



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MARIANA TIMBAÚBA BENÍCIO COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR
DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) NO CARCINOMA
INFLAMATÓRIO DA MAMA**

FORTALEZA - CE
2024

MARIANA TIMBAÚBA BENÍCIO COELHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR
DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) NO CARCINOMA
INFLAMATÓRIO DA MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: oncologia

Orientadora: Prof.^a. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Choquenaira Quispe

FORTALEZA - CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C618a Coelho, Mariana.
Avaliação da expressão do receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE) no carcinoma inflamatório da mama / Mariana Coelho. – 2024.
49 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong.
Coorientação: Profa. Dra. Célia Choquenaira Quispe.
1. Doença inflamatória. 2. Inflamação. 3. Câncer de mama. 4. Receptor de produtos finais de glicação avançada. I. Título.

CDD 571.9

MARIANA TIMBAÚBA BENÍCIO COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR
DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) NO CARCINOMA
INFLAMATÓRIO DA MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: oncologia

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Célia Choquenaira Quispe
Universidad Católica de Santa María (UCSM)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a. Dra. Sara Maria Moreira Lima Verde
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico esse estudo às pacientes do Instituto do
Câncer do Ceará. Minha gratidão e respeito.

AGRADECIMENTO

À Deus pela Misericórdia e por me lembrar através de Sua palavra, que nunca estou sozinha. A Ele toda honra e glória para todo o sempre!

À Nossa Senhora de Fátima por Sua imensa proteção e ao guardião celeste São Miguel Arcanjo, que esteve ao meu lado nas batalhas o qual enfrentei e tencionava desistir. As minhas lágrimas são demonstrações de gratidão e muito amor!

Aos meus pais, Maninho e Berenice, por me conduzirem nos caminhos do saber, afirmando sempre com humildade e sabedoria, que a maior herança ofertada para os filhos eram por meio dos livros! Amo vocês!!!

À minhas irmãs Paula e Paloma, pelas orações e companheirismo. Gratidão!

Aos meus pequenos amáveis sobrinhos... que renovam minhas forças, me enchendo de paz e alegria através das travessuras inocentes, risos e beijinhos.

Ao Rocha Neto, por todo incentivo de encorajamento e confiança na minha vida profissional.

Às pacientes do Instituto do Câncer do Ceará, que algumas foram minhas pacientes na Residência de Oncologia do Hospital. Mulheres resilientes e cheias de lições de vida. Sem vocês, essa pesquisa não seria possível. Minha gratidão e respeito!!!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Deysi Wong, por ser exemplo de dedicação e profissionalismo, que, de maneira sábia, me acompanhou durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho, partindo de seus conhecimentos e humildade. Obrigada professora! Que Deus te abençoe sempre.

Às professoras participantes da minha banca examinadora: Dra. Célia Choquenaira, Dra. Katharine Gurgel, Dra. Vilma de Lima e Dra. Sara Moreira, pelas valiosas considerações, enriquecendo ainda mais a nossa pesquisa científica. Gratidão!

A coordenadora do Programa de Patologia Dra. Cristiane Frota, por toda paciência e incentivo.

Aos colegas em especial Camylla Almeida, Jordana Valente, Darla Aguiar, Jussara Rodrigues, Isabelle de Fátima, Célia Quispe e Aurilene Cajado, Breno Abucater pelos momentos de conversas, partilhas, anseios e alegrias vividos ao longe desses anos. Que amizade ultrapasse as paredes da Universidade.

Agradeço toda parceria e companheirismo da minha equipe de pesquisa: Bianca de Souza, Darla Aguiar, Larissa Monta'Ivrene, Ana Caroline Teles e Pedro Ruan Amorim. Essa conquista também é de vocês. Muito obrigada!!!

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), por toda ajuda nos experimentos e por serem exemplos de pesquisadores dedicados à ciência, mesmo com tantas dificuldades e pouco reconhecimento nesse País.

A toda equipe de funcionários do ICC pela parceria, em especial a patologista do ICC, Dra. Maria do Perpétuo Socorro (Dra. Patty) pela leitura histológica e toda disponibilidade quando precisei.

Ao Instituto do Câncer do Ceará (ICC) pela autorização para concretizar a pesquisa e reconhecendo a importância para a medicina.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará por toda a atenção despendida, em especial ao técnico de patologia Francisco Deomar Maciel da Silva, pela ajuda quando necessitei dos cortes histológicos. Obrigada!

O presente trabalho foi financiado pelas Agências Financiadoras brasileiras, a citar Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Edital Universal MCTI Grant # 428354/2016-5 coordenado pela Profa. Deysi Wong e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP) - Edital PPSUS – Grant # P20-0171-00121.01.00/20 coordenado pelo Prof. Roberto César Lima-Júnior.

Agradeço a FUNCAP pelos meses de bolsa de estudos concedidos durante o mestrado.

Muito obrigada a todos que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho, porque pesquisa não se faz sozinha, e a colaboração/apoio é a chave para a evolução do conhecimento.

“É justo que muito custe o que muito vale”
(Santa Teresa d’Ávila).

RESUMO

O Carcinoma Inflamatório de Mama (CIM) possui manifestação clínica agressiva do câncer de mama que cursa com sinais de inflamação, o que dificulta o diagnóstico precoce, e com acentuada evolução e de baixa taxa de sobrevida. Pode ainda observar características distintas, como: vias de sinalização celular alteradas e maior frequência de mutações somáticas. Assim, o *Receptor for Advanced Glycation End-products* (RAGE) emerge nesse cenário apresentando alta expressão em tumores agressivos, como o carcinoma triplo negativo, associado, também, a piores resultados clínicos. Objetiva-se avaliar a expressão do RAGE e a sua associação com os marcadores de agressividade tumoral em pacientes com CIM. Trata-se de um estudo transversal com um grupo caso e outro controle, envolvendo amostras de CIM e Carcinoma Não Inflamatório da Mama (CANI) de 34 pacientes com diagnóstico histopatológico recrutados no período de 2015.1 a 2020.2, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará, sendo estes: 18 diagnosticados com CIM e 16 CANI. Foram realizados cortes histopatológicos de 3 µm em lâminas sinalizadas, seguido de imunofluorescência com anticorpo policlonal anti-RAGE e a expressão de RAGE foi semi quantificada usando o *software* Image J/FIJI. Os dados clínicos, epidemiológicos e patológicos foram coletados e analisados estatisticamente no *software* SPSS, utilizando testes para comparações entre os grupos. O presente estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará sob nº 5.010.710. Os resultados foram expressos com significância estatística ($p < 0,05$). Foi evidenciado maior nível de expressão do RAGE em associação com o Ki67 ($p = 0,034$) e o subtipo CMTN ($p = 0,026$) nos pacientes com CIM quando comparado ao grupo CANI. As fotomicrografias das biópsias apresentaram nichos infiltrativos, nucléolos proeminentes indicativos de carcinoma ductal invasivo de alto grau. Na análise da imunofluorescência do RAGE, evidenciou expressão aumentada ($107,4 \pm 37,9$) no grupo CIM quando comparado às amostras CANI ($78,4 \pm 42,2$). Assim, conclui-se que a marcação do RAGE associado maior índice de proliferação e subtipo molecular triplo negativo, considerado de maior agressividade e de pior prognóstico, o que evidencia a relevância desse receptor na prática clínica e a sua contribuição como biomarcador.

Palavras-chave: Doença inflamatória; Inflamação; Câncer de mama; Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada.

ABSTRACT

Inflammatory Breast Carcinoma (IBC) is a clinically aggressive manifestation of breast cancer characterized by signs of inflammation, which complicates early diagnosis, and by rapid progression and low survival rates. Additionally, IBC may exhibit distinct characteristics, such as altered cellular signaling pathways and a higher frequency of somatic mutations. In this context, the Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) emerges as a significant factor, showing high expression in aggressive tumors like triple-negative carcinoma, which is also associated with worse clinical outcomes. This study aims to evaluate RAGE expression and its association with tumor aggressiveness markers in patients with IBC. This is a cross-sectional study involving a case group and a control group, including samples from IBC and non-inflammatory breast carcinoma (non-IBC) from 34 patients with histopathological diagnoses, recruited between 2015.1 and 2020.2 at Haroldo Juaçaba Hospital/Cancer Institute of Ceará, comprising 18 diagnosed with IBC and 16 with non-IBC. Histopathological sections of 3 μ m were prepared on signalized slides, followed by immunofluorescence with polyclonal anti-RAGE antibody, and RAGE expression was semi-quantified using the Image J/FIJI software. Clinical, epidemiological, and pathological data were collected and statistically analyzed using SPSS software, applying tests for comparisons between groups. This study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Institute of Ceará under No. 5.010.710. Results were expressed with statistical significance ($p < 0.05$). A higher level of RAGE expression was observed in association with Ki67 ($p = 0.034$) and the TNBC subtype ($p = 0.026$) in patients with IBC compared to the non-IBC group. Photomicrographs of the biopsies revealed infiltrative niches and prominent nucleoli indicative of high-grade invasive ductal carcinoma. The RAGE immunofluorescence analysis showed increased expression (107.4 ± 37.9) in the IBC group compared to non-IBC samples (78.4 ± 42.2). Therefore, it is concluded that RAGE expression is associated with a higher proliferation index and the triple-negative molecular subtype, which is considered more aggressive and has a poorer prognosis, highlighting the relevance of this receptor in clinical practice and its potential as a biomarker.

Keywords: Inflammatory diseases; Inflammation; Breast cancer; Receptor for advanced glycation and products; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Êmbolos tumorais de Carcinoma Inflamatório de Mama.....	25
Figura 2 – Vias de sinalização de RAGE.....	27
Figura 3 – Etapas do desenho do estudo.....	30
Figura 4 – Fotomicrografias de amostras de CIM e CANI.....	33
Figura 5 – Fotomicrografias da expressão do RAGE por imunofluorescência em paciente CIM e CANI.....	35
Figura 6 – Quantificação da expressão do RAGE.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos e patológicos dos participantes com CIM e CANI.....	34
Tabela 2 – Análise de associação entre a expressão de RAGE e o CIM e CANI segundo as características clínico e patológicas.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos finais da glicação avançada
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CANI	Carcinoma Não Inflamatório da Mama
CIM	Carcinoma Inflamatório de Mama
CM	Câncer de Mama
CMTN	Câncer de Mama Triplo-negativo
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol,
DIAPH1	Formina 1 diáfana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOCK7	<i>Dedicator of cytokinesis protein</i>
DP	Desvio padrão
ERBB2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
ERK1	Proteína-serina treonina quinase
ERK2	Proteína-serina treonina quinase 1
EUA	Estados Unidos da América
G1	Pré-síntese (cromossomo simples)
G3	Pós síntese (cromossomos duplos)
GM-CSF	Fator estimulante do crescimento de granulócito-macrófago
H&E	Hematoxilina e eosina
HCMV	Células infectadas com citomegalovírus humano
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HMGB1	Grupo 1 de Alta Mobilidade
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IF	Imunofluorescência
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno).

