

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES NO CARCINOMA
INFLAMATÓRIO DE MAMA**

FLÁVIA LIMA COSTA FALDONI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-orientadores: Dra. Sandra Drigo Linde

Dr. Fábio Marchi

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Faldoni, Flávia Lima Costa

Identificação de marcadores moleculares no carcinoma inflamatório de mama / Flávia Lima Costa Faldoni – São Paulo, 2018.

172p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. Neoplasias Inflamatórias Mamárias/genética/Inflammatory Breast Neoplasms/genetics. 2. Biomarcadores Tumorais/Biomarkers, Tumor. 3. Mutação/Mutation. 4. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry. 5. Prognóstico/Prognosis.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda minha família que se sacrificou comigo nesta
jornada.

Às mulheres batalhadoras e sofridas que tiveram ou têm este tipo de tumor
tão agressivo.

Às almas das pacientes que tiveram suas vidas ceifadas pelo Carcinoma
Inflamatório de Mama.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pai de infinita bondade e misericórdia, pelo dom da vida e por me fornecer tudo aquilo que necessito e muito mais. E ao Mestre Jesus, que nos acompanha de maneira tão especial e carinhosa, zelando por nós e nos amando incondicionalmente.

À Dra. Silvia Regina Rogatto pela paciência, empenho e amor a este trabalho e pelo exemplo de pesquisadora, professora, mãe e mulher. Por ter me dado essa oportunidade e acreditado em mim.

Aos meus co-orientadores Dra.Sandra Drigo Linde e Dr. Fábio Marchi pelas instruções e colaborações a este trabalho.

A todos aos meus colegas que contribuíram diretamente para este trabalho ser concluído: ao André Villacis, que foi imprescindível nas análises e opiniões, a Luisa Matos Canto Alvim por estar sempre presente ajudando com tudo que estivesse ao seu alcance e Tatiane Basso pelo companheirismo, parceria e ajuda na bancada.

Aos demais amigos do grupo NeoGene, que participaram da caminhada para a realização desse trabalho, Caroline Beltrami, Graziela Spilborgs, Hellen Kuasne, Isabella Maria Paião Ortiz, Julia Mello, Maísa Pinheiro, Marco Lopez, Mariana Bisarro, Mateus de Camargo Barros Filho, Priscila Mayrink e Sara Martorelli.

A Fundação Hermínio Ometto e a todos os meus coordenadores Ismar, Cyntia, Carlos Singnorini, Sofia, Laura e Carlos Grignoli por entenderem minhas faltas e compreenderem minhas necessidades.

Às minhas amigas Fernanda Flores Navarro e Maíra Felonato Mendes por serem minhas irmãs de alma.

À UNESP de Botucatu, pelo espaço cedido para os experimentos e ao Márcio, que sempre solícito, me ajudou a me encontrar no lab.

A todos do Hospital de Barretos, Dr Cristovam Scapulatemo-Neto, Dr. Zucha-Matheus e Dr. Cristiano Pádua, por toda a assessoria patológica e clínica e às meninas prestativas do Biobanco.

Ao Departamento de Patologia, em especial a Dra. Cynthia de Toledo Osório, pela colaboração, dedicação e paciência para revisar todas as lâminas utilizadas nesse estudo.

Ao Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, Louise, Eloisa e Ana Paula.

Aos professores da pós graduação, pela qualidade das aulas proferidas, pelo tempo e dedicação ao programa.

À equipe do Programa de Pós Graduação em Ciências (Oncologia) por todo o apoio e orientação.

À biblioteca.

Ao A.C.Camargo Cancer Center por investir em ensino e pesquisa, proporcionando esperança para os milhares de brasileiros que foram, são ou serão acometidos por câncer.

Ao pessoal da Dinamarca, que são pessoas cuja alegria é contagiante. E aos colaboradores Simon Larsen e Mads.

À minha tia Maria da Penha, e as primas Rita, Rachel e Gercília pela hospedagem e carinho sempre que fiquei em São Paulo.

À minha amiga Alline que me hospedava em Botucatu e que foi acometida por câncer de mama durante meu doutorado.

Agradeço a minha mãe Raquel e ao meu pai Félix, aos quais devo tudo o que sou, que me ensinaram os verdadeiros valores da vida e não pouparam esforços e sacrifícios para que eu tivesse todo apoio intelectual e principalmente moral. Amo vocês.

Aos meus filhos Isabella e Pedro que são a minha razão de viver, amor infinito e incondicional. Espero que possam sentir orgulho da mamãe apesar de deixá-los em vários momentos para me dedicar a este trabalho. Obrigada por toda a compreensão e carinho. Amo vocês.

Ao amor da minha vida, Vinícius, quem eu admiro muito, e que além de marido, é parceiro, amigo e confidente. Seu amor me mantém de pé, me faz sorrir todos os dias, ilumina meus pensamentos e acalenta meu coração. Agradeço a Deus por ter te colocado no meu caminho. Espero que possamos trilhar nossos caminhos juntos até o final de nossa jornada terrena.

RESUMO

Faldoni FLC **Identificação de marcadores moleculares no carcinoma inflamatório de mama**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma inflamatório de mama (CIM) é um tipo raro e agressivo de doença com prognóstico extremamente desfavorável e biologia molecular pouco conhecida. Neste estudo foram avaliadas alterações no número de cópias genômicas (CNA) e perdas de heterozigose de cópia neutra (cnLOH) em 24 casos de CIM. A partir destes dados foram calculados os escores (nTAI, LST e HRD-LOH) preditores da deficiência na via de recombinação homóloga (HR). Em 21 destes casos foram também avaliadas mutações em 105 genes relacionados com o câncer, sendo 13 envolvidos na via de recombinação homóloga (HR) por sequenciamento de alto desempenho (tNGS). A maioria dos CIM analisados apresentou um grande número de CNAs, demonstrando alta instabilidade genômica. Os ganhos genômicos foram mais frequentes que as perdas. As alterações mais frequentes foram ganhos em 1q32 e 8q24 e perdas em 17p13.1. As cnLOHs foram observadas em um grande número de casos, principalmente nos cromossomos 3p e 6q. Nas regiões alteradas foram identificados importantes genes incluindo aqueles envolvidos na resposta imunológica (como *CD46*, *CD55* e *CR1*), de matriz extracelular, associados a processos metastáticos, entre outros. A análise de enriquecimento de vias biológicas destacou as vias envolvendo os genes *MYC*, *SQLC* e *MDM4*. Foram encontrados amplicons mapeados em 1q32.1 1q32.2 1q32.3, 8p23.1 e 17q12-q21.1, os quais podem estar associados com o fenótipo tumoral. Em adição, as amplificações de *CD46* e *CD55* podem levar a supressão da resposta imunológica, o que aponta para o potencial desses candidatos como alvos terapêuticos. Foram também identificadas mutações nos genes da via de HR: *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *PALB2*, *RAD51B*, *RAD51D* e *MUS81*.

Ao menos um dos três escores de deficiência da via de HR foi alto em 15 dos 21 CIM, sendo 14 casos portadores de mutação em genes dessa via. Estes achados sugerem que os pacientes com CIM podem se beneficiar do tratamento com inibidores de PARP. Altos escores foram associados com menor sobrevida em relação aos casos com baixos valores ($p < 0,019$). As mutações somáticas mais recorrentes ocorreram em *TP53* (11 casos) e em *BRCA2* (9 casos). Mutações no gene *TP53* são frequentemente descritas em carcinomas mamários, incluindo CIM. As mutações em *BRCA2* são menos frequentes em literatura do que as descritas em nosso estudo, possivelmente pelo significativo número de pacientes com história de câncer de mama. Este estudo permitiu a identificação de altos escores da via HR e mutações em genes da via de HR, os quais podem ser relevantes para o delineamento de estratégias terapêuticas mais eficazes para estas pacientes. Além disso, foram identificados novos candidatos associados com a resposta imunológica e a características de pior prognóstico, os quais precisam ser avaliados por diferentes estratégias moleculares e num grupo maior de casos de modo a contribuir para o avanço do conhecimento sobre esses raros e agressivos tumores.

SUMMARY

Faldoni FLC [**Identification of molecular markers in inflammatory breast cancer**]. São Paulo 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Inflammatory breast carcinoma (IBC) is a rare and aggressive disease with poor prognosis and its molecular biology is still poorly explored. In this report we evaluated copy number variations (CNAs) and copy neutral loss of heterozygosity (cnLOH) in 24 IBC samples. From these data, we calculated scores (nTAI, LST e HRD-LOH) predictors of Homologous Recombination Deficiency (HRD). A targeted-next generation sequencing was performed using a panel with 105 cancer-related genes (13 HR genes) in 21 samples. Most of the tumors presented a large number of CNAs showing high level of genomic instability. Genomic gains were more frequent than losses. Gains of 1q32 and 8q24 and losses of 17p13.1 were commonly detected. cnLOH was observed in almost all cases, mainly in chromosomes 3p and 6q. We have identified important genes mapped in these altered regions, including those involved in the immunological response (such as *CD46*, *CD55* and *CR1*), extracellular matrix, metastatic process and others. An enrichment analysis using revealed pathways encompassing *MYC*, *SQLC* and *MDM4* genes. We also detected amplicons mapped on 1q32.1 1q32.2 1q32.3, 8p23.1 and 17q12-q21.1, which may be associated with the tumor phenotype. Furthermore, amplification of *CD46* and *CD55* could promote immunological response suppression, which pointed out their potential as therapeutic targets. Mutations in HR genes were detected: *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *PALB2*, *RAD51B*, *RAD51D* and *MUS81*. At least one of three HR deficiency scores was high in 15 of 21 IBC being 14 HR mutated carriers. These findings suggest that IBC patients could benefit from *PARP* inhibitors treatment. Cases with high scores were associated with worse survival ($p < 0,019$) compared with those with low scores. The mutational profile showed recurrent somatic mutations in *TP53* (11 cases) and *BRCA2* (9

cases). *TP53* mutations are frequently reported in breast cancer, including IBC. *BRCA2* mutations presented higher frequency in our CIM cases compared with the literature data, possibly by the significative number of patients with family history of breast cancer. This study allowed us to identify high scores values of HR pathway and HR gene mutations that could be translated into novel therapeutic strategies for the patients care. In addition, new candidates associated with immunological response and worse prognosis features were found. However, these findings need to be evaluated using different molecular strategies and a larger number of cases, which together has potential to contribute to better understand this rare and aggressive tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrando o processo carcinogênico das células do tecido mamário	9
Figura 2	Escores utilizados na avaliação de deficiência da via de recombinação homóloga (HRD).....	32
Figura 3	Representação esquemática da preparação das amostras para hibridação nos microarranjos e dos possíveis resultados encontrados utilizando a plataforma CytoScan HD	39
Figura 4	Representação do pipeline utilizado para o processamento dos dados brutos provenientes do sequenciamento de 105 genes relacionados ao câncer em amostras de CIM.....	45
Figura 5	CNAs identificadas por caso.	52
Figura 6	Perfil das alterações genômicas dos 24 casos de CIM.....	53
Figura 7	Perfil de alterações genômicas do tipo cnLOH (roxo) dos 24 casos de carcinomas inflamatórios.	61
Figura 8	Análise de enriquecimento de vias utilizando a ferramenta <i>GO Biological Process</i>	64

Figura 9	Representação das alterações genômicas identificadas em nove casos evidenciando a presença de cromotripsis.....	71
Figura 10	Vias canônicas significativamente alteradas envolvendo os genes mapeados nas regiões alteradas e presentes em pelo menos 70% dos casos utilizando o software <i>IPA</i>	74
Figura 11	Fluxograma de análise de variantes filtradas e separadas em grupos	76
Figura 12	Representação do número de mutações encontradas por gene.....	79
Figura 13	Valores de escore para cada caso de CIM deste estudo	88
Figura 14	Comparação entre os grupos de casos com e sem mutação em genes da via de HR.....	90
Figura 15	Valores de escore tAI, LST e HRD-LOH calculados para os carcinomas inflamatórios.....	91
Figura 16	Curva de Kaplan-Maier para sobrevida global em meses	92
Figura 17	Índice de Instabilidade genômica (GII) para os casos de carcinomas inflamatórios deste estudo	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo das características clínicas e histopatológicas das 24 pacientes com carcinomas inflamatórios de mama incluídas neste estudo.....	48
Tabela 2	Resumo dos dados de sequenciamento de um painel de 105 genes associados com o câncer em 21 carcinomas inflamatórios de mama.....	75
Tabela 3	Valores de escore pra nTAI, LST, HRD-LOH e GII obtidos nos carcinomas inflamatórios deste estudo.....	94
Quadro 1	Resumo das principais alterações cromossômicas encontradas em biópsias de CIM.....	27
Quadro 2	Regiões de ganhos e perdas de cópias genômicas presentes em pelo menos 70% dos casos deste estudo.	54
Quadro 3	Genes amplificados nos CIM e presentes em pelo menos três casos.....	63
Quadro 4	Deleções homozigotas presentes nos carcinomas inflamatórios (CIM)	65

Quadro 5	Comparação de CNAs entre os casos com diferenças clínicas	67
Quadro 6	Casos com ocorrência de cromotripsis.....	70
Quadro 7	Vias biológicas e os genes envolvidos a partir das regiões alteradas em 70% dos casos.....	73
Quadro 8	Variantes encontradas nos 105 genes sequenciados nos CIM.	80
Quadro 9	Variantes detectadas nos genes da via de HR nos CIM	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH*	<i>Array-based Comparative Genomic Hybridization</i>
ACMG*	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AGCC*	<i>Affymetrix® GeneChip® Command Console®</i>
AJCC*	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CIM	Carcinoma Inflamatório de Mama
CISH*	Hibridação <i>in situ</i> Cromogênica
CM	Carcinoma Mamário
ChAS*	<i>Chromosome Analysis Suite v3.1</i>
CNA*	<i>Copy number alteration</i>
CNAs	Regiões cromossômicas alteradas
cnLOH*	<i>Copy Neutral Loss of Heterozygosity</i>
CNV*	<i>Copy number variants</i>
cT4	Estadio tumoral clínico 4
cTNM	Classificação clínica
DGV*	<i>Database of Genomic Variants</i>
DSB*	<i>Double strand break</i>
ER	Receptor de estrógeno
EMT*	<i>Epithelial to mesenchymal transition</i>
FISH*	<i>Fluorescent in Situ Hybridization</i>
GII	Index de instabilidade genômica
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HT	Hormonioterapia
HR*	<i>Homologous recombination</i>
HRD*	<i>Homologous recombination deficiency</i>
ICGC	Consortio Internacional do Genomado Câncer
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA*	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>

LOH*	<i>Loss of Heterozygosity</i>
LST*	<i>Large-Scale Transitions</i>
MMR*	<i>Mismatch repair</i>
MAM	Macrófagos associados a metástase
NST*	No special type
NHEJ*	<i>Non-homologous end joining</i>
PARP	Poli-ADP ribose polimerase
pCR	Resposta patológica completa
PD-1*	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PDL-1*	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand</i>
PR	Receptor de Progesterona
SEER*	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
SOE	Sem outra especificação
T1	Lesões em estágio inicial
tAI*	<i>Telomeric allelic imbalance</i>
TCGA*	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-1	Transforming growth factor 1
TN	Triplo negativos
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa
TNM	Tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e Metástases
TNBC*	Tumores triplo negativos
WHO*	World health organization

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO..	1
1.1	O carcinoma inflamatório da mama.....	7
1.2	O carcinoma inflamatório da mama e o microambiente tumoral.....	16
1.3	Estudos Moleculares no Carcinoma Inflamatório de Mama.....	18
1.4	Alterações de número de cópias nos CIM.....	23
1.5	Perfil Mutacional dos CIM.....	28
1.6	Instabilidade Genética em Carcinomas de Mama	29
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral.....	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Pacientes e amostras	35
3.2	Metodologia	37
3.2.1	Extração de DNA.....	37
3.2.2	Análise de alterações genômicas em CIM - CNAs	37
3.2.3	Análise de regiões com Cromotripsis	40
3.2.4	Associação de CNAs com os dados clínico-histopatológicos.....	41
3.2.5	Análise de vias biológicas- <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i>	41
3.2.6	<i>Target-Next Generation Sequencing (tNGS)</i>	42
3.2.7	Cálculo dos escores de deficiência da via de recombinação homóloga.....	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Características Clínicas e Histopatológicas.....	47
4.2	Alterações do número de cópias genômicas (CNA)	50
4.3	Comparação das CNAs com os dados clínico-histopatológicos.....	65
4.4	Cromotripsis.....	70

4.5	Análise de vias biológicas-- <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA).....	71
4.6	Sequenciamento de alto desempenho usando alvos específicos <i>Target-Next Generation Sequencing</i> (tNGS)	74
4.7	Pontuação dos Escores De Deficiência da Via de Recombinação Homóloga	86
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO.....	142
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	144

ANEXOS

Anexo 1 Cartas de aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa-
CEP (A.C.Camargo Cancer Center e Hospital de Câncer de
Barretos)

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama (CM) é o tipo mais comumente encontrado em mulheres em todo o mundo. Segundo as estimativas para 2017 (SEER - *Surveillance, Epidemiology and End Results Program 2017*), foram estimados nos Estados Unidos 252.710 novos casos de câncer de mama. As taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas na Europa Ocidental (96/100 mil) e as menores na África Central e na Ásia Oriental (27/ 100 mil) (Cancer Research UK 2018). Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2018).

Os CMs podem ser categorizados de acordo com o subtipo histológico e molecular. Até 2012 mais de 75% dos tumores diagnosticados como invasivos, eram definidos como carcinomas ductais e aproximadamente 5 a 15% como carcinomas lobulares, entretanto, foram definidas e identificadas outras variantes menos comuns (CALDARELLA et al. 2013). Em 2012, o WHO *Classification of Tumors of the Breast*, publicou uma atualização propondo algumas modificações. A terminologia do tumor mais comum, o Carcinoma Ductal Invasivo sem outra Especificação (SOE), passou a ser chamado de Carcinoma Invasivo sem Tipo Especial (*Invasive carcinoma of no Special Type- NST*), o qual compreende os tumores sem características específicas de diferenciação. A diferença desta nomenclatura

ocorre apenas pela retirada do nome “ductal”, pois este transmitia a ideia de ser derivado histologicamente dos ductos, o que pode não ser comprovado, porém as duas nomenclaturas são sinonímias e ambas são aceitas pelos patologistas.

A nova classificação inclui também nove tipos especiais e suas variantes e 11 tipos muito raros de tumores mamários. Entre os subtipos especiais, foram incluídos os carcinomas lobulares invasivos, tubular, cribriforme, carcinomas com características medulares, carcinoma mucinoso, carcinoma com diferenciação de células em anel de sinete, carcinoma com diferenciação apócrina, carcinoma micropapilar invasivo e carcinoma metaplásico sem tipo especial. Dentre os tipos raros foram incluídos os tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos, carcinoma secretório, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma polimorfo, carcinomas com elementos neuroendócrinos, carcinoma papilar invasivo, carcinoma de células acinares, carcinoma oncocítico, carcinoma rico em lipídios, carcinoma de células claras rico em glicogênio e carcinoma sebáceo. Dois padrões clínicos, o carcinoma inflamatório e carcinomas mamários bilaterais sincrônicos e não sincrônicos, também foram incluídos na abordagem dos subtipos especiais (LAKHANI et al. 2012). Estes tipos incomuns apresentam uma morfologia distinta e apresentam fatores prognósticos e preditivos diferentes dos demais subtipos (CALDARELLA et al. 2013).

Segundo o *AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition* (AMIN et al. 2017), embora o sistema TNM (T; tamanho tumoral; N: comprometimento de linfonodos e M: metástase a distância) tenha valor determinante no resultado

futuro do paciente, na prática clínica, devem ser considerados múltiplos fatores que sejam relacionados com prognóstico e predição. Além da avaliação do comprometimento linfonodal axilar, tamanho e estadiamento tumoral, o grau e subtipo histológico, idade da paciente, perfil de expressão dos receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), do fator de crescimento epidérmico (ERBB2/HER2) assim como o índice de proliferação celular (Ki67) também são essenciais na tomada de decisões. Estas características são essenciais, por exemplo, para a tomada de decisão da necessidade ou não da paciente receber tratamento hormonal (anti-estrógeno) ou anti-HER2. O sistema TNM pode ser determinado clinicamente, (cT, cN, c/pM), e em conjunto com os dados de expressão de ER, PR e HER2 e grau tumoral, permitem um primeiro estadiamento que direcionará a paciente para, por exemplo, cirurgia com tratamento adjuvante (neoadjuvância). Após a ressecção cirúrgica, antes de qualquer tratamento, pode ser determinado o estadiamento a partir da análise anatomopatológica, (pT, pN, c/pM), em conjunto com a avaliação do grau, expressão de ER, PR e HER2 e ensaios genômicos, quando disponíveis (como OncotypeDx® em pacientes T1 ou T2, N0, M0, positivos para ER e negativos para HER2) (AMIN et al. 2017).

A expressão do ER e PR detectados por imunohistoquímica (IHQ) é utilizada na rotina clínica, tendo essas proteínas aplicação prognóstica e preditiva, definindo a resposta ao tratamento do CM com hormonioterapia (HT) (AMIN et al. 2017). A amplificação do gene *HER2/ERBB2* com consequente aumento de expressão da proteína na superfície da célula

tumoral, é relatado em 20% dos CM e está relacionada a um pior prognóstico (CALDARELLA et al. 2013).

O proto-oncogene *HER2/ERBB2* codifica um receptor para tirosina quinase e está envolvido em várias vias reguladoras da proliferação, invasão, sobrevivência e motilidade celular (para revisão CORBEN 2013). O aumento da expressão deste gene é um fator preditivo ao tratamento com o anticorpo monoclonal Trastuzumabe, o qual se liga à porção extracelular da proteína HER2, impedindo a sua dimerização e, conseqüentemente, interrompendo a transdução de sinal e o crescimento celular. Como consequência, ocorre o aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes, tanto na doença localizada quanto na metastática (BENSON et al. 2009; GIANNI et al. 2016). Recentemente, a utilização de Pertuzumabe demonstrou aumento significativo nas taxas de sobrevida livre de doença invasiva em pacientes com câncer de mama HER2 positivo quando adicionado ao Trastuzumabe e quimioterapia (BASELGA et al. 2012; SWAIN et al. 2015). O anticorpo Pertuzumabe se ligar ao domínio de dimerização do HER2, inibindo sua heterodimerização com outros receptores da família HER. Estes dois anticorpos induzem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (SWAIN et al. 2015). O aumento da expressão da proteína HER2 é detectado por IHQ ou pela presença da amplificação gênica, identificada pela metodologia de FISH (Hibridação *in situ* por Fluorescência) ou CISH (Hibridação *in situ* Cromogênica), por exemplo (ROSA et al. 2009, 2013).

Para compreender a complexidade biológica do câncer de mama, subtipos moleculares foram estabelecidos e definidos em cinco grupos, luminal A, luminal B, HER2, *basal-like* e *normal-like* (revisado em KIM et al. 2018). Os primeiros estudos que evidenciaram esses subtipos foram conduzidos por PEROU et al. (2000) e SORLIE et al. (2001) que avaliaram o perfil de expressão gênica global em CM. Baseados na similaridade ou diferença de seus perfis de expressão, foi verificado que os tumores do subtipo luminal apresentam expressão elevada de ER e mostram perfis de expressão similares às células luminais da glândula mamária normal. Os tumores *basal-like* mostram expressão negativa dos receptores hormonais e expressam genes geralmente detectados em células do epitélio basal/mioepitelial. Os tumores HER-2 apresentam expressão elevada deste gene com concomitante amplificação gênica e os casos denominados de *normal-like* ficaram agrupados com amostras de fibroadenoma e mama normal. Subsequentemente, demonstrou-se que o subtipo luminal poderia ser subdividido em luminal A e B (SORLIE et al. 2003). Os tumores do tipo luminal A e B podem ser discriminados pelo índice de proliferação celular, Ki67 baixo ou alto, respectivamente (THOMPSON et al. 2011). Entre outras diferenças, os tumores luminais A são positivos para ER e/ou PR e negativos para HER2 e apresentam Ki-67 baixo (<14%). Por outro lado, os tumores luminais B são positivos para ER, negativos para PR e positivos ou negativos para HER2 e apresentam Ki-67 alto ($\geq 14\%$) (BRAUN et al. 2013). Comparativamente, os tumores luminais A apresentam bom prognóstico e são resistentes à quimioterapia e sensíveis ao tratamento hormonal, ao

passo que os luminais B apresentam, em geral, pior prognóstico, respondem melhor à quimioterapia e são menos sensíveis ao tratamento hormonal (revisado em PRAT e PEROU 2011).

Em 2010, PRAT et al. relataram um novo subtipo molecular, denominado *claudin-low*. Estes tumores são caracterizados pela expressão baixa a ausente dos marcadores de diferenciação luminal, alto enriquecimento para marcadores de transição epitélio-mesênquima, genes de resposta imunológica e fenótipo de células-tronco tumorais. Clinicamente, a maioria dos tumores enquadrados neste subtipo molecular, é triplo-negativo e com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular. Estes tumores também têm uma taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante padrão, a qual pode ser classificada como resposta intermediária entre os tumores *basal-like* e luminal.

Em geral, os tumores *basal-like* acometem especialmente mulheres afro-americanas e associados um prognóstico desfavorável, pois não possuem expressão de receptores hormonais ou aumento de expressão de HER2 (triplo-negativos), além de apresentarem expressão de citoqueratinas, receptor do fator de crescimento epidérmico e outros genes relacionados com células basais. Em estudos do perfil de expressão gênica, o câncer de mama associado a mutações no gene *BRCA1* se agrupa com o grupo *basal-like*. Além disso, muitos tumores *basal-like* esporádicos mostram disfunção de *BRCA1* (SCHNITT 2010).

SANTAGATA et al. (2014) propuseram uma classificação dos tumores de mama baseada no fenótipo das células epiteliais mamárias normais.

Foram identificados 11 estágios de diferenciação das células luminais os quais foram associados com quatro principais subtipos diferencialmente expressos de receptores hormonais de vitamina D, andrógenos e estrógenos relacionando-os com a sobrevivência dos pacientes (HR0: não expressa nenhum dos receptores e está associado a um pior prognóstico; HR3: expressa os três receptores hormonais e está associado a um melhor prognóstico).

1.1 O CARCINOMA INFLAMATÓRIO DA MAMA

O carcinoma inflamatório de mama (CIM) é um subtipo raro de câncer de mama que apresenta prognóstico desfavorável. É caracterizado por uma incidência não uniforme quanto a distribuição geográfica, sendo mais comum no Norte da África atingindo mais mulheres afro-descendentes quando comparado com mulheres brancas (WINGO et al. 2004; HANCE et al. 2005; IL'YASOVA et al. 2011; VAN UDEN et al. 2015).

O CIM corresponde a 2,5% dos casos de câncer de mama nos Estados Unidos (HANCE et al. 2005; VAN UDEN et al. 2015), 5 a 7% dos casos de carcinomas de mama na Tunísia (BOUSSEN et al. 2008) e 11% dos casos no Egito (SOLIMAN et al. 2009), as quais são consideravelmente mais elevadas do que no Ocidente. Para o nosso conhecimento, não há dados sobre a incidência deste tipo tumoral no Brasil.

Além da variabilidade da distribuição geográfica dos CIM, ocorrem disparidades relacionadas a fatores etários, de raça e socioeconômicos (LEVINE et al. 1985; HANCE et al. 2005).

Os fatores de risco associados aos CIM são pouco compreendidos; entretanto; foram associados a esses tumores o alto índice de massa corpórea (IMC), fatores relacionados com os hormônios como idade precoce de menarca e pré-menopausa (maior proporção de pacientes CIM na pré-menopausa do que os não CIM), etnia (preditor independente de risco elevado de mortalidade por câncer de mama) e status socioeconômico (preditores independentes de diagnóstico de estágio avançado de câncer de mama) (SCHAIRER et al. 2013; VAN UDEN et al. 2015). Não foi claramente evidenciada a associação deste subtipo tumoral com mutações genéticas herdadas ou história familiar, mas sabe-se que são tumores que apresentam muitas alterações cromossômicas e mutações somáticas. Fatores de risco como infecções virais ou inflamação crônica têm sido sugeridos como associado a sua etiologia, porém há poucas evidências em literatura (MENTA et al. 2018). Portanto, uma reunião de fatores intrínsecos e extrínsecos levam à alterações cromossômicas e dano ao DNA, promovendo diversas alterações celulares vantajosas que conduzem ao processo tumoral (Figura 1).

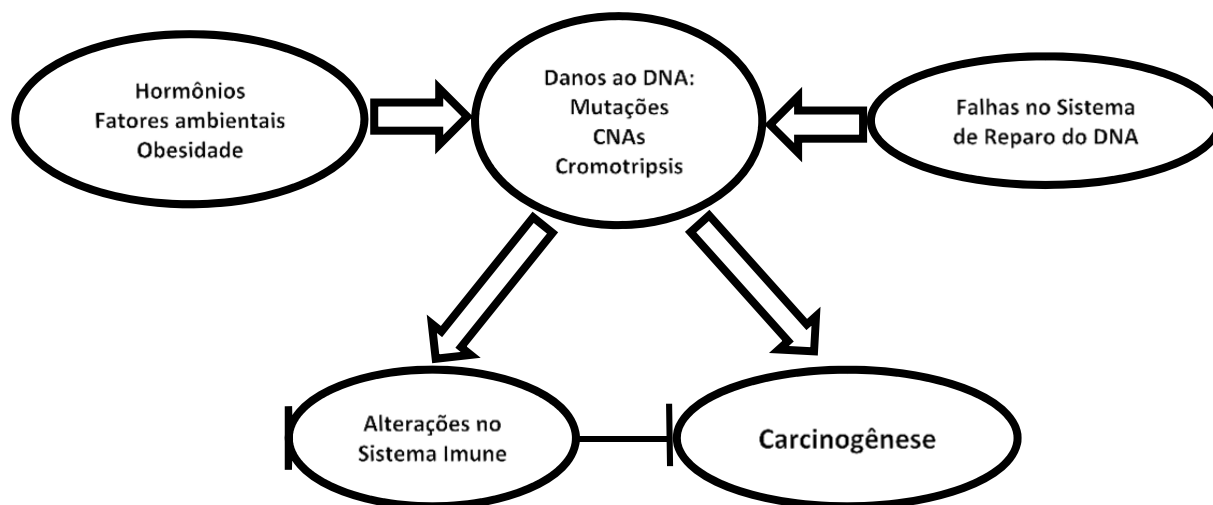


Figura 1. Esquema ilustrando o processo carcinogênico das células do tecido mamário. Fatores ambientais associados aos efeitos dos hormônios ovarianos nas células da mama, promovem proliferação celular que pode ser intensificada pela desregulação do metabolismo de lipídios e colesterol. Um constante estímulo de proliferação significa menor tempo para o reparo de alterações, levando a célula mamária a reproduzir erros como mutações, CNAs (Alterações no número de cópias) e cromotripsis. O acúmulo dessas alterações associadas com a inibição do sistema imunológico, podem ser fatores associados a gênese tumoral.

O CIM é a forma mais letal de carcinoma mamário e é caracterizado por rápida progressão e comportamento agressivo desde as fases iniciais da doença (ROBERTSON et al. 2010; VAN UDEN et al. 2015) sendo responsável por 7 a 10% das mortes associadas ao câncer de mama em estados do oeste dos Estados Unidos, correspondendo a 4.000 mortes por ano neste país (HANCE et al. 2005; MENTA et al. 2018).

Na apresentação clínica são observados sinais inflamatórios como eritema, edema cutâneo, pele tipo casca de laranja com espessamento e aumento de temperatura local e dor (TARDIVON et al. 1997). Com o aparecimento desses sinais, muitas pacientes procuram o atendimento médico, entretanto, como é comum a ausência de massas palpáveis, é

excluído o diagnóstico de câncer e a lesão acaba sendo tratada como uma mastite bacteriana. Como consequência, ocorre o atraso do diagnóstico e comprometimento do prognóstico dessas pacientes. Em 2005, WALSH e SWAIN relataram que um exame clínico preciso pode detectar 55% a 85% dos casos de CIM assim como a presença de pequenos nódulos nos linfonodos axilares e supraclaviculares.

A dificuldade no diagnóstico dos CIM está no fato de existirem outras patologias que apresentam características clínicas e sinais similares a estes tipos tumorais, como nas infecções (mastite que frequentemente apresenta febre e melhora com o uso de antibióticos), traumas (gerando lesões teciduais internas e inflamação) e outras doenças neoplásicas, que são denominadas tumores inflamatórios secundários (metástase e leucemias que podem afetar a pele que recobre a mama) (DAWOOD et al. 2011).

O aparecimento brusco das lesões na pele associado ao fato de que muitas mulheres já apresentam comprometimento de linfonodos e metástases ao diagnóstico, sugere um fenótipo altamente invasivo com taxas de progressão tumoral não compatíveis com as taxas de crescimento observada em tumores sólidos (JAIYESIM et al. 1992; MERAJVER et al. 1997; MCCARTHY et al. 2002; MENTA et al. 2018).

Embora estes tumores apresentem manifestações clínicas peculiares, não existem achados histológicos específicos que os diferencie dos demais tipos de carcinomas, exceto pela presença de êmbolos tumorais espalhados no sistema linfático cutâneo e subcutâneo (CORBEN 2013; MENTA et al. 2018). Esses achados mostram alto grau de angiogênese e invasão dos

vasos linfáticos. Os êmbolos tumorais (achado histológico clássico) interferem na drenagem local contribuindo com o edema (ROBBINS et al. 1974; VAN UDEN et al. 2015; LIM et al. 2018). Estes êmbolos por serem formadas por massas celulares pouco aderentes, se desprendem e se espalham por disseminação passiva e contínua favorecendo a metástase à distância e recorrência local (ALPAUGH et al. 2002). A invasão dos vasos é uma característica intrínseca observada desde o seu surgimento e não um evento progressivo (ALPAUGH et al. 1999; VAN UDEN et al. 2015). Portanto, o termo carcinoma inflamatório não diz respeito a um infiltrado de células inflamatórias caracterizando o tumor, e sim à aparência eritematosa, edemaciada e quente do local, os quais são sinais inflamatórios clássicos (DIRIX et al. 2006).

