,4 anos para CMLA. Contrastando com os nossos resultados, Mejri e colaboradores (2015) observaram uma média de idade entre as mulheres africanas diagnosticadas com CIM de 45 anos e 62% das mesmas foram diagnosticadas antes dos 35 anos.

Ainda em relação aos dados demográficos não foi observada uma diferença entre ter histórico familiar de câncer de mama entre os dois grupos. Entretanto, se considerarmos apenas o câncer de mama independentemente dos seus subgrupos, de fato, aproximadamente 30% das pacientes apresentaram histórico familiar de câncer de mama.

Grandes estudos epidemiológicos não tem reportado uma verdadeira associação familiar para CIM e não parece haver estudos prospectivos adequadamente desenhados para avaliar esta possível associação genética. A literatura reporta que aproximadamente 90% a 95% dos cânceres de mama sejam esporádicos (não familiares) e decorram de mutações somáticas, que ocorrem durante a vida, e que apenas 5% a 10% sejam hereditários (familiares) como as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (BILIMORIA et al., 1995).

Entretanto, em um estudo caso-controle com mulheres paquistanesas foi sugerido que a história familiar de câncer de mama foi significativamente mais proeminente nos casos de CIM do que nos correspondentes CMLA não inflamatórios (20% vs. 5% respectivamente, $p=0,0002$) (AZIZ et al., 2001). Dados semelhantes aos nossos foram encontrados nos registros do *MD Anderson Cancer Center* em que 40% dos pacientes com CIM possuíam história familiar de algum tipo de câncer de mama sendo que em 18% tratava-se de um parente de primeiro grau (ROBERTSON et al., 2010). O mesmo grupo relatou 36% de história familiar para os carcinomas não inflamatórios (ROBERTSON et al., 2010).

Na amostragem aqui apresentada a grande maioria dos carcinomas inflamatórios da mama eram do tipo ductal invasivo - CDI (85,3%) o que, absolutamente, corrobora com os dados da literatura (SUTHERLAND et al., 2010; YAMAUCHI et al., 2012; BERTUCCI et al., 2014).

Em relação a positividade dos biomarcadores (RE, RP e C-erbB2) não foi observada, em nossa amostra diferença significativa entre os dois grupos estudados, o que corrobora com dados de alguns estudos registrados na literatura. Em dados do SEER com uma amostragem de 2384 casos de CIM, foram identificados 48,3% de tumores RE positivos e 36,2% de tumores RP positivos. Em outra série de casos do *MD Anderson Cancer Center* foram identificados 42,9 de positividade para RE e 28,6 para o RP (ROBERTSON et al., 2010; DAWOOD et al., 2011). Uma outra série do *Royal Marsden Hospital* de Londres, evidencia, a partir de uma amostragem de 155 pacientes com CIM, uma positividade para RE e RP de 33% e 9,7% respectivamente. Apesar do trabalho ter sido publicado na *Cancer* causa estranheza o registro de 19,3% de RE e 58,7% de RP desconhecidos (SUTHERLAND et al., 2010).

É importante registrar que a positividade para RE em nossa amostragem foi fator prognóstico positivo para o grupo CMLA quando comparado com CIM RE+, desde que, foi observado uma sobrevida geral significativamente superior neste grupo quando comparado com o grupo CIM RE+ (4,4 vs. 2,3 anos ou 52 vs. 27 meses respectivamente). Dentro do mesmo grupo (CIM ou CMLA) o *status* de RE não impactou na sobrevida. Dados do SEER com 2.237 casos de CIM e 7.985 casos de CMLA mostraram que de fato, os pacientes com CMLA RE+ chegam a ter uma sobrevida significativamente superior (80 meses) e que àqueles pacientes CIM RE+ sobrevivem em média 60 meses (ANDERSON et al., 2003). Torna-se relevante ressaltar nesta grande série do SEER, dois aspectos: 1. a positividade para RE impactou na sobrevida dos dois grupos CMLA e CIM, diferente do nosso estudo; 2. chama atenção o fato da sobrevida dos pacientes americanos ser significativamente superior a dos nossos pacientes nos dois grupos.