MGO	Metilglioxal
MMP	Matriz do tipo membrana
N	População
n°	Número
N1	Disseminação do tumor para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou linfonodos mamários internos
NF-<i>Kb</i>	Factor nuclear Kappa B
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
P	p valor
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
Ph	Potencial hidrogênio
<i>PIK3CA</i>	Gene Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa
RAGE	Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada
RE	Receptores de Estrogênio
RH	Receptores Hormonais
RHO-GTPases	Pequenas proteínas G sinalizadores.
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP	Receptores de Progesterona
RTK/RAS	Receptor tirosina quinase
S100A8	Proteína codificada pelo gene humano
S100A9	Proteína codificada pelo gene humano
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Srage	Produtos finais de glicação avançada solúvel
T4	Tumor possui qualquer tamanho e invadiu o tórax ou a pele
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TNF	Fator de necrose tumoral
TASY	Software de gestão hospitalar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 Carcinoma inflamatório da mama (CIM).....	21
3.2 Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE).....	25
4 MÉTODOS.....	29
4.1 Tipo e local de estudo.....	29
4.2 População e amostra.....	29
4.3 Critérios de elegibilidade.....	29
4.4 Coleta de dados.....	30
4.4.1 Identificação dos pacientes e demarcação da área tumoral.....	30
4.4.2 Análise histopatológica.....	31
4.4.3 Imunofluorescência para quantificação da expressão de RAGE.....	31
4.5 Análise dos dados.....	32
4.6 Aspectos éticos.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Análise clínica e patológica dos participantes	33
5.2 Imunofluorescência para expressão do RAGE.....	35
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A - CONTROLE NEGATIVO DA MUNOFLUORÊSCENCIA.....	48
ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	49

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico que contempla um grupo de doenças, mais de 100 diferentes tipos, que podem afetar qualquer parte do corpo devido o desenvolvimento rápido, desordenado e incontrolável de células anormais que crescem para além de seus limites, com potencial agressivo na formação de tumores, e que podem envolver tecidos adjacentes ou órgãos à distância. Estima-se que haverá 25 milhões de novos casos, no Brasil, até o ano de 2030. (INCA, 2022), evidenciando o câncer como um problema de saúde pública nacional.

Dentre os diferentes tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama (CM) que corresponde à neoplasia de maior incidência, com elevada taxa de mortalidade, estando no *ranking* dos cânceres mais prevalentes entre as mulheres a nível de Brasil. São esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025, sendo as regiões Sul e Sudeste as mais afetadas, com 71,44/100 mil e 84,46/100 mil casos, respectivamente, seguidos do Centro-Oeste: 57,28/ 100 mil, Nordeste: 52,20/100 mil e Norte: 24,99/100 mil (INCA, 2022), destacando a importância do diagnóstico precoce, devido melhora significativa das chances de sucesso no tratamento e sobrevida. Programas de rastreamento e conscientização são essenciais para a redução da mortalidade e aumento da qualidade de vida. Além disso, avanços na pesquisa de biomarcadores e terapias personalizadas oferecem novas esperanças e opções de tratamento.

Para tanto, o diagnóstico do CM fundamenta-se no exame clínico aliado a estudos de imagem, sendo corroborado pela avaliação histopatológica. É imperativo realizar uma anamnese meticulosa, com ênfase particular no estado menopausal, histórico familiar de CM e ovário, bem como um exame físico abrangente, que incluindo a avaliação das mamas e linfonodos regionais. Simultaneamente, deve-se atentar para sinais e sintomas que possam indicar possíveis sítios de doença metastática. É imprescindível a realização de mamografia bilateral, complementada por ecografia mamária, se necessário (ROSA *et al.*, 2022).

O estadiamento clínico e patológico inclui o estadiamento anatômico, fundamental para considerar o prognóstico do paciente. A utilização de perfis de expressão gênica validados oferece informações prognósticas e preditivas adicionais, auxiliando na tomada de decisões no tratamento adjuvante. Um estadiamento sistêmico preciso é crucial para determinar a extensão da doença, prever o prognóstico e personalizar o tratamento. Recentes avanços na compreensão da biologia do CM devem ser integrados não apenas nas decisões terapêuticas, mas nas recomendações para exames de imagem durante o estadiamento inicial, incluindo a avaliação do risco individual de presença de doença metastática (ROSA *et al.*, 2022). Portanto, é preciso compreender a complexidade que envolve diferentes variáveis, como: localização, tamanho,

volume; extensão, o tipo de tumor; presença de invasão direta e linfática; metástase à distância; diagnósticos histopatológicos; manifestações sistêmicas; sinais e sintomas; sexo e idade do paciente (COSTA *et al.*, 2020).

Entende-se CM como uma doença complexa e heterogênea, descrita por distintas formas moleculares, tipos histológicos e características clínicas que contribuem para o prognóstico da doença, sendo este diretamente relacionado ao fator regressão ou progressão, e que se encontra relacionado com o tratamento optado, a interação com o subtipo molecular e as particularidades do indivíduo, como: idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, aspectos comportamentais e ambientais, genéticos e hereditários (SARTORI; FRASSON, 2015; LUKASIEWICZ *et al.* 2021).

O perfil sociodemográfico das mulheres brasileiras com CM corresponde a idade igual ou superior a 50 anos (66%), não branca (64%), católica (50%), casada ou em união estável (57%), procedente da capital (52%), desempregada (62%), renda familiar entre 1 a 2 salários mínimos (87%) e escolaridade abaixo do ensino médio (53%). Relacionado ao tabagismo e etilismo, possui 28% e 26% da amostra, respectivamente (ROCHA; MARQUES, 2020).

Quando relacionado aos aspectos clínicos epidemiológicos em mulheres brasileiras, foi identificado o carcinoma ductal invasivo como o tipo histológico mais prevalente (95%), com grau histológico 1 ou 2 (57%), receptor hormonal positivo (64%), gene HER 2 negativo (63%), estadiamento T4 (57%) e N1 (56%), sendo esse muito importante para analisar extensão da doença, prognóstico e tratamento individualizado, com metástases principalmente para ossos (57%), pele (44%), linfonodos locorregionais (42%), fígado (38%) e pulmão (37%) (ROCHA; MARQUES, 2020).

Ressalta-se que no CM podem ser identificados: carcinoma inflamatório da mama (CIM), que são inflamatórios devido ao bloqueio por células tumorais nos ductos linfáticos que existem na pele sobre o tecido mamário, gerando sinais de inflamação com presença maciça de êmbolos tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos da derme, onde o eritema apresenta maior frequência de aparição dentre as alterações associadas. Os pacientes com esta condição apresentam sobrevida em cinco anos de 30% a 40%, enquanto os pacientes com o carcinoma de mama não inflamatório (CANI) apresentam índices de 70% a 80% de sobrevida, devido a sua particularidade no que tange a agressividade e evolução (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; HESTER *et al.*, 2021).

Além dos sinais identificados na clínica, o CIM possui características genômicas que os diferenciam do CANI. Os tumores CIM apresentam maior frequência de mutações

somáticas quando comparados aos tumores de CANI. Nesse sentido, pacientes com CIM frequentemente possuem mutações em genes como *TP53*, *PIK3CA* e *ERBB2* e, somado a isso, as vias de sinalização celular têm significativas alterações em seus tumores, podendo influenciar na proliferação descontrolada de células, dando origem a tumores (MATSUDA *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2018).

O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) consiste em um receptor de reconhecimento de padrões multiligantes encontrados em variados estados inflamatórios crônicos (SIMS *et al.*, 2010; KIM; JEONG; JANG, 2021). O RAGE, devido a sua capacidade em se ligar e mediar efeitos dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), pode ligar-se a uma classe diversificada de ligantes não-AGE em decorrência da sua competência de reconhecer ligantes endógenos e exógenos estruturalmente não relacionados, denominando-o receptor de reconhecimento de padrões (PRR) (HUDSON; LIPPMAN, 2018).

Tais ligantes podem ativar diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo de célula e do ligante, como as proteínas de alta mobilidade do grupo (HMG), proteínas S100/calgranulinas, beta amiloide (A β), entre outros. Em sua maioria, podem ser definidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), induzindo uma resposta pró-inflamatória (PRUNEDA, 2021), atuando como sensor imunológico inato, incluindo endotoxinas bacterianas, vírus respiratórios e DNA microbiano (HUDSON; LIPPMAN, 2018)

Essas descobertas sinalizam para a importância de serem consideradas as heterogeneidades genômicas de CIM, especialmente em subgrupos específicos, a exemplo do tumor de mama triplo negativo (CMTN) e HER2+, dos quais associam-se a pior sobrevida livre de metástase (MATSUDA *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2018). Embora seja considerado um fator clínico patológico distinto, esta doença mostra heterogeneidade morfológica (tipo histológico, grau infiltrado inflamatório) e molecular com *status* do receptor de hormônio e subtipos moleculares intrínsecos. O receptor de HER2 e triplo negativo são frequentes, com estimativa em 40% nos tumores HER2 (LIM *et al.*, 2018; SEUNG *et al.*, 2022).

O receptor HER2 atua como oncogene e sua amplificação gera superexpressão da proteína HER2, um receptor quinase transmembrana. Esta expressão anormal ocasiona ativação constitutiva de vias de sinalização a jusante, promovendo a proliferação de células tumorais. A presença de HER2 positivo está associada a mau prognóstico, com recorrência precoce e doença metastática. Portanto, a sua descoberta como alvo terapêutico acionável, altamente sensível, foi considerada um grande avanço para o tratamento do CM (SWAIN; SHASTRY; HAMILTON,

2023) e a compreensão das variações genômicas entre CIM e CANI podem contribuir para a inovação terapêuticas mais eficazes no tratamento.

O desenvolvimento desse estudo foi motivado, inicialmente, pela participação no grupo de farmacologia da inflamação e do câncer, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em colaboração ao Instituto do Câncer do Ceará (ICC) e por entender que o câncer de mama permanece como uma das principais causas de mortalidade entre mulheres globalmente, sublinhando a necessidade de identificar biomarcadores e alvos terapêuticos que possam aprimorar o seu diagnóstico, prognóstico e/ou tratamento. Neste contexto, o RAGE tem emergido como um potencial mediador da progressão tumoral, desempenhando um papel multifacetado em diversas vias celulares, o que evidencia a relevância do estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) e a sua associação com os marcadores de agressividade tumoral em pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama (CIM).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil clínico dos pacientes com Carcinoma Inflamatório da Mama e Carcinoma Não Inflamatório da Mama;
- Quantificar o percentual de expressão do RAGE em amostras de Carcinoma inflamatório ou não inflamatório da mama;
- Verificar a associação entre a expressão de RAGE e os dados patológicos dos pacientes em estudo

3 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer consiste em um tumor maligno que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças e que comumente apresentam o crescimento desordenado de células anormais com capacidade para invadir tecidos e espalhar-se para outras regiões do corpo humano por meio dos vasos sanguíneos. São estimados 25 milhões de novos casos, no Brasil, até o ano de 2030. Entretanto, no ano de 2023, foram previstos os principais tipos de câncer e a sua incidência relacionada ao sexo nos seres humanos, conforme apontam os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2022).

Espera-se 704 mil casos novos de câncer para o triênio 2023-2025, com 70% dos casos previstos para as regiões Sul e Sudeste, respectivamente 71,44/100 mil e 84,46/100 mil. Entretanto, apresenta números expressivos nas demais regiões, como: Centro-Oeste com 57,28/100 mil, Nordeste: 52,20/100 mil e Norte: 24,99/100 mil. Excetuando o câncer de pele não melanoma, ocorrerão 483 mil casos novos (INCA, 2022). O CM feminina e o de próstata foram os mais incidentes com 73 mil e 71 mil casos novos, respectivamente. Em seguida, o câncer de cólon e reto (45 mil), pulmão (32 mil), estômago (21 mil) e no colo do útero (17 mil) (SANTOS *et al.*, 2023).

O CM é uma doença complexa e heterogênea, descrita por distintas formas moleculares, tipos histológicos e características clínicas (SARTORI; FRASSON, 2015). Em contexto nacional, é instituído como tipo de câncer mais frequente em mulheres e seus distintos prognósticos contribuem para sua regressão ou progressão, de acordo com o tratamento optado, a interação ao subtipo molecular e as particularidades do indivíduo, como: idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, aspectos comportamentais e ambientais, genéticos e hereditários (LUKASIEWICZ *et al.* 2021).