A porcentagem de carcinoma ductal e outros subtipos histológicos nos CIM é semelhante ao dos tumores não inflamatórios (JAIYESIMI et al. 1992), e por não possuírem características específicas, o exame patológico se torna difícil de ser realizado com precisão (YAMAUCHI et al. 2012).

Apesar de sua natureza agressiva, ainda não foi encontrado um marcador que seja específico para esta doença, tanto para a diferenciação da morfologia celular e histológica, como em nível molecular. Na ausência desses critérios, o diagnóstico depende inteiramente dos critérios definidos pela classificação TNM. A discrepância no diagnóstico, na maioria dos estudos moleculares e nos ensaios clínicos, leva a exclusão de pacientes com a doença ou a inclusão de pacientes sem a doença, reduzindo o desenvolvimento de novas drogas específicas para este tipo tumoral,

almejado há anos pela indústria farmacêutica (FOUAD et al. 2017; LIM et al. 2018).

Quanto ao estadiamento destes tumores, os indivíduos com CIM estágio IV têm sobrevida significativamente pior quando comparados aos pacientes com câncer de mama não inflamatório. Portanto, é imperiosa a distinção entre essas duas formas do câncer de mama, para o reconhecimento do pior prognóstico nos casos de CIM. Essa representação imprecisa conduz a uma incerteza em termos de critérios de seleção para a investigação clínica e experimental, pois o sistema TNM não considera diferenças significativas na sobrevida entre os dois grupos de tumores no estágio IV (AMIN et al. 2017).

Segundo os novos critérios para a classificação dos CIM do *American Joint Committee on Cancer 8th Edition*, que entrou em vigor em 2018, o CIM é caracterizado pelo eritema difuso e edema (*peau d'orange*) envolvendo um terço ou mais da pele da mama. O tumor é classificado como cT4d sendo importante ressaltar que o diagnóstico clínico é o principal a ser considerado nestes casos. Em análises de imagem, pode ser detectada uma massa e o espessamento da pele mamária, mas nem sempre estas características estão presentes. Uma massa subjacente pode ser ou não palpável, sendo que as alterações cutâneas são causadas pelo linfedema ocasionado pela presença de êmbolos nos vasos linfáticos da derme, que pode ou não ser detectado em biópsias. Portanto, os achados de êmbolos tumorais na pele não são necessários para o diagnóstico de CIM. Entretanto, é necessária a identificação histológica para demonstrar um carcinoma invasivo no

parênquima ou nos vasos linfáticos. A determinação dos marcadores moleculares (ER, PR, HER2) e grau histológico são imprescindíveis para o tratamento (AMIN et al. 2017).

Tumores mamários que apresentam êmbolos nos vasos linfáticos, sem a presença das alterações características na pele da mama, devem ser classificados de acordo com o tamanho do tumor (T1, T2 ou T3) e não como inflamatórios. Segundo o consenso, não podem ser diagnosticados como inflamatórios os tumores avançados que invadem os vasos da derme ou causam ulceração na pele, sem alterações típicas na pele. Uma das características do CIM é seu início abrupto e sua rápida evolução (inferior a 6 meses), em relação ao primeiro sintoma, portanto não devem ser considerados como inflamatórios tumores nos quais houve a negligência no tratamento (AMIN et al. 2017). Além disso, estes tumores apresentam uma alta taxa de metástases ao diagnóstico (aproximadamente 30%) e, portanto, o estadiamento inicial preciso é fundamental para planejar um tratamento sistêmico e locorregional adequado (GROHEUX et al. 2013).

Em relação a idade, mulheres com CIM apresentam idade mais jovem do que em tumores não-CIM (VAN UDEN et al. 2015). A mediana da idade do diagnóstico em pacientes com CIM é de aproximadamente 5,25 anos mais jovem do que em pacientes com câncer de mama não CIM (HANCE et al. 2005).

O tratamento para o CIM inclui terapia sistêmica neoadjuvante, cirurgia e radioterapia, incluindo terapia baseada em antraciclina e/ ou taxano e terapia adicional direcionada a HER2 na neoadjuvância quando

positivos ou hormonioterapia com tamoxifeno quando positivos (luminal A). Os casos triplo negativos são tratados apenas com quimioterapia, pois ainda não possuem tratamento alvo (MENTA et al. 2018). Todos os subtipos moleculares são consideravelmente mais agressivos nos CIM do que nos demais tumores de mama, com pior sobrevida livre de doença (MASUDA et al. 2013; MENTA et al. 2018).

Pacientes no estadio III, recebem a neoadjuvância com antraciclina e taxano, cirurgia e radioterapia, com boas taxas de resposta. Pacientes no estadio IV (aproximadamente um terço dos pacientes com CIM apresentam doença metastática ao diagnóstico) são tratados com quimioterapia sistêmica, não sendo comumente indicado nestes casos a cirurgia e radioterapia (MENTA et al. 2018).

Vários ensaios clínicos tentaram abordar a questão do benefício na terapia local em pacientes CIM e não-CIM no estadio IV, sendo que os pacientes CIM foram associados com menor sobrevida global em relação aos não-CIM (2,3 vs 3,4 anos) (AKAY et al. 2014).

A resposta ao tratamento é avaliada utilizando dados do exame clínico e radiológico a cada 6 a 12 semanas. Para o estadio III, a resposta patológica completa (pCR) é de aproximadamente 15,2%, sendo 7,3% para o subtipo positivo para receptores hormonais/HER2+, 30,6% para o subtipo negativo para receptores hormonais/HER2+ e 18,6% para os triplo-negativos. Em geral, a pCR em pacientes com CIM é menor em comparação com os tumores não-CIM no mesmo estadio e subtipo molecular. Mais

importante, a pCR mostrou ser um marcador preditivo de sobrevida nos CIM (MASUDA et al. 2014; MENTA et al. 2018).

Embora todos os subtipos moleculares que ocorrem nos carcinomas não CIM também ocorrem nos CIM, a proporção com que ocorrem é diferente. A incidência do subtipo receptor hormonal positivo nos CIM ocorre em 30% dos casos de CIM e 60-80% nos não-CIM (LI et al. 2011; MASUDA et al. 2014). As taxas de incidência dos subtipos HER2 positivo e TNBC (triplo negativos) são maiores nos CIM quando comparados aos não CIM. Os tumores HER2 positivos compreendem 40% nos CIM versus 25% nos não CIM enquanto os TNBC correspondem a 30% dos CIM versus 10-15% nos não CIM (PARTON et al. 2004; KERTMEN et al. 2015).

Além de altas taxas de proliferação celular e angiogênese, expressão aumentada de quimiocinas, receptores de quimiocinas, E-caderina e MUC1, os CIM também apresentam mutações no gene *TP53* (revisado por BERTUCCI et al. 2014) e *eIFG41* (SILVERA et al. 2009).

Alguns ensaios clínicos estão em andamento, como a utilização a neoadjuvância de Bevacizumab (anti-VEGF), Ruxolitinib (inibidor de JAK-STAT), Eribulin (quimioterapia com propriedades anti-células tronco); adjuvância de Pembrolizumab (anti PD-1), Atezolimumab (anti PDL-1), Cobemetinib (inibidor de MEK), Talimogene laherparepvec (imunoterapia oncolítica), Olaparib e radioterapia, entre outros (LIM et al. 2018; MENTA et al. 2018). Atualmente, estes ensaios estão na fase II (LIM et al. 2018).

1.2 O CARCINOMA INFLAMATÓRIO DA MAMA E O MICROAMBIENTE TUMORAL

Apesar da literatura enfatizar que a palavra “inflamatório” se refere apenas aos sinais inflamatórios decorrentes da embolia dos vasos linfáticos da derme pelas células tumorais, e não pela ativação das vias inflamatórias, muitos grupos têm estudado o envolvimento de células do sistema imunológico e células do microambiente tumoral que possam estar envolvidas no processo. Diversos autores propuseram inúmeras associações entre o processo imune com fatores preditivos favoráveis em termos de sobrevida e resposta à quimioterapia aplicado ao câncer de mama (RODY et al. 2009; DENKERT et al. 2010; ALI et al. 2014; LOI et al. 2014).

A presença de macrófagos associados com metástase (MAMs) no sítio metastático (os quais estão envolvidos com o microambiente que favorece o tumor) parecem estimular o extravasamento de células tumorais, sobrevivência e subsequente crescimento de metástase pulmonar (CHEN Q et al. 2011). Nos CIM, foi relatado que os MAMs que promovem a metástase são mediados pela IL-6 secretada pelas células epiteliais e também pelas células tronco mesenquimais (WOLFE et al. 2016).

A interação entre o receptor PD1 (*Programmed Cell Death 1*) (presente nos linfócitos T) e de um de seus ligantes o PDL1 ou CD274 (presente em células tumorais e outras células do sistema imunológico) é uma das principais vias inibitórias da resposta imunológica. A expressão desse ligante nas células tumorais cria um microambiente imunossupressor

que favorece a progressão tumoral. Quando o PDL1 interage com o receptor PD1, ocorre supressão da migração, proliferação e secreção de citocinas dos linfócitos T, impedindo a resposta adequada que eliminaria a célula tumoral. Diversos ensaios clínicos testaram drogas anti-PD1 ou anti-PDL1 em tumores que expressam altos níveis desses ligantes como novas estratégias terapêuticas. Os CIM apresentam expressão aumentada de *PDL1* em aproximadamente 30% dos casos quando comparados aos não-CIM, portanto esses pacientes poderiam se beneficiar deste tipo de imunoterapia (BERTUCCI et al. 2015).

As células do CIM migram rapidamente de seu sítio para os vasos linfáticos da derme da mama, levando a perda de adesão. A transição epitélio-mesênquima (EMT) é um processo biológico no qual uma célula epitelial perde sua característica sedentária ganhando motilidade. Este processo parece ser fundamental para o fenótipo metastático da célula tumoral e pode ser controlado por fatores de transcrição codificados por diversos genes, incluindo os associados com a migração celular durante a embriogênese (*SOX2*, *SNAI1* e *SNAI2*), ou envolvidos com a repressão da região promotora do gene codificador da E-caderina (*SNAI1*, *SNAI2* e *ZEB1*) (revisado por COHEN et al. 2015). Outros genes como o *TWIST* (YANG et al. 2004), *FOXC2* (MANI et al. 2007) e *TGM2* (KUMAR et al. 2010) também foram descritos como envolvidos no controle da EMT. Embora a EMT pareça ser fundamental e um passo necessário na rápida progressão tumoral, os CIM são caracterizados por altos níveis da molécula de adesão E-caderina, até mesmo nos sítios metastáticos, levando alguns autores a postularem que

esta molécula poderia estar promovendo a progressão tumoral (RODRIGUEZ et al. 2012).

As citocinas TNF- α , TGF-1 e IL-6 foram descritas como envolvidas na EMT (COHEN et al. 2015). Os autores cultivaram linhagens celulares comerciais (SUM149 e SUM190) e linhagens estabelecidas (IBC-3 e KPL4) de CIM com fatores provenientes de células T ativadas e detectaram a indução da expressão de genes relacionados ao processo EMT. Paradoxalmente, esses mesmos fatores induziram um aumento da expressão da E-caderina, apenas nas células dos CIM e não nas linhagens de outros tipos de carcinomas mamários também testados. Este estudo sugeriu, portanto, um importante papel das células imunológicas na agressividade dos CIM e, conseqüentemente, de possíveis alvos terapêuticos que envolvam essa interação.

1.3 ESTUDOS MOLECULARES NO CARCINOMA INFLAMATÓRIO DE MAMA

A identificação de um perfil molecular que caracterizasse os CIM tem sido alvo de investigação; entretanto, a escassez de amostras e o pequeno tamanho das biópsias dificultaram um estudo molecular mais aprofundado. Foram realizados alguns estudos do perfil de expressão gênica comparando os subtipos moleculares clássicos propostos previamente para os tumores de mama não inflamatórios (BERTUCCI et al. 2004, 2005; BOERSMA et al. 2008; BERTUCCI et al. 2010). Em resumo, estes estudos demonstraram que

os CIM são tumores bastante heterogêneos e apresentam os mesmos subtipos moleculares dos carcinomas não inflamatórios. Estes achados sugerem que as células tumorais destes dois subtipos têm a mesma origem e indicam que os subtipos moleculares e o fenótipo dos CIM são características biológicas independentes (BERTUCCI et al. 2010).

A maioria dos estudos que utiliza a estratégia de análise de expressão de transcritos que buscou identificar uma assinatura molecular para os CIM, relatou poucos genes e vias comuns entre os estudos (BERTUCCI et al. 2004, 2005; BOERSMA et al. 2008; BERTUCCI et al. 2010). Este fato pode estar relacionado com a escassez de números de casos quando comparado com um grande número de genes, com os critérios de elegibilidade entre os estudos, diferenças entre as características e definições dos grupos CIM e não-CIM, principalmente no que diz respeito ao status dos receptores hormonais e também pelo uso de diferentes tecnologias e diferentes plataformas. Apesar dessas limitações, alguns genes candidatos foram sugeridos nestes estudos como o *RHOC* e *WISP3* (VAN GOLEN et al. 1999), *NFκB* (VAN LAERE et al. 2006); e *GLI1* (THOMAS et al. 2011; OLADAPO et al. 2017). O gene *WISP3* foi encontrado expresso e secretado em linhagens de CIM (MDA-IBC-1) (HALL et al. 2009). A via de *NFκB* foi relatada como uma das principais vias mediadores da inflamação, mediando as interações do microambiente tumoral com as células CIM, sendo relacionada com o surgimento de resistência a tratamento por evasão de apoptose (WANG e KITAJIMA 2007; GHOSH-CHOUDHURY et al. 2010; LIM et al. 2018). O gene *GLI1* foi relatado com

baixa atividade em CIM nos pacientes que alcançaram a resposta patológica completa, sendo associado com o fenótipo agressivo destes tumores (BERTUCCI et al. 2014).

Em 2013, WOODWARD et al. realizaram a análise de expressão de transcritos e de alterações no número de cópias genômicas (CNA), em uma plataforma de alta resolução, usando 20 CIM 20 não-CIM e 5 casos de tecidos mamários normais de biópsias congeladas. Praticamente todos os tumores apresentaram ganhos em 1q e 8q e perdas em 8p. Perda em 16q foi observada em alta frequência nos não-CIM comparados com os CIM. Nos tumores inflamatórios foram frequentes os ganhos em 1p34 1p12 2p25 2p21, 6p22-6p21, 9q34, enquanto ganhos em 14q11 14q22-14q23 16p13-16p11 20q13 22q11 foram mais frequentes nos tumores não-CIM. Perdas em 5q13, 8p23, 8p21, 9p12 16q12-16q13 16q22 17p13-17p11 e 17q21 foram encontradas com maior frequência nos tumores não-CIM. Em adição, os CIM não apresentaram perdas genômicas frequentes. A concordância entre os dados de CNA e expressão revelaram 15 genes com correlação positiva mapeados em 6p21-22 e 20q13 incluindo *TTRAP*, *C6orf89*, *C6orf62*, *NFKBL1*, *C6orf47*, *BAT3*, *MDC1*, *CSNK2B*, *EHMT2*, *BCF1*, *MTCH1*, *TUBB*, *OR2B6*, *ZNF217*. Entretanto, após a comparação destes dados com o TCGA, os autores observaram que havia uma sobreposição desta assinatura com outros tumores agressivos, mas não inflamatórios, e assim, não foi possível determinar uma assinatura específica para os CIM.

Um outro estudo procurou identificar uma assinatura genética associada a resposta clínica à quimioterapia, comparando CIM de pacientes

que atingiram resposta patológica completa (pCR) após a quimioterapia pré-operatória com aqueles que não atingiram (BERTUCCI et al. 2014). Neste estudo, foi relatada a expressão aumentada do *IFN α* (interferon- α) e a expressão diminuída do *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico) e do *TGF β* , os quais estavam associadas a pCR dos CIM. Níveis mais baixos de expressão de fatores de transcrição, como *STAT5*, *GLI1* e *SMAD* também foram associados a uma taxa mais alta de pCR. Os autores também encontraram um conjunto de genes diferencialmente expressos entre tumores com pCR versus doença residual em CIM. Esta assinatura também foi fator preditor de pCR em pacientes não CIM, sugerindo que esta assinatura não é exclusiva dos CIM (BERTUCCI et al. 2014). Os achados que envolvem os fatores de transcrição, incluindo *STAT5*, *GLI1* e *SMAD*, que aparecem com níveis baixos de expressão em pacientes com CIM que alcançaram o pCR, demonstram que a modulação transcricional também pode levar a um comportamento agressivo nas células dos CIM. Esses achados sugerem que a regulação transcricional pode conferir resistência à quimioterapia e, portanto, é justificada a exploração de abordagens terapêuticas para modular os fatores de transcrição (BERTUCCI et al. 2014).

O silenciamento de genes via modulação epigenética também pode contribuir para características agressivas nos CIM. Por exemplo, *EZH2* (*Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 subunit*), responsável pelo controle epigenético da diferenciação do desenvolvimento, apresenta expressão aumentada no CIM. Este aumento de expressão foi correlacionado com menor sobrevida livre de recidiva local após cirurgia e

radioterapia nos CIM (DEBEB et al. 2014). Inibidores da histona desacetilase (HDAC) foram estudados no CIM, em uma abordagem baseada na perda de função de RNA funcional. Em um modelo pré-clínico foi verificado que HDAC6 contribuiu para a proliferação celular (PUTCHA et al. 2015). Além disso, o tratamento com Entinostat, um inibidor de HDAC, em combinação com agentes direcionados a HER2 (Lapatinibe e Trastuzumabe) aumentou a apoptose em células CIM resistentes ao Trastuzumabe (LEE et al. 2014).

BEKHOUCHE et al. (2011) realizaram a análise integrada dos dados de expressão gênica e CGH-array (Agilent 244K) de 49 CIM e 124 carcinomas não-inflamatórios. Apesar deste estudo revelar perfis genômicos extremamente semelhantes entre os grupos, os carcinomas inflamatórios apresentaram uma maior porcentagem de genes com alterações de número de cópias. Os autores identificaram 24 potenciais candidatos a estarem relacionados com a agressividade dos CIM, os quais foram validados em um grupo de 14 CIM e 10 não-CIM.

Em 2015, REMO et al. utilizaram os dados de expressão do estudo de BEKHOUCHE et al. (2011) para identificar fatores de transcrição que estivessem relacionados com o fenótipo tumoral inflamatório utilizando a aplicação de um algoritmo e análise *in silico*. Os autores identificaram o gene *NFAT5* (*Nuclear Factor of Activated T-Cells 5*) diferencialmente expresso, um membro da família de fatores de transcrição NF-κB. Utilizando análise de expressão proteica por imunistoquímica em um grupo independente de 39 amostras de CIM, 82 não-CIM e 15 de tecido de mama normal, os autores mostraram que este fator de transcrição (NFAT5) além de

aumentado nos CIM, apresenta uma expressão nuclear anormal, quando comparado com outros tipos de carcinomas de mama e tecidos saudáveis de mama. Estes dados sugeriram que *NFAT5* tem um importante papel no fenótipo agressivo deste tumor e potencial para ser utilizado como um marcador molecular.

As células estromais de CIM foram avaliadas por expressão global de transcritos sendo identificados agrupamentos distintos entre CIM e não CIM. Foram detectadas alterações em genes de resposta ao estresse do retículo endoplasmático sugerindo que a compreensão genômica das células estromais é importante nestes processos tumorais (BOERSMA et al. 2008).

Em um recente estudo, MANAI et al. (2017) relataram aumento da expressão da proteína MARCKS, a qual está envolvida na regulação e interação célula-célula e na motilidade celular. Os autores relataram que a expressão aumentada da proteína MARCKS foi mais frequente em CIM do que em não CIM. Foi também observada associação entre a alta expressão desta proteína e menor sobrevida livre de metástase.

1.4 ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS NOS CIM

O mecanismo exato da formação das CNAs não é claramente compreendido. É conhecido que as duplicações, deleções, inserções, inversões e translocações representam alguns dos processos que levam à formação de novas CNAs (STANKIEWICZ e LUPSKI 2010; ALMAL e PADH 2012). Outros rearranjos genômicos mais complexos associados com o

mecanismo de reparo do DNA também podem contribuir para a formação de CNAs, como alterações em genes da via de recombinação homóloga (HR), de recombinação homóloga não alélica (NAHR - *Nonallelic homologous recombination*) e união terminal não-homóloga (NHEJ - *Nonhomologous end joining*), além de mecanismos de transposição gênica (CONRAD et al. 2010; MILLS et al. 2011).

Os mecanismos patogênicos das CNAs estão associados à dosagem gênica, interrupção e fusão de genes, efeitos de posição, desmascaramento de alelos recessivos ou polimorfismos funcionais (STANKIEWICZ e LUPSKI 2010). Alterações do número de cópias (CNAs) em células somáticas, distintas do número de cópias da linhagem germinativa (CNVs) são extremamente comuns em câncer. A análise genômica de amostras tumorais identificaram alterações recorrentes associadas a determinados tipos de câncer levando a identificação de genes causadores de câncer e sugerindo abordagens terapêuticas específicas. Um desafio crítico na análise de CNAs é distinguir as alterações *drivers* que impulsionam o crescimento do câncer das numerosas alterações aparentemente aleatórias, *passengers*, que se acumulam durante a tumorigênese (BEROUKHIM et al. 2010).

O gene *ALK* estava amplificado nos CIM (ROBERTSON et al. 2013). O gene *ALK* (*Anaplastic lymphoma kinase*) pertence a uma superfamília de receptores de insulina que codifica um receptor tirosina quinase que é normalmente expresso em alguns tipos celulares podendo apresentar uma atividade oncogênica devido a mutações, ampliações, translocações

cromossômicas e rearranjos. Em concordância com esses achados, alterações na via de sinalização de AKT foram reportadas em tumores de mama triplo negativos (LEHMANN et al. 2011). Estes achados apresentam implicações importantes, dado que nos CIM há uma frequência maior de tumores classificados como triplo negativos ou HER-2 positivos. O gene *ALK* foi sugerido como um potencial *driver* para modelos pré-clínicos utilizando a droga Crizotinib, um inibidor da via de cMET/ALK (ROBERTSON et al. 2013).

Dois estudos avaliaram CNAs em carcinomas inflamatórios por métodos não clássicos e de baixa resolução. O primeiro determinou a presença de LOH (perda de heterozigose) utilizando microssatélites e comparando o DNA tumoral com o DNA extraído do sangue das pacientes buscou identificar regiões de perda no DNA tumoral que não ocorriam no DNA do sangue (LEREBOURS et al. 2002). Neste estudo, regiões de perda em 3p21-p14, 6p, 8p22 11q 13q14 e 17q21 foram identificados. O segundo estudo comparou esses achados com as características clínicas e histopatológicas (LEREBOURS et al. 2003). Os autores relataram que a extensão da inflamação na mama estava relacionada com um aumento das regiões de LOH.

BEKHOUCHE et al. (2011) utilizaram uma plataforma de 244K (Agilent Technologies) para avaliar o perfil genômico de 49 casos de CIM e realizaram uma análise integrada com dados de expressão das mesmas amostras. Os autores relataram heterogeneidade similar entre os tumores CIM e não-CIM. Os dois tipos de tumores apresentaram semelhanças nas

regiões alteradas e nas frequências com que foram detectadas. Entretanto, algumas regiões alteradas apresentaram-se mais frequentes nos CIM incluindo ganhos em 1q, 8q e 17q. A região de ganho mais frequente (acima de 40%) foi observada em 8q12.1-24. No geral, os CIM apresentaram maior porcentagem CNAs sugerindo uma maior instabilidade genômica do que os não CIM. Em uma análise supervisionada, os autores relataram 628 genes significativamente alterados nos CIM, com frequências diferentes de CNAs entre os CIM e não-CIM. A análise integrada dos dados entre as alterações genômicas e a expressão de transcritos revelou 24 genes candidatos com correlação positiva incluindo *RBM13*, *RAD54B*, *KIAA1429*, *INTS8*, *VPS13B*, *PABPC1*, *RAD21*, *RAD21*, *TAF2*, *DCC1*, *MTBP*, *WDR67*, *ATAD2*, *MTSS1*, *SQLE*, *ST3GAL1*, *ARID2*, *C17orf37*, *MRPL27*, *LRRC59*, *EPN3*, *ABCC3*, *INTS2*, *PTPN2*. As principais alterações estão resumidas no Quadro1.

Todos os genes descritos no estudo acima, apresentaram ganho e/ou amplificação ou expressão aumentada nos CIM e a maioria estava mapeado em 8q e 17q, incluindo *RAD21*, *ATAD2*, *MTSS1*, *ST3GAL1*, *C17orf37*, *ABCC3* e *PTPN2*, os quais foram previamente descritos como alterados em outros tumores. Estes genes estão envolvidos em diferentes funções como tradução de proteínas, transcrição e processamento de RNA, ciclo celular, migração celular e reparo do DNA. Entretanto, quando os autores realizaram uma validação em um set independente de casos (CIM e não-CIM), não foi observada diferença significativa entre os grupos (BEKHOUCHE et al. 2011).

Quadro 1 - Resumo das principais alterações cromossômicas encontradas em biópsias de CIM. Apenas um estudo investigou alterações genômicas em plataforma de alta resolução (BEKHOUCHE et al. 2011).

Referência	Nº de casos	Plataforma	Principais regiões alteradas	Genes candidatos
Lerebours et al., 2002	66	Microssatélites	3p21-p14, 6p,8p22, 11q,13q14,17q21	
Lerebours et al., 2003	64	Microssatélites	3p21.2-p14.2,6p,8p22, 11q22-q25,13q14,17q21	
Bekhouche, et al., 2011	49	Agilent 244K	8q,17q	<i>RBM13, RAD54B, KIAA1429, INTS8, VPS13B, PABPC1, RAD21, RAD21, TAF2, DCC1, MTBP, WDR67, ATAD2, MTSS1, SQLE, ST3GAL1, ARID2, C17orf37, MRPL27, LRRC59, EPN3, ABCC3, INTS2, PTPN2.</i>

Embora as CNAs sejam as principais alterações encontradas em cânceres de mama, as SNVs e indels em genes *drivers* também são importantes, e podem contribuir de forma relevante para a biologia do tumor. Entretanto, a maioria dos genes descritos neste tipo tumoral possui mutações somáticas em baixas frequências, o que torna difícil a caracterização de *drivers* por perfis de mutação quando o tamanho da amostra é limitado (PEREIRA et al. 2016).

Têm sido realizados esforços integram os dados depositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e o Consórcio Internacional do Genoma do Câncer (ICGC) para caracterizar os genes e suas alterações no câncer de mama, porém nessas plataformas não há distinção entre os CIM e os tumores invasivos T4, dificultando ainda mais os esforços para se estabelecer uma assinatura molecular específica nestes tumores.

1.5 PERFIL MUTACIONAL DOS CIM

Para o nosso conhecimento, dois estudos buscaram identificar mutações nos CIM. ROSS et al. (2015) analisaram o perfil mutacional de 53 amostras de CIM em blocos de parafina (média de 54 anos de idade) utilizando sequenciamento de alto desempenho (*Hybrid Capture-based Foundation One Assay*). Essa plataforma permite a detecção de alterações genômicas que já sejam alvos terapêuticos, por meio da análise de substituições de bases, *indels*, ampliações focais e deleções homozigóticas e fusões gênicas. Neste estudo 19% dos CIM eram triplo negativos, e 25% eram positivos para HER2. Os genes mais frequentemente alterados foram *TP53* (62 %), *MYC* (32 %), *PIK3CA* (28 %), *ERBB2* (26 %), *FGFR1* (17 %), *BRCA2* (15 %), *PTEN* (15 %), *CCND1* (9 %), *RB1* (9 %), *AKT1* (8 %), *AKT3* (6 %), *NF1* (8 %), *FGFR2* (6 %), *KRAS* (4 %), *BRAF* (4 %), *EGFR* (2 %). Considerando apenas as mutações em ponto, os genes alterados foram, *TP53*, *PIK3CA*, *ESR1*, *ERBB2*, *PTEN*, *AKT1*, *PAX5*, *KRAS*, *CDKN2A*, *FBXW7*, *MLL2*, *BRAF*, *CDH1*, *ATM*, *FGFR3*, *EPHA3*, *EGFR*, *AR* e *APC*, nesta ordem de frequência das mutações.

Em 2017, MATSUDA et al. avaliaram uma coorte de 24 amostras de CIM (média de idade de 54 anos) para mutações utilizando um painel de 50 genes em uma plataforma baseada em mutações *hotspot* (*hotspot-region-testing NGS*). Os autores excluíram as variantes germinativas. Foi observado que 41,7% das amostras eram positivas para receptores hormonais (HR+) e HER2- 12,5% HR+ e HER2+, 8,3% HR- e HER2+ e

37,5% triplo negativas. Os autores encontraram um maior número de mutações nos genes *TP53* (n = 18, 75%), *PIK3CA* (n = 10, 41,7%) e *ERBB2* (n = 4 16,7%).

1.6 INSTABILIDADE GENÉTICA EM CARCINOMAS DE MAMA

Mutações germinativas em uma cópia do *BRCA1* ou *BRCA2* predispõem as pacientes ao câncer de mama (85% de risco ao longo da vida) e ao câncer de ovário (10% a 40%) (LEVY-LAHAD e FRIEDMAN 2007). A maioria dos portadores de mutações em *BRCA1* apresenta tumores de mama com perfil TN enquanto os cânceres de mama associados à mutação *BRCA2* têm fenótipo imunoistoquímico menos restrito (MAVADDAT et al. 2013). Como resultado dessas mutações, ocorre a deficiência na via de recombinação homóloga (HRD) e as células são incapazes de reparar quebras de fita dupla do DNA, resultando em uma grande instabilidade genômica que eventualmente leva ao câncer (WATKINS et al. 2014). Esses tumores são intrinsecamente sensíveis a inibidores de resposta a danos no DNA, como os inibidores da PARP (GLENDEENING e TUTT 2011). Este benefício pode ser estendido para os tumores "*BRCAness*", os quais apresentam HRD, porém sem mutações germinativas em *BRCA1/2*. Este fenômeno pode ser explicado pelo silenciamento epigenético de *BRCA1/2* ou a inativação de vários outros genes associados à via de recombinação homóloga como *PTEN*, *ATM*, *ATR*, *AURKA*, *PALB2*, *BRIP*, *RAD51*, *FANC* e *MUS81* (WATKINS et al. 2014).

Dessa forma, alguns estudos utilizam metodologias distintas com o objetivo de detectar um marcador de deficiência da via HR que abrangeria todas as alterações relacionadas com esta via. Como a HRD gera grande instabilidade genômica com muitas alterações do número de cópias do DNA, estudos propuseram a associação de padrões de alteração do número de cópias e perda de heterozigose com a HRD, formando um perfil de alterações estruturais chamado de cicatriz genômica (WATKINS et al. 2014; LEDERMANN et al. 2016; LORD e ASHWORTH 2016).

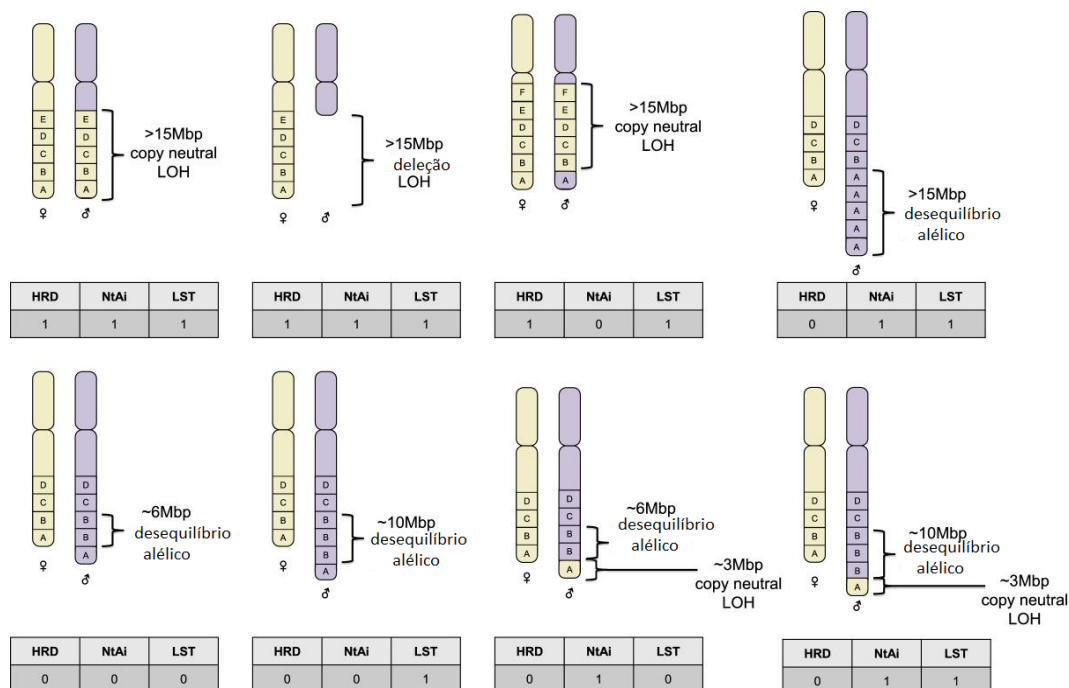
Essas cicatrizes genômicas estão envolvidas com a HRD e não podem ser confundidas com as alterações inerentes a complexidade tumoral, com as alterações espontâneas e também com aquelas induzidas por agentes indutores. Por outro lado, o papel desempenhado pelo *BRCA1* em outros mecanismos de reparo pode ofuscar um genuíno HRD (WATKINS et al. 2014).

Foram desenvolvidos modelos matemáticos baseados em escores que permitem quantificar esse grande número de alterações genômicas como um marcador da HRD (Figura 2). O escore HRD-LOH (Deficiência de Recombinação Homóloga por Perda de Heterozigose) representa uma contagem do número de regiões de LOH de tamanho intermediário (> 15 Mb e < cromossomo inteiro) observado no genoma do tumor. Utilizando um *cut-off* de 10 segmentos de LOH, verificou-se que é possível identificar pacientes com mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (ABKEVICH et al. 2012) e casos TN com maior resposta à quimioterapia baseada em platina (TELLI et al. 2015).