Com relação a expressão do C-erbB2, a positividade no CIM e CMLA foi equivalente (32,7% e 28,6% respectivamente). Na série de CIM do *Royal Marsden Hospital* de Londres, evidenciou-se 38% de expressão de C-erbB2 nas amostras (SUTHERLAND et al., 2010), e naquela do *MD Anderson Cancer Center* também de CIM foram identificados 44,3% (Robertson et al., 2010). Em contrapartida, em estudo realizado com mulheres indianas (n=45) foi mostrado 60% de positividade para o C-erbB2 em CIM (AJAY et al., 2014) destoando dos nossos e dos outros resultados.

A ausência de imunexpressão da oncoproteína C-erbB2 impactou de forma significativa na menor sobrevida dos pacientes com CIM em relação ao CMLA (2,1 vs. 4,4 anos ou 25 vs. 52 meses, respectivamente). Da mesma forma a ausência de imunexpressão de C-erbB2 associada a não imunexpressão dos receptores hormonais (RE e RP) também piorou significativamente a sobrevida dos pacientes pertencentes ao grupo CIM quando confrontados ao grupo CMLA (2,0 vs. 4,4 anos ou 24 vs. 52 meses) (DAWOOD et al., 2008; GIANNI et al., 2010).

Há dados na literatura que sustentam a ideia de que a positividade para C-erbB2 nos CIM, na ausência de exposição ao anticorpo anti-C-erbB2 (trastuzumabe) não se constitui em fator prognóstico adverso associado (ZELL et al., 2009; DAWOOD et al., 2008). Diante de exposição ao trastuzumabe, no entanto, o *status* de C-erbB2 confere melhor prognóstico nas mulheres com CIM (DAWOOD et al., 2008; GIANNI et al., 2010).

Outro dado convergente com a vasta literatura relacionada, foi a demonstração, aqui apresentada da pior evolução das pacientes portadoras de carcinomas inflamatórios *versus* aqueles portadores de tumores avançados não inflamatórios, o que culminou com curvas de sobrevida claramente mais desfavoráveis no grupo dos CIM. Em 25 meses (2,3 anos) aproximadamente 50% dos pacientes com CIM estavam mortos, ao passo que, para os CMLA este evento só aconteceu com 51 meses (4,3 anos). Portanto, a curva de sobrevida de *Kaplan-Meier* do CIM foi significativamente inferior ao grupo CMLA com o $p < 0,001$.

Quando comparou-se a curva de *Kaplan-Meier* do CIM da série do presente estudo com algumas publicadas na literatura verificou-se ter havido um pior desfecho para os pacientes aqui apresentados (Sobrevida média de 2,3 anos). Na série do *Royal Marsden Hospital* em Londres com uma amostragem de 155 pacientes a sobrevida média de pacientes com CIM foi de 3 anos e 4 meses. Neste trabalho não foi feita comparação com os avançados localmente não inflamatório. Por outro lado num seguimento de longo prazo envolvendo 107 pacientes com CIM ou CMLA da *Medical Oncology Clinical Research Unit and Surgery Branch do National Cancer Institute* (NCI) foi observado uma sobrevida média de 3,8 anos para o CIM comparado com 5,8 anos para os CMLA.

Levando em consideração as informações supracitadas é importante registrar que apesar de não haver diferença estatística quanto a expressão dos marcadores clássicos (RE, RP e C-erbB2) entre os grupos CIM e CMLA, existe uma clara diferença quanto a sobrevida dos dois grupos (25 meses para CIM vs. 51 meses para CMLA). Com base nestes dados pode-se sugerir que o CIM aparentemente possui um perfil biológico diferenciado do CMLA, o qual, provavelmente não está relacionado com a expressão de RE, RP e C-erbB2, e que novos marcadores e potenciais alvos terapêuticos mais específicos para este subtipo de câncer de mama devem ser estudados. Desta forma, o objetivo primário deste trabalho foi avaliar a expressão do NF- κ B e da IL-18, em amostras humanas de CIM e CMLA.