O câncer de mama é dividido em diferentes subtipos moleculares, a saber: Luminal A, Luminal B, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2 positivo) e Triplo negativo (CMTN) (RAMOS *et al.*, 2022; ALVES *et al.*, 2024). Os Luminais A e B são caracterizados pela presença de receptores hormonais (RH) e recebem esse nome devido à semelhança das células neoplásicas com as células luminais da mama normal (LUKASIEWICZ *et al.* 2021). Assim, o subtipo Luminal A costuma se mostrar como tumores de histologia de baixo grau (G1), bem diferenciados; com crescimento lentificado; acentuada taxa de controle local; e maior sobrevida, implicando em melhor prognóstico (HENNIGS *et al.*, 2016). Por outro lado, o subtipo Luminal B possui acentuada expressão de marcadores de proliferação; baixa

expressão de RH; e maior grau histológico (G3), pouco diferenciado, o que acarreta pior prognóstico (ADES *et al.*, 2014).

A superexpressão de HER2 mostra negatividade para RH e acentuada expressão da oncoproteína HER2. Possui alta agressividade, apresentando grande índice de recorrência posterior a tratamentos quimioterápicos adjuvantes, bem como uma baixa sobrevida, gerando um pior prognóstico, (FRANCO, 2022).

O triplo-negativo (CMTN), conhecido como basal-similar, apresenta expressão negativa para receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e HER2 (ALVES *et al.*, 2024), o que se caracteriza por significativas taxas de crescimento e atividade proliferativa, curso clínico agressivo, metástase precoce e prognóstico negativo, tendo como fatores contribuintes a genética, multiparidade, menopausa, obesidade, não amamentação e situação socioeconômica por influenciar significativamente nas práticas de prevenção secundária (BARANOVA *et al.*, 2022).

No câncer de mama, pormenoriza-se o Carcinoma inflamatório da mama, devido a sua particularidade no que tange a agressividade, o que demonstra incidência variada em diferentes regiões do mundo, apresentando maior incidência em mulheres afro-americana (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; HESTER *et al.*, 2021).

3.1 Carcinoma inflamatório da mama (CIM)

O carcinoma inflamatório da mama (CIM) apresenta uma evolução rápida, e, embora a introdução da terapia trimodal, a qual integra o procedimento cirúrgico, radioterapia e terapia sistêmica que podem ser por meio de fármacos citotóxicos, hormônios, monoclonais e inibidores de tirosina quinase, a depender da necessidade de cada paciente e a preservação da segurança oncológica, tenha avançado tecnologicamente, o prognóstico ainda é desfavorável. Os pacientes com esta condição apresentam uma taxa de sobrevida em cinco anos correspondente à 30% a 40%, enquanto os pacientes com câncer de mama não inflamatório (CANI) apresentam índices de 70% a 80% (HESTER *et al.*, 2021).

Esses tumores são classificados como inflamatórios devido ao bloqueio dos ductos linfáticos na pele sobre o tecido mamário pelas células tumorais. Esse bloqueio resulta em sinais de inflamação, caracterizados pela presença abundante de êmbolos tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos da derme. O eritema é uma das alterações mais comuns associadas, podendo afetar a mama de forma generalizada ou limitar-se a uma região específica (ROBERTSON *et al.*, 2010; HESTER *et al.*, 2021).

Esses sinais podem atrasar o diagnóstico devido às semelhanças com outras patologias mamárias, como a mastite, uma infecção do tecido mamário que também provoca um quadro inflamatório. Essa sobreposição de sintomas pode contribuir para um diagnóstico tardio, tornando a definição de tratamentos eficazes um desafio na prática clínica. Além disso, o desconforto e a dor associados à biópsia podem limitar a realização de estudos de perfil molecular em amostras de CIM, agravando ainda mais as dificuldades no manejo da doença. (LIM *et al.*, 2018).

Além dos sinais identificados na clínica, os CIM possuem características genômicas que os diferenciam dos CANI. Os tumores CIM apresentam maior frequência de mutações somáticas quando comparados aos tumores de CANI. Nesse sentido, pacientes com CIM frequentemente possuem mutações em genes como *TP53*, *PIK3CA* e *ERBB2* e, somado a isso, as vias de sinalização celular têm significativas alterações em seus tumores, como reparo de DNA, RTK/RAS/MAPK e NOTCH, podendo influenciar na proliferação descontrolada de células, dando origem a tumores (MATSUDA *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2018). Dessa forma, a compreensão das variações genômicas entre CIM e CANI contribuem para a inovação terapêuticas, mais eficazes.

Essas descobertas sinalizam para a importância de serem consideradas as heterogeneidades genômicas de CIM, especialmente em subgrupos específicos, a exemplo do CMTN e HER2+, dos quais associam-se a pior prognóstico. Embora seja considerado um fator clínico patológico distinto, o CIM mostra heterogeneidade morfológica (tipo histológico, intensidade do infiltrado inflamatório) e *status* molecular do receptor de hormônio e subtipos moleculares intrínsecos (MATSUDA *et al.*, 2017; LIANG *et al.*, 2018).

Os subtipos moleculares HER2-positivo e triplo negativo são comuns, representando cerca de 40% dos casos de CM. Porém, o HER2-positivo com superexpressão do receptor HER2, pode ser tratado com terapias direcionadas específicas, como o trastuzumabe (Herceptin) e outros inibidores do HER2, que têm mostrado eficácia significativa no controle da doença. Já o triplo negativo, que não expressa os receptores de estrogênio, progesterona e HER2, é mais agressivo e possui opções limitadas de tratamento, tornando o manejo mais desafiador. Para esse subtipo, as opções terapêuticas frequentemente incluem quimioterapia e, mais recentemente, imunoterapia e terapias alvo específicas, como inibidores de Poly (ADP-ribose) *polymerase* (LIM *et al.*, 2018; SEUNG *et al.*, 2022).

Quanto aos fatores de risco modificáveis do CIM, têm-se a obesidade, mensurada pelo alto índice de massa corporal (IMC). Esta descoberta é referenciada pelo registro no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), da Universidade de Texas, MD Anderson

Cancer Center, EUA, em uma grande coorte (N= 617 casos) (CHO *et al.*, 2022). Além disso, mulheres com idade <26 anos e afro-americanas, tinham risco maior de desenvolver CIM triplo-negativo (FOUAD *et al.*, 2018).

Estudo aponta que a cada aumento de 5 kg/m² no IMC, o risco de câncer de mama aumenta em 31%. Além do que a obesidade e o histórico familiar de câncer estão associados a um maior risco de CM em mulheres. Dentre 15.055 participantes, observou-se que quando o IMC (Índice de Massa Corporal) é ≥ 24 , o risco de câncer de mama aumenta proporcionalmente com o aumento do IMC. Essa tendência é particularmente evidente em mulheres com histórico familiar de câncer (CAO *et al.*, 2024).

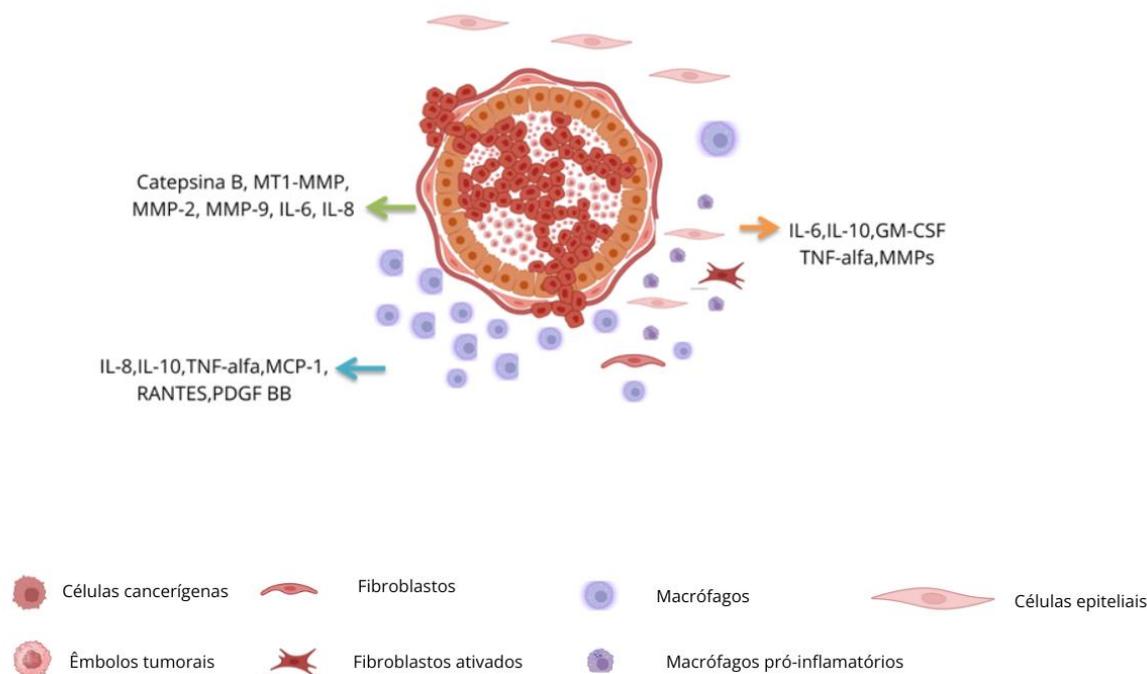
A presença de um histórico familiar de câncer pode intensificar a relação entre o IMC e o câncer de mama, sugerindo que esses indivíduos podem estar em um risco ainda maior. Estudos mostram que mulheres com histórico familiar de câncer têm uma probabilidade significativamente maior de desenvolver câncer de mama à medida que seu IMC aumenta, comparadas àquelas sem tal histórico. A interação entre o IMC elevado e o histórico familiar pode potencializar o risco de câncer de mama, indicando a necessidade de uma vigilância mais rigorosa e estratégias de prevenção mais intensivas para essas mulheres. Para mulheres sem histórico familiar de câncer, embora o risco de CM também aumente com o IMC elevado, a intensidade dessa associação tende a ser menor. A relação do CM e o IMC é complexa e envolve vários mecanismos biológicos interligados, onde a interação entre o IMC elevado e fatores moleculares inflamatórios pode criar um ambiente tumoral mais agressivo, devido predisposições genéticas, o que leva a um aumento significativo no risco e na gravidade do CM (CAO *et al.*, 2024).

Investigações feitas por Mohamed *et al.* (2014) mostraram que o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Interleucina-6 (IL-6) fomentam a inflamação crônica, a sobrevivência das células tumorais e a angiogênese. O Fator Estimulante do Crescimento de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF) estimula a ativação e infiltração dos TAMs, que secreta também proteases como as metaloproteinasas da matriz, facilitando a invasão e disseminação do tumor. A Interleucina-12 (IL-12) e a Interleucina-23 (IL-23) promovem a inflamação e a resposta imunológica, mas podem contribuir para um ambiente favorável ao tumor, enquanto infecções virais associadas podem interagir com esses processos, exacerbando a progressão do câncer.

Nesse sentido, êmbolos tumorais de CIM secretam proteases e citocinas que facilitam a degradação, a invasão e a motilidade da matriz extracelular, induzindo a imunossupressão e disseminação de células de carcinoma. Células infectadas com citomegalovírus humano (HCMV) secretam citocinas e proteases associadas à angiogênese,

imunossupressão, invasão e motilidade de células de CIM, visualizada na figura 1 (MOHAMED *et al.*, 2014).

Figura 1- Êmbolos tumorais de Carcinoma Inflamatório de Mama.