O escore tAI (desequilíbrio alélico telomérico) contabiliza o número de regiões subteloméricas (que tem início além do centrômero estendendo-se até o telômero) que apresentam desequilíbrio alélico por CNAs ou cnLOH (*copy neutral* LOH) e que varia de 0 a 46, sendo 2 a contribuição máxima admissível por cromossomo. Altos níveis de tAI foram encontrados e associados com sensibilidade a agentes de platina em tumores TN, além de estarem associados também a tumores com mutação, metilação do promotor ou baixos níveis de mRNA para *BRCA1* ou *BRCA2* (BIRKBAK et al. 2012).

O escore LST – *Large scale transition* (transição de larga escala) (POPOVA et al. 2012) considera o número de pontos de quebra que ocorre entre regiões de pelo menos 10Mb em cada braço cromossômico, sendo o limiar 15 e 20 LSTs para tumores “quase-diplóides” e “quase-tetraplóides” respectivamente (POPOVA et al. 2012). Em tumores quase tetraplóides, um valor de corte LST de 20 foi usado para segregar tumores em *BRCA1/2*-intacto e *BRCA1/2* deficiente (WATKINS et al. 2014).

A associação dos três escores foi avaliada para diversos tumores por MARQUARD et al. (2015). Assim, dependendo dos valores dos escores, avalia-se o benefício do tratamento com platina e inibidores de PARP para estes pacientes. Para nosso conhecimento, não existem estudos sobre cicatrizes genômicas para os CIM.



Fonte: Esquema baseado em WATKINS et al. (2014).

Figura 2 – Escores utilizados na avaliação de deficiência da via de recombinação homóloga (HRD). São apresentados exemplos de aberrações estruturais do número de cópias e rearranjos cromossômicos. Nas caixas, representadas pelas letras de A a F, estão os segmentos genômicos de aproximadamente 3 Mbp. Abaixo dos cromossomos estão indicados os três escores: defeito de recombinação homóloga por LOH (HRD), escore de desequilíbrio alélico telomérico (tAI) e Transição em larga escala (LST). Os valores de cada escore para cada alteração encontram-se assinalados nos retângulos em cinza (0 = não observado 1 = detectado uma vez).

O número de estudos em carcinomas inflamatórios é ainda muito limitado e não há marcadores disponíveis, que sejam específicos para este tipo tumoral, tanto diagnósticos como prognósticos ou preditivos. Embora alguns grupos tenham tentado estabelecer uma assinatura de expressão exclusiva para este tumor, nenhum obteve sucesso. Segundo LIM et al. (2018) este insucesso pode ser atribuído pelo alto índice de erros no diagnóstico, o que limita a coleta de amostras e os ensaios clínicos dedicados ao CIM, também pelos protocolos que exigem início imediato do tratamento, o que dificulta a coleta de tecido não tratado, e finalmente pela

dor na coleta das biópsias, limitando a capacidade de obter amostras de tumores em vários momentos.

Por fim, o fato dos CIM serem tumores raros e estarem divididos em diversos subtipos moleculares, ocasiona uma maior segregação das limitadas amostras disponíveis. Portanto, todos esses fatores contribuem para o sucesso limitado, encontrado até hoje, na pesquisa genômica.

Além desses fatores, os estudos genômicos que foram desenvolvidos com os CIM, utilizaram plataformas de baixa resolução, gerando a necessidade de buscar novas metodologias, com plataformas mais robustas, que visem a obtenção de dados mais confiáveis.

Neste estudo avaliamos as alterações genômicas em CIM de pacientes brasileiras, buscando a melhor caracterização destes tumores. Para isso, utilizamos a plataforma *CytoScan HD Array (Affymetrix)*, que contém mais de 2,6 milhões de sondas polimórficas e não-polimórficas. Também avaliamos o perfil mutacional e as variantes usando um painel de 105 genes relacionados com câncer, incluindo aqueles bem caracterizados em câncer de mama e 13 genes envolvidos na via de recombinação homóloga. E, por fim, avaliamos os CIM quanto à deficiência da via de recombinação homóloga utilizando escores calculados a partir do perfil genômico obtido em cada caso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações genômicas, danos na via de recombinação homóloga e o perfil de mutação em genes relacionados ao câncer nos carcinomas inflamatórios de mama para caracterizar molecularmente este tipo tumoral agressivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar as alterações genômicas nos CIM;
- Investigar as mutações em genes relacionados com câncer, incluindo 13 envolvidos na via de recombinação homóloga;
- Avaliar a via de deficiência de recombinação homóloga utilizando escores definidos em literatura;
- Buscar associações dos achados moleculares com características clínico-patológicas;
- Analisar a função dos genes identificados como alterados, avaliando sua participação nas vias biológicas e possível contribuição para esse fenótipo tumoral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Neste estudo, houve uma grande preocupação em se definir a elegibilidade das amostras, visto que a literatura aponta como sendo esta uma das maiores causas do insucesso dos estudos prévios. Inicialmente foram levantados 130 casos de dois grandes centros brasileiros de oncologia, o A.C.Camargo Cancer Center e o Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo, Brazil. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética das duas Instituições (Protocolos n° 2121/15 e n° 49669615.5.2001.5437, respectivamente).

A seleção dos casos foi baseada nos novos critérios para a classificação dos CIM apresentados na oitava edição do *American Joint Committee on Cancer - AJCC 2018* - (AMIN et al. 2017). É importante ressaltar que o diagnóstico clínico é o principal a ser considerado nestes casos. Portanto, os achados de êmbolos tumorais na pele não são necessários para o diagnóstico de CIM, contudo a identificação histológica é necessária para demonstrar um carcinoma invasivo no parênquima ou nos vasos linfáticos e a determinação dos marcadores moleculares são imprescindíveis para o tratamento (ER, PR, HER2 e grau) (AMIN et al. 2017).

As biópsias incisionais dos CIM foram obtidas das pacientes sem prévio tratamento quimioterápico e ou radioterápico, entre os anos de 2002 a 2014, e em todos os casos as pacientes não tinham história de câncer sincrônico ou metacrônico. Foram excluídos os tumores mamários que apresentaram êmbolos nos vasos linfáticos, sem a presença das alterações características na pele da mama. Segundo o consenso, não podem ser diagnosticados como inflamatórios os cânceres avançados que invadem os vasos da derme ou causam ulceração na pele sem alterações típicas na pele.

Todos as amostras foram revisadas pela patologista com expertise na área, Dra. Cynthia Ap. Bueno de Toledo Osório, A.C.Camargo Cancer Center. O objetivo desta análise foi padronizar a seleção de casos quanto a adequabilidade da amostra e a presença de células neoplásicas viáveis.

Trinta das 130 amostras revisadas preenchem os critérios adotados e quatro delas foram excluídas por apresentarem pequena quantidade de células tumorais na avaliação histopatológica. Nos tecidos identificados com quantidade adequada de células tumorais, as regiões contendo estas células foram demarcadas na lâmina e serviram de guia para macrodissecção do tecido congelado e posterior extração dos ácidos nucleicos. A maioria dos casos apresentou quantidade limitada de tecido disponível.

Os 26 casos foram processados para a obtenção de DNA para a investigação de CNAs pela plataforma *CytoScan HD* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Entre os 26 casos, dois deles não passaram pelos critérios de qualidade recomendados pelo fabricante, sendo, portanto excluídos da

análise. Infelizmente, não havia amostra adicional para a repetição dos experimentos.

Para a análise do sequenciamento de um painel de 105 genes, três casos foram excluídos por não passarem nos critérios de qualidade para a realização do experimento. Desta forma, foram sequenciados 21 casos.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada usando o kit QIASymphony DNA (Qiagen, Valencia, CA, USA) segundo as recomendações do fabricante. A qualidade do material extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% e quantificada pelo Kit Qubit® dsDNA BR Assay no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies).

3.2.2 Análise de alterações genômicas nos CIM

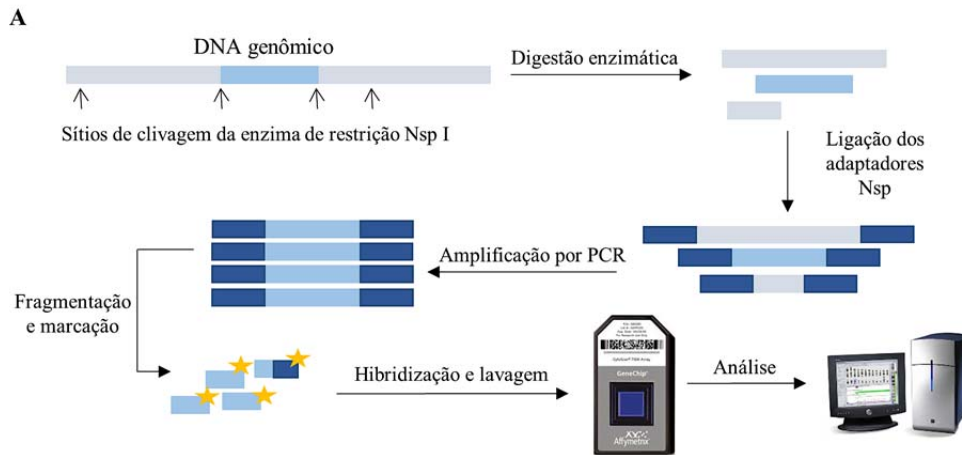
A plataforma *CytoScan HD Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) é uma plataforma de alta densidade composta por mais de 2,6 milhões de sondas polimórficas e não-polimórficas de 25 pares de bases. Um esquema representativo ilustra a plataforma na figura 3. As 750 mil sondas polimórficas ou de SNPs (para determinação alélica) e as 1,9 milhões de sondas não polimórficas (CNVs) permitem detectar ganhos e perdas genômicas a partir de 25-50kb, assim como regiões com mosaicismos e de *cnLOH* (do inglês, *Copy Neutral Loss of Heterozygosity*).

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo padrão do fabricante. Resumidamente 250ng do DNA genômico (gDNA) foi digerido com a enzima de restrição Nspl, ligado a adaptadores específicos, amplificado pela PCR com a enzima Titanium Taq DNA polimerase (Clontech, Mountain View, CA, USA) e visualizado em gel de agarose 2% (fragmentos entre 150 e 2000 pb). O material amplificado foi purificado utilizando-se beads magnéticas e quantificado em NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A concentração desejada de DNA deve ser superior a 2,5 µg/µL. Posteriormente, o DNA purificado foi fragmentado com a enzima DNaseI, visualizado em gel de agarose 4% (fragmentos entre 25 e 125 pb) e marcado com biotina. O DNA marcado foi hibridado por 16-18h a 50°C no *GeneChip® Hybridization Oven 645* (Affymetrix), lavado e corado no *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix) e escaneado no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix).

Os resultados foram gerados pelo *Affymetrix® GeneChip® Command Console®* Software (AGCC) 4.0 e analisados com o software *Chromosome Analysis Suite v2.1* (ChAS) (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante.

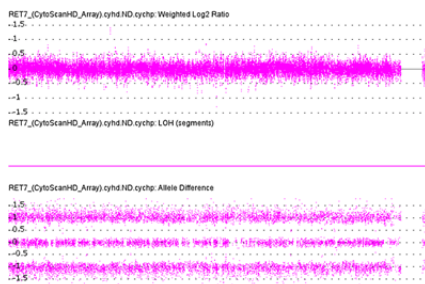
As alterações foram comparadas individualmente com banco de dados *Affymetrix SNP6* (GSE25016). Para cada amostra foi utilizado um *pipeline* de análise que inclui a avaliação das regiões com ganhos ou perdas identificadas pelo valor de logaritmo de base 2 (\log_2). Cada marcador “m” é calculado pela razão do perfil de sinal da amostra e da referência \log_2 (amostra m) – \log_2 (referência m). Com base no valor de \log_2 resultante

(*weighted log2*), o número de cópias de cada marcador é estabelecido de acordo com o modelo de *Hidden Markov* (HMM).

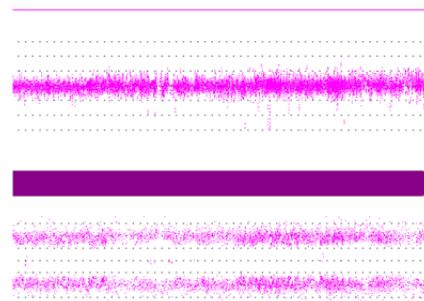


B Cromossomo 6: CN = 2

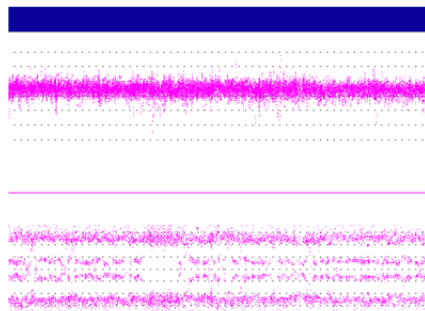
RET7_CytoScanHD_Array.cyt4.nd.cytp: Copy Number State (segments)



C Cromossomo 16: CN = 2, LOH



D Cromossomo 13: CN > 2



E Cromossomo 14: CN < 2

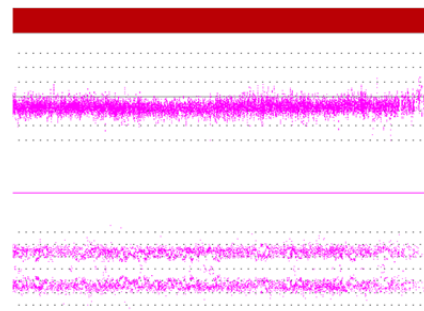


Figura 3 - Representação esquemática da preparação das amostras para hibridação nos microarranjos e dos possíveis resultados encontrados utilizando a plataforma CytoScan HD (Affymetrix/Thermofisher, EUA). **A.** Para o preparo dos microarranjos, o DNA genômico foi clivado por digestão enzimática, seguido da ligação de adaptadores e amplificação pela PCR. O produto da PCR foi então fragmentado e marcado, sendo hibridado nos GeneChips por 16 horas a 50°C e 60rpm. Após lavagem e escaneamento dos arrays, os dados resultantes foram analisados usando o programa Chromosome Analysis Suite (ChAS), sendo identificadas regiões genômicas normais (**B**) e com alterações (**C-E**). As figuras **B-E** representam regiões de diferentes cromossomos de um mesmo caso. Em cada figura estão representadas as sondas indicativas do número de cópias genômicas (*Weighted Log2 Ratio*) e as sondas de SNP (*Allele Difference*). O resultado dos diferentes grupos de sondas permitem distinguir uma região normal, com CN = 2 (**B**), de uma região com perda de heterozigose - LOH (**C**), assim como identificar regiões com ganho (**D**), ou perda genômica (**E**).

3.2.3 Análise de regiões com Cromotripsis

A cromotripsis foi avaliada usando uma estratégia de varredura dos arquivos contendo as alterações genômicas gerados a partir dos SNP arrays já filtrados obtidos da plataforma Cytoscan HD (Affymetrix). Para isso, foi utilizada a ferramenta CTLP- Scanner (programa R v3.3.235) disponível em <http://cgma.scu.edu.cn/CTLPScanner/> (CAI et al. 2014). Os seguintes limiares foram definidos: número de modificação das CNA ≥ 10 ; razão de probabilidade de $\log_{10} \geq 8$, tamanho mínimo do segmento de 10 kb; e distância dos sinais entre os segmentos adjacentes $\log_2 \geq 0,1$, limiares para perdas $\leq -0,15$ e para ganhos $\geq 0,15$. Foram excluídos os eventos com status de número de cópias prevalente (CN) e alterações envolvendo $\leq 10\%$ do tamanho da região. Esta análise foi baseada no dados descritos por KORBEL e CAMPBELL (2013) e FONTANA et al. (2018).

3.2.4 Associação de CNAs com os dados clínico-histopatológicos

A ferramenta CoNVaQ (<http://tomcat.compbio.sdu.dk/convaq/>) foi utilizada para a comparação entre CNAs nos diferentes casos e associação com os dados clínico-histopatológicos definida estatisticamente por um q -value. O valor de q é a probabilidade de encontrar uma região correspondente de mesmo tamanho ou maior, permitindo a distribuição aleatória das amostras entre os grupos. A ferramenta também fornece dados de enriquecimento de vias, os quais foram confirmados, posteriormente, com o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, EUA).

3.2.5 Análise de vias biológicas- Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

O programa *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, EUA) foi utilizado para a análise in silico dos dados obtidos no estudo. Com essa abordagem, o enriquecimento biológico das informações e as redes foram obtidos a partir do banco de dados do fabricante (Knowledge Base). Esse banco de dados inclui genes, substâncias endógenas, informações sobre diferentes espécies, linhagens celulares e doenças, como o câncer. O enriquecimento é calculado pelo teste exato de Fisher para determinar a probabilidade de que a associação entre os genes e as funções biológicas não foram obtidas ao acaso.

3.2.6 Target-Next Generation Sequencing (tNGS)

A integridade do DNA foi avaliada usando o ensaio *Agilent Genomic DNA ScreenTape* (Agilent, Santa Clara, CA). Antes de iniciar a construção das bibliotecas para os 105 genes relacionados ao câncer (*SureSelect^{XT} Custom Panel*, Agilent Technologies), foram utilizados ensaios de controle de qualidade para cada caso. A biblioteca foi preparada utilizando *SureSelect^{QXT} Library Prep Kit* (Agilent Technologies) e 50 ng de DNA genômico. As bibliotecas foram validadas utilizando 1 µL de DNA diluído (1:10) utilizando o ensaio *Agilent Genomic DNA ScreenTape* (Agilent, Santa Clara, CA) e o *TapeStation High Sensitivity D1000*. O sequenciamento foi realizado no *NextSeq 500* (Illumina, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após o sequenciamento dos 105 genes, os dados brutos provenientes do tNGS foram processados para demultiplexação e geração das sequências FASTQ, as quais foram alinhadas ao genoma humano de referência hg19 produzindo arquivos BAM. Foram identificadas, manualmente interpretadas e revisadas as variantes de nucleotídeos únicos (SNV – *Single Nucleotide Variants*) assim como as inserções/deleções. Os dados gerados a partir do sequenciamento foram analisados de acordo com o *pipeline* estabelecido pelo grupo de bioinformática e seguindo as recomendações da literatura (desenvolvido por Mads Malik Aagaard, Department of Clinical Genetics, Vejle Hospital, DK). Em resumo, os dados brutos foram extraídos após o sequenciamento e as amostras identificadas e separadas do *pool* (processo denominado demultiplexação). Os *reads*

resultantes foram mapeados no genoma de referência humano UCSC hg19 usando o algoritmo de alinhamento BWA (LI e DURBIN 2009). A identificação das variantes e a filtragem de qualidade das variantes foram realizadas com *Genome-Analysis-Toolkit* - GATK (DEPRISTO et al. 2011). As variantes resultantes foram anotadas principalmente utilizando as ferramentas ANNOVAR (WANG et al. 2010), GATK e SnpEff (CINGOLANI et al. 2012).

O programa *Ingenuity Variant Analysis* (Qiagen) foi usado para classificar as variantes de acordo com o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (RICHARDS et al. 2015). Foram excluídas as variantes consideradas benignas ou provavelmente benignas. Em seguida, foram excluídas as variantes com frequência > 0,01 nos bancos de dados: *Genetic Association Database* (GAD) (BECKER et al. 2004) e/ou no *The Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (LEK et al. 2016).

As demais variantes foram curadas manualmente usando o programa Genome Browse (Golden Helix Inc., EUA). As variantes mapeadas em regiões de homopolímeros também foram excluídas. Foi aplicada uma filtragem adicional excluindo-se variantes de significância incerta (VUS, classificadas pela ACMG) com valor do escore *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD) < 3,0. O resumo do *pipeline* básico de análise, anotação e filtragem de variantes está esquematizado na Figura 4.

Foi utilizado um painel customizado, contendo 105 genes (incluindo todos os exons, 3'UTR e 5'UTR) descritos como alterados em vários processos tumorais: *ABCC1*, *ABCG2*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *AR*, *AREG*, *ARF1*,

ATM, BARD1, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CCND1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, COL11A1, CTNNB1, DICER1, DNMT3A, DNMT3B, EGF, EGFR, EPCAM, ERBB2, ERBB3, ERBB4, EREG, EZH2, FBXW7, FGF1, FGFR1, FGFR2, FLT1, FLT3, FLT4, FOXL2, FOXO1, GALNT12, GNA11, GNAQ, GPS1/CSN1, GREM1, HGF, HRAS, HSPH1, IDH1, IDH2, IGF1, IGF1R, JAK1, JUN, KDM4C, KDR, KRAS, MAP2K1, MEN1, MET, MLH1, MLH3, MMP1, MMP12, MMP13, MSH2, MSH3, MSH6, MTHFR, MTOR, MUS81, MUTYH, MYC, NF1, NOTCH1, NRAS, PALB2, PAX8, PIK3CA, PLCB3, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PPARG, PTEN, RAD50, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, RYR3, SCG5, SMAD4, STAT3, STK11, TGFA, TP53, TYMS, VEGFA, VHL, WNT1 e XRCC2.

Os resultados dessa análise foram comparados com dados clínicos-histopatológicos e com os achados das CNAs.

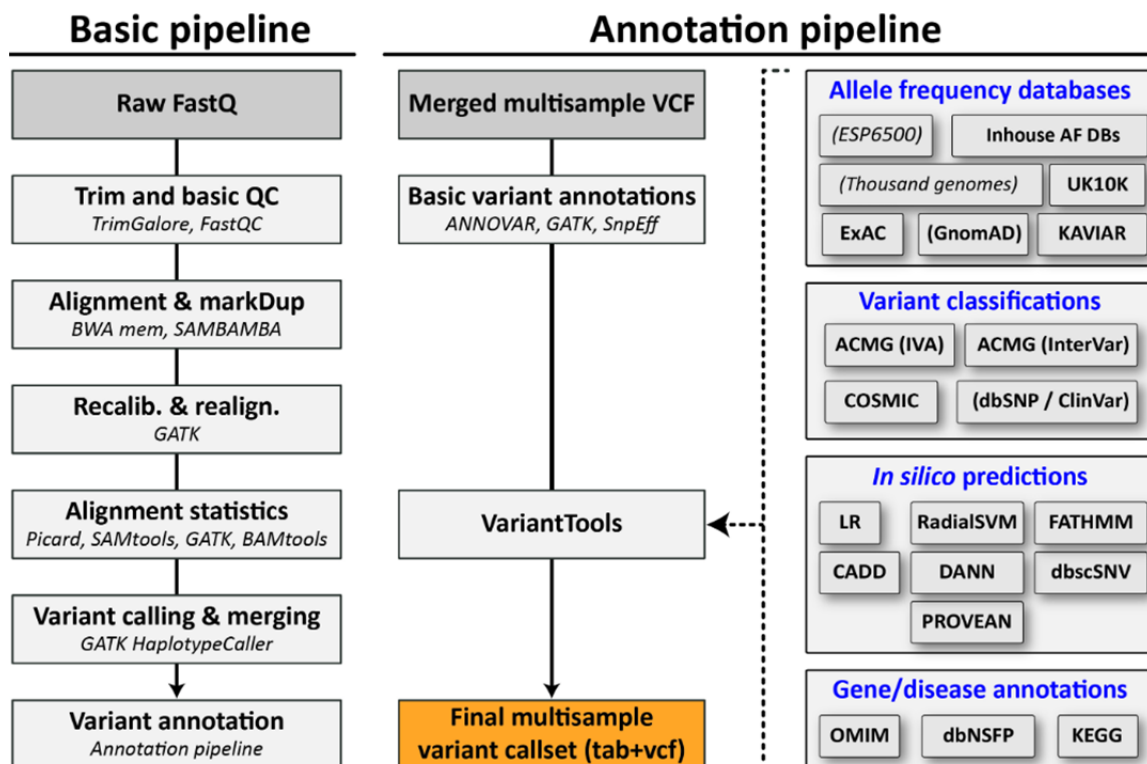


Figura 4 - Representação do *pipeline* utilizado para o processamento dos dados brutos provenientes do sequenciamento de 105 genes relacionados ao câncer em amostras de CIM. Estão apresentados na figura os pacotes, programas ou banco de dados utilizados para comparações de frequências alélicas e de classificação das variantes de acordo com a patogenicidade. A classificação das variantes foi realizada segundo as recomendações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). A classificação é baseada em 28 critérios (16 de patogenicidade e 12 de benignidade segundo evidências subjetivas e experimentais).

3.2.7 Cálculo dos escores de deficiência da via de recombinação homóloga

Foram avaliados os seguintes escores relacionados à deficiência da via da recombinação homóloga: *Telomeric Allelic Imbalance* (tAI), escore de perda de heterozigose (HRD-LOH) e escore de Large Scale Transition (LST). Os escores para a deficiência na recombinação homóloga (LST, tAI e HRD-LOH) foram calculados segundo MARQUARD et al. (2015). Em resumo, o tAI refere-se ao número de regiões subteloméricas com desequilíbrio alélico e se restringe a não cruzar o centrômero (alto: > valor da mediana); LST indica o número de quebras cromossômicas entre regiões adjacentes com um tamanho de pelo menos 10Mb (alto: >15 em tumores diplóides e > 20 em tumores poliplóides); HRD-LOH indica o número de regiões de cnLOH maiores do que 15Mb e menores do que um cromossomo inteiro (alto: > 10).

O número de quebras e a fração do genoma afetado pelas alterações no número de cópias (*Genomic Instability Index*, GII) foi calculado para cada indivíduo como previamente descrito por LIU et al. (2016). Em nosso estudo, foi utilizado o valor da mediana.

As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com mutações somáticas em genes da via de recombinação homóloga (13 genes) e os valores dos scores foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney, com valores de $p > 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Os prontuários das pacientes foram consultados para a obtenção das seguintes informações: data do diagnóstico, tipo histológico, carcinoma *in situ* associado, resultados da expressão de ER, PR e HER2 por análise imunohistoquímica, grau histológico, classificação TNM, estadió clínico, tratamento (quimioterapia e radioterapia neoadjuvante, data da cirurgia, quimioterapia e radioterapia adjuvante, hormonioterapia), evolução clínica, histórico familiar de câncer, metástase ao diagnóstico, metástase à distância durante o seguimento clínico (data e local), data da última consulta e status atual das pacientes. As características clínicas e histopatológicas estão sumarizadas na Tabela 1.

A maioria das pacientes apresentava idade superior a 50 anos, 75% estavam na pós-menopausa, 96% dos tumores eram do tipo histológico ductal invasivo, destes 34,8% possuíam carcinoma ductal *in situ* associado, todos os casos exceto um tinham acometimento linfonodal. Dezesete das 24 pacientes apresentaram metástase e na maioria delas (11 casos) a metástase foi identificada ao diagnóstico. Quanto ao status hormonal, 58,4% dos CIM eram ER positivos e/ou PR positivos e HER2 negativos.

Em nossa casuística, três casos (CIM8, CIM12 e CIM25) apresentaram expressão aumentada da proteína HER2 (3+ de intensidade;

membrana fortemente corada em mais de 10% das células). Foram considerados como HER2 negativos os tumores em que não se observava coloração ou a coloração da membrana estava presente em menos de 10% das células tumorais ou quando a coloração era fraca em mais de 10% das células tumorais (apenas parte da membrana das células tumorais coradas; 1+ de intensidade). Sete casos (29%) eram triplo-negativos (ER negativos, PR negativos e HER2 negativos).

Tabela 1 - Resumo das características clínicas e histopatológicas das 24 pacientes com carcinomas inflamatórios de mama incluídas neste estudo. Todos os CIM são classificados como T4d. ^aHER2 negativo indica ausência e/ou expressão basal da proteína (1/3). ^b Nd: ausência de informação. ^c Pacientes em tratamento. IMC: índice de massa corporal.

Características	N =24	%
Idade		
<50 years	6	25
≥50 years	18	75
Tipo Histológico		
Ductal invasivo	23	96
in <i>situ</i> associado	8	34,8
Lobular	1	4
Status Hormonal		
Pré-menopausa	6	25
Pós-menopausa	18	75
N		
N0	1	4,2
N1	9	37,5
N2	8	33,3
N3	6	25
M		
M0	13	54,2
M1	11	45,8
Estadio		
IIIB	11	45,8
IIIC	2	8,4
IV	11	45,8

Cont/Tabela 1

Características	N =24	%
Receptores hormonais		
ER – PR – HER2 +	3	12,5
ER + e/ou PR + HER2 –	14	58,4
ER – PR – HER2 – ^a	7	29,1
História familiar de câncer		
Negativa	6	25
Positiva	16	66,7
Câncer de mama e ovário	9	56,3
Outros	7	43,7
Nd ^b	2	8,3
Metástase		
Negativa	5	20,8
Positiva	17	70,8
ao diagnóstico	11	64,7
ao <i>follow up</i>	6	35,3
Sem informação	2	8,3
Local da Metástase		
Óssea	11	64,7
Pulmonar	4	23,5
Outras	2	11,8
Follow-up		
Morte pela doença	18	75
< 2 anos	11	61,1
> 2 anos	7	38,9
Vivo sem a doença	4	16,7
Vivo com a doença	2	8,3
Índice de Massa Corpórea - IMC		
Acima de 25kg/m ²	14	58,4
Abaixo de 25kg/m ²	6	25,0
Não informado	4	16,6

A maioria das pacientes possui história familiar de câncer (66,7%), sendo os cânceres de mama e ovário os mais frequentes (9 de 16 casos). Foram relatados outros sítios acometidos por câncer nas famílias das pacientes deste estudo incluindo o sistema nervoso central, intestino, próstata, estômago e leucemias. Embora em quatro pacientes não houvessem informações sobre o peso e a altura, 58,4% dos casos

apresentaram alto índice de massa corpórea.

Foi observada a presença de metástases em 75% das pacientes, sendo 66,7% identificadas ao diagnóstico e 33,3% durante o *follow-up*. A metástase óssea foi a mais frequente. Um total de 75% das pacientes morreu pela doença, sendo 61% em um período inferior a dois anos.

Quanto ao tratamento, as pacientes com tumores em estádios IIIB e IIIC, em sua maioria, receberam quimioterapia neoadjuvante (4 ciclos de ciclofosfamida com doxorrubicina e 12 ciclos de taxol). Em cinco das 13 pacientes nestes estádios não haviam informações adicionais disponíveis nos prontuários, cinco apresentaram resposta parcial ao tratamento (definida como a presença de carcinoma invasivo com alterações no estroma (CHEVALLIER 1993), três tiveram progressão da doença e uma apresentou doença estável. Entre as quatro pacientes com CIM no estágio IV, duas foram submetidas a neoadjuvância e duas receberam tratamento radioterápico, não constando informações adicionais no prontuário das pacientes.

4.2 ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS (CNA)

Foram identificados 1.267 ganhos (584 em mosaico), 704 perdas (580 em mosaico) e 165 cnLOH (50 em mosaico) entre as 24 amostras avaliadas para alterações no número de cópias genômicas.

As regiões envolvidas em CNAs do nosso estudo foram comparadas com aquelas disponibilizadas no TCGA em 1080 amostras de carcinoma

invasivo de mama e 113 amostras de TNBC avaliadas pela plataforma Affymetrix SNP 6.0. Não há informações se entre estes tumores alguns são inflamatórios. Entre as 1.267 regiões de ganhos genômicos 105 encontravam-se envolvidas em ganhos nos tumores de mama invasivos e 35 nos TNBC. Entre as 704 perdas genômicas encontradas nos CIM 239 foram também detectadas nos tumores de mama invasivos e 80 nos TNBC (TCGA dataset). As alterações em mosaicismo não foram consideradas nas comparações realizadas com o banco de dados disponibilizados do TCGA.

A Figura 5 resume o total de alterações detectados nos 24 casos deste estudo. Os casos CIM06, CIM13 e CIM25 apresentaram o menor número de alterações (20 21 e 10 alterações, respectivamente) e os casos CIM16 e CIM18 apresentaram o maior número (213 e 218, respectivamente). Apenas seis casos apresentaram um número inferior a 50 CNAs, revelando alta instabilidade genômica. Os casos CIM06, CIM13, CIM25 e CIM26 apresentaram poucas alterações, configurando um padrão diferente dos demais casos. O caso CIM06 é um carcinoma lobular e os demais que são carcinomas ductais invasivos da mama.

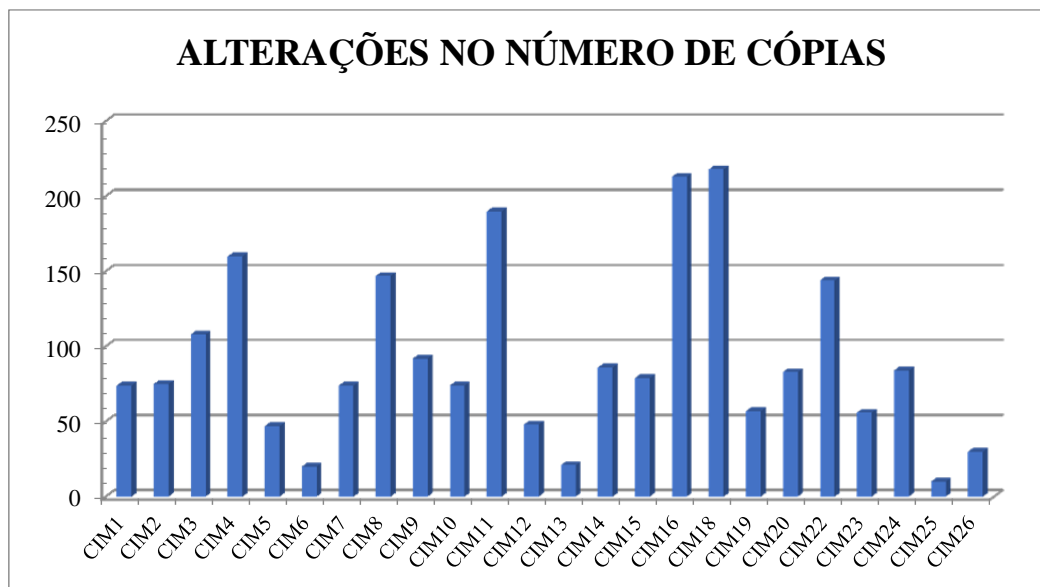


Figura 5 – CNAs identificadas por caso. Observa-se que 18 dos 24 CIM analisados apresentaram mais de 50 alterações genômicas, os casos CIM16 e CIM18 apresentaram o maior número de alterações enquanto os casos CIM06 e CIM25 apresentaram o menor número.