Contudo, à despeito de haver na literatura ampla descrição do importante papel do NF- κ B na iniciação e progressão do câncer de mama (ZUBAIR e FRIERI, 2013) e de haver uma relação entre a positividade para C-erbB2, a negatividade na expressão de RE e aumento na ativação do NF- κ B (revisado por AHMED et al., 2006), não foi possível estabelecer, na presente

investigação nenhuma correlação com nenhum dos fatores prognósticos classicamente reconhecidos no Câncer de Mama (RE, RP e C-erbB2). Tal ausência de associação foi evidenciada na comparação entre os dois grupos.

Diferente do esperado também não foi possível identificar claramente uma diferença na expressão de IL-18 nas duas populações estudadas. Além disso, neste estudo não foi observada relação entre a expressão de IL-18 com os biomarcadores (RE, RP e C-erbB2), resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida geral dos pacientes com câncer de mama. Contudo, é importante ressaltar que nossa pequena amostragem utilizada na imunoistoquímica para NF- κ B e IL-18 pode ter prejudicado a análise desses resultados.

Curiosamente, não foi possível identificar diferenças entre a marcação de mediadores clássicos da inflamação entre o dito Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM) e o Carcinoma Localmente Avançado do tipo Não Inflamatório (CMLA). Este fato, nos permite propor duas hipóteses: 1. Os achados clínicos clássicos da resposta inflamatória (calor, rubor, e esporadicamente edema) que são utilizados para diferenciar os casos CIM do CMLA parecem ocorrer independentemente de uma resposta inflamatória presente no tecido tumoral. 2. Aparentemente, a maior agressividade do CIM se deva não a participação de mediadores inflamatórios mas ao envolvimento de mediadores anti-inflamatórios (IL-10, TGF- β , células T reguladoras, macrófagos M2, e neutrófilos N2). Estes mediadores são responsáveis por regular o escape da resposta imune considerado hoje um dos fatores responsáveis por facilitar e acelerar a progressão e metastatização do câncer (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). O entendimento do papel desses mediadores poderia auxiliar na identificação de marcadores específicos para o CIM, uma vez que, esse tipo de câncer de mama é marcado pela rápida progressão tumoral e pequeno intervalo livre de doença. Para provar estas hipóteses mais estudos serão realizados.

Em suma, o presente estudo demonstrou que na população estudada aproximadamente um quarto dos casos de CIM ocorrem em mulheres com até 40 anos. Que a sobrevida média é mais desfavorável no grupo dos CIM quando comparado ao CMLA como também evidenciada nos subgrupos RE+, C-erbB2, e triplo negativo. Interessantemente, o tempo de sobrevida média das mulheres com CIM ou CMLA da nossa amostragem apresentou-se claramente inferior ao observado em outras séries realizadas nos EUA. Mas, diferentemente do esperado não foi possível detectar diferenças na expressão de NF- κ B ou IL-18 nos grupos CIM ou CMLA.

7. CONCLUSÕES

1. Não houve diferença quanto a expressão do NF-kB e da IL-18 nos grupos CIM e CMLA;
2. Não foi observado correlação entre a expressão de NF-kB e IL-18 com os marcadores moleculares, resposta a quimioterapia neoadjuvante e a sobrevida de pacientes com câncer de mama.
3. Pacientes portadores de CIM apresentam sobrevida significativamente menor que aqueles com CMLA;
4. Na população aqui estudada um quarto dos casos de CIM aparece em mulheres mais jovens (até 40 anos);

REFERÊNCIAS

ABBAS KB, LICHTMAN AH, PILLA S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AHMED KM, CAO N, LI JJ, et al. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. **Anticancer Res.** v. 26, n.6, p. 4235-43, 2006.

AJCC, Staging System for Breast Cancer 7th Edition, 2010

ALBONI A, et al. Interleukin 18 in the CNS. **J. Neuroinflam.** v. 7, n. 9, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY: Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2015. Disponível online. Acesso em 7/01/2015.

ANDERSON W, SCHAIRER C, CHEN, B, et al. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). **Breast Dis.** v.22, p.9-23, 2005.

ANDERSON WF, CHU KC, CHANG S. Inflammatory Breast Carcinoma and Noninflammatory Locally Advanced Breast Carcinoma: Distinct Clinicopathologic Entities? **J. Clin Oncol.** v. 21, n. 12, p. 2254-2259, 2003.

AZIZ SA, PERVEZ S, KHAN S, et al. Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast. **Breast J.** v.7, n. 6, p. 398-404, 2001.