Fonte: Adaptado de Mohamed *et al.* (2014, p. 531). Imagens realizadas no BioRender

Legenda: As catepsinas B estimulam a invasividade e a motilidade das células do carcinoma da mama); metaloproteinases de matriz do tipo membrana (MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9) são biomarcadores preditivos para agressividade; a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), estimulam a auto-renovação das células-tronco cancerígena (seta verde). Os macrófagos associados ao tumor exibem propriedades associadas à infecção por citomegalovírus (HCMV) no câncer de mama inflamatório, incluindo secreção de citocinas e proteases que induzem a migração celular, angiogênese e ativação da via de sinalização NF- κ B (seta laranja). Essa ativação da via de sinalização ocorre dentro do microambiente tumoral, via específica e induzida pela infecção por HCMV (seta azul).

3.2 Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE)

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) consiste em um receptor de reconhecimento de padrões multiligantes encontrados em variados estados inflamatórios crônicos (SIMS *et al.*, 2010; KIM; JEONG; JANG, 2021), apresentando uma região transmembrana de ancoragem que o fixa e auxiliam na sinalização intracelular.

O RAGE é uma molécula sinalizadora central no sistema imunológico inato e tem reconhecimento de padrões multiligantes que propaga efeitos em várias doenças inflamatórias e tumores por meio de conjuntos abundantes de classes diversificadas de ligantes, endógenos e exógenos. É expresso em baixos níveis em tecidos normais, exceto no pulmão, local onde o

RAGE, torna-se regulado positivamente nos locais onde seus ligantes se acumulam, estando associados a uma doença específica (KIM; JEONG; JANG, 2021).

O RAGE, devido a sua capacidade em se ligar e mediar efeitos dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), base das complicações diabéticas, pode ligar-se a uma classe diversificada de ligantes não-AGE em decorrência da sua competência de reconhecer ligantes endógenos e exógenos estruturalmente não relacionados, denominando-o receptor de reconhecimento de padrões (PRR) (HUDSON; LIPPMAN, 2018).

Tais ligantes podem ainda ativar diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo de célula e do ligante, como as proteínas de alta mobilidade do grupo (HMG), proteínas S100/calgranulinas, beta amiloide ($A\beta$), entre outros. Em sua maioria, podem ser definidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), induzindo uma resposta pró-inflamatória (PRUNEDA, 2021) e atuando como sensor imunológico inato, incluindo endotoxinas bacterianas, vírus respiratórios e DNA microbiano (HUDSON; LIPPMAN, 2018).

A composição dessa proteína é glicosilada, tendo seu peso molecular aproximadamente 50 kDa e estruturação em três diferentes domínios, a saber: um pequeno domínio citoplasmático (aminoácido 364-404) que é primordial à sinalização intracelular, um amplo domínio extracelular de ligação ao ligante da região (aminoácidos 23-342) e um domínio transmembranar hidrofóbico (aminoácidos 343-363) (FERNANDEZ *et al.*, 2020).

O domínio citoplasmático se faz necessário para a interação com efetores a jusante de RAGE, como a formina 1 diáfana (DIAPH1), ERK1/2, TIRAP e DOCK7, as quais são essenciais para ativação de diferentes vias de sinalização RAGE. Quanto ao domínio extracelular, este reconhece ligantes como produtos finais de glicação avançada (AGEs), desencadeando sinais intracelulares, desempenhando ativação de vias associadas a respostas imunes, inflamatórias e/ou de estresse oxidativo. Por fim, o domínio transmembranar hidrofóbico exercerá papel fundamental na estrutura proteica, proporcionando a homodimerização hélice-hélice (FERNANDEZ *et al.*, 2020).

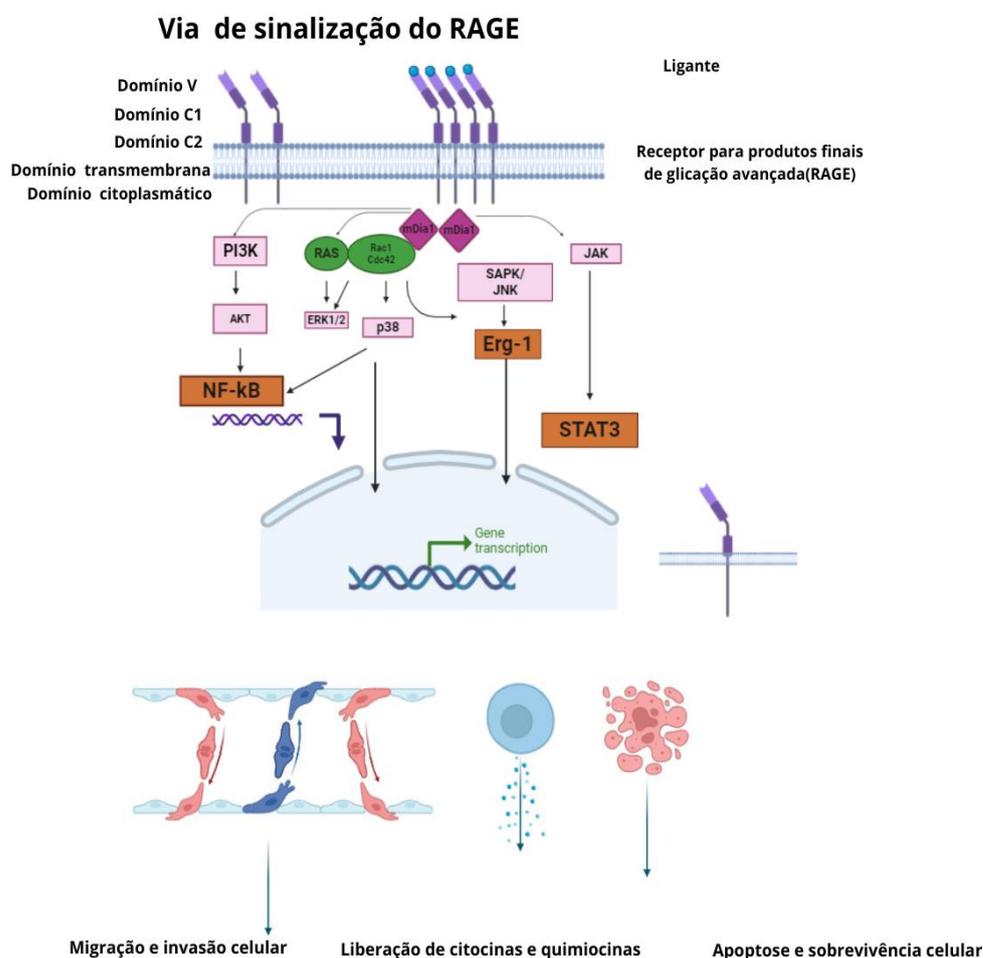
Acrescenta-se ainda que este receptor possui potencial de desempenho duplo na resposta inflamatória, resultando em ativação celular, envolvendo o fator de transcrição NF- κ B na interação com leucócitos ou células endoteliais com seus ligantes e, por outro lado, pode funcionar nas células endoteliais como receptor que interage diretamente com β 2-integrinas de leucócitos, demonstrando portanto seu envolvimento direto no recrutamento de células inflamatórias, ocasionando o desenvolvimento e progressão de estados patológicos, como o CM (PRUNEDA, 2021).

Quanto a expressão de RAGE, essa se encontra amplamente aumentada em células agressivas de CMTN, tanto em tumores primários quanto em metástases linfonodais (NASSER *et al.*, 2015). Para tanto, para melhor compreensão, a figura 2 detalha as vias de sinalização de RAGE.

Isso posto, o contato de RAGE com seu ligante demonstra potencial de possibilitar diversos meios de sinalização intracelular, incluindo o estímulo e a translocação ao núcleo do fator de transcrição, gerando transcrição de quimiocinas, citocinas, estresse oxidativo, moléculas pró-inflamatórias e de adesão, acarretando, então, em uma resposta inflamatória (FERNANDEZ *et al.*, 2020).

O acúmulo de AGEs está diretamente associado a diversas condições patológicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, câncer, entre outras que possuem relação com processos inflamatórios. O metilglioxal (MGO) tem relação direta com o desenvolvimento dessas condições, sendo ele um subproduto da glicólise envolvido na formação de AGEs (HUDSON; LIPPMAN, 2018).

Figura 2 - Vias de sinalização de RAGE.



Fonte: Elaboração própria (2024). Adaptado de Hudson e Lippman (2018, p 35).

Legenda: O RAGE ativa a sinalização intracelular pré-montando em dímeros e multímeros na superfície celular, antes da ligação do ligante. O RAGE multimérico acopla os ligantes utilizando interações eletrostáticas entre o domínio VC1 positivo (+) ao negativo (-). Após a ligação, alterações conformacionais intracelular do RAGE permitem interações intracelulares, incluindo mDia1. A sinalização RAGE ocorre por meio de Rho GTPases (verde) e quinases (rosa) ativando fatores de transcrição (amarelo). A ativação de RAGE gera mudanças na expressão gênica e alteração da função celular (migração, sobrevivência, inflamação e regulação positiva da própria expressão).

Considerando o contexto de câncer, o metilglioxal (MGO) tem papel significativo na formação e avanço metastático e, quando há inibição, resulta na redução do crescimento de tumores. Entretanto, em razão de seu potente efeito citotóxico, a elevada concentração de MGO pode estar relacionada à apoptose. Portanto, o MGO, ao se ligar ao receptor RAGE, ativa vias de sinalização que promovem inflamação e estresse oxidativo, contribuindo para a progressão e a metástase do câncer. A inibição dessa interação pode reduzir o crescimento tumoral e a disseminação metastática, oferecendo uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento do câncer (MAGNA *et al.*, 2023; PRUNEDA, 2021).

Em avaliação das contribuições funcionais do RAGE no CM, foi percebido que há propensão reduzida para o crescimento de tumores na mama quando há deficiência em RAGE, destacando-o como um possível biomarcador para o mau prognóstico e, desta maneira, revelando um papel funcional para a sinalização na ligação da inflamação ao desenvolvimento agressivo do câncer de mama (PRUNEDA, 2021).

De tal forma é sabido do potencial que o sRAGE demonstra na modulação celular e levanta a perspectiva de sua utilização terapêutica em enfermidades inflamatórias e diversos tipos de cânceres, tendo em vista o prognóstico favorável. Pode-se considerar, portanto, que os resultados obtidos em estudos anteriores podem indicar o sRAGE com potencialidade para se tornar biomarcador na detecção precoce do câncer (PRUNEDA, 2021).

Em estudo feito por Rigidacciolo *et al.* (2022) foi revelado a importância do RAGE no TNBC, onde foi identificado uma alta expressão dos ligantes S100A8 e S100A9 em diferentes subtipos de CM e, por consequência, associando-o a piores resultados clínicos.

Além disso, descobriu-se que uma alta expressão de RAGE também está correlacionada à menor taxa de sobrevida global em pacientes com CM, sugerindo em seus resultados que a via de transdução RAGE-FAK-YAP poderia ser explorada como um sistema passível de tratamento para interromper o subtipo agressivo TNBC (RIGIRACCILO *et al.*, 2022).

4 MÉTODOS

4.1 Tipo e Local de Estudo

Trata-se de um estudo transversal com um grupo caso e um grupo controle. Foram incluídas amostras de pacientes com carcinoma inflamatório da mama (caso) e não inflamatório da mama (controle).

O presente estudo foi realizado com pacientes atendidas no Instituto do Câncer do Ceará (ICC)/ Hospital Haroldo Juaçaba localizado em Fortaleza no Estado do Ceará, que apresenta uma estrutura com mais de 30 especialidades médicas e referência no tratamento oncológico a nível Norte e Nordeste. Realiza, também, atendimentos no âmbito do Sistema único de Saúde e por meio de convênios (HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA, 2024).

4.2 População e amostra

A população estudada refere-se a pacientes diagnosticados com carcinoma inflamatório da mama (CIM) e carcinoma não inflamatório da mama (CANI), no ICC/Hospital Haroldo Juaçaba, correspondendo a um total de 51 prontuários de pacientes no período de 2015.1 a 2020.2 por conveniência. Dentre as amostras, apenas 34 amostras foram selecionadas para experimento da expressão do RAGE, sendo esses: 18 referente ao CIM e 16 amostras de CANI.