Entre as 1.267 regiões de ganhos 103 foram compartilhadas por 17 dos 24 casos (aproximadamente 70%). De forma similar, apenas 4 das 704 perdas genômicas, foram compartilhadas em pelo menos 70% dos casos. A Figura 6 ilustra as alterações de perdas e ganhos assim como as alterações em mosaïcismo detectadas nos 24 CIM. As alterações de ganhos e perdas genômicas e os genes codificadores mapeados nestas regiões e presentes em no mínimo 70% dos casos estão listados no Quadro 1.

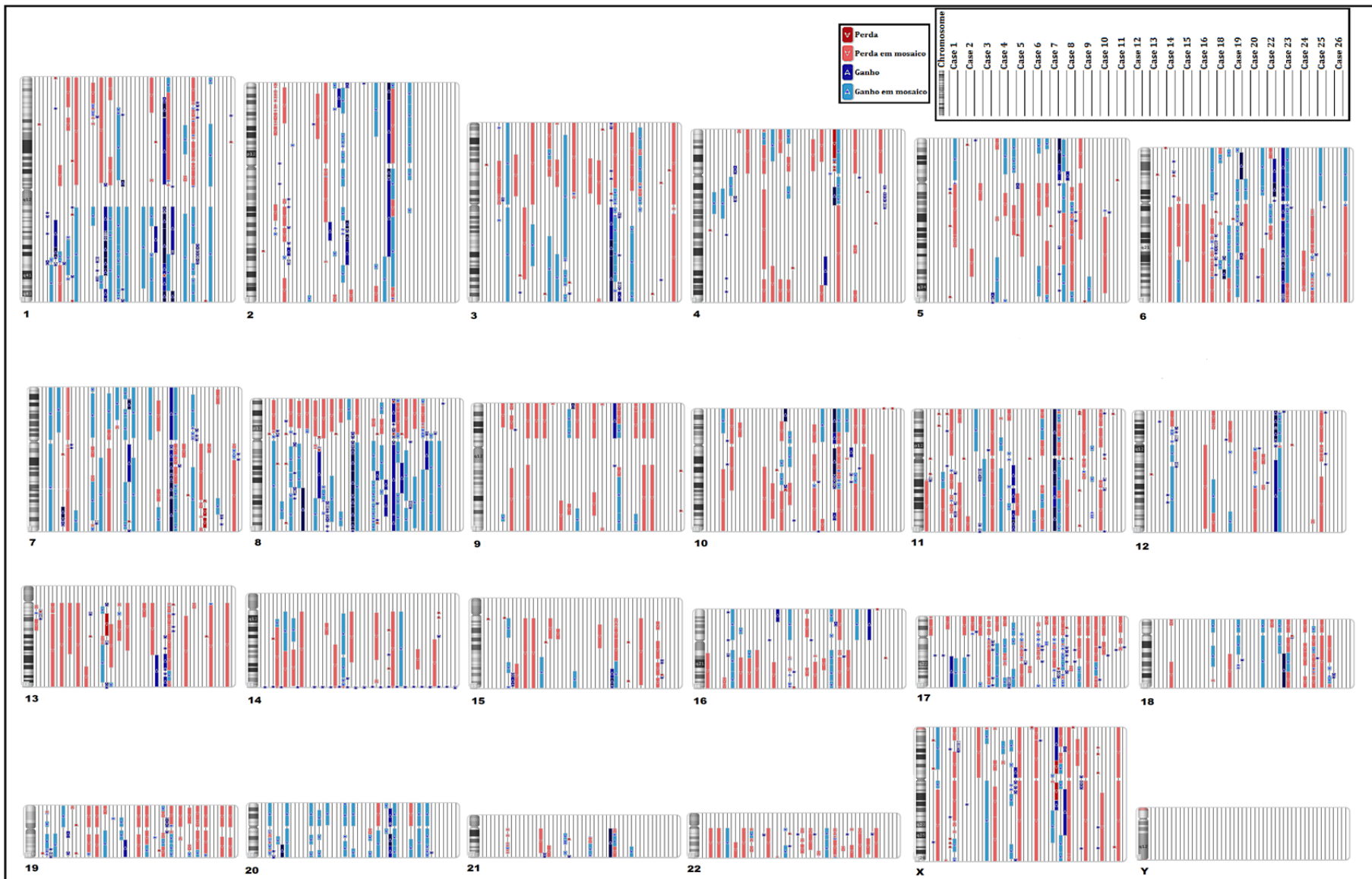


Figura 6 – Perfil das alterações genômicas dos 24 casos de CIM. Em azul os ganhos de cópias genômicas (incluindo ganhos em mosaico) e em vermelho as perdas genômicas (incluindo perdas em mosaico). Nota-se que as alterações envolvem praticamente todos os cromossomos, sendo o cromossomo 8 o que possui um maior número de alterações, seguindo pelo cromossomo 1 e 17. Foi utilizado o software Chromosome Analysis Suite (ChAS, v.3.1.0) para a geração das imagens.

Quadro 2 - Regiões de ganhos e perdas de cópias genômicas presentes em pelo menos 70% dos casos deste estudo. Análises utilizando a ferramenta CoNVaq (<http://tomcat.compbio.sdu.dk/convag/>).

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
1q32.1	199885843	200404222	<i>NR5A2</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	200446886	200692390	<i>KIF14, DDX59</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	200868121	201185044	<i>CACNA1S, KIF21B, TMEM9, GPR25</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	202192520	202692736	<i>UBE2T, PPP1R12B, LGR6, SYT2</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	203006242	203380123	<i>FMOD, MYOG, CHI3L1, MYBPH, CHIT1, PPFIA4, BTG2, TMEM183A, ADORA1</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	203484498	204078837	<i>ATP2B4, ZC3H11A, LAX1, SOX13, LINC00303, SNRPE, OPTC, PRELP, SNORA77, HSPE1P6, KRT8P29, CBX1P3, ZBED6</i>	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	204078837	204320796	<i>REN, SOX13, ETNK2, PLEKHA6, KISS1, GOLT1A</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	204331514	204769799	<i>PIK3C2B, PLEKHA6, PPP1R15B, LRRN2, MDM4, SCARNA20</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	204769799	205160410	<i>RBBP5, DSTYK, NFASC, TMEM81, CNTN2</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	205357977	205565865	<i>CDK18, LEMD1, LEMD1-AS1, LEMD1, BLACAT1</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	205565865	206329926	<i>NUCKS1, RAB29, SLC41A1, ELK4, SLC45A3, PM20D1, SLC26A9, MFSD4A, CTSE, FAM72A, AVPR1B, SNORA72, SRGAP2</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	206539637	206963135	<i>IL10, IL19, DYRK3, EIF2D, MAPKAPK2, IL20, IL24, FCMR, PIGR, FCAMR, RASSF5</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	206965712	207455527	<i>CR2, PFKFB2, C4BPA, C4BPB, FCAMR, YOD1, C1orf116, CD55, C4BPAP1, C4BPAP2</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	207461883	207894416	<i>CR2, CD46, CD34, CR1L, C1orf132, CR1, CDCA4P3, CDCA4P4, CD46P1,</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	208188417	208471425	<i>PLXNA2</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	200407572	200446885	<i>ZNF281</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24

Cont/ Quadro 2

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
1q32.1	200700635	200763105	<i>CAMSAP2</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	200765312	200867803	<i>CAMSAP2, RPL34P6</i>	3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	203380123	203475572	<i>LARP7P1</i>	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	205160573	205357143	<i>DSTYK, TMCC2, KLHDC8A, NUA2, SNRP, GP10</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	207903691	208037269	<i>PLXNA2, CD34</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	208037966	208171498	<i>PLXNA2</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	203475572	203484498	<i>PRELP</i>	2, 3, 4, 5, 6, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
1q32.1	204320796	204331321	<i>PLEKHA6</i>	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 24
8q24.12	119852446	119861903	<i>DSCC1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 20 22 23 24
8q24.13	124909042	125106390	<i>SQLE, NSMCE2, KIAA016, ZNF572</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 22 23 24
8q24.13	125324625	125416289	<i>NSMCE2</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 22 23 24
8q23.1	105605923	105615745	<i>ZFPM2</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 22 24
8q24.12	119702489	119713399	<i>RN7SKP153</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	104340540	104351683	<i>DPYS, DCSTAMP</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 19 20 23 22 24
8q23.1	105051937	105063438	<i>ZFPM2</i>	2, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.21	129918264	129944875	<i>FAM49B</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	104312870	104340540	<i>DPYS, DCSTAMP</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24

Cont/ Quadro 2

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
8q23.3	110133436	110195207	-	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.2	100703293	100777019	<i>PABPC1</i>	2, 4, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	113064893	113139629	<i>CSMD3</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.11	117820276	117908925	<i>EXT1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	104914104	105051937	<i>ZFPM2</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.12	119713399	119852446	<i>FAM84B</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	116643412	116795541	<i>EIF3H, UTP23</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.12	119315533	119471136	<i>NOV</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.3	139939268	140113090	<i>TRAPPC9, PEG13</i>	2, 4, 5, 7, 8 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	112876632	113064737	<i>CSMD3</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	131143639	131332990	<i>CTD-2501M5.1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	104718241	104914028	<i>ZFPM2</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	125106390	125324625	<i>NSMCE2, RN7SL329P</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.1	90398875	90620855	<i>AB015752.3</i>	2, 4, 5, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.12	119471136	119702489	<i>ENPP2, CYCSP23</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	109851781	110118562	<i>KCNV1, RPSAP48</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.1	106012200	106292504	<i>SLC16A14P1</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24

Cont/ Quadro 2

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
8q24.21	129618873	129918264	<i>GSDMC, FAM49B, CCDC26</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.11	117913455	118240824	<i>SAMD12, EXT1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	130809142	131139299	<i>ADCY8</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.1	105615745	105956842	<i>ZFPM2, FOG</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	104351683	104717960	<i>DPYS, LRP12, DCSTAMP, ZFPM2, FOG, NDUFA5P2</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	124497782	124909042	<i>NDUFB9, TATDN1, MTSS1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	120745853	121169810	<i>SNTB1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	113139629	113564259	<i>CSMD3</i>	2, 4, 5, 8, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	122040950	122513805	<i>MRPS36P3</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	110321891	110831718	<i>CTD-2544L4.1, KB-1299A7.2, NDUFB9P3</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	133245523	133755970	<i>ST3GAL1, NDRG1, ST13P6, CTC-458A3.1, CTC-369M3.1, MTCO1P49, MTND2P7</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 ,10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	112348539	112876632	<i>CSMD3, RPL30P16</i>	2, 4, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	115392971	115929098	<i>TRPS1, AF178030.2</i>	2, 3, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.1	105063438	105605923	<i>ZFPM2, TMCC1P1</i>	2, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	133757515	134303394	-	2, 5, 7, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	123909889	124497782	<i>TATDN1, TMEM65, RNF139, FER1L6-AS1, TRMT12, FER1L6, FER1L6-AS2, ARF1P3</i>	2, 3, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	132636886	133245523	<i>TG, WISP1, NDRG1, PHF20L1, LRRC6, SLA, TMEM71, AF230666.2, WISP1-OT1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24

Cont/ Quadro 2

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
8q24.3	140679379	141290234	<i>SLC45A4, DENND3, PTK2</i>	2, 4, 5, 7, 8 10,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	115929269	116594291	-	2, 3, 4, 5, 7, 8 10,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	114698275	115382722	<i>CARSP2</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8 10,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.1	98867855	99647756	<i>STK3, VPS13B, OSR2, MRPL57P7,</i>	2, 4, 5,7, 8 10,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q21.3	89554698	90396062	<i>RIPK2, NBN, DECR1, CALB1, OSGIN2, COX6B1P6</i>	2, 4, 5, 8 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.21	129944876	130809142	<i>FAM49B, ASAP1, ADCY8</i>	2, 3, 4, 5 10,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	121169810	122037425	<i>HAS2, RPL35AP19</i>	2, 3, 4, 5, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.12	119861903	120738163	<i>DEPTOR, SNTB1, MTBP, MRPL13, COL14A1, NCAPGP1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.1	97953236	98866768	<i>POP1, NIPAL2, STK3, RIDA, MATN2, RPL30, KCNS2, ERICH5, SNORA72</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.11	116800962	117817678	<i>UTP23, RAD21, SLC30A8, MED30, EXT1, AARD</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	103272313	104296152	<i>FZD6, CTHRC1, SLC25A32, DCAF13, RIMS2</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.2	99647756	100700567	<i>RNF19A, PABPC1, SPAG1, VPS13B, RGS22, POLR2K, FBXO43, COX6C, SNX31, ANKRD46, GAPDHP62</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.3	100835241	101898707	<i>GRHL2, NCALD, ZNF706, YWHAZ, RN7SKP249, RPS26P6, NACAP1, FLJ42969, DUXAP2</i>	2, 3, 4, 5,7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.12	118243266	119313457	<i>MAL2, TNFRSF11B, SAMD12, COLEC10</i>	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9,11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	125416289	126487333	<i>TRIB1, RFPL4AP5, KNOP1P5, SOD1P3</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	113612669	114697562	-	2, 3, 4, 5, 7, 8 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	131332990	132636886	<i>LRRC6, EFR3A, HHLA1, KCNQ3, OC90, HPYR1</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24

Cont/ Quadro 2

Região	Início	Fim	Genes*	Casos
Ganhos				
8q22.3	101898783	103264173	<i>RRM2B, NCALD, UBR5, ODF1, KLF10, AZIN1, ATP6V1C1, BAALC, RPS12P15, RPL5P24, ADI1P2, SUMO2P19, POU5F1P2, MTCO1P4, NPM1P52, MTND1P5, MTCO2P4, HSPE1P14</i>	2, 4, 5, 7, 8 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.13	122513805	123904878	<i>ANXA13, DERL1, FAM83A, TBC1D31, WDYHV1, ATAD2, FBXO32, ZHX1, KLHL38, FAM91A1, ZHX2, C8orf76, FAM83A-AS1, MIR548AA1, FER1L6, CDK5P1, UBA52P5, HMGB1P19, IMPDH1P6, DUTP2, ZHX1-C8orf76</i>	2, 3, 4, 5, 7, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.3	110836451	112348539	<i>CSMD3, EEF1A1P37, MTCO1P47, SERPINA15P</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.21	126625773	128333917	<i>MYC, RN7SKP226, POU5F1B, CASC8, CCAT1, CASC11, PVT1, PCAT2, PCAT1, CASC21, CASC19, TMEM75, CCAT2, PRNCR1</i>	2,3, 4, 5, 7, 9,10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.1	96212432	97948066	<i>CPQ, LAPTM4B, MATN2, MTDH, UQCRB, MTERF3, PTDSS1, SDC2, TSPYL5, RPS23P1, SUMO2P18</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q24.22	134306123	136332770	<i>ZFAT, KHDRBS3, RPL23AP56, NCRNA00250, MAPRE1P1</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q21.3	86415183	89549970	<i>CPNE3, WWP1, MMP16, CNGB3, DCAF4L2, CNBD1, RMDN1, GOLGA2P1, KRT8P4, NTAN1P2, IARS2P1, MIOXP1, VTA1P2, RPSAP74, SLC2A3P4, SOX5P1</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q23.1	106306222	109845351	<i>EIF3E, EMC2, NUDCD1, ENY2, SYBU, EBAG9, RSPO2, ANGPT1, OXR1, TMEM74, TRHR, ABRA, PKHD1L1, PGAM1P13, NRBF2P4, TAGLN2P1, HMGB1P46</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
8q22.1	90620855	96209272	<i>RUNX1T1, CDH17, ESRP1, NECAB1, SLC26A7, TMEM55A, OTUD6B, DPY19L4, NDUFAF6, C8orf37, GDF6, TP53INP1, INTS8, KIAA1429, GEM, PDP1, TMEM67, CCNE2, PLEKHF2, TMEM64, RP11-44N17.1, RBM12B, FAM92A, RAD54B, TRIQK, LRRC69, RNA5SP274, MRPS16P1, RPL34P18, RPS4XP10, FLJ46284, PSMA2P2, IRF5P1, C8orf88, ZNF317P1, MYL12AP1, FSBP, PRR13P7, C8orf87, RAD54B</i>	2, 4, 5, 7, 8, 9 11 12 14 15 16 18 19 20 23 22 24
Perdas				
17p13.3	447710	2097377	<i>VPS53, FAM57A, GEMIN4, DBIL5P, GLOD4, RNMTL1, NXN, TIMM22, ABR, BHLHA9, TUSC5, YWHAE, CRK, MYO1C, INPP5K, PITPNA, SLC43A2, SCARF1, RILP, PRPF8, TLCD2, WDR81, SERPINF2, SERPINF1, SMYD4, RPA1, RTN4RL1, DPH1, OVCA2, HIC1, SMG6</i>	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 10 11 12 15 16 18 20 22 23 24 26
17p 13.2	3247287	3534710	<i>ASPA, OR1E2, SPATA22, OR3A3, TRPV3, OR1E1, OR1R1P, OR3A4P, OR3A1, OR3A2</i>	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 10 11 12 15 16 18 20 22 23 24 26
17p13.1	5474980	6775489	<i>DERL2, NLRP1, PITPNM3, MED31, FAM64A, AIPL1, TXNDC17, XAF1, SLC13A5, MIS12, WSCD1, KIAA0753, RPL23AP73, C17orf100, BTF3P14</i>	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 10 11 12 15 16 18 20 22 23 24 26
17p13.1	6775489	7285276	<i>DVL2, PHF23, ACADVL, ALOX12, CLEC10A, XAF1, DLG4, ASGR1, RNASEK-C17orf49, BCL6B, ASGR2, TEKT1, ELP5, GABARAP, SLC16A11, SLC16A13, CTDNEP1, FBXO39, SLC2A4, CLDN7, RNASEK, C17orf49</i>	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 10 11 12 14 15 16 18 20 22 23 24 26

*Foram excluídos os miRNA, lncRNA outras seqüências sem genes conhecidos.

A análise utilizando a ferramenta CoNVaq possibilita encontrar regiões alteradas (ganhos e perdas) compartilhadas entre os casos, sua localização (cromossomo envolvido, início e fim do segmento alterado) e quais os casos que as possuem. Devido ao grande número de alterações, selecionamos as regiões compartilhadas em pelo menos 70% dos casos.

Ganhos genômicos foram muito mais frequentes quando comparados a perdas. Ganhos em 1q32.1 e perdas em 17p foram eventos frequentes observados em 70% dos casos, onde se mapeiam inúmeros genes detalhados no Quadro 2.

A região mais frequentemente encontrada em ganhos está mapeada em 8q22.1-24.3 (mais de 70% dos casos), a qual inclui o oncogene *MYC* (8q24.21). Um total de 18 casos apresentou ganhos envolvendo o oncogene *MYC*, já descrito em tumores de mama, inclusive nos inflamatórios. Além desta região, em 83% dos casos foram detectados ganhos em 8q24.13 (início:124909042 bp e final:125106390) onde se mapeiam os genes *SQLE*, *FAM84B*, *NSMCE2*, *KIAA0196* e *ZNF572*.

Praticamente todos os casos apresentaram *cnLOH* sendo em maior frequência nos casos CIM11 (30 alterações), CIM16 (24 alterações) e CIM20 (11 alterações) (Figura 7). Sete casos apresentaram *cnLOH* (CIM03, CIM11, CIM14, CIM16, CIM20, CIM22 e CIM23) em 3p26.3. Destes, quatro casos são triplo negativos (CIM11, CIM14, CIM16 e CIM20). Os genes mapeados nesta região incluem *CHL1*, *CNTN6*, *CNTN4*, *CNTN4-AS2*, *IL5RA*, *TRNT1*, *CRBN*, *LRRN1*, *SETMAR*, *SUMF1*, *ITPR1*, *EGOT*, *BHLHE40-AS1*, *BHLHE40*, *ARL8B*. Interessantemente, perdas em mosaico nessa m

essa região foram identificadas em seis casos (CIM07, CIM09, CIM10, CIM12, CIM18 e CIM26), sendo um deles (CIM10) triplo negativo. Desta forma, cinco entre sete CIM triplo negativos apresentaram *cnLOH* ou perdas em 3p26.3. Quatro casos (CIM07, CIM16, CIM23 e CIM26) possuem grandes regiões genômicas envolvidas em perdas e ou *cnLOH* e, portanto, incluem uma grande quantidade de genes já descritos como alterados no câncer de mama, incluindo o gene *ROBO1*.

A *cnLOH* mapeada em 6q22.31 foi comum a quatro casos (CIM04, CIM05, CIM09 e CIM22), todos eles HER2 negativos. Esta mesma região estava envolvida em ganhos em dois casos triplo-negativos (CIM11 e 16). Em 6q22.31 estão mapeados 48 genes (*NCOA7*, *HINT3*, *CENPW*, *RSPO3*, *RNF146*, *ECHDC1*, *THEMIS*, *PTPRK*, *LAMA2*, *ARHGAP18*, *EPB41L2*, *AKAP7*, *ARG1*, *MED23*, *ENPP3*, *ENPP1*, *CTGF*, *MOXD1*, *STX7*, *TAAR9*, *TAAR8*, *TAAR6*, *TAAR5*, *TAAR2*, *TAAR1*, *VNN1*, *VNN3*, *VNN2*, *SLC18B1*, *RPS12*, *EYA4*, *TCF21*, *TBPL1*, *SLC2A12*, *SGK1*, *ALDH8A1*, *HBS1L*, *MYB*, *AHI1*, *PDE7B*, *BCLAF1*, *MAP7*, *MAP3K5*, *PEX7*, *SLC35D3*, *IL20RA*, *IL22RA2*, *IFNGR1*), incluindo os receptores de interleucinas (*IL20RA* e *IL22RA2*).

Grandes regiões genômicas mapeadas no cromossomo 17 estavam envolvidas em *cnLOH*, incluindo os casos CIM11 e CIM22 (*cnLOH* em mosaico). Dois casos (CIM12 e CIM16) apresentaram *cnLOH* no braço curto do cromossomo 17 (17p13.3), sendo um deles mosaico (CIM12). O caso CIM14 apresentou *cnLOH* em mosaico no braço longo do cromossomo 17 (17q23.2). A região 17p13.3 também foi encontrada em perda em 15 casos

(CIM01, CIM03, CIM05, CIM06, CIM07, CIM08, CIM09, CIM10, CIM15, CIM16, CIM18, CIM20, CIM23, CIM24, CIM26) onde se mapeiam 37 genes (Quadro 2). Em adição, perdas em 17q23.2 foram encontradas em seis casos (CIM08, CIM12, CIM13, CIM16, CIM 19 e CIM22), compreendendo um grande número de genes incluindo miRNAs e lncRNAs (*LINC00673*, *LINC00511*, *SLC39A11*, *SSTR2*, *COG1*, *FAM104A*, *C17orf80*, *CPSF4L*, *CDC42EP4*, *SDK2*, *LINC00469*, *LOC400620*, *RPL38*, *MGC16275*, *TTYH2*, *DNAI2*, *KIF19*, *BTBD17*, *GPR142*, *GPRC5C*, *CD300A*, *CD300LB*, *CD300C*, *CD300LD*, *C17orf77*, *CD300E*, *RAB37*, *CD300LF*, *SLC9A3R1*, *MIR3615*, *NAT9*, *TMEM104*, *GRIN2C*, *FDXR*, *FADS6*, *USH1G*, *OTOP2*, *OTOP3*, *HID1*, *CDR2L*, *ICT1*, *ATP5H*, *KCTD2*, *SLC16A5*, *ARMC7*, *NT5C*, *HN1*, *SUMO2*, *NUP85*, *GGA3*, *MRPS7*, *MIF4GD*, *LOC100287042*, *SLC25A19*, *GRB2*, *MIR3678*, *KIAA0195*, *CASKIN2*, *TSEN54*, *LLGL2*, *MYO15B*, *RECQL5*, *SMIM5*, *SMIM6*, *SAP30BP*, *ITGB4*, *GALK1*, *H3F3B*, *MIR4738*, *UNK*, *UNC13D*, *WBP2*, *TRIM47*, *TRIM65*, *MRPL38*, *FBF1*, *ACOX1*, *TEN1*, *TEN1-CDK3*, *CDK3*, *EVPL*, *SRP68*, *GALR2*, *ZACN*, *EXOC7*, *FOXJ1*, *RNF157-AS1*, *RNF157*, *UBALD2*, *QRICH2*, *PRPSAP1*, *SPHK1*, *UBE2O*, *AANAT*, *RHBDF2*, *CYGB*, *PRCD*, *SNHG16*, *SNORD1C*, *SNORD1B*, *SNORD1A*, *ST6GALNAC2*, *ST6GALNAC1*, *MXRA7*, *JMJD6*, *METTLL23*, *SRSF2*, *MIR636*, *MFSD11*, *MGAT5B*, *LINC00338*, *SEC14L1*, *SCARNA16*, *SEPT9*, *MIR4316*, *LOC100507351*, *FLJ45079*, *TNRC6C*, *TNRC6C-AS1*, *TMC6*, *TMC8*, *C17orf99*, *SYNGR2*, *TK1*, *AFMID*, *BIRC5*, *TMEM235*, *LOC100996291*, *SOCS3*, *PGS1*, *DNAH17*, *DNAH17-AS1*, *CYTH1*, *USP36*, *TIMP2*, *LOC100653515*, *LGALS3BP*, *CANT1*, *C1QTNF1-AS1*, *C1QTNF1*,

ENGASE, RBFOX3, MIR4739, ENPP7, CBX2, CBX8, CBX4, TBC1D16). As duas regiões genômicas no cromossomo 17 envolvidas em perdas estavam presentes apenas no caso CIM8.

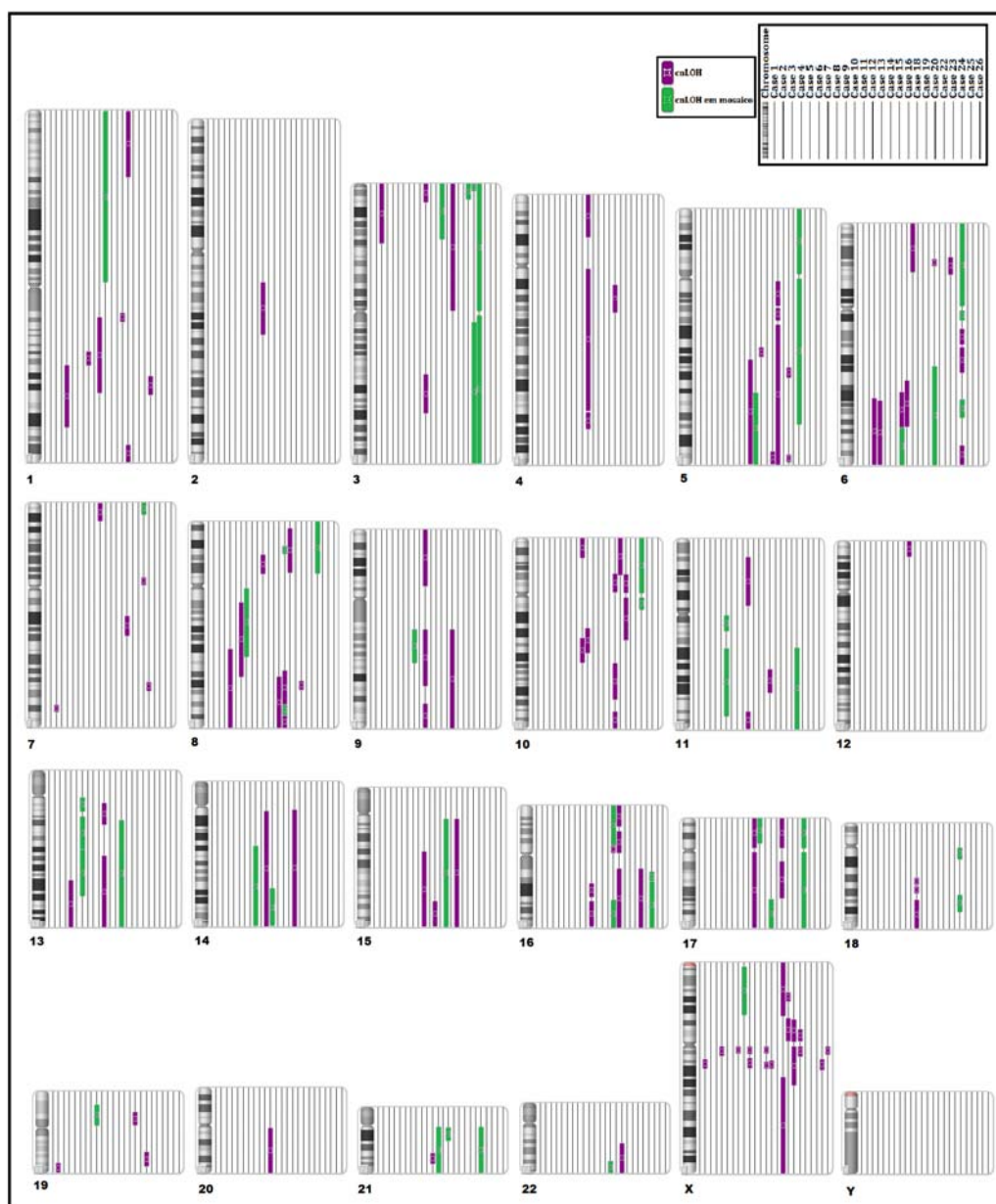


Figura 7 – Perfil de alterações genômicas do tipo cnLOH (roxo) dos 24 casos de carcinomas inflamatórios. Em verde estão representadas as cnLOH em mosaico. As regiões mais frequentemente alteradas estão mapeadas em 3p, 6q e cromossomos 17 e X. Foi utilizado o programa *Chromosome Analysis Suite* (ChAS, v.3.1.0) para a geração das imagens.

Foram também investigadas as regiões envolvendo amplificação gênica (mais de 5 cópias) e deleção homozigota que estivessem presentes em pelo menos três casos. Foram identificados 16 casos com amplificação. A presença de amplificação gene-específica (50 genes) em no mínimo três casos, está detalhada na Quadro 3 (CoNVaq). Um achado interessante foi a presença de amplicons nos casos CIM9 11 e 22 mapeados em 1q32.1 (envolvendo 21 genes), assim como o lncRNA *LINC00862* e dois outros genes mapeados nesta região e amplificados nos casos CIM03, CIM09 e CIM22. Um segundo amplicon foi observado nos casos CIM03, CIM09 e CIM11 mapeados em 1q32.2 (envolvendo 6 genes e 2 miRNAs). O gene *KCNT2* estava amplificado nos casos CIM9 18 e 22 e o gene *TRHR* mapeado em 8p23.1 nos casos CIM 4 11 e 14. Os casos CIM8 12 e 14 apresentaram dois amplicons mapeados no cromossomo 17: 17q12 e 17q21.1 além do gene *IKZF3* mapeado em 17q12-q21.1.

Quadro 3 - Genes amplificados nos CIM e presentes em pelo menos três casos.

Gene	Cromossomo	Casos
ASCL5	1q32.1	9 11 22
C1orf106	1q32.1	9 11 22
CACNA1S	1q32.1	9 11 22
CAMSAP2	1q32.1	9 11 22
CSRP1	1q32.1	9 11 22
GPR25	1q32.1	9 11 22
IGFN1	1q32.1	9 11 22
IPO9	1q32.1	9 11 22
IPO9-AS1	1q32.1	9 11 22
MIR5191 [#]	1q32.1	9 11 22
NAV1	1q32.1	9 11 22
PHLDA3	1q32.1	9 11 22
PKP1	1q32.1	9 11 22
RPS10P7	1q32.1	9 11 22
SHISA4	1q32.1	9 11 22
TMEM9	1q32.1	9 11 22
TNNI1	1q32.1	9 11 22
TNNT2	1q32.1	9 11 22
KIF21B	1q32.1	9 11 22
LAD1	1q32.1	9 11 22
MIR1231 [#]	1q32.1	9 11 22
LINC00862 [*]	1q32.1	3, 9 22
NR5A2	1q32.1	3, 9 22
ZNF281	1q32.1	3, 9 22
CD34	1q32.2	3, 9 11
CD46	1q32.2	3, 9 11
CD55	1q32.2	3, 9 11
CR1	1q32.2	3, 9 11
CR1L	1q32.2	3, 9 11
CR2	1q32.2	3, 9 11
MIR29B2 [#]	1q32.2	3, 9 11
MIR29C [#]	1q32.2	3, 9 11
KCNT2	1q31.3	9 18 22
TRHR	8p23.1	4 11 14
CDK12	17q12	8 12 14
ERBB2	17q12	8 12 14
GRB7	17q12	8 12 14
MIEN1	17q12	8 12 14
MIR4728 [#]	17q12	8 12 14
NEUROD2	17q12	8 12 14
PGAP3	17q12	8 12 14
PNMT	17q12	8 12 14
PPP1R1B	17q12	8 12 14
STARD3	17q12	8 12 14
TCAP	17q12	8 12 14
IKZF3	17q12-q21.1	8 12 14
GSDMB	17q21.1	8 12 14
ORMDL3	17q21.1	8 12 14
ZBP2	17q21.1	8 12 14

Dados obtidos utilizando a ferramenta CoNvaq. As linhas demarcadas indicam os casos com o mesmo amplicon. [#] miRNAs, ^{}lcnRNA

A análise de enriquecimento de vias utilizando a ferramenta *GO Biological Process* (www.geneontology.org/) para os casos que apresentaram amplificação gênica revelou o envolvimento da via de regulação negativa da resposta humoral, representada pelos genes *CD46*, *CR1* e *CD55* e da via da interleucina 10 (Figura 8). Estes genes, além de amplificados em três casos (CIM03, CIM09 e CIM11), também estavam envolvidos em ganhos em 13 casos (CIM02, CIM04, CIM05, CIM06, CIM10, CIM12, CIM14, CIM15, CIM16, CIM18, CIM20, CIM22, CIM24).