BAKER RG, HAYDEN MS, GHOSH S. NF-kB, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism.** v. 13, p. 11–22, 2011.

BELL C. *A System of Operative Surgery Founded on the Basis of Anatomy*. Hartford, CT, Hale and Hosmer, 1816.

BERTUCCI F, UENO NT, FINETTI, et al. Gene expression profiles of inflammatory breast cancer: correlation with response to neoadjuvant chemotherapy and metastasis-free survival. **Ann Oncol.** v. 25, n. 2, p. 358-65, 2014.

BERTUCCI, F. et al. Gene Expression Profiling Molecular Subtypes of Inflammatory Breast Cancer. **Cancer Res.** v. 15, n. 65, p. 2170-8, 2005.

BHARTI AC, AGGARWAL BB. Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets. **Biochemical Pharmacology**, v.64, n.5-6, p.883-888, 2002.

BILIMORIA MM, MORROW M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. **Cancer J Clin.** v. 45, p. 263-78, 1995.

BISWAS DK, SHI Q, BAILY S, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci.** v.6, n.101, p.10137-42, 2004.

BISWAS DK, SHI Q, BAILY S, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci.** v. 6, n. 101, p. 10137-42. 2004.

BONNIER P, et al. Inflammatory cancers of the breast: a clinical, pathological, or clinical and pathological definition? **Int J Cancer.** v.62, p.382-385, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/>, Acessado em 15/05/2015.

CABIOGLU N, et al. Expression of growth factor and chemokine receptors: new insights in the biology of inflammatory breast cancer. **Ann Oncol.**, v.18, p.1021-1029, 2007.

CHARIOT KSA. NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 214, 2011.

CHIA SK, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. **Clin Cancer Res**, v.18, n.16, p.4465-72, 2012.

CREAGH EM, CONROY H, MARTIN SJ, Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev.**, v. 193, p. 10-21, 2003.

CSAKI C, MOBASHERI A, SHAKIBAEI M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis Res Ther.** v.11, n.6, p. 165, 2009.

DAWOOD S, BROGLIO K, GONG Y et al. Prognostic significance of HER-2 status in women with inflammatory breast cancer. **Cancer.** v. 112, n. 9, p. 1905–1911, 2008.

DAWOOD S. et al. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 515-523, 2011.

DE LA GARZA-SALAZAR JG, et al. (eds.), **Inflammatory Breast Cancer**. Springer-Verlag London, p.29-50, 2013.

DINARELLO CA. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. **Am J Clin Nutr**, v. 83, p. 447–55, 2006.

DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch.** v. 446, n. 5, p. 475-82, 2005.

DOYLE SL, O'NEILL LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem Pharmacol.** v. 30, n. 72, p. 1102-13, 2006.

EROĞLU A, AYDIN F. Management of non-inflammatory locally advanced breast cancer: focus on surgical approaches. **Experimental oncology**, v.35, n.4, p. 272-279, 2013.

GAMBLE C, MCINTOSH K, SCOTT R, et al. Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *Br J Pharmacol.* v. 165, n. 4, p. 802-19, 2012.

GARG A, AGGARWAL BB. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. **Leukemia.** v.16, n. 6, p.1053, 2002.

GIANNI L, EIERMANN W, SEMIGLAZOV V et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. **Lancet**. v.375, n. 9712, p. 377–384, 2010.

GILMORE TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v.18, n.49, p.6842-4, 1999.

GIULIANI C, NAPOLITANO G, BUCCI I, et al. Nf-kB transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *Clin Ter*. v. 152, p. 249-53, 2001.

GOGIA A, RAINA V, VISHNU D. Inflammatory Breast Cancer: a Single Centre Analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 15, n. 7, p. 3207-3210, 2014.

GONZALEZ-ANGULO AM, et al. p53 expression as a prognostic marker in inflammatory breast cancer. **Clin Cancer Res**. v.10, p.6215-6221, 2004.

GUÉRIN M, SHENG ZM, ANDRIEU N, et al. Strong association between c-myc and oestrogen-receptor expression in human breast cancer. **Oncogene**. v.5, p.131-13, 1990.