4.3 Critérios de elegibilidade

Critérios de Inclusão:

- Pacientes com o diagnóstico clínico e histopatológico de CIM e CANI;
- Amostras consideradas satisfatórias, segundo critérios: boa visualização em microscópio; sem desgaste ou perda de material; e fixadas adequadamente no bloco de parafina.

Critérios de exclusão:

- Diagnóstico diferencial, como mastite ou abscesso na mama.

4.4 Coleta de dados

Para o desenho do presente estudo, foram realizadas as seguintes etapas: I- Identificação dos pacientes; II – Lâminas de hematoxilina e eosina; III- Imunofluorescência para RAGE. Detalhadas em separado para melhor compreensão das etapas, conforme figura 3 a seguir:

Figura 3 – Etapas do desenho do estudo.



Fonte: Elaboração própria (2024).

4.4.1 Identificação dos pacientes e demarcação da área tumoral

Os pacientes foram triados pelo *software* de gestão empresarial *TASY*, que é um prontuário eletrônico utilizado pela equipe do hospital, que tem como objetivo atender às necessidades de organização de saúde, como informações de pacientes, profissionais, medicamentos, equipamentos e outras informações importantes de forma rápida. Posteriormente, os pacientes foram selecionados conforme os critérios de inclusão pela Oncologista do ICC (L.M.A), por se tratar de um diagnóstico clínico primariamente.

Nessa fase, foram solicitados acesso as lâminas do serviço de patologia do ICC referente aos pacientes selecionados para compor a amostra do estudo. Em seguida, as lâminas de Hematoxilina & Eosina (HE) incluídas no estudo foram analisadas e demarcadas a área

tumoral e/ou presença de êmbolos pela patologista responsável (M.P.S.S.C) do laboratório de patologia Livino Pinheiro, vinculado ao ICC.

De posse dos dados, foram extraídas informações referentes ao perfil sociodemográfico (idade, sexo) e aspectos clínico-patológico (Índice de massa corpórea, histórico familiar de câncer, tipo histológico, estadiamento dos tumores, receptores de estrógeno, receptor de progesterona, HER2, índice de proliferação Ki67 e subtipo molecular) do prontuário do paciente. Em relação à obesidade, essa foi calculada segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), que consiste em uma fórmula que corresponde: peso/altura^2 , sendo considerado paciente com obesidade grau I quando IMC for acima de 30 Kg/m².

4.4.2 Análise histopatológica

A análise das lâminas se deu utilizando a fotomicrografia das amostras dos pacientes com tumores primários, CIM e CANI, utilizando o microscópio óptico com aumento de 100x e 200X no Laboratório de Osteofarmacologia, que compõe, também, o NPDM. As imagens de HE foram analisadas pela patologista da UFC (D.I.M.)

Assim, foram solicitados os blocos parafínicos ao ICC contendo tecidos de biópsia dos pacientes com CIM e CANI, sendo analisados conforme a referência numérica dos laudos anatomopatológicos do diagnóstico para realização de imunofluorescência para RAGE.

4.4.3 Imunofluorescência para quantificação da expressão de RAGE

Das 38 amostras utilizadas nesse estudo, para a etapa de imunofluorescência só foram possíveis de serem analisados 34: 18 CIM e 16 CANI, devido à baixa qualidade da imagem para visualização. As lâminas sinalizadas foram cortadas (3 µm de espessura) no micrótomo do setor de Patologia e Medicina Legal da UFC. Inicialmente, realizou-se a desparafinização e permeabilização com Triton X-100 0,2% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram marcadas com o anticorpo policlonal RAGE anti-rabbit (Clone AGER PA5-24787, Invitrogen) na diluição 1:50. Após *overnight* 12 horas, foram lavadas em PBS e incubadas com um anticorpo secundário 568 anti-anti-rabbit 1:100 durante 45 minutos à temperatura ambiente, contendo a descrição do anticorpo.

Os núcleos foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 10 minutos. De acordo com testes-piloto realizados em outros estudos, foi analisado que a expressão do

RAGE em pulmão possui alta expressão, sendo esse selecionado para compor o controle positivo, na concentração de 1:100. Para o controle negativo, foi utilizada amostra de mama (1:50) diferenciando-o com a inserção do PBS/BSA 5% sem o anticorpo primário conforme protocolo do experimento utilizado no LAFICA.

As lâminas foram visualizadas usando o sistema de imagem multi-espectral (*Cytation 3*, fabricante BD Biosciences). Em seguida foi realizada a análise da expressão por meio da quantificação da intensidade de fluorescência para RAGE e DAPI (marcador de núcleo), utilizando o *software* Image J/FIJI, versão 1.53.

4.5 Análise dos dados

Foram empregadas estatísticas descritivas, incluindo médias e desvios-padrão para variáveis contínuas, além de distribuições de frequência expressas em valores absolutos e relativos para variáveis categóricas.

A normalidade dos dados foi verificada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, a homogeneidade das variâncias foi avaliada mediante o teste de Levene, conforme propriedade respectiva para dados paramétricos e não-paramétricos, seguidos do teste para a comparação entre os grupos em relação às variáveis contínuas.

Recorreu-se, também, ao teste t de Student, além da avaliação das variáveis por meio do teste Qui-Quadrado de Pearson ou, quando apropriado, o teste exato de Fisher. Na análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram superiores a cinco (>5), foi adotado o teste de Fisher. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada com o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 17; *software* GraphPad Prism®, versão 8.01.

4.6 Aspectos Éticos

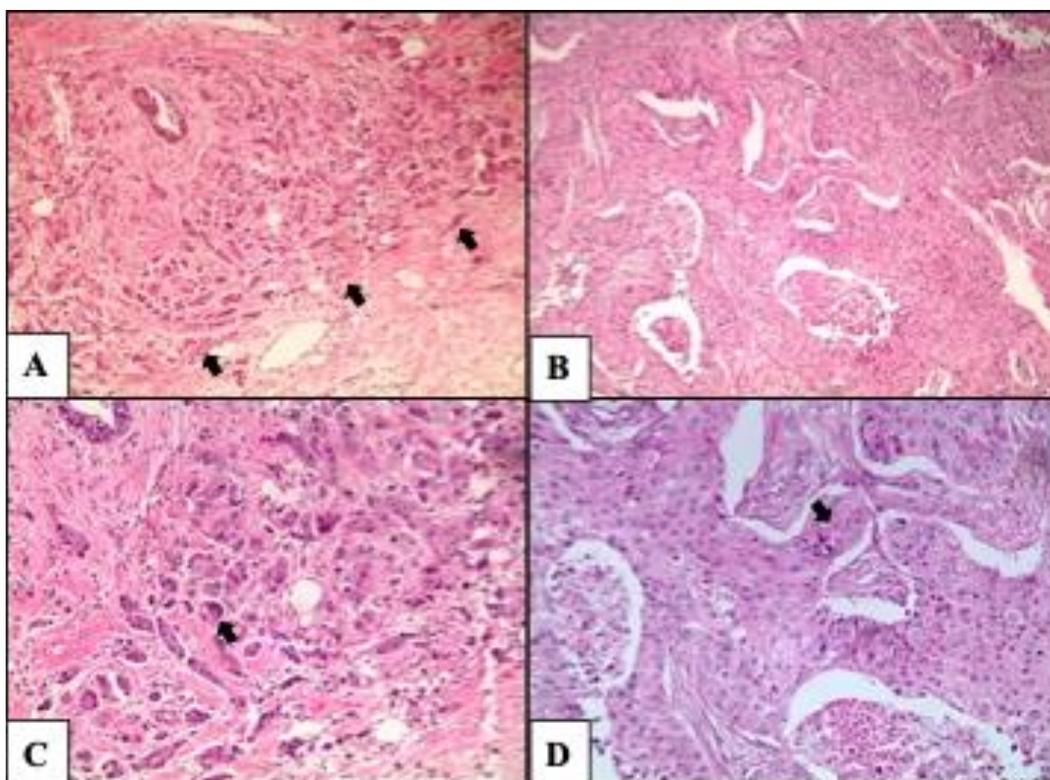
O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Haroldo Juaçaba/ICC, sob nº de parecer 5.010.710 (ANEXO I) e lavrados pelo termo de fiel depositário referente a guarda/consentimento das amostras da pesquisa. Por se tratar de pesquisa com acesso aos prontuários dos pacientes, foi garantido a segurança e o sigilo da identidade dos participantes. Ressalta-se ainda o cuidado especial para não exaurir o material biológico dos blocos de parafina para fins de pesquisa, entendendo que as coletas para biópsias de cunho científico são rotineiras no hospital.

5 RESULTADOS

5.1 Análise clínica e patológica dos participantes

O presente estudo foi realizado com amostras de 34 participantes, sendo 18 com o diagnóstico de CIM e 16 com CANI. A figura 4 mostra as fotomicrografias de biopsias de Carcinoma inflamatório da mama evidenciado pelo carcinoma ductal invasivo com presença de nichos infiltrativos. Por sua vez, o CANI também evidenciou alterações histopatológicas de carcinoma invasivo.

Figura 4 – Fotomicrografias de amostras de CIM e CANI



Legenda: CIM: (A, C) As setas indicam ninhos infiltrativos de carcinoma ductal invasivo de alto grau (H&E, 100x e 200x). CANI: (B, D) Carcinoma invasivo com lâminas de células com núcleos aumentados e nucléolos proeminentes (H&E, 100x e 200x).

No que se refere aos dados gerais das pacientes, a Tabela 1 apresenta os dados clínicos e patológicos dos pacientes CIM e CANI.

Tabela 1 – Dados clínicos e patológicos dos pacientes com CIM e CANI

Característica	CANI (N=24) No. (%)	CIM (N=27) No. (%)	P
Idade mediana em anos (min-máx)	57 (32 – 91)	55 (36 – 83)	0,996
Idade			
< 45 anos	8	5	0,335
≥ 45 anos	16	22	
Histórico familiar			
Não	11 (45,8%)	14 (51,9%)	0,781
Sim	13 (54,2%)	13 (48,1%)	
Obesidade			
Não (IMC <30)	18 (85,7%)	18 (72,0%)	0,304
Sim (IMC ≥ 30)	3 (14,3%)	7 (28,0%)	
Linfonodo (N)			
N0	5 (21,7%)	3 (11,1%)	0,444
N1-N3	18 (78,3%)	24 (88,9 %)	
Metástase			
M0	10 (41,7%)	14 (51,9%)	0,577
M1	14 (58,3%)	13 (48,1%)	
RE-	7 (29,2%)	8 (29,6%)	
RE+	17 (70,8%)	19 (70,4%)	0,999
RP-	8 (33,3%)	10 (37,0%)	
RP+	16 (66,7%)	17 (63,0%)	0,999
HER2 -	19 (79,2%)	22 (81,5%)	
HER2 +	5 (20,8%)	5 (18,5%)	0,999
Ki67 <20%	7 (30,4%)	5 (18,5%)	
Ki67 ≥ 20%	16 (69,6%)	22 (81,5%)	0,507
Triplo-negativo			
Não	20 (83,3%)	21 (77,8%)	0,731
Sim	4 (16,7%)	6 (22,2%)	

Legenda: IMC: índice de massa corporal; RE: receptor de estrogênio; HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; CIM: Câncer de mama inflamatório; N: linfonodo; RP: Receptor de Progesterona; CMTN: câncer de mama triplo negativo. A análise estatística foi realizada por meio do teste Qui-quadrado.