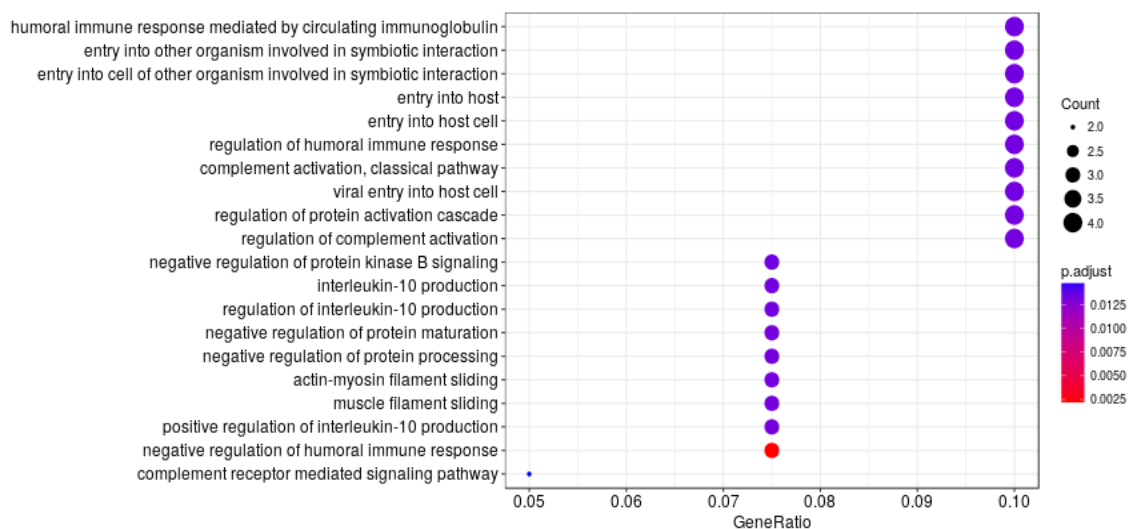


Figura 8 - Análise de enriquecimento de vias utilizando a ferramenta *GO Biological Process*. A via de regulação negativa da resposta humoral apresentou um valor de $p < 0,0025$.

As deleções homozigotas do gene *TP63* foram detectadas em dois casos (CIM8 e CIM23). Além disso, foi verificado que o gene *TP63* também se encontra na região de cnLOH do caso CIM22 e em uma perda em mosaico no caso CIM26. Foi também identificada deleção homozigota dos genes *ADAM5* e *ADAM3A* em quatro casos (CIM1, CIM3, CIM9, CIM14). A deleção homozigota do gene *CSMD1* foi identificada no caso CIM16; outros

três casos (CIM07, CIM08 e CIM10) apresentaram perdas mosaicos envolvendo este gene. A perda homocigota dos receptores olfatórios foi identificada em quatro casos (Quadro 4).

Quadro 4 - Deleções homocigotas presentes nos carcinomas inflamatórios (CIM). Os dados foram obtidos utilizando a ferramenta CoNVaq.

Cromossomo	Início	Fim	CIM	Genes
1q21.3	152.761.909	152.768.346	5	-
3q28	189.360.834	189.371.964	8	<i>TP63</i>
3q28	189.363.665	189.371.964	23	<i>TP63</i>
8p11.22	39.247.097	39.386.952	9	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
8p11.22	39.247.097	39.386.952	14	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
8p23.2	3.997.049	4.474.400	16	<i>CSMD1</i>
8p11.22	39.247.097	39.386.952	1	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
8p11.22	39.247.097	39.386.952	3	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
11q11	55.374.018	55.452.996	13	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>
11q11	55.374.134	55.452.996	18	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>
11q11	55.374.018	55.452.996	19	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>
11p15.4	5.783.909	5.809.230	2	<i>OR52N5, OR52N1</i>
13q21.1	57.758.275	57.793.430	7	-
13q21.1	57.758.275	57.778.238	23	-
14q21.1	41.892.350	41.973.619	16	-
14 q31.3	86.284.753	86.322.886	16	-

(-): não há descrição de genes conhecidos.

4.3 COMPARAÇÃO DAS CNAs COM OS DADOS CLÍNICOS-HISTOPATOLÓGICOS

Foram comparados os perfis genômicos segundo as características clínicas e histopatológicas dos pacientes utilizando a ferramenta CoNVaq (<http://tomcat.compbio.sdu.dk/convaq/>). As comparações incluíram casos de

CIM triplo negativos *versus* demais casos, casos com presença *versus* ausência de história familiar de câncer, pacientes em pré menopausa *versus* pós-menopausa quando do diagnóstico tumoral, pacientes que foram a óbito pela doença em um período inferior dois anos *versus* óbito superior a dois anos e pacientes que apresentaram metástase ao diagnóstico *versus* os que não apresentaram. Como resultado de cada uma das comparações entre os grupos, foi possível identificar regiões genômicas alteradas que diferem entre os grupos (Quadro 5).

Quadro 5 - Comparação de CNAs entre os casos com diferenças clínicas. As análises foram realizadas utilizando ferramenta CoNVaq (<http://tomcat.compbio.sdu.dk/convaq/>).

EVENTO	REGIÃO	INÍCIO	FIM	GENES*
TRIPLOS NEGATIVOS	1q21.1 Ganho	143932349	150094644	<i>LOC100288142, LINC00623, LOC728875, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4A, PFN1P2, NBPF8, NBPF9, LOC653513, PDE4DIP, SEC22B, NOTCH2NL, NBPF10, HFE2, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, GNRHR2, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A, GPR89C, PDZK1P1, NBPF24, NBPF11, HYDIN2, NBPF12, LOC728989, NBPF13P, PRKAB2, PDIA3P, FMO5, CHD1L, LINC00624, BCL9, ACP6, GJA5, GJA8, GPR89B, MIR5087, E OUTROS 195 GENES</i>
	1q21.3 Ganho	150764007	151574654	<i>CTSK, ARNT, SETDB1, CERS2, ANXA9, FAM63A, PRUNE, BNIPL, C1orf56, CDC42SE1, MLLT11, GABPB2, SEMA6C, TNFAIP8L2, TNFAIP8L2-SCNM1, LYSMD1, SCNM1, TMOD4, VPS72, PIP5K1A, PSMD4, ZNF687, PI4KB, RFX5, SELENBP1, PSMB4, POGZ, CGN, TUFT1, MIR554</i>
	1q21.2 Ganho	150328474	150571090	<i>PRP13, RPRD2, TARS2, ECM1, MIR6878, FALEC, ADAMTSL4, MIR4257</i>
	1q21.3 Ganho	150573897	150741592	<i>ENSA, GOLPH3L, HORMAD1, CTSS</i>
	1q21.2 Ganho	150202236	150327954	<i>ANP32E, CA14, ALPH1A, C1orf54, CIART, MRPS21</i>
	1q21.3 Ganho	151586539	151638403	<i>SNX27, CELF3</i>
	6p22.2 Ganho	25261494	26286689	<i>SNX27, CELF3, RIIAD1, MRPL9, OAZ3, TDRKH, LINGO4, RORC, C2CD4D, LOC100132111, THEM5, THEM4, S100A10, NBPF18P, S100A11, TCHHL1, TCHH, RPTN, HRNR, FLG, FLG2, CRNN, LCE5A, CRCT1, LCE3E, LCE3D, LCE3C, LCE3B, LCE3A, LCE2D, LCE2C, LCE2B, LCE2A, LCE4A, C1orf68, KPRP, LCE1F, LCE1E, LCE1D, LCE1C, LCE1B, LCE1A, LCE6A, SMCP, IVL, SPRR4, SPRR1A, SPRR3, SPRR1B, SPRR2D, SPRR2A, SPRR2B, SPRR2E, SPRR2F, SPRR2C, SPRR2G, LELP1, PRR9, LOR, PGLYRP3, PGLYRP4, S100A,</i>
	6p22.3 Ganho	17251328	25100223	<i>CMAHP, LRRC16A, SCGN, HIST1H2AA, HIST1H2BA, HIST1H2APS1, SLC17A4, SLC17A1, SLC17A3, SLC17A2, TRIM38, HIST1H1A, HIST1H3A, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H3B, HIST1H2AB, HIST1H2BB, HIST1H3C, HIST1H1C, HFE, HIST1H4C, HIST1H1T, HIST1H2BC, HIST1H2AC, HIST1H1E, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H4D, HIST1H3D, HIST1H2AD, HIST1H2BF, HIST1H4E, HIST1H2BG, HIST1H2AE, HIST1H3E, HIST1H1D, HIST1H4F, HIST1H4G, HIST1H3F, HIST1H2BH, HIST1H3G, HIST1H2BI, HIST1H4H, BTN3A2, BTN2A2, BTN3A1, BTN2A3P, BTN3A3, E OUTROS 57 GENES</i>
6p21.33 Ganho	26359655	34138088	<i>DPB2, COL11A2, RXRB, SLC39A7, HSD17B8, MIR219-1, RING1, HCG25, VPS52, RPS18, B3GALT4, WDR46, PFDN6, RGL2, TAPBP, ZBTB22, DAXX, KIFC1, PHF1, CUTA, SYNGAP1, MIR5004, ZBTB9, BAK1, GGNBP1, LINC00336, ITPR3, MNF1, IP6K3, LEMD2, MLN, LOC100507584, MIR1275, GRM4, HMGA1, C6orf1, NUDT3, RPS10-NUDT3, RPS10, PACSIN1, SPDEF, C6orf106, SNRPC, UHRF1BP1, TAF11, ANKS1A, TCP11, SCUBE3, ZNF76, DEF6, PPARD E OUTROS 586 GENES</i>	

Cont/ Quadro 5

EVENTO	REGIÃO	INÍCIO	FIM	GENES*
	4p15.2 Perda	171568 75	26493433	<i>QDPR, CLRN2, LAP3, MED28, FAM184B, DCAF16, NCAPG, LCORL, SLIT2, SLIT2-IT1, MIR218-1, PACRGL, KCNIP4, KCNIP4-IT1, LOC100505912, GPR125, GBA3, MIR548AJ2, PPARGC1A, MIR573, DHX15, SOD3, CCDC149, LGI2, SEPSECS, LOC285540, PI4K2B, ZCCHC4, ANAPC4, SLC34A2, SEL1L3, SMIM20, RBPJ, CCKAR, TBC1D19, STIM2, MIR4275, PCDH7, ARAP2, DTHD1, MIR4801, KIAA1239, C4orf19, RELL1, PGM2, TBC1D1, PTTG2, FLJ13197, KLF3, TLR10, TLR1, TLR6</i>
	4p15.1 Perda	302902 55	35925764	<i>PCDH7, ARAP2, DTHD1, MIR4801, KIAA1239, C4orf19, RELL1, PGM2, TBC1D1, PTTG2, FLJ13197, KLF3, TLR10, TLR1, TLR6, FAM114A1, MIR574, TMEM156, KLHL5, WDR19, RFC1, KLB, RPL9, LIAS, LOC401127, UGDH, UGDH-AS1, SMIM14, UBE2K, PDS5A, LOC344967, N4BP2, RHOH, CHRNA9, RBM47, MIR4802, NSUN7, APBB2, UCHL1-AS1, UCHL1, LIMCH1, PHOX2B, TMEM33, DCAF4L1, SLC30A9, BEND4, SHISA3, ATP8A1, GRXCR1, KCTD8, YIPF7, GUF1, GNPDA2, GABRG1, GABRA2</i>
HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER POSITIVA	8q11.21 Ganho	469546 93	48277751	<i>LINC00293, LOC100287846, KIAA0146, CEBPD, PRKDC, MCM4, UBE2V2, EFCAB1, SNAI2, C8orf22, SNTG1</i>
CIM NA PRÉ MENOPAUSA	10q26.13 Perda	122160 807	135204574	<i>PPAPDC1A, MIR5694, C10orf85, WDR11-AS1, WDR11, FGFR2, ATE1, NSMCE4A, TACC2, BTBD16, PLEKHA1, MIR3941, ARMS2, HTRA1, DMBT1, C10orf120, FLJ46361, CUZD1, FAM24B-CUZD1, FAM24B, LOC399815, FAM24A, C10orf88, PSTK, IKZF5, ACADSB, HMX3, HMX2, BUB3, GPR26, CPXM2, CHST15, OAT, NKX1-2, LHPP, FAM53B, METTL10, FAM175B, ZRANB1, CTBP2, MIR4296, LOC100169752, TEX36, LOC283038, FLJ37035, C10orf137, MMP21, UROS, MIR4484, BCCIP, DHX32, FANK1, FANK1-AS1, ADAM12, LINC00601, C10orf90, DOCK1, FAM196A, NPS, FOXI2, CLRN3, PTPRE, MKI67, MGMT, EBF3, MIR4297, LINC00959, CTAGE7P, GLRX3, MIR378C, TCERG1L, FLJ46300, PPP2R2D, BNIP3, JAKMIP3, DPYSL4, STK32C, LRRC27, PWWP2B, C10orf91, INPP5A, NKX6-2, TTC40, LOC399829, GPR123, KNDC1, UTF1, VENTX, MIR202, ADAM8, TUBGCP2, ZNF511, CALY, PRAP1, FUOM, ECHS1, MIR3944, PAOX, MTG1, SPRN, LOC619207, CYP2E1, SYCE1, SPRNP1</i>
	12q13 Perda	476695 83	58926750	<i>RPAP3, ENDOU, RAPGEF3, SLC48A1, HDAC7, VDR, TMEM106C, COL2A1, SENP1, PFKM, ASB8, C12orf68, OR10AD1, H1FNT, ZNF641, ANP32D, C12orf54, OR8S1, LALBA, KANSL2, SNORA34, MIR1291, SNORA2A, SNORA2B, CCNT1, LINC00935, ADCY6, MIR4701, CACNB3, DDX23, RND1, CCDC65, FKBP11, ARF3, WNT10B, WNT1, DDN, PRKAG1, KMT2D, RHEBL1, DHH, LMBR1L, TUBA1B, TUBA1A, TUBA1C, PRPH, TROAP, C1QL4, DNAJC22, SPATS2, E OUTROS 255 GENES</i>

Cont/ Quadro 5

EVENTO	REGIÃO	INÍCIO	FIM	GENES*
PRESENÇA METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO	8q24.21 Ganho	117908925	132636886	AARD, SLC30A8, MED30, EXT1, TNFRSF11B, COLEC10, MAL2, NOV, ENPP2, COL14A1, MRPL13, MTBP, SNTB1, FBXO32, KLHL38, ANXA13, FAM91A1, FER1L6, FER1L6-AS1, FER1L6-AS2, TMEM65, POU5F1B, LOC727677, MYC, MIR1204, PVT1, TMEM75, MIR1205, MIR1206, MIR1207, MIR1208, FAM49B, MIR5194, ASAP1, LOC100507117, ASAP1-IT1, EFR3A, OC90, HHLA1, KCNQ3, HPYR1, LRRC6, TMEM71, PHF20L1, TG, SLA, WISP1, NDRG1, ST3GAL1, ZFAT, ZFAT-AS1, MIR30B, MIR30D, LOC286094
ÓBITO EM 2 ANOS	1q41 Ganho	220019406	220027360	HLX
	8q21.13 Ganho	78630391	78633877	PKIA

4.4 CROMOTRIPSIS

A análise de alterações genômicas também revelou a presença de cromotripsis (CTPL). Este evento é definido pela presença de inúmeras quebras cromossômicas que podem ocorrer em um único evento catastrófico levando a perda parcial ou completa de informações genéticas. Foram detectados 14 eventos de cromotripsis em nove casos (37,5%) envolvendo diferentes cromossomos (Quadro 6). A Figura 9 ilustra as regiões em cromotripsis localizadas nos respectivos cromossomos nos casos CIM. O cromossomo mais afetado foi o 11 (CIM04, CIM07 e CIM24), seguido pelos cromossomos 17 (CIM08 e CIM18) 13 (CIM09 e CIM18) e 8 (CIM07 e CIM14).

Quadro 6 - Casos com ocorrência de cromotripsis.

Caso	Tamanho da região CTLP (Mb)	Cromossomo	Início	Fim	Nº de vezes que altera status CNA	Likelihood ratio (log10)
CIM04	59.13	11	65000001	124128983	16	13
CIM04	48.13	12	15000001	63129895	17	14
CIM07	78.08	8	35000001	113077248	13	9
CIM07	90.35	11	44651763	135006516	16	13
CIM08	51.3	6	95000001	146304566	32	37
CIM08	59.13	17	20000001	79128983	19	17
CIM09	78.08	1	170000001	248077248	13	9
CIM09	102.53	13	12638486	115169878	12	8
CIM14	115.17	8	25000001	140169878	14	11
CIM18	30	13	20000001	50000000	12	8
CIM18	48.13	17	30000001	78129895	19	11
CIM19	115.17	5	60000001	175169878	12	9
CIM20	102.53	7	1	102531392	12	9
CIM24	90.35	11	1	90354753	14	11

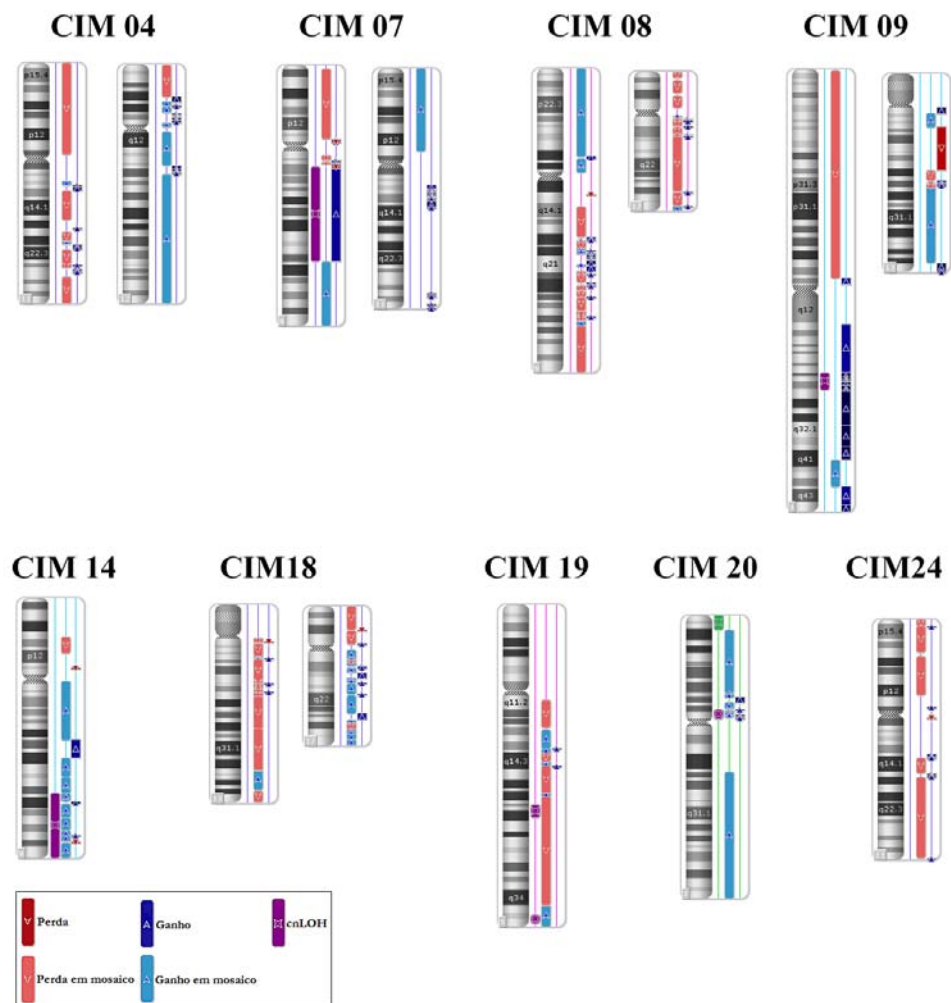


Figura 9 - Representação das alterações genômicas evidenciando a presença de cromotripsis. A região do mapeamento esta indicada na Quadro 6.

4.5 ANÁLISE DE VIAS BIOLÓGICAS- *INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)*

A partir das alterações (ganhos, perdas e cnLOH) compartilhadas em no mínimo 70% dos casos, gerou-se uma lista de genes mapeados nestas regiões genômicas. Os genes foram submetidos à análise *in silico* com o

programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, EUA) buscando a identificação de redes de interação gênica e proteica, vias canônicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular.

A análise evidenciou um grande número de moléculas alteradas já descritas no câncer, com um total de 129 registros de neoplasias envolvendo diferentes tipos celulares como células epiteliais, mesenquimais e hematológicas. Entre os tipos tumorais envolvidos foram detectados 18 registros em linfomas, nove em tumores de mama, nove em tumores gástricos, oito em tumores no fígado, sete em tumores de pâncreas, seis em carcinomas de ovário, cinco em carcinomas de endométrio, três em tumores cerebrais, dois em tumores colorretais, entre outros. Foi observado que o oncogene *MYC* estava envolvido como a principal molécula alterada nestes diferentes tumores.

Entre os 129 registros contendo os genes envolvidos em câncer 10 deles estavam relacionados com a neoplasia mamária (câncer de mama, câncer de mama e pâncreas, tumor mamário, carcinoma de mama e ovário, início da tumorigênese do câncer de mama, transformação da glândula mamária, hiperplasia dos lóbulos mamários, câncer de mama TNM estágio III e carcinoma ductal).

A análise também apresentou moléculas relacionadas com movimento celular descritas em seis diferentes tipos celulares e que se relacionam com processos metastáticos como migração de linhagens de células tumorais do tecido ósseo, estômago, células escamosas,

queratinócitos, sarcomas e carcinomas. Os genes relacionados com o processo metastático detectados nessa análise foram *MTBP*, *NOV*, *SDC2*, *WISP1*, *HAS2*, *MTDH*, *ANGPT1*, *MYC*, *MTBP* e *NDRG1*.

Na análise de vias canônicas (Figura 10), os cinco valores mais significativos foram encontrados para as vias de sinalização associadas à regulação de poliamina no câncer colorretal, de sinalização apoptótica mediada por MYC, via da biosíntese do epoxiescaleno, via de sinalização do fator de iniciação eucariótico (EIF2) e via de degradação de uracila. Os genes alterados que estão envolvidos nestas vias, estão listados no Quadro 7.

As vias envolvidas com migração, invasão e metástase apresentaram os seguintes genes *MDM4*, *MTBP*, *NOV*, *SDC2*, *WISP1*, *HAS2*, *MTDH*, *ANGPT1*, *MTBP* e *NDRG1*.

Quadro 7 - Vias biológicas e os genes envolvidos a partir das regiões alteradas em 70% dos casos

Vias biológicas	Genes
Regulação da Poliamina em Câncer Colorretal	<i>MYC, AZIN1</i>
Sinalização apoptótica mediada por MYC	<i>MYC, PIK3C2B, YWHAZ</i>
Biosíntese do Epoxiescaleno	<i>SQLE</i>
Sinalização EIF2	<i>MYC, PIK3C2B, EIF3H, RPL30, EIF3E</i>
Degradação de Uracil II	<i>DPYS</i>
Degradação da Timina	<i>DPYS</i>
Pluripotencialização das Células embriogênicas de ratos	<i>MYC, PIK3C2B, FZD6</i>
Sinalização IGF-1	<i>PIK3C2B, NOV, YWHAZ</i>
Sinalização p53	<i>PIK3C2B, MDM4, RRM2B</i>
Regulação do Dano do Checkpoint G2/M do Ciclo Celular	<i>MDM4, YWHAZ</i>

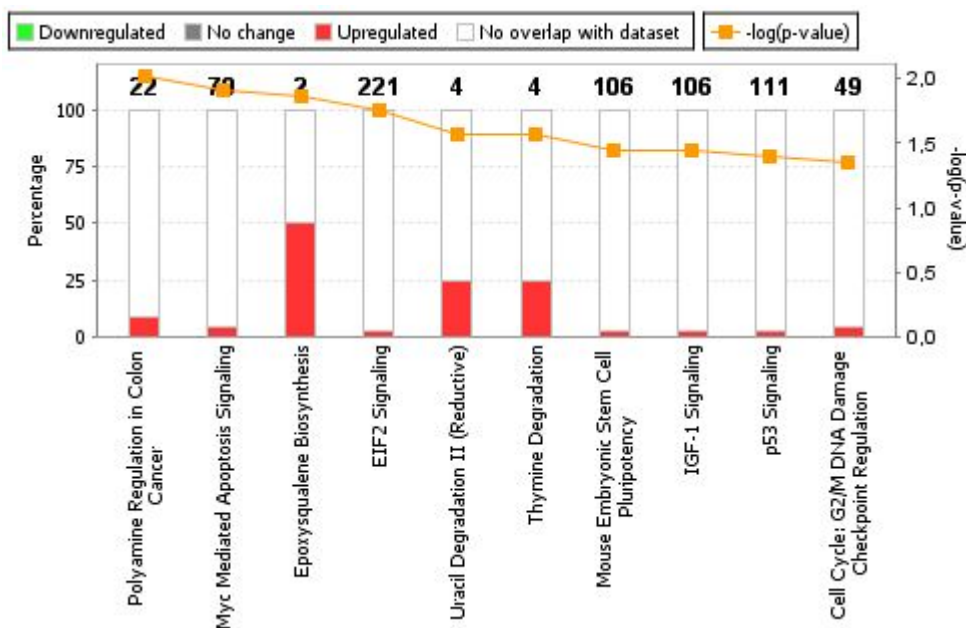


Figura 10 - Vias canônicas significativamente alteradas envolvendo os genes mapeados nas regiões alteradas e presentes em pelo menos 70% dos casos utilizando o software *IPA*.

4.6 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO USANDO ALVOS ESPECÍFICOS (*TARGET-NEXT GENERATION SEQUENCING - tNGS*)

O sequenciamento de alto desempenho foi realizado em painel contendo 105 genes (todos os exons, 3' UTR e 5'UTR) descritos como envolvidos em diferentes tipos tumorais, incluindo o câncer de mama. Foram analisadas 21 amostras tendo sido excluídos três delas (CIM03, CIM19 e CIM23) por não apresentarem os critérios recomendados de qualidade técnica.

Os detalhes da cobertura de sequenciamento de cada caso estão detalhados na Tabela 8, incluindo a média da cobertura por amostra, total de

reads, total de *reads* alinhadas, porcentagem de alinhamento, tamanho médio dos fragmentos em bp.

Tabela 2 - Resumo dos dados de sequenciamento de um painel de 105 genes associados com o câncer em 21 carcinomas inflamatórios de mama.

Caso (CIM)	Média de coberturas	Total de reads	Alinhamento de reads	Porcentagem de reads alinhados	Média dos comprimentos dos fragmentos bp	X30	X100
1	522,32	10001011	9985488	99,84	198	96,2	93,5
2	488,53	8353442	8340703	99,85	205	96,2	93,3
4	482,53	8372946	8361202	99,86	182	95,9	93,1
5	414,64	6764536	6755981	99,87	186	95,5	91,8
6	470,18	7960619	7950005	99,87	185	96	92,9
7	392,44	8581321	8568639	99,85	193	95,6	91,9
8	392,16	5959296	5951589	99,87	205	95,6	91,1
9	454,75	7668858	7658984	99,87	188	96	92,7
10	266,6	13373484	13353234	99,85	188	96,3	91,8
11	419,97	7870887	7860844	99,87	179	95,4	91,9
12	573,59	15462607	15440237	99,86	188	96,7	94,7
13	356,57	5628327	5620866	99,87	213	95,5	90,8
14	527,87	9543518	9532125	99,88	179	95,9	93,2
15	417,66	6729927	6721644	99,88	181	95,5	91,5
16	394,24	6941499	6932255	99,87	204	95,9	91,9
18	415,87	7448385	7438517	99,87	189	96,1	93,1
20	522,14	15182418	15159907	99,85	213	97	95,3
22	417,68	7979223	7968509	99,87	173	95,8	92,9
24	427,7	8181148	8170865	99,87	181	95,8	92,6
25	361,97	6744840	6735172	99,86	211	95,7	91
26	372,99	7014438	7004224	99,85	186	95,5	90,9

Bp: pares de base

Foram detectadas 1.991 variantes seguindo os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* (RICHARDS et al. 2015), COSMIC, CIVIC ou ICGC. As variantes selecionadas foram divididas

em quatro grupos (Figura 11) após a aplicação dos filtros detalhados no pipeline de análise descrito em Material e Métodos (Figura 4).

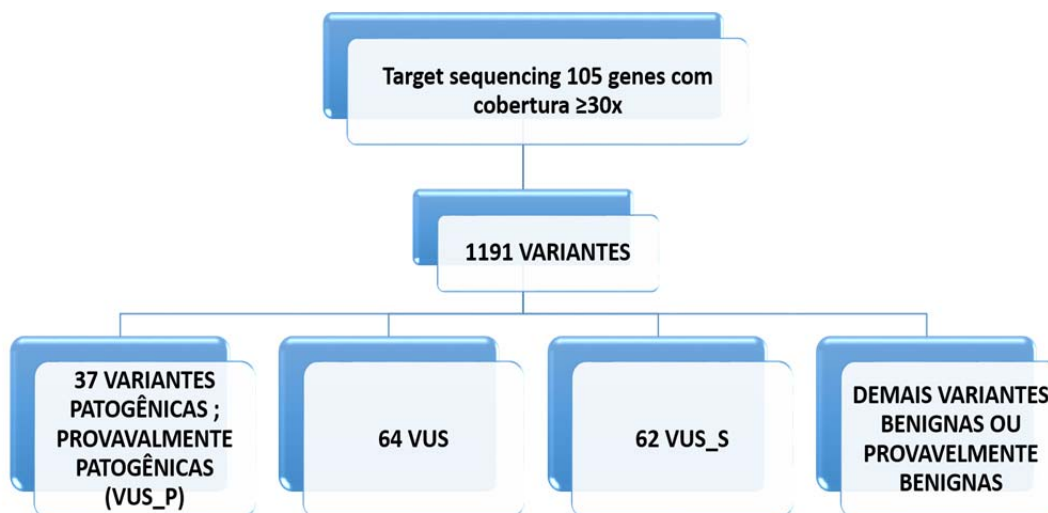


Figura 11 – Fluxograma de análise de variantes filtradas e separadas em grupos. Foram identificadas 1991 variantes, sendo 37 patogênicas, provavelmente patogênicas ou variantes de significado incerto (VUS) com potencial patogênico (*VUS_P*).

A grande maioria das variantes (1191) detectadas foram benignas ou provavelmente benignas. Trinta e sete variantes foram classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, e variantes de significado incerto com potencial patogênico (*VUS_P*). Os critérios de filtragem consideraram:

- frequência da variante deveria ser inferior a 1% ou ausente no GnomAD ou nos 609 exomas brasileiros (projeto ABRAOM);
- variante deveria ser classificada como patogênica ou provavelmente patogênica pelo ACMG ou Clinvar ou Clinvtiae; as variantes *VUS_P* foram classificadas pelo ACMG como variantes de significado incerto e necessariamente apresentam perda de função.

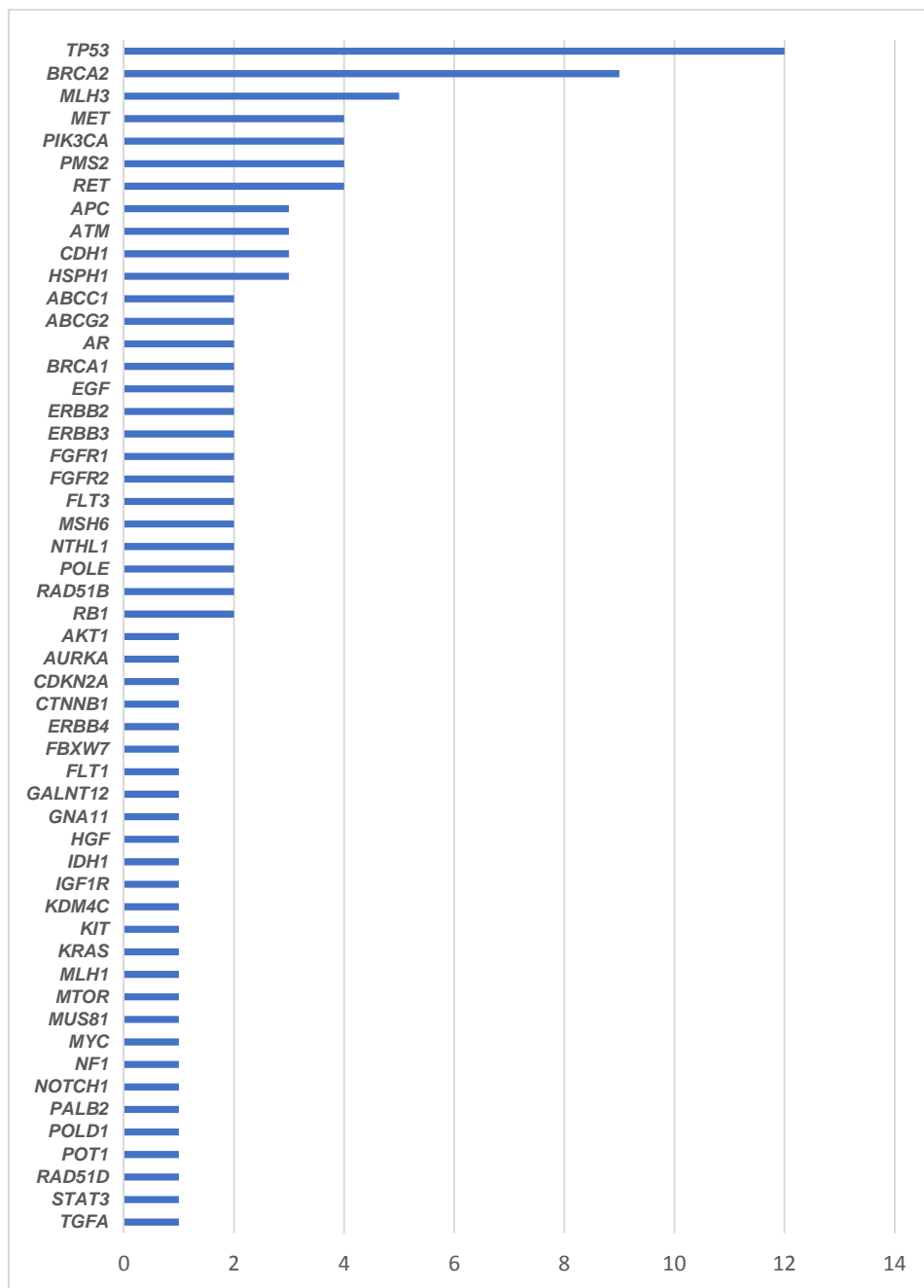
No segundo grupo foram filtradas 64 VUS, segundo os critérios: **a.** a frequência da variante deve ser inferior a 1% ou ausente no GnomAD ou nos 609 exomas brasileiros (projeto ABRAOM); **b.** a variante classificada como VUS pelo ACMG não pode estar mapeada na região 3' ou 5' UTR devendo ser sinônima, com um mínimo 30 *reads* para cada amostra; **c.** não pertencer ao grupo das VUS_P.