HAAGGENSEN C. Inflammatory Carcinoma. **Disease of the Breast**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.576-584, 1971.

HANAHAN e WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, n. 4, 2011.

HANCE KW, et al. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the Surveillance, Epidemiology and End Results Program at the national Cancer Institute. **J Natl Cancer Inst**, v.97, p.966-975, 2005.

HARVEY HA, et al. Estrogen receptor status in inflammatory breast carcinoma. **J Surg Oncol.**, v.21, p.42-44, 1982.

ILIOPOULOS D, HIRSCH HA, STRUHL K. et al. An epigenetic switch involving NF-κB, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell.**, v.139, n.4, p.693-706, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Atlas da Mortalidade**. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Banco de dados atualizado em 18/07/2013 (<http://www.datasus.gov.br>).

KLEER CG, et al. WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res**. v.6, p. 110-115, 2004.

KUERER HM, et al. Neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast carcinoma: conceptual basis and fundamental surgical issue. **J Am Coll Surg**, v.190, p.350-63, 2000.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, ASTER JC. Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUMAR V. et al. **Acute and Chronic Inflammation**. In: ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease Ninth Edition, 2015, Chap 2: acute and chronic inflammation, pg 47-86, Elsevier-Saunders, USA.

LEE B, TANNENBAUM E. Inflammatory carcinoma of the breast. **Surg Gynecol Obstet.**, v.39, p.580-595, 1924.

LEE MC, NEWMAN LA. Management of patients with locally advanced breast cancer. **Surg Clin N Am**, v.87, p.379-98, 2007.

LEREBOURS F, et al. NF-kappa B genes have a major role in inflammatory breast cancer. **BMC cancer**, v.8, n.1, p.41, 2008.

LI X, SU J, CUI X, LI Y, et al. Can we predict the effects of NF-kappaB inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate. **Expert Opin Investig Drugs**. v.18, n. 8, p. 1047-60, 2009.

LING Y, et al. Discovery of IL-18 as a novel secreted protein contributing to doxorubicin resistance by comparative secretome analysis of MCF-7 and MCF-7/Dox. **PloS one**, v. 6, n.9, p.24684, 2011.

MATTHEW S, HAYDEN, GHOSH S. Signaling to NF-kB. **Genes Dev**. v. 15, n. 18, p. 2195-224, 2004.

MEJRI N, BOUSSEN H, LABIDI S, et al. Inflammatory Breast Cancer in Tunisia from 2005 to 2010: Epidemiologic and Anatomoclinical Transitions from Published Data. **Asian Pac J cancer Prev**. v.16, n. 3, p. 1277-80, 2015.

MENARD JP, et al. Sentinel lymphadenectomy for the staging of clinical axillary node-negative breast cancer before neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Surg Oncol**. v.35, p.916-20, 2009.

MERAJVER S, SABEL MS. **Inflammatory breast cancer**. In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, C.K. Diseases of the breast. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.

METEOGLU I, et al. NF-KappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. **J Exp Clin Cancer Res**. v. 19, n. 27 p. 53, 2008.

MOLL UM, RIOU G, LEVINE AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc Natl Acad Sci**, v.89, n.15, p.7262-7266, 1992.

MOURALI, N. et al. Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. **Cancer**, v.46, p.2741-2746, 1980.

NAOTO TU, CRISTOFANILLI M. Inflammatory Breast Cancer: An Update. Houston, TX, USA. Springer Science+Business Media B.V. 2012

NICOLINI A, CARPI A, ROSSI G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.17, n.5, p.325-337, 2006.

NOLAN KF, DAVID R, WALDMANN H. The Human Interleukin 18 Gene IL18Maps to 11q22. 2-q22. 3, Closely Linked to the DRD2 Gene Locus and Distinct from Mapped IDDM Loci. **Genomics**, v.51, n.1, p.161-163, 1998.

OKAMURA H, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. **Nature**, v.378, n.6552, p.88-91, 1995.

OZMEN V, et al. Axillary sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy. **EJSO**, v.36, p.23-9, 2010.

PAIK S, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v.351, n.27, p.2817-26, 2004.

PALMA G, et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v.1836, n.2, p.296-303, 2013.

PARK S, CHEON S, CHO D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. **Cell Mol Immunol**, v.4, n.5, p.329-335, 2007.