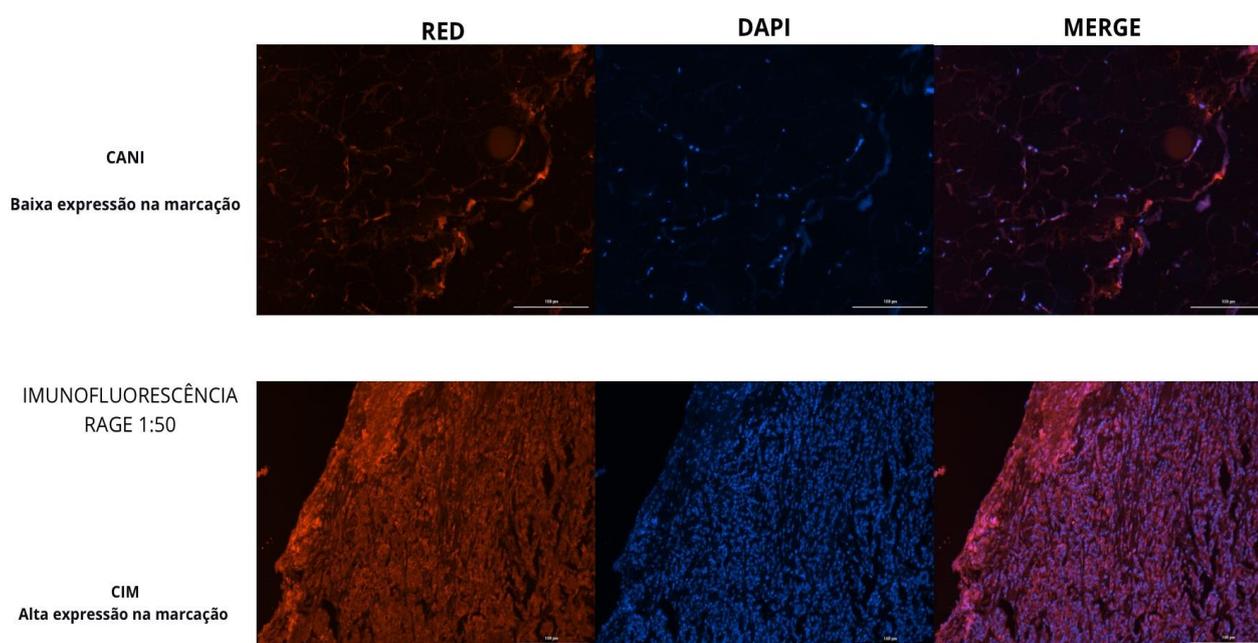
Os pacientes com CIM apresentaram padrões comparáveis de obesidade, histórico familiar, envolvimento de linfonodos, metástases e níveis de expressão de ER, PR, HER e Ki-67 acima de 20% ($p > 0,05$). O número de indivíduos com câncer de mama triplo negativo (CMTN) dentro dos grupos também foi semelhante ($p > 0,05$), segundo a tabela 1.

O índice proliferativo aumentado mensurado pela marcação por imunohistoquímica para Ki67 durante o diagnóstico demonstrou um percentual de 81,5 para o CIM e 69,9 para o CANI quando analisados com o Ki67 acima de 20%. Observa-se também que o percentual de pacientes com CMTN foi maior em pacientes com diagnóstico de CIM (22,2%) *versus* o CANI (16,7%). O Ki-67 >20% é um indicador importante de alta taxa de proliferação celular, associado a uma natureza mais agressiva do tumor. Esse dado é crucial para a avaliação do prognóstico, planejamento do tratamento e monitoramento da resposta ao tratamento no câncer de mama. O conhecimento dos níveis de Ki-67 ajuda a orientar as decisões clínicas e a personalizar o manejo da doença.

5.2 Imunofluorescência para expressão do RAGE

Foi identificado uma baixa expressão na marcação para o CANI e alta expressão na marcação para CIM, na imunofluorescência e técnicas de imagem celular, a partir da coloração e visualização de diferentes componentes celulares, utilizando o RED, DAPI e MERGE (Figura 5). Essa abordagem permitiu uma análise mais detalhada da distribuição e intensidade da expressão RAGE nas amostras de CANI e CIM microscopicamente. Os resultados apontaram que há maior porcentagem do RAGE em pacientes com CIM.

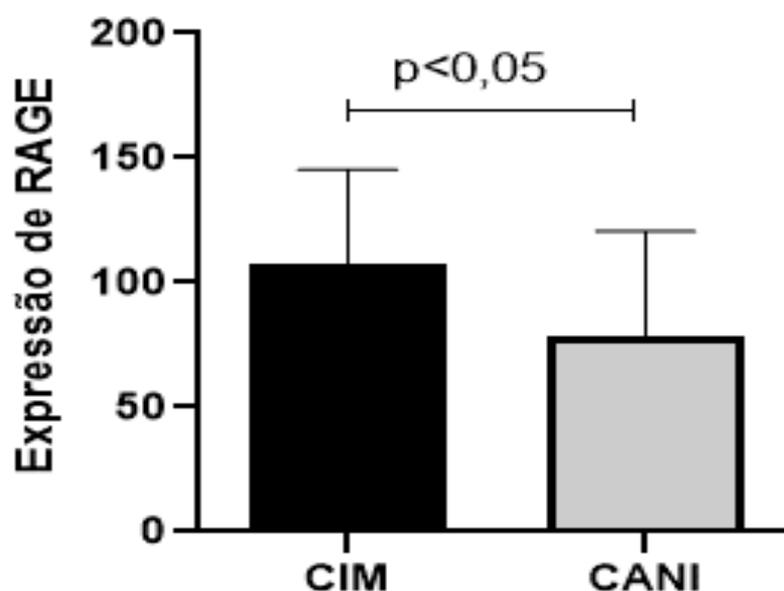
Figura 5 - Fotomicrografias da expressão do RAGE por imunofluorescência em paciente CIM e CANI



Legenda: Todas as análises de imagem foram executadas utilizando o microscópio de imunofluorescência *Cytation* do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos. RED – vermelho em inglês; DAPI – Marcador de núcleo; MERGE – Co-marcação do DAPI e RAGE.

As análises de imagens da expressão do RAGE resultaram na quantificação da expressão do anticorpo nas amostras de CIM e CANI, visualizados na figura 6. Dessa forma, a análise da imunofluorescência do RAGE evidenciou uma expressão aumentada ($107,4 \pm 37,9$) no grupo CIM quando comparado às amostras CANI ($78,4 \pm 42,2$) ($p = 0,042$).

Figura 6 – Quantificação da expressão do RAGE



Legenda: Quantificação da expressão do RAGE utilizando o método da imunofluorescência. Foram analisadas 34 amostras, sendo $n=18$ para CIM e $n=16$ para CANI, com médias total por participante correspondendo a 107,4 e 78,4, respectivamente.

Dentre os achados, os participantes correspondentes a pessoas com idade inferior a 45 anos ao diagnóstico apresentaram uma intensidade de fluorescência para RAGE de 83,7 % (DP: 28,7) para o CIM, por sua vez, evidenciou-se uma menor expressão de RAGE 65,1 % (DP: 36,4) para o CANI. Para a idade superior a 45 anos, a média de intensidade de fluorescência para RAGE foi de 112,2 % e DP: 38,4 no CIM e média de 86,4 % com DP: 45,1 para CANI. Ambos as médias de percentual de expressão não apresentaram significância ($p=0,190$). Quanto ao histórico familiar, esse apresenta resultados estatísticos semelhantes, não apresentam significância ($p=0,180$) relevante se presença ou não de CIM ou CANI nos grupos

familiares. Apesar das diferenças numéricas entre presença e ausência de carcinomas, elas não influenciaram nos resultados deste estudo, conforme detalhado na Tabela 2.

Cabe ressaltar, que a porcentagem de expressão de RAGE foi significativamente maior em amostras de CIM no subtipo molecular de câncer de mama triplo negativo ($136,8 \pm 6,8$) em comparação com amostras CANI ($33,6 \pm 35,9$) ($p = 0,026$). Além disso, as amostras de CIM apresentaram expressão aumentada de RAGE em comparação às CANI ($121,1 \pm 36,5$ vs. $64,2 \pm 33,5$) de acordo com o Ki-67 acima de 20% ($p = 0,034$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de associação entre a expressão de RAGE e o CIM e CANI segundo as características clínico e patológicas.

Característica	% Expressão de RAGE		P
	CIM Média \pm DP	CANI Média \pm DP	
Idade			
<45anos	83.7 \pm 28.7	65.1 \pm 36.4	0.109
> 45 anos	112.2 \pm 38.4	86.4 \pm 45.1	
Histórico familiar			
Não	97.3 \pm 35.6	84.3 \pm 48.0	0.180
Sim	117.0 \pm 40.9	68.5 \pm 31.4	
Obesidade			
Não (IMC <30)	101.5 \pm 34.4	86.6 \pm 40.9	0.086
Sim (IMC \geq 30)	133.8 \pm 33.0	8.2 \pm 0.0	
Linfonodos			
N0	141.7 \pm 0.0	97.7 \pm 0.0	
N1-N3	105.4 \pm 38.0	75.7 \pm 44.6	0.131
Metástase			
M0	107.4 \pm 35.0	96.6 \pm 8.6	
M1	107.5 \pm 40.7	74.2 \pm 45.9	0.141
RE-	108.4 \pm 49.4	51.3 \pm 36.7	
RE+	110.6 \pm 38.0	90.7 \pm 39.9	0.094
RP-	98.6 \pm 44.7	76.1 \pm 57.4	0.144
RP+	114.1 \pm 37.6	80.21 \pm 29.2	
HER2-	111.4 \pm 39.6	84.4 \pm 44.4	0.147

HER2+	92.6 ± 0.0	60.3 ± 32.4	
Ki67 <20%	95.0 ± 33.2	96.7 ± 47.4	
Ki67 ≥ 20%	121.1 ± 36.5	64.2 ± 33.5	0.034*
Triplo-negativo			
Não	115.5 ± 35.3	87.7 ± 40.3	0.026*
Sim	136.8 ± 6.8	33.6 ± 35.9	

Legenda: CIM - Carcinoma Inflamatório da Mama; CANI - Carcinoma Não inflamatório; DP – Desvio padrão; IMC - Índice de Massa Corporal; N - Linfonodos regionais; N0 - Ausência de linfonodos; N1 - presença de linfonodos (1); N2 - presença de linfonodos (2); N3 - presença de linfonodos (3); M0 - Ausência de Metástase à distância; M1 - Presença de Metástase a distância; RE- - Receptor de estrogênio negativo; RE+ - Receptor de estrogênio positivo; RP- - Receptor de progesterona negativo; RP+ - Receptor de progesterona positivo; HER2- - HER2 negativo; HER2+ - HER2 positivo; Ki67 <20% - presença inferior a 20% da proteína nuclear Ki67; Ki67 ≥ 20% - presença superior ou igual a 20% da proteína nuclear Ki67.

6 DISCUSSAO

Demonstramos que as amostras de CIM apresentaram maior expressão de RAGE do que as amostras de carcinoma não inflamatório da mama. Apesar de o grupo CIM apresentar graus mais elevados e tumores com resultado negativo para receptores hormonais ou triplo-negativos, não encontramos diferença estatística comparando os parâmetros clínico patológicos entre os grupos CIM e CANI. Esse resultado pode ser explicado com base em nossos critérios de elegibilidade, nos quais os casos e controles apresenta fenótipos mais homogêneos de tumores avançados, apenas a resposta inflamatória foi o diferencial para o grupo CIM. Por outro lado, a estratificação dos pacientes quanto à expressão de RAGE evidenciou um impacto significativo com base no perfil de proliferação e subtipo molecular de maior agressividade como os tumores triplo-negativos.