No terceiro grupo, foram identificadas 62 variantes nomeadas de variantes somáticas de significado incerto (VUS_S), sendo aquelas não classificadas pelo ACMG ou outra classificação, porém que preenchem os seguintes critérios: **a.** frequência inferior a 1% ou ausente no GnomAD ou nos 609 exomas brasileiros (projeto ABRAOM); **b.** variante detectada pelo COSMIC, CIVIC ou ICGC; **c.** o número de *reads* é compatível com a existência da variante (no mínimo 30% dos *reads* suportam a variante).

As demais variantes (1098), que não preencheram nenhum dos critérios de filtragem acima, compreendem o quarto grupo.

Os genes alvo apresentaram uma cobertura superior a 30 *reads* para cada amostra, acima de 90% dos *reads* foram cobertos 100x. A alta cobertura permite avaliar as alterações genômicas com precisão, diminuindo o número de falso-positivos. Foram identificadas 37 variantes patogênicas entre os 105 genes investigados incluindo os genes *TP53* (12 mutações 11 casos; o caso 20 apresentou duas variantes) e *BRCA2* (9 casos). Os genes e o número de variantes que cada gene apresentou estão ilustrados na Figura 12.

Dezessete genes apresentaram 37 variantes patogênicas, potencialmente patogênicas e VUS_P. O gene *TP53* apresentou 11 variantes, *BRCA2* apresentou 7 variantes, *PIK3CA* apresentou 4, *CDH1* apresentou 2 e os genes *AKT1*, *APC*, *BRCA1*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *KRAS*, *MSH6*, *NF1*, *PALB2*, *PMS2*, *RB1* e *RET* apresentaram uma variante cada. Três casos (CIM04, 08 e 25) não apresentaram variantes deste grupo (Quadro 8). O caso CIM20 foi o que apresentou um maior número de variantes (n=6), seis casos (CIM09, CIM11, CIM12, CIM16, CIM22 e CIM26) apresentaram três variantes cada, três casos (CIM14, CIM15 e CIM18) apresentaram duas variantes cada e oito casos (CIM01, CIM02, CIM05, CIM06, CIM07, CIM10, CIM13 e CIM 24) apresentaram uma variante cada.



Número total de variantes para cada gene

Figura 12 - Representação do número de mutações encontradas por gene. Os genes *TP53* (11 casos) e *BRCA2* (9 casos) foram os mais frequentemente alterados.

Quadro 8 - Variantes encontradas nos 105 genes sequenciados nos CIM.

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM01	<i>KIT</i>	4:55593402	VUS	c.5502_5522del	p.Thr520Ile	.
	<i>ERBB3</i>	12:56487323	VUS	c.1469G>A	p.Arg490His	rs149951770
	<i>PIK3CA</i>	3:178952085	Patogênica	c.3140A>G	p.H1047R	rs121913279
	<i>FLT1</i>	13:28979945	VUS	c.1523G>A	p.Arg508His	rs765194215
CIM02	<i>ERBB4</i>	2:212652875	VUS	c.431A>G	p.Asn144Ser	rs772663811
	<i>PIK3CA</i>	3:178936091	Patogênica	c.1633G>A	p.E545K	rs104886003
	<i>MET</i>	7:116339642	VUS_S	c.504G>T	p.Glu168Asp	rs55985569
	<i>AR</i>	X:66766376	VUS	c.1388G>T	p.Gly463Val	.
CIM04	<i>ATM</i>	11:108155094	VUS	c.3887C>G	p.Pro1296Arg	.
	<i>FLT3</i>	13:28578209	VUS	c.2962G>C	p.Ala988Pro	rs74041526
	<i>NTHL1</i>	16:2094746	VUS	c.434A>T	p.Gln145Leu	.
	<i>AR</i>	X:66765382	VUS	c.394G>A	p.Val132Ile	rs770661499
CIM05	<i>BRCA2</i>	13:32913456	Patogênica	c.4963_4964insA	p.Tyr1655Ter	rs398122789
CIM06	<i>EGF</i>	4:110866366	VUS	c.875T>A	p.Leu292His	rs35191533
	<i>APC</i>	12:133202740	VUS_S	c.6494G>A	p.Arg2165His	rs5745068
	<i>FGFR1</i>	8:38273388	Patogênica	c.1852_1854delAAG	c.1852_1854delAAG	.
	<i>CDKN2A</i>	9:21974397	VUS	c.150+280C>T	-	rs150201743
CIM07	<i>MLH1</i>	3:37092019	VUS	c.2146G>A	p.Val716Met	rs35831931
	<i>MET</i>	7:116339571	VUS	c.433G>A	p.Val145Ile	.
	<i>POT1</i>	7:124538303	VUS	c.-44_-40+12del	p.Ile803Thr	.
	<i>BRCA2</i>	13:32911298	Patogênica	c.2808_2811delACAA	-	rs80359351, rs80359352
	<i>RET</i>	10:43614994	VUS	c.2408T>C	p.A938fs*21	.
	<i>HSPH1</i>	13:31717979	VUS	c.1672C>G	p.Pro558Ala	.
	<i>MET</i>	7:116339209	VUS	c.71G>A	p.Gly24Glu	rs180985111
	<i>POLE</i>	12:133226333	VUS	c.3725C>T	p.Ser1242Phe	rs373213156
	<i>TP53</i>	17:7578418	VUS	c.512A>G	p.Glu171Gly	.

Cont/ Quadro 8

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM09	<i>FGFR1</i>	8:38285618	VUS	c.449-7C>T	-	rs754454127
	<i>ERBB3</i>	12:56495339	VUS	c.3529C>A	p.Leu1177Ile	rs55699040
	<i>RAD51B</i>	14:68353893	VUS	c.728A>G	p.Lys243Arg	rs34594234
	<i>BRCA2</i>	13:32914174	Patogênica	c.5682C>G	p.Tyr1894Ter	rs41293497
	<i>CDH1</i>	16:68846088	Patogênica	c.1059_1064delGGGGTT	p.Gly354_Leu355del	.
	<i>CDH1</i>	16:68846095	Patogênica	c.1066_1067delAG	p.Ser356Hisfs	.
	<i>CDH1</i>	16:68846086	VUS	c.1057G>C	p.Glu353Gln	.
	<i>POLD1</i>	19:50906394	VUS	c.1055G>A	p.Arg352His	rs556862476
CIM10	<i>GALNT12</i>	9:101589058	VUS	c.566A>G	p.Asn189Ser	rs183981750
	<i>PMS2</i>	7:6026607	VUS_S	c.1789A>T	p.Thr597Ser	rs1805318
	<i>BRCA2</i>	13:32890599	Patogênica	c.2T>G	p.Met1?	rs80358547
	<i>FLT3</i>	13:28609624	VUS	c.1597+8A>G	-	rs111404906
CIM11	<i>HGF</i>	7:81335073	VUS	c.1758-4T>C	-	rs778863051
	<i>RET</i>	10:43613907	VUS	c.2371T>A	p.Tyr791Asn	rs377767417
	<i>RAD51B</i>	14:68301921	VUS	c.315+8A>G	c.315+8A>G	rs181714884
	<i>MSH6</i>	2:48033750	Patogênica	c.3961A>G	p.Arg1321Gly	rs41295278
	<i>BRCA2</i>	13:32893463	Patogênica	c.316+1G>T	-	rs397507303
	<i>TP53</i>	17:7579378	Patogênica	c.309C>A	p.Y103*	.
	<i>IGF1R</i>	15:99500588	VUS	c.4021G>A	p.Asp1341Asn	rs150801101
	<i>MLH3</i>	14:75513142	VUS_S	c.3217G>A	p.Asp1073Asn	rs28756993
	<i>ERBB2</i>	17:37864584	VUS	c.236A>C	p.Glu79Ala	rs61737968
	<i>ERBB2</i>	17:37881575	VUS	c.2650-5C>G	-	rs150056709

Cont/ Quadro 8

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM12	<i>TGFA</i>	2:70683511	VUS	c.343G>A	p.Val115Met	rs11466259
	<i>PMS2</i>	7:6018315	Patogênica	c.2186_2187delTC	p.Leu729Glnfs	rs587779335, rs63751666
	<i>FGFR2</i>	10:123239406	Patogênica	p.Gln812Ter	-	.
	<i>TP53</i>	17:7578190	Patogênica	c.380A>G,c.659A>G	p.Y127C, p.Y220C	rs121912666
	<i>PMS2</i>	7:6018320	VUS_S	c.2182A>G	p.Thr728Ala	rs141893001
	<i>ABCG2</i>	4:89020553	VUS	c.1415G>T	p.Gly472Val	.
	<i>FGFR2</i>	10:123239538	VUS	c.2305-3C>T	-	.
CIM13	<i>RAD51D</i>	17:33428224	VUS	c.899G>A	p.Arg300Gln	rs761290755
	<i>MYC</i>	8:128752745	VUS	c.906C>A	p.His302Gln	rs139697494
	<i>APC</i>	5:112174677	VUS_S	c.3386T>C	p.Leu1129Ser	rs143638171
	<i>ATM</i>	11:108119823	VUS_S	c.1229T>C	p.Val410Ala	rs56128736
	<i>BRCA2</i>	13:32921014	VUS	c.6988A>G	p.Ile2330Val	rs876661032
	<i>TP53</i>	17:7577569	Patogênica	c.712T>G	p.Cys238Gly	.
CIM14	<i>RB1</i>	13:48954189	VUS	c.1390_1392delGAA	p.Glu466del	.
	<i>EGF</i>	4:110885699	VUS	c.1575+6G>T	-	rs148355596
	<i>BRCA2</i>	13:32953568	Patogênica	c.8869C>T	p.Gln2957Ter	rs276174913
	<i>TP53</i>	17:7578263	Patogênica	c.190C>T,c.307C>T,c.586C>T	p.R64*,p.R103*,p.R196*	rs397516435
CIM15	<i>NOTCH1</i>	9:139418204	VUS	c.368C>T	p.Thr123Met	rs187473846
	<i>MTOR</i>	1:11190677	VUS	c.5502_5522del	p.Ala1836_Ala1842del	.
	<i>MSH3</i>	5:80024783	VUS	c.1567G>A	3;p.Glu523Lys	rs34058399
	<i>MSH3</i>	5:80037285	VUS	c.1571A>C	p.Asn524Thr	rs55724159
	<i>RB1</i>	13:48923159	Patogênica	c.607delG	p.Glu204Lysfs	.
	<i>MLH3</i>	14:75513142	VUS_S	c.3217G>A	p.Asp1073Asn	rs28756993
	<i>PALB2</i>	16:23652436	Patogênica	c.43G>T	p.Glu15Ter	rs730881884
<i>HSPH1</i>	13:31722171	VUS	c.1309C>G	p.Leu437Val	rs181708109	

Cont/ Quadro 8

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM16	<i>CTNNB1</i>	3:41266853	VUS	c.524T>C	p.Val175Ala	.
	<i>MSH3</i>	5:80083379	VUS	c.2436-5C>G	p.Ile88Val	.
	<i>RET</i>	10:43596095	VUS	p.Ile88Val	p.Gly3076Val	rs141679950
	<i>FBXW7</i>	4:153249441	Patogênica	c.620G>A,c.983G>A, c.1097G>A,c.1337G>A	p.W207*, p.W328*, p.W366*,p.W446	.
	<i>BRCA2</i>	13:32954261	Patogênica	c.9235G>A	p.Val3079Ile	rs55933907
	<i>TP53</i>	17:7577082	Patogênica	c.856G>A	p.E286K	rs786201059
	<i>ABCC1</i>	16:16101809	VUS	c.185G>A	p.Ile176Thr	rs187769078
	<i>ABCC1</i>	16:16200683	VUS	c.2824G>C	p.Arg62Gln	.
CIM18	<i>AURKA</i>	20:54961483	VUS	c.149C>T	p.Pro50Leu	rs34572020
	<i>BRCA2</i>	13:32954253	VUS	c.9227G>T	p.Gly3076Val	rs80359187
	<i>PIK3CA</i>	3:178952085	Patogênica	c.3140A>T	p.H1047L	rs121913279
	<i>TP53</i>	17:7578222	Patogênica	c.230_231delGA, c.347_348delGA, c.626_627delGA	p.R77fs*6, p.R116fs*6, p.R209fs*6	frameshift
	<i>ATM</i>	11:108175463	VUS_S	c.5558A>T	p.Asp1853Val	rs1801673
CIM20	<i>NTHL1</i>	16:2094653	VUS	c.527T>C	p.Ile176Thr	rs1805378
	<i>MLH3</i>	14:75513721	VUS	c.2638C>G	p.Leu880Val	rs201453923
	<i>PIK3CA</i>	3:178921553	Patogênica	c.3140A>G	p.H1047R	rs121913284
	<i>KRAS</i>	12:25398284	Patogênica	c.35G>T	p.G12V	rs121913529
	<i>TP53</i>	17:7578271	Patogênica	c.182A>T, c.299A>T, c.578A>T	p.H61L, p.H100L, p.H193L	rs786201838
	<i>TP53</i>	17:7578291	Patogênica	c.164-2A>C, c.281-2A>C,c.560-2A>C	p.?	.
	<i>NF1</i>	17:29550489	Patogênica	c.1749delG	p.Lys584Asnfs	.
	<i>BRCA1</i>	17:41243690	Patogênica	c.3858delT	p.Ser1286Argfs	.
	<i>GNA11</i>	19:3115048	VUS	c.583G>A	p.Asp195Asn	rs769982397

Cont/ Quadro 8

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM22	<i>IDH1</i>	2:209101898	VUS	c.1155-5G>A	-	rs201787135
	<i>ABCG2</i>	4:89053790	VUS	c.204-3C>T	-	rs34124189
	<i>PMS2</i>	7:6017314	VUS	c.2383G>A	p.Asp795Asn	rs143340522
	<i>APC</i>	5:112175240	Patogênica	c.3949G>C	p.E1317Q	rs1801166
	<i>TP53</i>	17:7577550	Patogênica	c.452G>A,c.731G>A	p.G151D,p.G244D	.
	<i>BRCA1</i>	17:41245090	VUS_S	c.2458A>G	p.Lys820Glu	rs56082113
	<i>PIK3CA</i>	3:178952085	Patogênica	c.3140A>G	p.H1047R	rs121913279
	<i>MUS81</i>	11:65629482	VUS	c.416G>A	p.Arg139Gln	rs148465534
	<i>HSPH1</i>	13:31712572	VUS	c.2348G>A	p.Arg783His	rs73171026
	<i>STAT3</i>	17:40489879	VUS	c.551-4G>A	-	rs80162032
CIM24	<i>MSH6</i>	2:48026528	VUS	c.1406A>G	p.Tyr469Cys	rs748165218
	<i>APC</i>	5:112175651	VUS_S	c.4360A>G	p.Lys1454Glu	rs111866410
	<i>TP53</i>	17:7577094	Patogênica	c.844C>T	p.R282W	rs28934574
	<i>MET</i>	7:116436105	VUS	c.4154C>G	p.Ser1385Cys	rs747239403
CIM25	<i>KDM4C</i>	9:7011719	VUS	c.1808T>C	p.Ile603Thr	rs34369202
CIM26	<i>RET</i>	10:43613908	Patogênica	c.2372A>T	p.Y791F	rs77724903
	<i>AKT1</i>	14:105246551	Patogênica	c.49G>A	p.E17K	rs121434592
	<i>TP53</i>	17:7578388	Patogênica	c.146G>A, c.263G>A, c.542G>A	p.R49H, p.R88H, p.R181H	rs397514495

VUS (variantes de significado incerto classificadas pelo ACMG mapeadas em regiões codificantes); VUS_S (variantes de significado incerto (classificadas pelo COSMIC, CIVIC ou ICGC).

Variantes patogênicas (patogênicas, potencialmente patogênicas e variantes de significado incerto levando a perda de função proteica); VUS (variantes de significado incerto classificadas pelo ACMG mapeadas em regiões codificantes); VUS_S (variantes de significado incerto (classificadas pelo COSMIC, CIVIC ou ICGC). Cr:Pos: cromossomo: posição.

No segundo grupo foram identificadas 64 variantes de significado incerto pelo ACMG, do qual foram excluídas as variantes nas regiões 3' ou 5' UTR assim como as variantes sinônimas (Quadro 8). Essas variantes ocorrem em regiões exônicas do tipo *missense* ou em sítios de *splicing* e que diferem das variantes VUS_P do primeiro grupo, pois não apresentam perda de função proteica, segundo os preditores *in silico*.

O terceiro grupo, nomeado VUS_S é composto por 62 variantes que não foram classificadas como variantes pelo ACMG ou outra classificação, porém foram detectadas pelo COSMIC, CIVIC ou ICGC ou o número de *reads* sustentam essa variante. Apenas 10 variantes dentre as 62 eram *missense* e não-sinônimas, as quais foram consideradas neste estudo (Quadro 8).

Treze dos 105 genes investigados pertencem a via de recombinação homóloga (HR), são eles: *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *MUS81*, *PALB2*, *POLD1*, *RAD50*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*. No Quadro 9, são apresentados os 16 casos que apresentaram variantes nos genes da via HR. Mutações patogênicas no gene *BRCA2* foram as mais comuns (7 casos).

Quadro 9 - Variantes detectadas nos genes da via de HR nos CIM.

Casos	Gene	Cr:Pos	Tipo de Alteração	cDNA	Proteína	dbSNPs
CIM04	<i>ATM</i>	11:108155094	VUS	c.3887C>G	p.Pro1296Arg	.
CIM05	<i>BRCA2</i>	13:32913456	Patogênica	c.4963_4964insA	p.Tyr1655Ter	rs398122789
CIM07	<i>BRCA2</i>	13:32911298	Patogênica	c.2808_2811delACAA	-	rs80359351, rs80359352
CIM09	<i>RAD51B</i>	14:68353893	VUS	c.728A>G	p.Lys243Arg	rs34594234
	<i>POLD1</i>	19:50906394	VUS	c.1055G>A	p.Arg352His	rs556862476
	<i>BRCA2</i>	13:32914174	Patogênica	c.5682C>G	p.Tyr1894Ter	rs41293497
CIM10	<i>BRCA2</i>	13:32890599	Patogênica	c.2T>G	p.Met1?	rs80358547
CIM11	<i>RAD51B</i>	14:68301921	VUS	c.315+8A>G	c.315+8A>G	rs181714884
	<i>BRCA2</i>	13:32893463	Patogênica	c.316+1G>T	-	rs397507303
CIM12	<i>RAD51D</i>	17:33428224	VUS	c.899G>A	p.Arg300Gln	rs761290755
CIM13	<i>ATM</i>	11:108119823	VUS_S	c.1229T>C	p.Val410Ala	rs56128736
	<i>BRCA2</i>	13:32921014	VUS	c.6988A>G	p.Ile2330Val	rs876661032
CIM14	<i>BRCA2</i>	13:32953568	Patogênica	c.8869C>T	p.Gln2957Ter	rs276174913
CIM15	<i>PALB2</i>	16:23652436	Patogênica	c.43G>T	p.Glu15Ter	rs730881884
CIM16	<i>BRCA2</i>	13:32954261	Patogênica	c.9235G>A	p.Val3079Ile	rs55933907
CIM18	<i>BRCA2</i>	13:32954253	VUS	c.9227G>T	p.Gly3076Val	rs80359187
CIM20	<i>BRCA1</i>	17:41243690	Patogênica	c.3858delT	p.Ser1286Argfs	.
CIM22	<i>MUS81</i>	11:65629482	VUS	c.416G>A	p.Arg139Gln	rs148465534
CIM24	<i>BRCA1</i>	17:41258459	VUS_S	c.212+14T>G	-	rs111866410

4.7 PONTUAÇÃO DOS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA (HRD)

Os escores medianos de deficiência da via HR entre as amostras de CIM para LST, tAI, e HRD-LOH foram 20,5 23 e 2,5 respectivamente e estão representados na figura 13.

Os valores de tAI variaram de 0 a 46, com 2 sendo o valor máximo por cromossomo. O valor mediano de tAI das amostras deste estudo foi utilizado como *cut off* (23,0). Valores acima da mediana são considerados

altos. Foram identificados 11 CIM com valores superiores a mediana e todos eles também apresentaram mutações em genes envolvidos na via HR. Foi também verificado que quatro casos com mutações em genes da via HR apresentaram valores inferiores a mediana de tAI, incluindo os casos CIM04 (tAI=21, mutação em *ATM*), CIM07 (tAI=20, mutação em *BRCA2*), CIM14 (tAI=15, mutação em *BRCA2*) e CIM24 (tAI=16, mutação em *BRCA1*) (Figura 13).

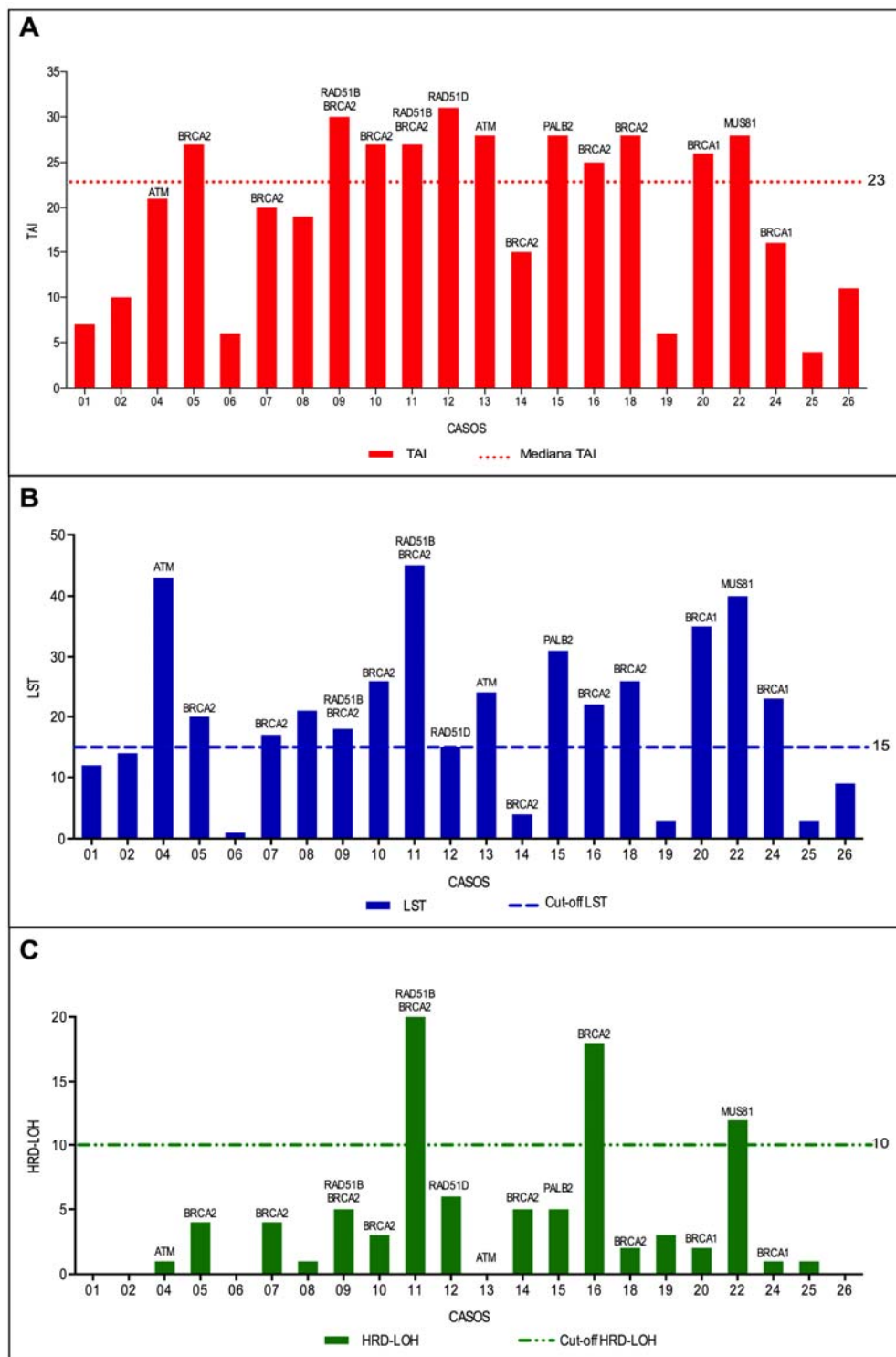


Figura 13 - Valores dos três escores usados para investigar a deficiência da via de recombinação homóloga nos CIM analisados neste estudo. **A.** escore tAI (mediana=23). **B.** escore LST (cut-off=15). **C.** escore HRD-LOH (cut-off=10). Os genes envolvidos na via de HR que foram encontrados mutados estão representados acima de seus respectivos casos.

Os valores de *cut off*, estabelecidos em literatura para LST foram >15 para tumores diplóides e >20 para tumores poliplóides. Segundo esses limiares 15 casos apresentaram valores acima do cut-off e 14 deles apresentaram mutação em genes da via de recombinação homóloga. Cinco casos (CIM01, CIM02, CIM06, CIM25 e CIM26) apresentaram baixos valores de LST e não apresentaram mutações nos genes da via de HR.

O escore HRD-LOH foi também avaliado nas amostras de CIM usando como *cut off* o valor de 10, proposto por TELLI et al. (2012). Nesse estudo clínico, os autores avaliaram tumores de mama triplo negativos e câncer de mama associado com mutações em *BRCA1/2*. Utilizando o *cut off* de 10, três CIM do nosso estudo apresentaram altos escores de HRD-LOH casos: CIM11 (HRD-LOH=20 e mutação em *BRCA2* e *RAD51B*), CIM16 (HRD-LOH=18 e mutação em *BRCA2*) e CIM22 (HRD-LOH=12 e mutação em *MUS81*). Onze dos 15 casos com mutação em genes da via HR estavam acima do valor da mediana dos nossos casos (*cut off* de 2,5).

Foi realizada a comparação entre os valores dos escores dos casos que apresentaram mutação nos genes da via HR, sequenciados neste estudo, *versus* os casos sem mutação (Figura 14). Para os três escores, as comparações entre os grupos apresentaram diferença significativa com $p < 0,005$.

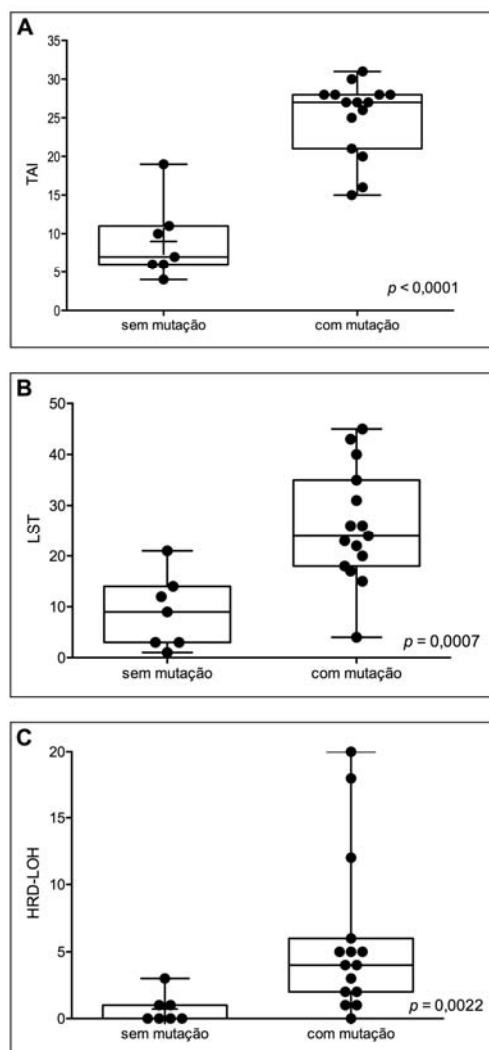


Figura 14 - Comparação entre os grupos de casos com e sem mutação em genes da via de HR. Em A, a comparação do escore tAI com valor de $p < 0,0001$. Em B, a comparação do escore LST com valor de $p = 0,0007$. Em C, a comparação do escore HRD-LOH com valor de $p = 0,0022$.

Em uma análise comparando todos os valores dos escores obtidos para cada caso (Figura 15), verificou-se que os CIM com mutação em genes da via HR apresentam pelo menos um valor alto dos escores avaliados, exceto o caso CIM14 que apresentou valores de tAI, LST e HRD-LOH de 15, 5 e 4 respectivamente. Os casos CIM04 (mutação em *ATM*; LST=43) e

CIM07 (*BRCA2*; LST=17) e CIM24 (sem mutação para os genes testados; LST=23) apresentaram apenas valor alterado de LST. Os casos CIM05 (*BRCA2* – tAI=27 e LST=20), CIM09 (*BRCA2* e *RAD51B* – tAI=30 e LST=18), CIM10 (*BRCA2* – tAI=27 e LST=26), CIM12 (*RAD51D* – tAI=31 e LST=15), CIM13 (*ATM* – tAI=28 e LST=24), CIM 15 (*PALB2* – tAI=28 e LST=31), CIM18 (*BRCA2* – tAI=28 e LST=26), CIM20 (*BRCA1* – tAI=26 e LST=35) apresentaram valores altos para tAI e LST. Os casos CIM11 (*BRCA2* e *RAD51B* – tAI=27 e LST=45; HRD-LOH=20), CIM16 (*BRCA2* – tAI=25, LST=22 e HRD-LOH=18) e CIM22 (*MUS81* – tAI=28, LST=40 e HRD-LOH=12), apresentam os três escores alterados.

Os casos CIM08 e CIM24 apresentaram altos valores do escore LST, porém não foram encontradas mutações nos genes sequenciados. O CIM19 também apresentou valor de escore de LST acima do *cut-off*, mas este caso não foi sequenciado por não passar nos parâmetros de qualidade do sequenciamento.

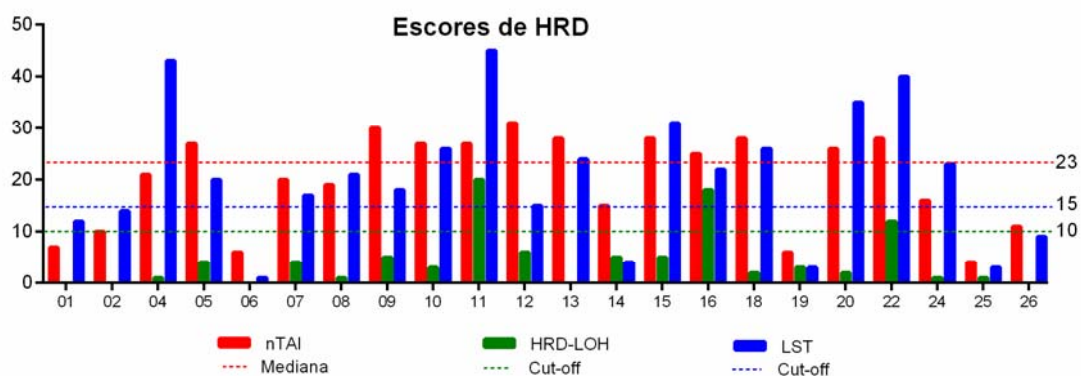


Figura 15 - Valores de escore tAI, LST e HRD-LOH calculados para os carcinomas inflamatórios. Os valores de cut-off para cada um dos escores também está representados.

Os casos que apresentaram pelo menos um valor de escore alto foram comparados (curva de Kaplan-Maier) com o grupo de casos que não apresentaram nenhum valor acima dos *cut-offs*. As curvas de sobrevida global mostraram diferença significativa quanto ao escore HRD, indicando que além dos escores apresentarem valor preditivo, também podem ter valor prognóstico (Figura 16).

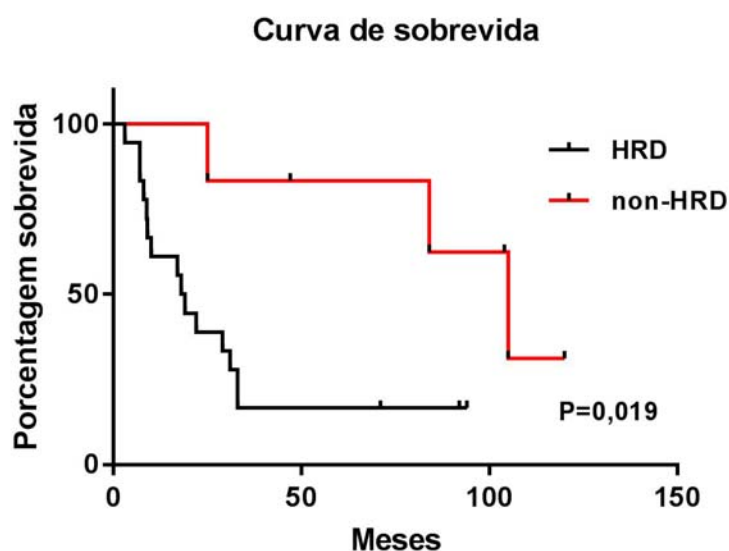


Figura 16- Curva de Kaplan-Maier para sobrevida global em meses. As amostras que apresentaram pelo menos um escore acima do cut-off foram comparadas com aqueles que não apresentaram essa característica. Foi observada diferença significativa nas curvas de sobrevida para estes dois grupos de casos ($p=0.019$).