PEROU CM, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. v.17, n.406, p.747-752, Aug. 2000.

PRAT A, et al. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.135, n.1, p.301-6, 2012.

ROBERTSON FM, et al. Inflammatory Breast Cancer: The Disease, the Biology, the Treatment. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v.60, p.351-375, 2010.

SEER Cancer Statistics Factsheets: Breast Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> visualizado em 20/04/2015

SEN R, BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v.46, n.5, p.705–16, 1986.

SIEGEL RL, MA J, ZOU Z, et al. Cancer Statistics 2014. **Ca Cancer J Clin**, v.64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SINACHI M, et al. Pattern of care in locally advanced breast cancer: focus on local therapy. **The Breast**, v.20, p.145-50, 2011.

SORLIE T, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.10869-10874, 2001.

SOTIRIOU C, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **J Natl Cancer Inst**, v.98, n.4, p.262-72, 2006.

SRABOVIĆ N, et al. Interleukin 18 expression in the primary breast cancer tumour tissue. **Official Publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton Bosnia and Herzegovina**, v.8, n.1, p.109, 2011.

STEVEN VL. et al. Nuclear Factor- κ B Signature of Inflammatory Breast Cancer by cDNA Microarray Validated by Quantitative Real-time Reverse Transcription-PCR, Immunohistochemistry, and Nuclear Factor- κ B DNA-Binding. **Clin Cancer Res**, v.12, n.1, p.3249, 2006.

SUTHERLAND S. et al. Inflammatory breast cancer—The Royal Marsden Hospital experience. **Cancer**, v.116, n.S11, p.2815-2820, 2010.

TAYLOR G, MELTZER A. Inflammatory carcinoma of the breast. **Am J Cancer**, v.33, p.33-49, 1938.

TEWARI M, KRISHNAMURTHY A, SUKLA HS. Breast conservation in locally advanced breast cancer in developing countries: wise or waste. **Surg Oncol.**, v.18, p.3-13, 2009.

THORNBERRY NA, BULL HG, CALAYCAY JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. **Nature**, v. 356, p. 768-774, 1992.

TORRE L, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2012, **Ca Cancer J Clin.** v. 65, p. 87–108, 2015.

TRYFONIDIS K, SENKUS E, CARDOSO MJ, et al. Management of locally advanced breast cancer-perspectives and future directions. **Nat Rev Clin Oncol.**12(3), 147-62. 2015

VAN DE VIJVER MJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med.**, v.347, p.1999-2009, 2012.

VAN GOLEN KL, et al. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. **Neoplasia.** v.2, 418-425, 2000.

VAN GOLEN KL, et al. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. **Cancer Res.**, v.60, p.5832-5838, 2000.

VAN LAERE STEVEN et al. Distinct Molecular Signature of Inflammatory Breast Cancer by cDNA Microarray Analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 93, n., pp 237-246, 2005.

VAN'T VEER LJ. et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v.5, n.1, p.57-8, 2003.

VERMEULEN PB, et al. Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern and tumor emboli in inflammatory breast cancer. **Cancer**, v.116, n.11, p.2748-2754, 2010.

WALSHE JM, SWAIN SM. Clinical aspects of inflammatory breast cancer. **Breast Dis.**, v.22, p.35-44, 2005.

XAVIER, D. et al. NF-kB in development and progression of human cancer. **Virchows Arch**, v.446, p.475-482, 2005.

YAMAUCHI H. et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. **The oncologist**, v.17, n.7, p.891-899, 2012.

ZELL JA, TSANG WY, TAYLOR TH et al. Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. **Breast Cancer Res.** v. 11, n. 1 p. 19, 2009.

ZELL, J.A. et al. Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. **Breast Cancer Res.** v. 11, n.1, 2009.

ZUBAIR A, FRIERI M. Role of nuclear factor- κ B in breast and colorectal cancer. **Curr Allergy Asthma Rep.** v. 13, n. 1, p. 44-9, 2013.