Em relação ao CM, estudos apontam que a expressão de RAGE se encontra significante aumentada em comparação ao grupo controle, saudável, demonstrando forte associação entre os níveis séricos de RAGE com o crescimento tumoral e sua agressividade. Em 2020, houve aproximadamente, 2,26 milhões de novos casos diagnosticados no mundo, sendo 685 mil mortes associadas ao CM. Corroborando os achados do presente estudo, onde demonstra clara relação entre o perfil de expressão de RAGE e o desenvolvimento do câncer de mama inflamatório (HANTOOSH; KADHIM, 2022).

Dentre os tipos de câncer, têm-se o CMTN, tipagem agressiva e com prognóstico desfavorável para a saúde das mulheres, que apresenta superexpressão de RAGE e contribui para a sua progressão. É definido como CM sem expressão de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Apesar dos avanços para o tratamento dessa condição, CMTN, ainda não foram desenvolvidos medicamentos peptídicos eficazes para o seu combate, além da falta de alvos clínicos reconhecidos, os resultados ainda se mostram insuficientes no tratamento (DAI *et al.*, 2023).

Entre nossos casos de CIM, 22,2% foram diagnosticados como triplo-negativos. Foi demonstrado o impacto do fenótipo agressivo e pior prognóstico em Carcinoma inflamatório da mama classificados como tumores triplo-negativos. Para esse subtipo molecular, CMTN, estima-se que o tempo de sobrevida global seja de 33 meses em comparação a todos os subtipos moleculares de pacientes com carcinoma inflamatório da mama. Em contraste, pacientes com CIM triplo-negativos apresentam menor taxa de sobrevida, ou seja, menos de 24 meses, quando comparados a todos os outros subtipos de câncer de mama (LI *et al.*, 2011).

O RAGE com o CMTN, é um marcador de agressividade entre os subtipos de CM, com alta taxa de recorrência, baixa taxa de sobrevida durante os primeiros 3 anos após o diagnóstico, alta frequência de metástases e com diferenças substanciais em seus perfis genômicos e transcriptômicos, são geralmente intratáveis quando metastizados (HU *et al.*, 2024; LEE *et al.*, 2018). No entanto, os resultados do presente estudo são discordantes no que tange a alta frequência de metástases em relação aos estudos supracitados, podendo ser justificado por fatores como o perfil biológico específico do tumor, barreiras físicas e biológicas, mecanismos moleculares específicos que inibem a disseminação e a resposta imunológica do paciente. Esses fatores contribuem para a complexidade da metástase e ajudam a entender as variações na agressividade e na capacidade de disseminação dos diferentes subtipos de CM.

A expressão de RAGE é regulada positivamente em células agressivas de câncer de mama triplo-negativas e desempenham papel funcional na ligação da inflamação ao desenvolvimento agressivo de CM (NASSER *et al.*, 2015), onde a expressão de RAGE apresenta significância elevada em CMTN quando comparado ao não-CMTN. Estudo realizado por Dai *et al.* (2023) sugeriu que a regulação positiva do RAGE possui significado clínico e se encontra associado a mau prognóstico no CMTN. É provável que o RAGE desempenhe um papel na progressão do CMTN.

Para Nasser *et al.* (2015), a expressão do RAGE é significativamente aumentada em amostras de tumor do tipo basal (principalmente CMTN) em pacientes com câncer de mama invasivo em comparação com tumores do tipo não basal (principalmente câncer RE α +). Os dados apresentaram maior incidência do subtipo Triplo negativo, cuja presença no CIM foi fortemente correlacionada. Esse subtipo de câncer de mama está super-representado no CIM, compreendendo 25–30% dos casos (LINCE *et al.*, 2024).

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento e ao prognóstico do CM, estão o excesso de peso corporal, obesidade, sendo apontado como um determinante de mau prognóstico da doença (SILVA *et al.*, 2023; GUO *et al.*, 2022). A obesidade ainda se encontra associado à desregulação da via de RAGE e na sinalização, alarmina S100A7, promovendo angiogênese, inflamação e progressão deste tipo de câncer (MUOIO *et al.*, 2021).

Em um estudo retrospectivo realizado por Kadi *et al.* (2023), o CMTN pode não estar associado a um risco maior de morte em relação ao Câncer de Mama Triplo-Positivo (TPBC), mas que fatores, como: idade, diagnóstico, intervenção cirúrgica e invasão linfovascular podem estar associados ao aumento do risco.

Ao contrário, Masuda *et al.* (2013) avaliou se o comportamento agressivo do CIM está ligado ao subtipo CMTN, mostrando que a classificação do subtipo CMTN não é afetada pelo *status* de CIM ou CANI e o câncer de mama inflamatório triplo negativo e o não inflamatório triplo negativo tiveram os mesmos subtipos usando perfis de expressão de mRNA.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, foi possível identificar que fatores como: idade, histórico familiar, obesidade, presença de acometimento de linfonodos, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, receptores do fator de crescimento epidérmico humano e metástase não apresentaram associação com a expressão de RAGE em CIM e CANI. Porém, a presença de $Ki67 \geq 20\%$ e a ausência de CMTN, sendo, respectivamente ($p=0.034$) e ($p=0.026$), estão associados à expressão do RAGE, revelando-os no grupo CIM quando comparado ao CANI.

Jackson e seus colaboradores (2023) apontaram que a idade é um elemento importante a ser observado no diagnóstico da doença, entendendo que o seu aumento é um fator de risco significativo e que contribui para o desenvolvimento do CM. Sugeriram ainda que a probabilidade da taxa de sobrevivência ao CM tenha correlação com a idade no momento do diagnóstico. A associação com um padrão clínico-patológico único, caracterizado por diferenças nas abordagens de tratamento, como a utilização de estratégias de redução de escala, resulta em desfechos inferiores que podem impactar negativamente e de maneira independente, independentemente do subtipo e do tratamento aplicado.

Tais características únicas podem exigir uma personalização mais rigorosa das estratégias terapêuticas, levando em consideração fatores genômicos e moleculares específicos para otimizar os resultados clínicos. A falta de resposta a tratamentos convencionais sublinha a necessidade de desenvolvimento de terapias inovadoras e direcionadas. No entanto, o presente estudo identificou que a idade não apresentou significância ($p= 0,190$) para a expressão do RAGE na presença ou não de CIM ou CANI, discordando dos autores supracitados em relação a correlação com a idade (JACKSON *et al.*, 2023).

Outro fator relacionado CM na literatura, têm-se o IMC possui associação à incidência, recorrência e mortalidade de CM (Chen *et al.*, 2023). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), os padrões estabelecidos são: baixo peso: $<18,5 \text{ kg/m}^2$; normal: $18,5 \text{ a } <25,0 \text{ kg/m}^2$; excesso de peso: $\geq 25 \text{ a } < 30 \text{ kg/m}^2$; e obesidade: $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ (LI *et al.*, 2023).

Estudo realizado por Fayanju *et al.* (2017), responsável por avaliar a relação entre o IMC com a resposta patológica completa (RPC) e os níveis de células tumorais circulantes (CTC) no CMI, onde foi constatado que dos 73 pacientes, apenas 16 (22%) foram classificados dentro da normalidade ($IMC \geq 18,5 \text{ a } < 25 \text{ kg/m}^2$) ou estavam abaixo do peso ($<18,5 \text{ kg/m}^2$),

enquanto 18 (25%) estavam com sobrepeso (≥ 25 a < 30 kg/m²) e 39 (53%) eram obesos ($\geq 30,0$ kg/m²), sugere que um IMC elevado pode estar associado a uma menor eficácia do tratamento e a maiores níveis de CTCs. Isso pode ser devido a fatores como a farmacocinética alterada dos medicamentos, a inflamação crônica e o impacto do tecido adiposo no microambiente tumoral. Esses fatores ressaltam a importância de considerar o IMC ao planejar o tratamento e monitorar a progressão da doença em pacientes CM. No entanto, os resultados desse estudo apontaram baixa correlação ao relacionar o IMC em pacientes com CIM e CANI.

Quando relacionado à presença de linfonodos ($p= 0,131$), o presente estudo não apresentou diferença significativa entre esse parâmetro e expressão RAGE, assim como também para a presença de metástase ($p= 0,141$), no CM, embora possa estar associados, conforme aponta a literatura, com outros tipos de câncer, onde influenciam no crescimento do número de nódulos metastáticos e na superexpressão do RAGE, contribuindo para a metástases, como por exemplo de adenocarcinoma pulmonar em camundongos xenoenxertados tumorais (CHEN *et al.*, 2020). Porém, ressalta-se que para o CM, não houve resultados significativos.

Ao relacionar a expressão RAGE a presença da proteína nuclear Ki67 $\geq 20\%$, estudos sugeriram que essa avaliação combinada é um importante marcador de mau prognóstico e preditivo, sendo um biomarcador de proliferação celular (HE *et al.*, 2012). O presente estudo corrobora os achados, sendo significativo ($p= 0,034$) a relação entre Ki67 $\geq 20\%$ com a expressão do RAGE para CIM e CANI.

Assim, a marcação do RAGE sugere pior prognóstico, o que destaca a relevância desse receptor na prática clínica e contribui para o avanço dos estudos na área de oncologia, por ser um receptor alvo terapêutico. Quanto as limitações do estudo, têm-se o quantitativo de amostras em condições adequadas e/ou disponibilizadas para as análises, o que pode limitar a potência estatística, dificultando a detecção de diferenças significativas entre grupos. Sugere-se o desenvolvimento de novos estudos para confirmação e expansão dos achados, com amostras maiores, permitindo generalização dos resultados e maior validade externa.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos uma expressão aumentada do RAGE em tumores com CIM em comparação com o CANI. Adicionalmente, os pacientes com CIM e tumores altamente proliferativos e de um subtipo molecular agressivo, apresentaram percentagens de expressão aumentadas de RAGE.

Foi identificado que os fatores relacionados à idade, histórico familiar, acometimento de linfonodos, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, receptores do fator de crescimento epidérmico humano e metástase não foram significativos para a expressão de RAGE em CIM e CANI. No entanto, a presença de Ki67 \geq 20% e de triplo negativo nos participantes, foram associados com a expressão aumentada de RAGE no CIM quando comparado ao CANI.

REFERÊNCIAS

- ADES, F. *et al.* Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. **J. Clin Oncol**, Alexandria, v. 32, n. 25, p. 2794–2803, set. 2014.
- ALVES, C.G *et al.* Subtipos moleculares do carcinoma de mama: como diferem do ponto de vista prognóstico? **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 1-23, 13 mar. 2024.
- AMORNSUPAK, K *et al.* HMGB1 mediates invasion and PD-L1 expression through RAGE-PI3K/AKT signaling pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Bmc Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022.
- AMORNSUPAK, K *et al.* High ASMA + Fibroblasts and Low Cytoplasmic HMGB1 + Breast Cancer Cells Predict Poor Prognosis. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 6, p. 441–452, 2017.
- BALEMA, W *et al.* Inflammatory breast cancer appearance at presentation is associated with overall survival. **Cancer Medicine**. p. 1-12, 2021.
- BARANOVA, A. *et al.* Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis. **Journal of Medicine and Life**, v. 15, n. 2, p. 153–161, fev. 2022.
- BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único De Saúde (CONITEC). **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- CAO, J *et al.* Interação entre índice de massa corporal e histórico familiar de câncer no risco de câncer de mama feminino. **Sci Rep**. 4927, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54762-x>
- CHEN, M.C *et al.* RAGE acts as an oncogenic role and promotes the metastasis of human lung cancer. **Cell Death Disease**, v. 1, n. 4, p. 265, 2020.
- CHEN, H *et al.* Impact of body mass index and its change on survival outcomes in patients with early breast cancer: A pooled analysis of individual-level data from BCIRG-001 and BCIRG-005 trials. **The Breast**. v.71, p.1-12, 2023.
- CHO, H.J *et al.* Associations of body mass index and weight change with circulating levels of high-sensitivity C-reactive protein, proinflammatory cytokines, and adiponectin among breast cancer survivors. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 122, n. 7, p. 1-18, 19 maio 2022.
- COSTA *et al.* Estadiamento tumor-nódulo-metástase e padrão de tratamento oncológico de 73.167 pacientes com cancer de pulmão no Brasil. **J Bras Penumol**. N;46, v.1: e20180251, 2020. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-3713/e20180251>
- DAI, X *et al.* A specific RAGE-binding peptide inhibits triple negative breast cancer growth through blocking of Erk1/2/NF-κB pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 954, p. 175861, set. 2023.