Os índices de instabilidade genômica (GII) foram calculados para os 24 CIM e apresentaram uma mediana de 0,363. MARQUARD et al. (2015), em uma análise para todos os tumores de mama encontraram uma mediana de 0,435 (Figura 17).

Catorze casos (CIM04, CIM07, CIM08, CIM09, CIM10, CIM11, CIM12, CIM14, CIM15, CIM16, CIM18, CIM20, CIM22 e CIM24) apresentaram valores acima da mediana. Entretanto, casos com mutação em genes da via HR como CIM05 e CIM13 não apresentaram valores de GII acima da mediana. Foi observada uma correlação moderada entre o GII e nTAI, LST e HRD-LOH, com valores de $r=0,61$ ($p=0,0027$), $r=0,62$ ($p=0,002$) e $r=0,65$ ($p=0,0011$), respectivamente.

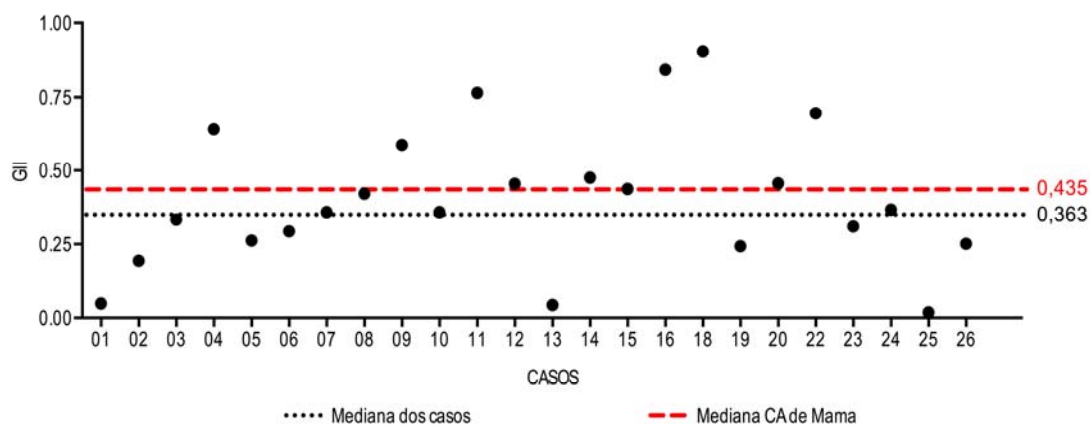


Figura 17 - Índice de Instabilidade genômica (GII) para os casos de carcinomas inflamatórios deste estudo. A mediana para os casos de canceres de mama (GII= 0,435) e para os casos deste estudo (GII=0,363) estão também indicados.

Os valores dos escore de tAI, HRD-LOH, LST e GII estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de escore pra nTAI, LST, HRD-LOH e GII obtidos nos carcinomas inflamatórios deste estudo.

Caso CIM	tAI	LST	HRD-LOH	GII
01	7	12	0	0,048
02	10	14	0	0,193
03	16	9	8	0,334
04	21	43	1	0,640
05	27	20	4	0,262
06	6	1	0	0,293
07	20	17	4	0,359
08	19	21	1	0,422
09	30	18	5	0,586
10	27	26	3	0,359
11	27	45	20	0,765
12	31	15	6	0,454
13	28	24	0	0,043
14	15	4	5	0,475
15	28	31	5	0,437
16	25	22	18	0,842
18	28	26	2	0,904
19	6	4	1	0,243
20	26	35	2	0,456
22	28	40	12	0,695
23	14	7	0	0,310
24	16	23	1	0,367
25	4	3	1	0,018
26	11	9	0	0,252

5 DISCUSSÃO

Os pacientes com carcinomas inflamatórios de mama apresentam prognóstico muito desfavorável e, desvendar os mecanismos moleculares que estão relacionados com esta agressividade, torna-se imperioso para o manejo dos pacientes acometidos.

Os CIM, semelhante aos demais carcinomas de mama, também tem seu perfil imunoistoquímico baseado na expressão do ER, PR e HER2 como parte do procedimento de rotina clínica. A presente casuística apresentou uma maior proporção de casos ER e/ou PR positivos e HER2 negativos (58,4%). Recentemente, numa análise de aproximadamente 600 casos de CIM do *National Cancer Database-NCI* (2017), LIU et al. (2017) relataram que aproximadamente 39% dos casos são ER e/ou PR positivos e HER2 negativos. Os tumores ER e/ou PR positivos e HER2 positivos compreenderam 16,5% das ocorrências. Este perfil não foi observado em nossa casuística. Já os tumores com ER e PR negativos e HER2 positivos, compreenderam 18,9% dos tumores do estudo de LIU et al. (2017) e 12,5% dos nossos casos. Carcinomas inflamatórios triplo negativos foram relatados em 25,6% dos casos do estudo de LIU et al. (2017) e 29,1% dos nossos casos, uma proporção semelhante. Em relação a proporção dos fenótipos analisados por imunoistoquímica, nossos casos apresentam proporções àquelas descritas pelos autores.

Neste mesmo estudo, LIU et al. (2017) relataram que os CIM

possuem prognóstico desfavorável independente do subtipo molecular. Os CIM triplo-negativos são mais frequentes quando comparados aos tumores triplo negativos não-CIM e apresentaram pior sobrevida quando comparados com os subtipos com positividade para HER2, independente da expressão dos receptores hormonais. Os autores atribuem essas diferenças ao desenvolvimento da terapia anti-HER2, bem como ao tratamento neoadjuvante e adjuvante mais efetivo para as pacientes triplo-negativos (LIU et al. 2017).

Em nossa casuística, entre os três casos positivos para HER2, um está vivo sem a doença (seguimento de 92 meses) e entre os seis casos vivos no seguimento, apenas um era HER2 positivo. DAWOOD e CRISTOFANILLI (2015) relataram a ausência de diferença significativa na sobrevida livre de recorrência em pacientes não tratadas com Trastuzumabe CIM HER2 positivos em comparação com os tumores CIM HER2 negativos.

Os estudos epidemiológicos apontam que a positividade dos receptores hormonais nos CIM não está associada com prognóstico favorável (LI et al. 2011; MASUDA et al. 2014; LIU et al. 2016). Porém, os estudos divergem quanto ao prognóstico nos casos triplo-negativos, como nos estudos de LI et al. (2011) e MASUDA et al. (2014). Em nossa casuística, todos os sete casos triplo negativos foram a óbito pela doença e apresentaram sobrevida baixa (média de 12,9 meses).

Em relação ao Índice de massa corpórea (IMC), 14 casos apresentaram valores maiores que 25kg/m^2 , compreendendo 58,4% dos casos. Chang et al (1998) foram os primeiros a relatar altos IMCs em

pacientes com IBC, independentemente do estado pós-menopausico. Esta associação também foi observada no estudo de Fouad et al. (2018), que encontraram valores de IMC variando de acordo com a etnia e não em relação ao status menopausal. Neste estudo, 83% dos negros americanos apresentavam obesidade classe III (IMC > 40kg/m²). Alguns estudos recentemente reportaram uma importante relação entre obesidade e câncer de mama, principalmente devido a excessiva aromatização que ocorre no tecido adiposo, aumentando assim, os níveis de estrogênios (Engin, 2017; Picon-Ruiz et al, 2017). Outras hipóteses seriam o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina, hiperativação de fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs), adipócito-adipocinas, hipercolesterolemia e estresse oxidativo excessivo (Engin, 2017).

Na análise de alterações no número de cópias genômicas, a amplificação do gene *ERBB2* (considerado como amplificado os casos com *copy number state* > 5) foi detectada nos casos CIM08, CIM12 e CIM14. Entretanto, os resultados de expressão proteica por imunistoquímica para o HER2 nos casos estava aumentada (3+) nos casos CIM08, CIM 12 e CIM25. Uma possível explicação para o caso CIM14 possuir amplificação gênica e não expressar altos níveis da proteína HER2, poderia ser a presença de algum evento de silenciamento gênico por modificações epigenéticas, por alterações no mecanismo pós-transcricional e ou no processamento proteico. Alternativamente, diferentes áreas do tumor podem ter sido analisadas pelos dois procedimentos e o resultado obtido pode ser consequência de heterogeneidade tumoral. O caso CIM25 embora não

tenha apresentado amplificação de *ERBB2* pelo critério utilizado, foram detectados ganhos de quatro cópias do gene. Valores superiores a três cópias do *ERBB2* são utilizados para categorizar a amplificação pelo método de FISH na prática clínica (BARTLLET et al. 2001).

Um total de 66,7% dos pacientes avaliados no presente estudo apresentava história familiar de câncer positiva, sendo os cânceres de mama e ovário os mais frequentes (56,3%). Outros sítios foram relatados pelas pacientes, como sistema nervoso central, intestino, próstata, estômago e leucemias. Considerando apenas o câncer de mama, 37,5% tinham história familiar deste tipo tumoral. Dados em literatura estimam que entre os CIM, aproximadamente 20% das pacientes tem história familiar positiva de câncer de mama (AZIZ et al. 2001; MOSLEHI et al. 2016). Em nosso estudo, não foram avaliadas as mutações germinativas destas pacientes.

Como os CIM são tumores muito agressivos, a frequência de metástase é alta. Estima-se que aproximadamente 30% dos CIM apresentam metástase à distância ao diagnóstico (VAN UDEN et al. 2015). Em nosso estudo, 70,8% das pacientes tiveram metástases, dos quais 64,7% foram ao diagnóstico e 35,3% ao *follow-up*, sendo a metástase óssea a mais frequente. O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos de inflamação (vermelhidão, edema, "peau d'orange) (DAWOOD et al. 2011). Assim, a subjetividade dos sintomas e o ocasional diagnóstico baseado exclusivamente no critério patológico podem ser os fatores que muitas vezes levam ao diagnóstico tardio e conseqüente progressão da doença.

Para o nosso conhecimento, não existem estudos epidemiológicos dos CIM na população brasileira, portanto não podemos afirmar que a presente casuística reflita as características clínicas e histopatológicas da nossa população. Estudos epidemiológicos, com um maior número de casos e utilizando análises mais robustas devem ser delineados para caracterizar adequadamente estes tumores.

No presente estudo foi utilizada a plataforma *CytoScan* HD (*Affymetrix*) para caracterizar o perfil de alterações genômicas além de quantificar a instabilidade genômica dos carcinomas inflamatórios de mama. Os mecanismos que conduzem a formação das CNAs incluem as vias de recombinação homóloga e não homóloga de reparo a danos no DNA (HASTINGS et al. 2009). Alterações nessas vias de reparo podem levar a uma alta instabilidade genômica, característica de alguns carcinomas incluindo o mamário, com a ocorrência de alterações no número de cópias e regiões de perda de heterozigose. A instabilidade genômica está, portanto, relacionada com fatores intrínsecos, como defeitos herdados ou adquiridos no sistema de reparo, na replicação do DNA, no controle do ciclo celular e na segregação dos cromossomos, assim como nos fatores extrínsecos, como agentes químicos ambientais, nanopartículas, radiação ou agentes biológicos (LANGIE et al. 2015).

As CNAs têm sido estudadas como importantes eventos genômicos envolvidos na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer e relatadas na maioria dos tipos tumorais. Diversas análises revelaram que os padrões de CNAs diferem dependendo do tipo de câncer e, embora tais

padrões gerais tenham sido observados frequentemente em um tipo tumoral, os genes alterados podem variar inclusive entre os pacientes com o mesmo câncer (PIOTROWSKI et al. 2008). Este efeito pode ser atribuído ao fato de que as vias relacionadas a um tipo tumoral específico podem estar alteradas por diferentes combinações de genes para cada paciente ou ainda pela ocorrência de alterações aleatórias que ocorrem concomitantemente às alterações de genes *drivers* (SANTARPIA et al. 2016).

No presente estudo, foram avaliadas 24 amostras de CIM para investigar a presença de CNAs as quais são automaticamente validadas pelos SNPs presentes na mesma plataforma. Foi identificado um número maior de regiões em ganhos (N=1267) em relação às perdas (N=704). As regiões genômicas mais frequentemente observadas em nosso estudo também foram reportadas por WOODWARD et al. (2013). Nesse estudo, os autores analisaram 20 CIM *versus* 20 não-CIM e cinco e encontraram ganhos em 1q e 8q em praticamente todos os tumores inflamatórios. Alterações envolvendo estas duas regiões foram também as mais frequentemente detectadas em nosso estudo (> 70% dos casos, Quadro 2).

Até a presente data e para o nosso conhecimento, os diferentes perfis genômicos dos CIM foram analisados utilizando métodos de baixa resolução (AHOMADEGBE et al. 2000; LEREBOURS et al. 2002, 2003) e apenas um estudo utilizou uma plataforma mais robusta (Agilent 244K) (BEKHOUCHE et al. 2011). Estes achados demonstram a dificuldade em realizar uma análise comparativa eficaz entre as alterações aqui relatadas com os dados da literatura. Entretanto, ganhos em 1q, 8q e 17q foram descritos como

frequentes sendo 8q12.1-8q24 a região de ganho mais freqüente (acima de 40%) (LEREBOURS et al. 2002, 2003). Em nosso estudo, ganhos em 1q32.1, 8q21.3-8q24 e perdas em 17p13.1-p13.3 foram observadas em mais de 70% dos casos.

Os estudos publicados em literatura sobre alterações genômicas nos CIM, apontam para as regiões mapeadas 1q, 8q e 17q como as mais frequentes. Em nosso estudo, como relatado acima ganhos em 1q e 8q foram observados em 70% dos casos, especificamente ganhos em 8q24.13 e 8q24.21 foram observados em 83% dos casos. Estas regiões, que abrigam os genes *SQLE*, *NSMCE2*, *KIAA0196*, *ZNF57* e *FAM84B*, não foram encontradas alteradas em um grande número de tumores de mama invasivos do TCGA, e podem, portanto, ser alterações específicas dos CIM. O fato do TCGA não distinguir a categoria de carcinomas inflamatórios também limita comparações.

As alterações em 8q foram relatadas no estudo de BEKHOUCHE et al.(2011). Em uma análise com 63 CIM, os autores descreveram ganhos frequentes envolvendo, principalmente 1q, 8q e 17q, sendo que 8q12.1-24.3 foi a mais frequentemente amplificada (40% dos casos). Em um outro estudo subsequente, os autores relataram que ganhos em 8q24 estavam associados com maior risco de metástase em CIM (BERTUCCI et al. 2014). Os autores atribuíram esse risco ao oncogene *MYC* mapeado nessa região. Em uma análise avaliando 53 CIM por sequenciamento de alto desempenho em um painel de genes, ROSS et al. (2015) relataram que 32% dos casos apresentavam ampliações do gene *MYC*. Amplificações de *MYC* têm sido

relatadas em 15-22% dos carcinomas mamários e associadas com os fenótipos mais agressivos, idade jovem e com pior prognóstico (CHEN e OLOPADE 2008; COLAK et al. 2013; PEREIRA et al. 2013). Porém, em nossos estudos, apesar da região onde está mapeado o oncogene *MYC*, estar envolvida em ganhos em 70% dos casos, apenas dois deles apresentaram amplificação do oncogene *MYC* (CIM11 e CIM16), o que obviamente não permite descartar essa alteração como de relevância para os CIM. Em conjunto estes dados sugerem que ganhos em 8q24.13 e 8q24.21 podem conter genes associados às características clínicas como agressividade tumoral e diagnóstico desfavorável dos CIM. Além do oncogene *MYC*, outros genes mapeados nessas regiões já foram relatados como envolvidos no processo tumoral, porém não em carcinomas inflamatórios.

Como descrito acima, os ganhos em 8q24.13 e 8q24.21 (onde se mapeiam os genes *SQLE*, *NSMCE2*, *KIAA0196*, *ZNF57* e *FAM84B*) foram muito frequentes em nosso estudo (83% dos casos). Alterações no número de cópias e expressão aumentada do gene *SQLE* foram relatadas em hepatocarcinomas e carcinomas de próstata (SUI et al. 2015; STOPSACK et al. 2016). A expressão aumentada deste gene foi descrita como um fator de prognóstico desfavorável em tumores de mama positivos para os receptores de estrógeno e em tumores do subtipo luminal A em afro-descendentes (D'ARCY et al. 2015). Nestes tumores foi detectada expressão aumentada de *SQLE*, além de alterações do padrão de metilação (CHIN et al. 2007; HELMS et al. 2008). Em um estudo mais recente, BROWN et al. (2016)

relataram correlação entre ganhos no número de cópias e o aumento da expressão do gene *SQLÉ* em diversos tumores. Os tumores de mama apresentaram a maior correlação, seguidos pelo carcinoma de ovário e colorretal. A expressão aumentada do gene *SQLÉ* foi mais prevalente nos tumores de mama mais agressivos, considerado como um fator independente de prognóstico desfavorável. Estudos funcionais foram realizados em linhagens de tumores mamários com o silenciamento gênico, resultando em redução da viabilidade celular e um aumento notável no tempo de replicação. Os autores sugeriram que o gene *SQLÉ* atua como um oncogene, estando relacionado com os tumores de mama mais agressivos (BROWN et al. 2016). Segundo PARRIS et al. (2014) as alterações envolvendo o gene *SQLÉ* são subestimadas pela proximidade deste gene com o oncogene *MYC*, o qual encontra-se amplificado em diversos tumores mamários.

O gene *FAM84B*, também mapeado nesta região, foi associado à tumorigênese e progressão em tumores de próstata (WONG et al. 2017). O silenciamento deste gene *in vitro* em células de carcinoma epidermóide de esôfago promoveu redução do crescimento celular, migração e invasão (CHENG et al. 2016). O gene *NSMCE2* atua na manutenção do genoma, facilitando a segregação dos cromossomos e suprimindo a recombinação mitótica. Em um recente estudo na população brasileira, FELICIO et al. (2018) relataram o aumento do número de cópias desse gene em tumores de mama e ovário de pacientes sem mutação em *BRCA1/2*, com história sugestiva de câncer familiar de mama e ovário.

Os demais genes mapeados em 8q com alta frequência de CNV em nosso estudo, *KIAA0196* e *ZNF572*, são pouco explorados em literatura. Amplificações do gene *KIAA0196* foram associadas a prognóstico desfavorável (JALAVA et al. 2009) em câncer de próstata. Para o nosso conhecimento, o gene *ZNF572* não foi descrito como relacionado ao processo tumoral.

Outras alterações, além daquelas envolvendo ganhos de regiões do cromossomo 8, foram observadas numa frequência igual ou superior a 70% (Quadro 2). Além dos ganhos envolvendo o gene *MDM4* mapeado em 1q32.1, o qual foi descrito como envolvido em ganhos e aumento de expressão em carcinomas de endométrio (DEPREUW et al. 2017), outros genes desta região foram relacionados em diversos tipos de tumores. Um deles, o gene *LGR6*, foi relatado em células progenitoras da mama com potencial para originar tumores (BLAAS et al. 2016). O gene *UBT* apresentou aumento de expressão em tumores de próstata (WEN et al. 2015). O gene *KIF14* foi associado com resistência a quimioterapia em tumores triplo-negativos (SINGEL et al. 2014) e relacionado com a baixa sobrevida, prognóstico desfavorável e a ausência de resposta ao tratamento, características dos tumores inflamatórios. Entre os nossos casos, ganhos envolvendo esta região foram observados em pacientes que apresentaram sobrevida média de 2 anos.

O gene *NR5A2*, também mapeado em 1q32.1, foi encontrado amplificado em três CIM. Previamente, alterações no gene *NR5A2* foram associadas a um prognóstico desfavorável em tumores de mama ER

negativos (CHANG et al. 2015). Em nossos casos, a região 1q32.1 foi associada com características de pior prognóstico, independente do padrão do receptor de estrógeno.

Alguns genes envolvidos na produção de citocinas estão localizados na região 1q32.1 e já foram descritos como alterados em câncer de mama (ZHENG et al. 2007; CHEN et al. 2013; KOROBENIKOVA et al. 2015). A IL-10 é uma citocina que pode suprimir a apresentação de antígenos, suprimir a produção de outras citocinas importantes na imunovigilância e facilitar o escape tumoral (PAUL et al. 2010), contribuindo com a agressividade tumoral.

A IL-19 e a IL-20 são citocinas da família da IL-10 e foram descritas como envolvidas em tumores de mama. Em células tumorais da mama, a expressão dessas citocinas foi associada ao aumento de figuras mitóticas, estadios mais avançados, alta taxa metastática e baixa sobrevida (HSING et al. 2012; HSU et al. 2012).

Na análise de genes amplificados compartilhadas em no mínimo três casos (Quadro 2), nove regiões contendo amplicons ou genes específicos estavam mapeadas em 1q, sendo a maioria em 1q32.1. Outras seis regiões amplificadas foram identificadas em 8q e duas em 17q. A análise de enriquecimento destes genes envolvidos em amplificações resultou na identificação de várias vias, sendo uma delas a de resposta humoral, incluindo os genes *CD46*, *CD55* e *CR1*.

A proteína codificada pelo gene *CD46* promove a inativação das enzimas do sistema complemento C3b e C4b por meio do fator sérico I,

protegendo as células do hospedeiro contra a degradação do sistema complemento. O aumento da expressão das proteínas que inibem o sistema complemento, pode constituir para o mecanismo de escape tumoral, protegendo as células tumorais da citotoxicidade mediada pelo sistema complemento (MACIEJCZYK et al. 2011; KESSELRING et al. 2014). O aumento de expressão de CD46 e outras proteínas inibidoras do sistema complemento, como CD55 e CD59, já foram reportadas em diversos tipos tumorais. Em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, KESSELRING et al. (2014) relataram que o aumento de expressão de CD46, CD55 e CD59 ocorre desde o início do tumor e que o microambiente tumoral pode interferir no nível da expressão destas proteínas. Em câncer de cólon, a expressão aumentada destas proteínas foi relatada como associada com estádios mais avançados da doença (III e IV) (SHANG et al. 2014). MACIEJCZYK et al. (2011) encontraram uma relação significativa entre o aumento da expressão de CD46 e menor sobrevida em pacientes com câncer de mama invasivo. Para o nosso conhecimento, o papel destes genes no carcinoma inflamatório ainda não foi explorado.

Tumores que possuem terapia alvo com anticorpos monoclonais podem apresentar resistência pelo aumento de moléculas que protejam as células contra mecanismos citolíticos. Portanto, a presença de amplificações em genes como *CD46* podem levar a uma resposta ineficiente a estes anticorpos. O mieloma múltiplo apresenta amplificações de *CD46* na maioria dos pacientes que desenvolvem recidiva pós tratamento com anticorpos monoclonais (SHERBENOU et al. 2016). Diversos ensaios clínicos atuais

têm sido descritos com a utilização de drogas baseadas em anticorpos monoclonais, incluindo os tumores de mama metastáticos e os CIM. Desta forma, amplificações de CD46 e ou seu aumento de expressão podem levar a uma diminuição da resposta ao tratamento, protegendo as células tumorais da destruição mediada por anticorpos. Isso demonstra a relevância em identificar o padrão do CD46 antes de tratar os pacientes por essa estratégia.

O CD46 também atua no sistema imunológico adaptativo, controlando a ativação, diferenciação e polaridade das células T (NI CHOILEAIN et al. 2017). Embora a co-estimulação do CD46 estimule a diferenciação de células T CD4+ naíve em células T helper 1 (TH1), a IL-2 se acumula, levando as células T estimuladas com CD46 a reduzirem a secreção de IFN- γ e aumentar a produção de IL-10, mudando assim de células TH1 para células T regulatórias. A regulação das células T é crítica no microambiente tumoral dos CIM (LIM et al. 2018). Interessantemente, foram relatados diminuição de linfócitos no sangue periférico de pacientes com CIM metastático quando comparados a doadores sadios (MEGO et al. 2016). Foram observadas menores porcentagens de TH1 ativado e linfócitos TCD8+ de pacientes com CIM quando comparados com não-CIM (BERTUCCI et al. 2015). Além disso, foi demonstrado que a TH1 pode ser um fator preditor de resposta completa ao tratamento (pCR) com trastuzumabe e quimioterapia em pacientes com CIM HER2 positivo (DATTA et al. 2015). Nos casos em que os pacientes tiveram supressão da resposta de TH1 não foi observado a pCR (DATTA et al. 2015). Em resumo, a análise

de CD46 pode ser de suma relevância nos carcinomas inflamatórios ter um papel na supressão de TH1 e contribuir para a agressividade tumoral.

A proteína codificada pelo gene CD55 inibe a deposição de fragmentos da enzima do sistema complemento C3, limitando a citotoxicidade dependente de sistema complemento. Assim como CD46, a CD55 protege as células de mecanismos imunológicos citolíticos, e seu aumento de expressão pode favorecer a sobrevivência de células tumorais e ainda propiciar a evasão tumoral (KESSELRING et al. 2014), além de proteger as células tumorais contra o ataque dos anticorpos monoclonais. WANG et al. (2017) avaliaram tumores de mama HER2 positivos no qual os pacientes não se beneficiavam da terapia com trastuzumabe. Os autores relataram um aumento de expressão de CD55 em linhagens celulares resistentes ao trastuzumabe e após o silenciamento de CD55 e CD59 (proteína com a mesma função de inibir o sistema complemento), houve um aumento significativo da morte celular provocada pelo tratamento.

Além de controlar o sistema complemento, CD55 é uma proteína de membrana que se liga à CD97, um importante membro da família 7 de fatores de crescimento epidermais. Essa ligação está envolvida nos processos de adesão célula-célula e adesão célula-matriz, migração e invasão (HE et al. 2015). O CD97 e CD55 foram relacionados à desdiferenciação tumoral, invasão, migração e metástase (WU et al. 2012; SAFAEE et al. 2013; HE et al. 2015). A expressão aumentada dessas proteínas foi correlacionada com invasão angiolinfática, grau histológico e estágio clínico e patológico em carcinomas de vesícula biliar (MENG et al.

2017). Em câncer de pâncreas foi associada com invasão vascular e metástase linfonodal (HE et al. 2015) e com recorrência e metástase no adenocarcinoma do reto (HAN et al. 2010).

As vias relacionadas ao processo inflamatório e a resposta imunológica são de particular interesse para o avanço do conhecimento sobre a biologia dos CIM. Recentemente, houve um avanço no entendimento dos mecanismos imunológicos e seu envolvimento da resposta adaptativa e inata na regulação e progressão tumoral (LIM et al. 2018). Linfócitos T citotóxicos, os quais são fundamentais para a resposta anti-tumoral, estão suprimidos nos CIM, enquanto as vias inflamatórias crônicas que contribuem com o processo metastático como as que envolvem a via de NF- κ B estão ativadas. O envolvimento dos genes *CD46* e *CD55*, podem trazer novas perspectivas do ponto de vista imunológico aos CIM. Em nossas análises 16 casos apresentam ganhos envolvendo os genes *CD46* e *CD55*, sendo que três deles apresentaram amplificação. Estas alterações podem estar contribuindo para o escape das células tumorais e, em particular o *CD55*, para a agressividade da doença

O gene *CR1* mapeado em 1q32.2 estava amplificado nas amostras de CIM. Este gene codifica uma glicoproteína de membrana que atua como receptora das enzimas do sistema complemento C3b/C4b. Porém, sua participação no processo tumoral não é conhecida.

Perdas em 17p também foram detectadas em aproximadamente 70% dos casos (Quadro 2). A deleção desta região foi reportada em diversos tumores, dando ênfase ao gene *TP53*, um supressor tumoral

extensivamente estudado e considerado um importante *driver* em câncer mama (BELLAZZO et al. 2018). Na presente casuística, 60% dos CIM apresentaram a deleção do *TP53* e em 6% foi observada *cnLOH* envolvendo este gene. LIU et al. (2016), observando que diversos tumores apresentavam deleção 17p, realizaram um estudo funcional *in vivo* para analisar se o gene *TP53* era o único responsável pela tumorigênese ou se outros genes estavam participando do processo. Os autores mostraram que o efeito da deleção somática da região 17p13.1 no processo tumoral é maior do que o efeito da deleção do gene *TP53* sozinho, sugerindo que a co-deleção de outros genes como *EIF5A* e *ALOX15B* atuam em conjunto *TP53* na gênese de tumores mais agressivos. Em nosso estudo, os genes *EIF5A* e *ALOX15B* (17 casos perdas e perdas em mosaico) mapeados na mesma região em que se encontra o *TP53* também estavam envolvidos em perdas e poderiam contribuir para a agressividade tumoral reportada nos CIM.

Neste estudo, as regiões de perda no cromossomo 17p englobavam vários genes. Entre eles, *NLRP1* e *XAF1* participam do processo de apoptose; os genes *ASGR1*, *ASGR2* e *CLEC10A* participam do processo de adesão celular e os genes *MYO1C*, *PHF23*, *YWHAE*, *MIS12*, *RPA1* e *DLG4*, os quais estão envolvidos no ciclo celular e na manutenção da sobrevivência.

As deleções homozigotas (*copy number state=0*), um raro evento, foram detectadas em pelo menos três casos e incluíram os genes *TP63* (CIM08 e CIM23), *ADAM5* e *ADAM3A* (CIM01, CIM03 e CIM09) e o gene *CSMD1* (CIM16 e em perda mosaico nos casos CIM07, CIM08 e CIM10).

Além de dois casos com a perda homozigota do gene *TP63*, foram também detectadas a perda em mosaico (CIM26) e *cnLOH* em mosaico (CIM22). Por outro lado, ganhos envolvendo esse gene foram detectados em seis casos (CIM04, CIM09, CIM10, CIM11, CIM16 e CIM18). O gene *TP63* é um membro da família de genes do supressor de tumoral *TP53*, sendo traduzido em pelo menos seis isoformas devido ao uso diferencial de promotores e de *splicing* alternativo. As variantes TAp63 têm um domínio de transativação N terminal p53-like, enquanto as isoformas Δ Np63 carecem deste domínio. A TAp63 tem uma função pró-apoptótica enquanto as isoformas Δ Np63 têm um papel oposto promovendo a sobrevivência celular (SU et al. 2013). A expressão da isoforma Δ Np63 está expressa em células progenitoras imaturas e células mioepiteliais / basais maduras e é uma característica dos tumores de mama triplo-negativos e *basal-like* (ORZOL et al. 2016). As isoformas oncogênicas Δ Np63s estão balanceadas com as isoformas TAp63s e p53, supressoras de tumor. Em certos cenários, com a ausência de p53 funcional, tanto a amplificação ou perda do locus do gene p63 parecem levar a um desequilíbrio das isoformas, levando à predisposição ao câncer (GUO et al. 2009; CHEN et al. 2018).

Embora o gene *TP63* tenha sido originalmente considerado como homólogo ao *TP53* e *TP73*, ambos, bem conhecidos como supressores de tumor, raramente é relatado como mutado em tumores. Por outro lado, a amplificação do *TP63* foi relatada em diversas linhagens tumorais, mas o significado desta alteração ainda não foi esclarecido (CHEN et al. 2018).

A deleção homozigota deste gene detectado em nosso estudo pode

levar a perda da função da proteína e de suas isoformas. Este raro evento pode estar contribuindo com o fenótipo tumoral. Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel do gene *TP63* e sua relação com a via de *TP53* nos CIM.

Três casos apresentaram perdas homozigotas dos genes *ADAM5* e *ADAM3A*. Os ADAMs (desintegrina e metaloproteinase) pertencem a família de proteínas de transmembrana, são secretadas e atuam na regulação do adesão, migração, proteólise e sinalização celular (EDWARDS et al. 2008). Entretanto, os genes *ADAM5* e *ADAM3A* são considerados pseudogenes. Pseudogenes têm sido descritos no câncer, e seu papel tem sido relacionado ao mesmo papel que o genoma não codificante desempenha na fisiologia normal, bem como sua relação aos processos patológicos. Eles participaram da regulação da expressão de seus genes parentais como um *long non-coding* (lncRNAs) (GROEN et al. 2014). Em nossos casos, a deleção homozigota de *ADAM5* e *ADAM3A* ocorreu em quatro casos perdas ocorreram em mais sete casos, totalizando 11 casos. A deleção homozigota poderia levar a ausência do controle da expressão dos genes *ADAM* e conseqüentemente um aumento de metaloproteinases que degradariam a matriz extracelular e favoreceriam a rápida migração das células. Entretanto, CNVs nesses pseudogenes são muito frequentes em indivíduos fenotipicamente normais (DGV, banco da Affymetrix, banco das 100 mulheres brasileiras). O papel das deleções homozigotas destes genes precisam ser melhor caracterizadas.

Quatro CIM apresentaram perdas afetando o gene *CSMD1* mapeado

em 8p23. A perda da expressão de *CSMD1* foi associada ao prognóstico desfavorável no câncer de mama, sugerindo que este gene atua como supressor tumoral nesse câncer (KAMAL et al. 2017). Ensaios funcionais com o silenciamento de *CSMD1* detectaram um aumento significativo na proliferação, migração celular e invasão em linhagens celulares. A perda da expressão de *CSMD1* interrompe o modelo de formação de ductos mamários, enquanto aumenta a proliferação, migração e invasão destas células (KAMAL et al. 2017). Desta forma, este gene é um candidato interessante a ser melhor avaliado nos CIM.

Genes supressores tumorais podem ser inativados pelo silenciamento da sua região promotora como resultado da metilação ou da inativação dupla por mutação ou uma combinação de mutação de um alelo e perda do segundo alelo (perda de heterozigose, *LOH*). A *cnLOH* (perda de heterozigose de cópia neutra ou alternativamente, dissomia uniparental-UPD) é um mecanismo que leva a *LOH* por duplicação do alelo materno ou paterno ou região cromossômica e concomitante perda do outro alelo. Um dos mecanismos que leva a *cnLOH* é a inativação mutacional inicial ou ativação de um alelo enquanto o alelo selvagem remanescente é deletado ao mesmo tempo em que o alelo mutado é duplicado. Esta alteração pode resultar na inativação de genes supressores de tumor ou ativação de oncogenes em tumores.

Em nossas análises, foram detectadas *cnLOH* em praticamente todos os casos. O maior número de *cnLOH* foi detectado nos casos CIM11 (30 alterações), CIM16 (24 alterações) e CIM20 (11 alterações).