ANEXO A - ESTADIAMENTO CLÍNICO (AJCC, 2010) DO CÂNCER DE MAMA**CLASSIFICAÇÃO TNM**

T1 ≤ 2 cm

T1mi – microinvasão ≤ 0,1 cm

T1a > 0,1 e ≤ 0,5 cm

T1b > 0,5 e ≤ 1 cm

T1c > 1 e ≤ 2 cm)

T2 > 2 e ≤ 5 cm

T3 > 5 cm

T4:

T4a - qualquer tamanho, com extensão direta para a parede torácica, não incluindo músculo Peitoral Maior

T4b - qualquer tamanho, com extensão direta para a pele. Ulceração, nódulos satélites, Edema incluindo peau d'orange, sem critérios para carcinoma inflamatório

T4c - **T4a** e **T4b**

T4d - câncer inflamatório.

N0: sem metástase regional

N1: metástase para linfonodos (LNs) axilares ipsilaterais móveis

N2a: metástase para LNs axilares ipsilaterais fixos entre eles ou a outras estruturas

N2b: metástase clinicamente aparente apenas em LNs da cadeia mamária interna ipsilateral, na ausência de metástase clinicamente aparente na cadeia axilar

N3a: metástase para LNs da cadeia infraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar

N3b: metástase clinicamente aparente na cadeia mamária interna ipsilateral, na presença de metástase clinicamente positiva na região axilar

N3c: metástase na cadeia supraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento da cadeia axilar ou mamária interna

M1: metástase à distância

ESTÁDIO

Zero	Tis	N0	M0
IA	T1 (inclui T1mi)	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	qqT	N3	M0
IV	qqT	qqN	M1

ANEXO B - Aprovação do CEP do Instituto do Câncer do Ceará - ICC

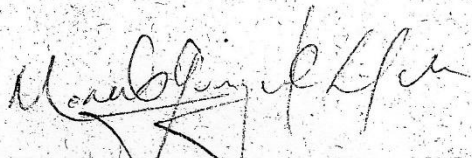
Fortaleza, 25 de julho de 2011.

Processo 073/2008 - Novos marcadores no carcinoma inflamatório da mama: avaliação do papel de citocinas TNF - alfa, IL-12 e IFN-gama, respectivos receptores *Toll-like*.

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Informamos que o projeto de sua responsabilidade, acima referenciado, foi apresentado em reunião do CEP, de 27/01/2008, merecendo o seguinte parecer: **aprovado**.

Atenciosamente,

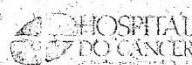


Prof. Dr. Marcelo Gurgel Carlos da Silva
Presidente

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Instituto do Câncer do Ceará - ICC

R. Papi Júnior, 1222 - Rodolfo Teófilo
Fone: (85) 3288.4400 | Fax: (85) 3281.2865
CEP: 60.430-230 - Fortaleza/CE

Escola Cearense de Oncologia - ECO
Fone/Fax: (85) 3288.4653



ANEXO C - Aprovação do CEP do Hospital Geral de Fortaleza

GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Saúde - SESA

SUS

Sistema
Único de
Saúde

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE/CE
HGF
HOSPITAL
GERAL
DE FORTALEZA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 12 de Março de 2012.

Ilmo. Sr. comunicamos-lhe o parecer do CEP

Pesquisador: **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**

Projeto Intitulado: **Expressão de mediadores inflamatórios no carcinoma inflamatório da mama**

Área de conhecimento: **Ciências da Saúde / Medicina**

Entrada no CEP: **26/01/12**

Protocolo do CEP: **290201/12**

Objetivo geral: Avaliar a expressão de mediadores inflamatórios em amostras humanas de carcinoma inflamatório da mama, carcinoma de mama localmente avançado não-inflamatório, mastite e amostras de tecido mamário sem patologia obtidas durante mamoplastia. Trata-se de uma pesquisa clínica (ensaio histoquímico) a ser realizada no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Instituto do Câncer do Ceará. O projeto tem parecer do CEP – ICC.

*Declaramos ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessário para a garantia de tal segurança e bem-estar. Diante disso, acrescentamos que a referida pesquisa tem muita relevância, é tecnicamente factível, portanto o projeto foi **aprovado** em reunião ordinária no dia 29/02/2012.

Atenciosamente,


Dr^a Maria Veraci Oliveira Queiroz
Coordenadora do Comitê de Ética do HGF/CEP