FAYANJU, O. M *et al.* Body mass index mediates the prognostic significance of circulating tumor cells in inflammatory breast cancer. **American journal of surgery**, v. 214, n. 4, p. 666–671, 2017.

FERNANDEZ, S.V. *et al.* Immune phenotype of patients with stage IV metastatic inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1-16, dez. 2020.

FRANCO, A. F. V. **Imunoexpressão de marcadores relacionados a via do HER2 em casos de carcinoma de mama HER2 positivo puro tratados com trastuzumabe.** 2022. Tese (Doutorado em Patologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2022.

FOUAD, T *et al.* Distinct epidemiological profiles associated with inflammatory breast cancer (IBC): a comprehensive analysis of the ibc registry at the university of texas md anderson cancer center. **Plos One**, v. 13, n. 9, p. 1-14, 24 set. 2018.

GUO, Z *et al.* Body mass index increases the recurrence risk of breast cancer: a dose response meta-analysis from 21 prospective cohort studies. **Public Health**, v. 2010, p. 26-33, 2022.

HANTOOSH, M.H.; KADHIM, M.M. Detection of HMGB1, RAGE and IL-33 proinflammatory cytokines in serum of breast cancer patients. **Teikyo Med J**, v. 45, p. 3425, 2022.

HE, W. *et al.* Combined evaluation of receptor for advanced glycation end products and proliferation cell nuclear antigen as prognostic predictor for colon cancer. **Chinese journal of experimental surgery**, v. 29, p. 2572-2574, 2012.

HENNIGS, A *et al.* Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. **BMC Cancer**, Heidelberg, v. 16, n. 1, p. 734. set. 2016.

HESTER, R.H. *et al.* Inflammatory breast cancer: early recognition and diagnosis is critical. **American Journal of Obstetrics And Gynecology**, v. 225, n. 4, p. 392-396, out. 2021.

HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA. **Hospital Haroldo Juaçaba**, 2024. Quem somos nós? Disponível em: <https://haroldojuacaba.com.br>. Acesso em: 24 mai 2024.

HU, H *et al.* Subtyping of triple-negative breast cancers: its prognostication and implications in diagnosis of breast origin, **ESMO Open**, Volume 9, Issue 4, 2024.

HUDSON, B.I.; LIPPMAN, M.E. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 69, n. 1, p. 349-364, 29 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>>. Acesso em: 02 mar 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas da mortalidade.** Rio de Janeiro: INCA, 2021. base de dados. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade> Acesso em: 18 jan 2021.

JACKSON, E.B *et al.* Does age affect outcome with breast cancer? **The Breast**, v. 70, p. 25-31, 2023.

KIM, H.J; JEONG, M.S; JANG, S.B. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. **Int J Mol Sci.** v. 22, n.13, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22136904>

KADI, M *et al.* Histopathological Patterns and Outcomes of Triple-Positive Versus Triple-Negative Breast Cancer: A Retrospective Study at a Tertiary Cancer Center. **Cureus**, v. 15, 2023.

LEE, K. J *et al.* M. Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via ERK and NF- κ B pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n.3, p. 2195–2201, 2018.

LIANG, X *et al.* Targeted next-generation sequencing identifies clinically relevant somatic mutations in a large cohort of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 221-238, 7 ago. 2018.

LYNCE, F *et al.* TBCRC 039: a phase II study of preoperative ruxolitinib with or without paclitaxel for triple-negative inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 26, p.20, 2024.

LIM, B *et al.* Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 18, n. 8, p. 485-499, ago. 2018.

LI, ZHOUIJUAN *et al.* Association between high body mass index and prognosis of patients with early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Pathogenesis and Therapy**. v. 1, p. 205-2015, 2023.

LI J, GONZALEZ-ANGULO AM, ALLEN PK, YU TK, WOODWARD WA, UENO NT, *et al.* Triple-Negative Subtype Predicts Poor Overall Survival and High Locoregional Relapse in Inflammatory Breast Cancer. **Oncologist**. 2011;16:1675–83.

LUKASIEWICZ, S *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 17, 2021.

MAGNA, M *et al.* RAGE inhibitor TTP488 (Azeliagon) suppresses metastasis in triple-negative breast cancer. **npj Breast Cancer**. v. 9, p.59, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00564-9>

MASUDA, H *et al.* Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. **Breast Cancer Res**. v. 15, n. 6, 2013.

MATSUDA, N *et al.* Identification of frequent somatic mutations in inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 163, n. 2, p. 263-272, 27 fev. 2017.

MOHAMED, M.M. *et al.* Inflammatory breast cancer: new factors contribute to disease etiology. **Journal Of Advanced Research**, v. 5, n. 5, p. 525-536, set. 2014.

MUOIO, M.G *et al.* Activation of the S100A7/RAGE Pathway by IGF-1 Contributes to Angiogenesis in Breast Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 621, 4 fev. 2021.

MUOIO, M. G. *et al.* Publisher Correction: rage inhibition blunts insulin-induced oncogenic signals in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, 10 ago. 2023.

NAHMIAS-BLANK, D *et al.* Excess body weight and postmenopausal breast cancer: Emerging molecular mechanisms and perspectives. **Seminars in Cancer Biology**. v. 96, p. 26-35, 2023.

NASSER, M.W *et al.* RAGE Mediates S100A7-Induced Breast Cancer Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Microenvironment. **Cancer Research**, v. 75, n. 6, p. 974-985, 12 mar. 2015.

PRUNEDA, M.P. **Connecting RAGE and cell plasticity in triple-negative breast cancer**. 2021. 181 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2021.

RAMOS, RN *et al.* Tissue-resident FOLR2+ macrophages associate with CD8+ T cell infiltration in human breast cancer. **Cell**, v. 185, n. 7, p. 1189-1207, mar. 2022.

RIGIRACCILO, D.Cosimo *et al.* Focal Adhesion Kinase (FAK)-Hippo/YAP transduction signaling mediates the stimulatory effects exerted by S100A8/A9-RAGE system in triple-negative breast cancer (TNBC). **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, p. 193, jun. 2022.

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

SANTOS *et al.* Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. **BIBCAV/UFPE**, Vitória de Santo Antão. 23° ed, p. 32, 2021.

SARTORI, J; FRASSON, A.L. Mecanismos epigenéticos na carcinogênese mamária: o papel das sirtuínas. **Perspectiva**, Erechim, v. 39, n. 145, p. 19-28, mar. 2015.

SEUNG, E *et al.* A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells. **Nature**, v. 603, n. 7900, p. 328-334, 23 fev. 2022.

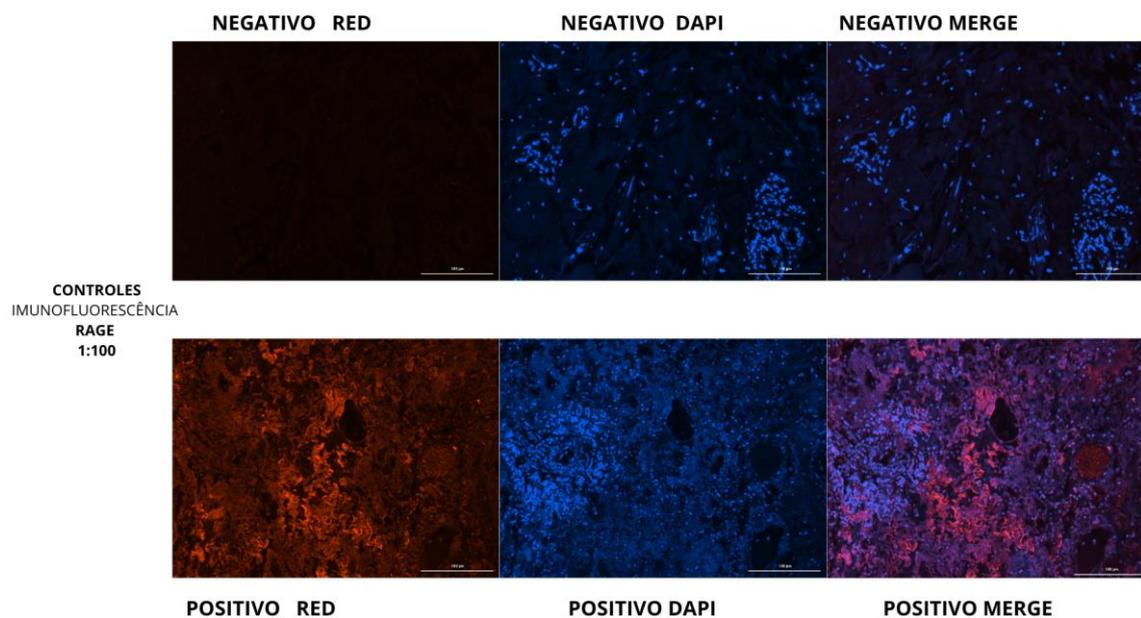
SIEGEL, R.L; GIAQUINTO, A.N; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2024. **CA Cancer J Clin**. v. 74, n. 1, p. 12-49, 2024.

SILVA, A. P. B.C *et al.* Excess body weight significantly affects systemic and tumor inflammatory status and correlates to poor prognosis parameters in patients with breast cancer. **Current research in immunology**, v. 4, 2023.

SILVA, G. R. P da *et al.* Tendência da taxa de mortalidade por câncer de mama em mulheres com 20 anos ou mais no Brasil, 2005-2019. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 29, n. 3, p. 1-11, 2024.

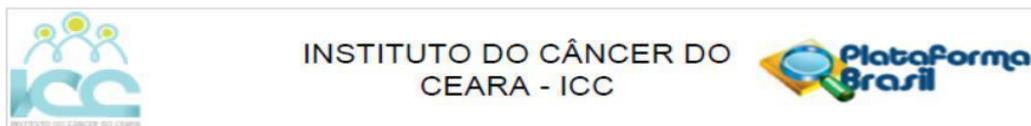
SIMS, G. P. *et al.* HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 367-388, 1 mar. 2010.

APÊNDICE A – CONTROLE NEGATIVO E POSITIVO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA



Legenda: as imagens foram executadas, sendo o controle positivo de um corte histológico pulmonar e o controle negativo de mama, utilizando o microscópio de imunofluorescência *Cytation* do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos. DAPI – Marcador de núcleo; RAGE – Receptor para produtos finais de glicação avançada; MERGE- co-marcação do DAPI e RAGE.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM CARCINOMAS INFLAMATÓRIOS DA MAMA.

Pesquisador: Deysi Viviana Tenazoa Wong

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.);

Versão: 1

CAAE: 51815621.4.0000.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.010.710

Apresentação do Projeto:

O carcinoma inflamatório de mama (CIM) é um subtipo raro e agressivo de câncer de mama e que apresenta prognóstico extremamente desfavorável. A incidência destes tumores corresponde a 2,5% dos casos de câncer de mama nos Estados Unidos, porém atinge altos índices de mortalidade, sendo desconhecidos esses dados no Brasil. O CIM é caracterizado pelo início abrupto de um aspecto inflamatório

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3022-1650 Fax: (85)3022-1650 E-mail: cep.icc@firt.edu.br

Página 04 de 05



Continuação do Parecer: 5.010.710

FORTALEZA, 30 de Setembro de 2021

Assinado por:
 Marcelo Gurgel Carlos da Silva
 (Coordenador(a))