Sete casos apresentaram *cnLOH* (CIM03, CIM11, CIM14, CIM16, CIM20, CIM22 e CIM23) em 3p26.3 e destes, quatro são triplo negativos (CIM11, CIM14, CIM16 e CIM20). Perdas em mosaico nessa mesma região também foram identificadas em seis casos (CIM07, CIM09, CIM10, CIM12, CIM18 e CIM26), sendo um deles (CIM10) triplo negativo. Em 3p26.3 está mapeado o gene *CHL1* que codifica uma molécula de adesão celular proposta como um supressor tumoral envolvido no câncer de mama. Este gene é regulado por metilação e seu silenciamento levou células mamárias a um aumento na sua proliferação e migração, sendo considerado um marcador de pior prognóstico desses tumores (MARTIN-SANCHEZ et al. 2017). Nos CIM deste estudo, cinco dos sete casos triplo negativos apresentaram *cnLOH* ou perdas em 3p26.3, sugerindo que a perda deste gene poderia também contribuir para a carcinogênese mamária.

Em 6q22.31 foi observada uma *cnLOH* comum aos casos CIM04, CIM05, CIM09, CIM10 e CIM22 e esta mesma região estava envolvida em ganhos em dois casos triplo-negativos (11 e 16). Nesta região está mapeado o gene *IL20R1*, um receptor da interleucina 20, encontrado hipermetilado em diversos tumores (TESSEMA et al. 2008). O gene *IL22RA2* também mapeado nessa região, codifica um receptor solúvel que se liga à interleucina 22 bloqueando a interação da IL-22 com a superfície celular. HUBER et al. (2012) descreveram que *IL22RA2* desempenha um papel crucial no controle da tumorigênese e proliferação celular do cólon. Em processos de lesão tecidual, a IL-22 é induzida e promove proteção ao tecido durante a fase da lesão, fase aguda do processo inflamatório, porém

promove desenvolvimento tumoral, se não controlado pelo IL22RA2. Sendo assim, este equilíbrio deve ocorrer para que ocorra reparo tecidual, sem proliferação anormal. Como a região destes genes foi encontrada em *cnLOH* em alguns casos e em outros em ganho, esperava-se encontrar uma proteína com ganho de função, funcionando como um oncogene, porém os relatos em literatura que envolvem a deleção do gene *IL20R1* levam a perda da função proteica e, conseqüentemente, aumento de IL-22, promovendo o processo tumoral. Estas proteínas por serem componentes envolvidos na resposta imunológica, podem participar de vias relevantes para o estudo de imunoterapias.

Interessantemente, foi observado *cnLOH* em todo o cromossomo 17 nos casos CIM11 e 22 e parcialmente no caso CIM16. Tumores de ovário têm sido caracterizados por frequentes *cnLOH* no cromossomo 17 e este achado foi relacionado com pior sobrevida global, sugerindo que algum gene desta região teve sua função alterada pela perda da heterozigose (TUNA et al. 2015).

O grande número de *cnLOH* observado em tumores pode ser explicado pela desregulação do ciclo celular e a replicação associada à progressão tumoral, na qual um alelo é perdido e o alelo remanescente é duplicado. Estes eventos podem ocasionar deleções homozigóticas levando à duplicação do alelo mutado, fazendo com que os clones portadores dessas alterações adquiram vantagens proliferativas. KUMAR et al. (2015) demonstraram uma maior ocorrência desses eventos como indicadores de danos ao DNA e instabilidade que podem estar relacionados com a

deficiência em genes do sistema de reparo.

Em tumores de mama, a frequência do desequilíbrio alélico é significativamente maior nos tumores HER2 positivos em comparação com tumores HER2 negativos (ELLSWORTH et al. 2008). Entretanto, os tumores triplo-negativos e *basal-like* apresentam grande instabilidade genômica, apesar da ausência de HER2. Portanto, o prognóstico desfavorável relacionado aos tumores *basal-like* e HER2 positivos podem ser atribuídos a instabilidade genômica global com altas frequências de alterações cromossômicas associadas ao aumento de proliferação e comportamento tumoral agressivo (TOKUNAGA et al. 2012).

O grande número de CNAs encontradas em nossa casuística, denota alta instabilidade genômica, a qual pode ser o fator principal para o prognóstico desfavorável dos CIM.

Alguns genes sugeridos em estudos anteriores, como potenciais candidatos, foram analisados em maiores detalhes no nosso estudo. O gene *WISP3* (VAN GOLEN et al. 1999), que codifica uma proteína que participa da via de *WNT1* envolvido em processos celulares de desenvolvimento e crescimento, é encontrado com expressão aumentada em vários tumores, sendo que em nosso estudo foi observado ganho em três dos sete casos triplo-negativos (CIM10, CIM11, CIM16) e no caso CIM18 (ER+, PR+, HER2).

Outro gene descrito em CIM por foi o gene *NFAT5* (*Nuclear Factor of Activated T-Cells 5*), o qual codifica um membro da família de fatores de transcrição da via do NF- κ B. O NF- κ B é um fator de transcrição que é

ativado por diversos estímulos intra e extracelulares como citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, bactérias e vírus, e sua ativação promove a expressão de genes envolvidos em inúmeras vias biológicas. Nos CIM, o NF- κ B medeia a inflamação dentro do microambiente tumoral, o que pode levar a resistência a quimioterapia e terapia hormonal (DRYGIN et al. 2011). Este fator de transcrição induz a expressão de diversos genes relacionados com a resposta imunológica. REMO et al. (2015) usando análise de expressão proteica por imunistoquímica descreveram que os CIM apresentaram expressão nuclear aberrante de NFAT5 comparado com cânceres de mama não CIM. Os autores sugeriram que este fator de transcrição pode ser um biomarcador para identificar CIM. Entretanto, encontramos resultados conflitantes ao descrito por esses autores. Em nossa casuística, foram detectadas perdas deste gene em 10 casos (CIM01, CIM05, CIM06, CIM07, CIM09, CIM11, CIM13, CIM14, CIM18 e CIM19) e em *cnLOH* em três casos (CIM15, CIM16, CIM22). Outros estudos são necessários para confirmar o papel deste gene e sua proteína em carcinomas inflamatórios de mama.

Foram relatadas alterações no número de cópias (amplificação) do gene *ALK* em CIM por ROBERTSON et al. (2013), com uma ocorrência maior nos CIM triplo-negativos. Este gene codifica um receptor de tirosina quinase com função de oncogene, com capacidade de transformação quando apresenta-se truncada ou fusionada à *NPM* (nucleofosmina) em um rearranjo cromossômico que é comum em linfomas anaplásicos de grandes células. No Linfoma de Hodgkin com um fenótipo de células T, está

amplificado, mutado ou rearranjado em vários tumores (MARIÑO-ENRÍQUEZ e DAL CIN 2013). Entre os sete casos triplo-negativos da nossa casuística, cinco deles (CIM 10 11 15 16 e 20) apresentaram ganhos de *ALK*, sugerindo um papel de destaque para esse gene nos CIM classificados como triplo-negativos.

Além de inúmeras regiões de ganhos, perdas e *cnLOH*, as análises genômicas dos CIM também revelaram a presença de cromotripsis. Foram detectados 14 eventos de cromotripsis em nove casos envolvendo diferentes cromossomos. Este evento é definido pela presença de inúmeras quebras cromossômicas que podem ocorrer em um único evento catastrófico levando a perda parcial ou completa de informações genéticas. Embora nem sempre associados a uma mutação *driver* discernível, esses padrões de variação estrutural do genoma têm o potencial de desregular vários elementos oncogênicos simultaneamente e têm sido claramente associados a fenótipos agressivos (STEPHENS et al. 2011).

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar os mecanismos que levam a cromotripsis, como a radiação ionizante (RI), pontes anafásicas, inibição da apoptose e instabilidade na replicação. Segundo STEPHENS et al. (2011), a radiação ionizante apesar de ser a fonte mais potente geradora de danos, poucas delas podem gerar o número de quebras que ocorre neste evento. As pontes anafásicas podem ocorrer pela presença de cromossomos dicêntricos que surgem pelo reparo de regiões cromossômicas terminais, com encurtamento de telômeros. O excesso do alongamento de cromossomos dicêntricos pelas fibras do fuso durante a

anáfase e/ou o seu aprisionamento durante a citocinese pode resultar em uma série de quebras em um cromossomo em intervalos espaçados (STEPHENS et al. 2011). Entretanto, este mecanismo não pode explicar todas as ocorrências de cromotripsis, uma vez que, em sua grande maioria, os rearranjos complexos que as envolvem não afetam as extremidades cromossômicas, nem implicam em uma fusão de um cromossomo dicêntrico (JONES e JALLEPALLI 2013).

Também foi postulado que a cromotripsis surge a partir de eventos de apoptose que foi transitoriamente iniciada e em seguida interrompida. Nesta hipótese a pergunta é como as células poderiam escapar não só à fragmentação do DNA completo, como também das vias que levam à morte celular. Uma possibilidade é que a clivagem seria restrita a regiões de acesso à cromatina ou ainda ser influenciada pela atividade de um vírus que inibe a apoptose (TUBIO e ESTIVILL 2011).

O estresse no momento da replicação deve ser considerado como potencial evento indutor de cromotripsis. Sob a influência de oncogenes ativados, a regulação do ciclo celular fica corrompida. Na fase S, três pontos de checagem são distinguidos e compartilham alguns componentes: (1) um *checkpoint* dependente da replicação, que ocorre quando a forquilha de replicação é bloqueada, seja por uma depleção no estoque de precursores de nucleotídeos, pela inibição da DNA polimerase ou pela colisão da forquilha com um fragmento de DNA danificado ou aberrante; (2) um *checkpoint* independente da replicação, induzido por quebras de fita dupla no DNA em regiões diferentes das forquilhas de replicação (denominado

intra-S); (3) o *checkpoint* S/G2, que garante que a célula não entre em divisão antes que todo o genoma esteja completamente duplicado. Uma tensão na replicação pode ser particularmente mais severa em regiões do genoma de difícil replicação pela baixa densidade de origens de replicação (sítios frágeis) (LETESSIER et al. 2011). O estresse na replicação também pode ser induzido por erros mitóticos antecedentes. Erros de segregação frequentemente resultam na formação de micronúcleos pós-mitóticos e também podem desencadear uma parada tardia em G1, dependente de p53.

Os rearranjos observados como *cromotripsis* podem levar a várias e simultâneas alterações genômicas em um único evento podendo ser detectados em praticamente todas as células tumorais e não apenas em subclones, sugerindo sua ocorrência em etapas iniciais do processo carcinogênico (KORBEL e CAMPBELL 2013).

Estudos que se propuseram a identificar genes diferencialmente expressos relacionados com a ocorrência de cromotripsis e sua análise ontológica, identificaram que os processos biológicos mais alterados estavam relacionados com proliferação e replicação do DNA sugerindo que estes eventos catastróficos promovem um aumento da replicação do DNA e, conseqüentemente, uma maior chance de erros neste processo (MENGHI et al. 2016).

Recentemente, FONTANA et al. (2018) relataram algumas alterações associadas aos eventos de cromotripsis em células leucêmicas, como mutações em *TP53*, deleções em *PTEN* e *CDKN2A*, ampliações em *EGFR*, *MDM2* e *MDM4*, reparo de quebras de dupla fita, cariótipo complexo

e mutações em *ATM*.

Em nosso estudo, regiões de cromotripsis foram detectadas em 37,5% dos casos: CIM04, CIM07, CIM09, CIM18, CIM19, CIM24 (ER PR+ e HER2-), CIM08 (ER PR- e HER2+) e CIM14 e CIM20 (triplo-negativos). PRZYBYTKOWSKI et al. (2014) avaliaram cromotripsis em tumores de mama e identificaram a ocorrência deste evento em 41% dos casos. Portanto, os tumores inflamatórios parecem seguir o padrão dos demais tumores de mama.

Os cromossomos mais alterados foram o cromossomo 11 (três casos), cromossomos 8 13 e 17 (2 casos cada um). Estes achados sugerem que a instabilidade genômica pode não ser igual para todos os cromossomos e que a contribuição dos cromossomos individuais para o desenvolvimento de alguns tumores pode ser determinada, pelo menos em parte, por suas características estruturais. Entre elas, podem ser destacadas a abundância relativa de duplicações segmentares e elementos repetitivos intercalados, telômeros relativamente curtos, bem como seu alto conteúdo gênico e a presença de genes sensíveis à dosagem.

A análise do perfil mutacional utilizando um painel de 105 genes relacionados com câncer revelou mutações no gene *TP53* em cinco casos (CIM08, CIM14, CIM18, CIM20 e CIM24), os demais não apresentaram mutações neste gene, porém, apresentaram mutações em genes da via de HR (CIM04=*ATM*; CIM07=*BRCA2* e CIM09=*RAD51B*, *BRCA2* E *POLD1*). Perdas genômicas envolvendo o gene *PTEN* foram detectadas em sete casos (CIM04, CIM08, CIM14 e CIM18). Perdas genômicas onde se mapeia

o gene *CDKN2A* também foram observadas em seis casos (CIM03, CIM04, CIM08, CIM14, CIM18, CIM22); não foram observadas ampliações nos genes *EGFR*, *MDM2* e *MDM4*, entretanto, foram encontrados ganhos em *MDM4* em todos os casos com cromotripsis. Esses achados dão um suporte adicional ao descrito por FONTANA et al. (2018) sobre a associação desses genes no evento cromotripsis.

Interessantemente, dos nove casos com ocorrência de cromotripsis, três deles são pacientes vivas ao follow-up, correspondendo a metade dos casos (total de seis pacientes vivas no estudo). É possível que as células portadoras de cromossomos em cromotripsis apresentem uma maior resposta a agentes quimioterápicos que formam ligações cruzadas com o DNA, como a ciclofosfamida, utilizada no tratamento de pacientes com carcinoma inflamatório de mama.

Em nosso estudo também foi investigada a associação entre as alterações genômicas e características clínicas e patológicas, incluindo a presença de alterações específicas nos tumores triplo negativos, nos casos com história de câncer na família, nos casos com diagnóstico dos CIM na pré-menopausa, na presença de metástase ao diagnóstico e naqueles em que a paciente foi a óbito em até dois anos.

Os CIM triplos negativos apresentaram ganhos em 1q21.1 1q21.2 1q21.3, 6p22.2, 6p22.3 e 6p21.33 e perdas em 4p15.1 e 4p15.2. Algumas dessas regiões não foram previamente descritas em câncer de mama. Estas regiões incluem vários genes tendo sido selecionados alguns deles para uma análise mais detalhada. O gene *CHD1L* (1q21.1) foi relatado em

ganhos e conseqüente aumento de expressão em tumores de mama de alto grau, com amplificação em HER2 e de pacientes em idade jovem, sendo considerado um biomarcador prognóstico (WU et al. 2014). Este gene codifica uma proteína helicase envolvida no reparo do DNA, a qual atua regulando o relaxamento da cromatina após danos no DNA. Não temos conhecimento de relatos em literatura sobre ganhos deste gene e sua associação com tumores triplo negativos. Entretanto, em uma recente meta-análise, foi demonstrado que diferentes tumores sólidos humanos apresentam expressão aumentada desta proteína, a qual estava associada com sobrevida global diminuída e pior sobrevida livre da doença, metástase linfonodal e à distância LIU et al. (2018).

A amplificação de genes mapeados em 1q21.3 e seu enriquecimento em subpopulações de células tronco de câncer de mama foi associada com recorrência tumoral (GOH et al. 2017). Os autores relataram a presença da amplificação em 10 a 30% dos tumores primários e em mais de 70% dos tumores recorrentes, independentemente do subtipo de câncer de mama. Segundo os autores, a família de proteínas de ligação ao cálcio S100 (S100A, S100A7, S100A8 e S100A9) e quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (IRAK1) impulsionaram o crescimento de mamoesferas. GOH et al. (2017) relataram que este circuito funcional pode ser interrompido pelo inibidor de quinase de moléculas pequenas, o Pacritinib. O tratamento com este fármaco levou ao comprometimento preferencial do crescimento de tumores de mama com a amplificação de 1q21.3. Estes dados sugeriram que esta região é um biomarcador rastreável e um alvo terapêutico acionável

para o câncer de mama.

A presença de CNAs em 6p22.3 foram relatadas em tumores *basal-like* (que possuem o fenótipo triplo negativo) e com mutação germinativa e somática em *BRCA1* (PRAT et al. 2014). Estes resultados sugeriram que existem características moleculares potencialmente relevantes nos tumores do tipo basal de acordo com o status *BRCA1*. Perdas em 6p22.2 foram significativamente mais incidentes nas pacientes que foram expostas à radiação no acidente de Chernobyl (WILKE et al. 2018). Segundo os autores, a presença de genes codificadores das histonas mapeados nessa região e que estão envolvidos na estrutura do DNA, apontam para a instabilidade cromossômica como uma consequência maior dos processos desregulados de reparo do DNA, que é uma característica bem conhecida das células expostas à radiação ionizante.

Ganhos em 8q11.21 foram exclusivamente detectados nos pacientes com história familiar de câncer positiva quando comparados com os casos sem relatos de câncer na família. Essa região cromossômica foi previamente relatada em ganhos e amplificação em casos câncer de mama não inflamatórios (WANG YH et al. 2015). O gene *MCM4* mapeado nessa região codifica uma subunidade do complexo helicase de replicação MCM (MCM2-7), que é essencial para a replicação do DNA, estabilidade do genoma e resposta a danos no DNA. Uma mutação do gene *MCM4* (Phe345Iso) foi associado ao desenvolvimento do câncer de mama em camundongos fêmeas (WANG YH et al. 2015). O gene *KIAA0146/SPDR* também mapeado nessa região codifica uma proteína envolvida no reparo do DNA. Mutações

bialélicas nesse gene foram associados com disgenesia gonadal (SMIRIN-YOSEF et al. 2017). O gene *CEBPD*, codifica uma proteína que atua na regulação de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória e pode estar associado com a regulação de genes que atuam na ativação e diferenciação de macrófagos. Em carcinoma urotelial, a amplificação e expressão aumentada do *CEBPD* foi associada com agressividade e metástase (WANG YH et al. 2015).

A perda em 12q13 (> 300 genes mapeados na região) foi exclusivamente detectada nas pacientes que desenvolveram CIM antes da menopausa. Não temos conhecimento de relatos sobre o envolvimento desta região relacionada a idade da ocorrência dos tumores. Entretanto, em um estudo de associação (GWAS, *Genome Wide Association Studies*) a presença de SNPs no gene *PFKM* foi associada ao risco aumentado de desenvolvimento do câncer de mama (AHSAN et al. 2014). O gene *PFKM* codifica uma das três isoenzimas fosfo-frutose-quinases (PFK), é o principal regulador da glicólise celular catalisando a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato. Os autores explicaram a associação entre a expressão de *PFKM* com o risco de câncer de mama por várias razões. Primeiro, esse gene é expresso em linhagens de células de câncer de mama, em segundo lugar, variantes no gene têm sido relacionadas a modificações pós-traducionais, que demonstraram alterar o metabolismo e promover o crescimento de células tumorais; terceiro, uma associação entre o risco de câncer de mama e este gene é consistente com observações de que as células tumorais podem consumir grandes quantidades de glicose

devido ao metabolismo aberrante da glicose e finalmente, a proteína supressora de tumor p53 tem mostrado suprimir a expressão de *PFKM in vitro* (AHSAN et al. 2014). Esses resultados sugerem que este gene é um candidato a estar envolvido dentro do perfil de alterações encontradas no câncer de mama.

Os casos que apresentaram metástase ao diagnóstico possuem em comum ganhos em 8q24.21 (56 genes). Nesta região estão mapeados genes relacionados com um fenótipo mais agressivo da doença, como o já descrito *MYC* e também o gene *PVT1*. Este último é um lncRNA que atua na patogênese do câncer de mama. Recentemente, LIU et al. (2018) relataram miRNAs que residem no locus do *PVT1*, como o miR-1204. Este miRNA está associado com a proliferação celular, transição epitélio-mesênquima e invasão de células tumorais da mama, *in vitro* e *in vivo*.

Foram identificadas duas regiões de ganhos em pacientes que morreram em menos de dois anos do diagnóstico de CIM: 1q41 (gene *HLX*) e 8q21.13 (gene *PKIA*). O gene *HLX* foi descrito como associado com a hematopoiese deficiente nas leucemias agudas (PIRAGYTE et al. 2018) e o gene *PKIA* foi associado a quadros de esquizofrenia (DJUROVIC et al. 2010). Não temos conhecimento do papel destes genes em carcinoma de mama.

A análise das vias biológicas dos genes compartilhados em no mínimo 70% dos casos mostrou o envolvimento de inúmeras vias relacionadas com processos tumorais e, em particular, no câncer de mama. O valor mais significativo foi obtido para a via de sinalização associada à

regulação de poliamina no câncer de colon. Em nossos casos, o gene envolvido nesta via é o *AZIN1*. Este gene codifica uma enzima citoplasmática com função de inibir a degradação da enzima ODC1, responsável pela síntese de poliaminas. As poliaminas são vitais para o crescimento e a função das células normais e seu acúmulo pode levar à neoplasia, invasão e metástase. Portanto, ganhos em *AZIN1* podem promover o aumento da expressão da enzima produzida, inibindo a degradação de ODC1, favorecendo a síntese de poliaminas e, conseqüentemente, seu acúmulo na célula e contribuição para o processo tumoral.

A segunda via canônica envolvida, com valor significativo, foi a de sinalização apoptótica mediada por MYC, com os genes *MYC*, *PIK3C2B* e *YWHAZ* alterados. A família do proto-oncogene *MYC* desempenha um importante papel na fisiologia celular como no ciclo celular, crescimento, proliferação, síntese de proteínas, reprogramação metabólica, diferenciação, adesão, senescência, apoptose, angiogênese e ativação imunológica (KRESS et al. 2015). Sob condições normais, *MYC* é regulado por fatores de crescimento e por múltiplos mecanismos genéticos e epigenéticos (THOMAS et al. 2015). A proteína MYC pode induzir a expressão de reguladores positivos da fase S do ciclo celular como a ciclina D e ciclina E e, ao mesmo tempo, reduzir a expressão de inibidores como p15INK4, p27KIP1 e p21CIP1 (BRETONES et al. 2015). Apesar de apresentar envolvimento com a tumorigênese de diversos tipos celulares, ensaios *in vivo* sugerem que, sozinha, a proteína MYC seria incapaz de iniciar a transformação neoplásica

na maioria das células, pois mecanismos de apoptose e senescência seriam acionados. Entretanto, essa atividade poderia causar replicação sem divisão, o que tornaria a célula poliplóide, além de provocar quebras no DNA (FELSHER et al. 2000).

A proteína MYC pode iniciar a tumorigênese em células com um ambiente genético e ou epigenético favorável como, por exemplo, nos casos com perda de função de p53 ou aumento de expressão de BCL-2 (LI et al. 2014), ou em células portadores de deficiência na via de recombinação homóloga. A ativação de *MYC* paradoxalmente resulta em intensa apoptose, porém a sua ação na proliferação e nos sinais de sobrevivência ocorrem mais rapidamente do que o aumento de sinais apoptóticos. Sendo assim, este gene é um importante alvo terapêutico, pois embora a inativação do *MYC* em um tumor pode suprimir alguns mecanismos que contribuem para sinais apoptóticos, o efeito global é a regressão do tumor (LOWE et al. 2004). Na segunda via canônica onde participa o MYC, também foi identificado o gene *PIK3C2B*, cujo produto codificado tem papel nas vias de sinalização envolvidas na proliferação, transformação oncogênica, sobrevivência celular, migração e tráfico de proteínas intracelulares.

A terceira via canônica detectada em nosso estudo foi a da biosíntese do epoxiescaleno, necessária para a síntese de colesterol. O gene *SQLE* codifica a enzima escaleno epoxidase, que cataliza a oxidação do escaleno, na biossíntese de esteróides. A ativação dessas vias compreende um mecanismo metabólico essencial para o câncer e alterações na sua função contribuem para a resistência ao tratamento por um mecanismo ainda

desconhecido (GABITOVA et al. 2014). No câncer de mama, foi identificada uma assinatura transcricional relacionanda a via do colesterol em tumores refratários ao tratamento com positividade de *MUC1* e *NSCLC* associada com a resistência a tamoxifeno (PITRODA et al. 2009).

Uma associação também foi descrita entre a regulação do colesterol e células tronco no câncer de mama, destacando seu envolvimento na agressividade dos CIM (WOLFE et al. 2015). Neste estudo, o VLDL aumentou e o HDL diminuiu a formação de mamóferas em culturas de células de carcinoma inflamatório. Nos pacientes com CIM, altos valores de VLDL (> 30 mg / dL) foram capazes de predizer sobrevida global inferior a 5 anos quando comparado com valores normais. Em adição, os valores de HDL de pacientes abaixo do normal (<60 mg / dL) foram capazes de predizer a sobrevida global inferior a 5 anos (WOLFE et al. 2015). LACERDA et al. (2015). relataram que pacientes com CIM que faziam uso de estatinas tiveram maior sobrevida livre de doença do que as pacientes que não utilizavam o fármaco. Outros grupos também demonstraram que as estatinas inibem a proliferação do câncer de mama *in vitro* e crescimento tumoral *in vivo*, diminuindo a expressão de *PI3K*, aumentando a expressão de *PTEN*, inibindo NF- κ B (GHOSH-CHOUDHURY et al. 2010), ativando JNK (GOPALAN et al. 2013) e inibindo outras vias associadas as propriedades de células tronco nos CIM (LIM et al. 2018). A sinvastatina também aumentou a sensibilidade de linhagens celulares de CIM e triplo negativas à radiação e suprimiu o recrutamento de macrófagos promotores de tumores reduzindo a liberação de IL-6 (WOLFE et al. 2016).

Nos estudos pré-clínicos, as estatinas em combinação com um inibidor de colesterol HDL suprimiram o fenótipo de células tronco (*stemness*) das células CIM (LACERDA et al. 2015) e promoveram a sensibilidade à quimioterapia em tumores triplo negativos (WOLFE et al. 2015). Além dos efeitos anti-tumorais das estatinas, a redução sistêmica do colesterol também foi sugerida como um importante mecanismo anti-tumoral (NELSON et al. 2013). O gene *SQLE*, portanto, pode estar envolvido com o fenótipo “*stemness*” das células de CIM, contribuindo com a agressividade tumoral. Terbinafine, um fármaco antifúngico aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA, tem como alvo o *SQLE*. Em tumores hepatocelulares, o uso deste fármaco inibiu o crescimento tumoral induzido por *SQLE in vitro* e atenuou o desenvolvimento tumoral em modelos de xenoenxerto em animais *SQLE*-transgênicos (LIU et al. 2018). A supressão do crescimento do tumor pelo Terbinafine foi associada à diminuição das concentrações do éster de colesterol, ao restabelecimento da expressão de *PTEN* e à inibição da AKT-mTOR, consistente com o bloqueio da função do *SQLE*. LIU et al. (2018), no estudo em carcinomas hepatocelulares, propuseram uma função de oncogene para *SQLE* e a utilização de seus inibidores como uma abordagem promissora para a prevenção e tratamento destes tumores.

Um fato interessante é que o gene *SQLE* estava envolvido em ganhos ou ganhos em mosaico (caso CIM11 apresentava amplificação) em 18 casos do nosso estudo sugerindo a sua participação na carcinogênese mamária.

inflamatória. A abordagem terapêutica descrita usando o Terbinafine poderia, portanto, ser testada em modelos pré-clínicos e clínicos em CIM.

Na análise das regiões mais frequentemente alteradas no IPA foram identificados inúmeros genes que apresentam funções relacionadas com o movimento celular e que se relacionam com processos metastáticos como migração de células tumorais. Os genes relacionados com o processo metastático mapeados nestas regiões são *MTBP*, *NOV*, *SDC2*, *WISP1*, *HAS2*, *MTDH*, *ANGPT1*, *MYC*, *MTBP* e *NDRG1*. Destes, o gene *ANGPT1* é um fator de crescimento identificado em uma região onde foi observado ganho de cópias, e que, quando secretado, ativa receptores presentes nas células endoteliais, promovendo angiogênese. Sua função também está relacionada com a interação entre o endotélio e a matriz extracelular contribuindo para o desenvolvimento e maturação dos vasos sanguíneos. Curiosamente, os CIM possuem como característica que os diferencia, a migração de células tumorais para os vasos linfáticos da derme culminando em um efeito de embolização dos mesmos que caracteriza os sinais inflamatórios. Portanto, este gene é um candidato interessante para futuros estudos. A proteína codificada pelo gene *ANGPT1* pode ser alvo do fármaco Trebananib, a qual se liga ao fármaco impedindo sua ligação com o receptor das células endoteliais. Esta poderia ser uma alternativa terapêutica para pacientes com CIM.

Em nosso estudo, também foi avaliado o perfil mutacional dos CIM. Um total de 54 genes relacionados com câncer apresentou mutações patogênicas ou de significado incerto, sendo que alguns genes

apresentaram mais de uma variante, como *TP53* (11 variantes patogênicas) e *BRCA2* (7 variantes patogênicas), além de mutações em genes do reparo a danos no DNA como *MLH1*, *MLH3*, *RAD51*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH3* e *MUS81* (Tabela 2). Foram também detectadas variantes nos genes *PIK3CA* (4 casos), *MET* (4 casos), *PMS2* (4 casos), *FGFR1* (2 casos), *CDH1* (1 caso), *PMS2* (3 casos), *RB1* (1 caso), *PALB2* (1 caso), *KRAS* (1 caso), *NF1* (1 caso), *APC* (1 caso), *RET* (1 caso) e *AKT1* (1 caso).

Mutações no gene *TP53* são frequentemente relatadas no câncer de mama e também em CIM (CHARAFE-JAUFFRET et al. 2008; ROSS et al. 2015; MATSUDA et al. 2017; LIANG et al. 2018). As mutações em *TP53* relatadas em carcinomas de mama parecem ocorrer em maior frequência nos tumores negativos para os receptores hormonais e estão associadas com tumores de alto grau e com prognóstico desfavorável (NIK-ZAINAL et al. 2016; PEREIRA et al. 2016). Entre os 11 casos com variantes patogênicas do gene *TP53*, sete casos eram negativos para os receptores hormonais (cinco triplo-negativos, dois ER-/PR-/HER2+) e quatro casos eram positivos ER+/PR+HER2-). Mutações em *TP53* ocorreram em 52,4% dos casos e de forma independente de outra característica fenotípica. Entretanto, estas mutações podem estar relacionadas com a grande instabilidade genética detectada nestes tumores. Por exemplo, a cromotripsis foi detectada em nove casos e variantes patogênicas e de significado incerto em *TP53* estavam presentes em cinco deles.

A mutação em *BRCA2* foi a segunda mais frequente em nossos casos (43%), e sua ocorrência está relacionada com prognóstico desfavorável e

uma sobrevida média inferior a dois anos. Estes dados divergem dos estudos de perfil mutacional nos CIM, que relataram incidência dessas mutações de 15% (ROSS et al. 2015; MATSUDA et al. 2017) e 7,7% (LIANG et al. 2018). Entretanto, um grande número de pacientes relatou história de câncer de mama e ovário na família. Em 16 pacientes com história de câncer na família, 8 relataram história de câncer de mama e uma de ovário. Analisando os nove casos com mutação em BRCA2, quatro delas tinham câncer de mama (CIM05, CIM07, CIM09, CIM18), uma câncer de ovário (CIM11) e duas com história de câncer na família mas com localização não conhecida (CIM10 e CIM13). A história de câncer na família pode ser uma possível explicação para as altas taxas de mutação em BRCA2 entre os casos que avaliamos. Em um recente relato, JIMENEZ et al. (2012) descrevem um caso de uma paciente de 40 anos, diagnosticada com CIM, que apresentava uma variante germinativa patogênica de BRCA2, cuja mãe havia morrido de CIM aos 35 anos, sendo este o único caso na família. Infelizmente, mutações germinativas não puderam ser analisadas em nossos casos.

Outro gene mutado entre as amostras de CIM foi gene *PIK3CA* (21% dos casos). Este achado está em consonância com os estudos prévios em CIM onde foram descritas mutações em 28% (ROSS et al. 2015), 41,7% (MATSUDA et al. 2017) e 29,5% (LIANG et al. 2018) dos CIM. Mutações no gene *PIK3CA* foram relatadas como tendo potencial para levar à resistência ao tratamento anti-HER2 (BIANCHINI et al. 2017) em tumores HER2+, mas estas diferenças não foram encontradas nos CIM HER2+ tratados com

trastuzumab combinado com quimioterapia (LIANG et al. 2018). Mutações em *PIK3CA* foram associadas a pior sobrevida livre de metástase (LIANG et al. 2018), porém em nossos casos não encontramos essa relação.

O oncogene *MET* foi encontrado mutado em 21% dos casos. Até o momento não há descrição em literatura de mutação em *MET* nos CIM. Dois casos, CIM07 e CIM24, que apresentaram as variantes de significado incerto do gene *MET* apresentaram formas muito agressivas de CIM, com sobrevida global de 8,8 e 3 meses, respectivamente. Em tumores de mama, foram relatadas mutações e ampliações de *MET* associadas a maior taxa de metástase, alto grau histológico e menor sobrevida global (GAGLIATO et al. 2014).

A instabilidade de genomas como a apresentada pelos carcinomas inflamatórios de mama poderia ser explicada por defeitos nas vias de reparo a danos ao DNA, incluindo, por exemplo, reparo por mal pareamento (*mismatch repair* - MMR), reparo de excisão de base (BER), reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e reparo de dupla fita de DNA, que pode ocorrer por reparo de recombinação homólogo (HR) e reparo de extremidades não homólogas (NHEJ).

O painel utilizado para o sequenciamento dos casos deste estudo, incluía 13 genes da via de HR (*ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD50, RAD51B, RAD51C, RAD51D, POLD1, PALB2, MUS81, XRCC2*) e seis genes relacionados a via de MMR (*MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2*). Os mecanismos conhecidos e primeiramente relatados em tumores colorretais, como a instabilidade de microssatélites (MSI) resulta de defeitos

na via de reparo da via MMR, levando a uma série de mutações (incluindo *frameshifts*) em repetições simples chamadas microssatélites. Em nosso estudo, seis casos apresentaram mutações nos genes MMR e várias mutações em outros genes, além de apresentarem características clínicas bem agressivas, como metástase ao diagnóstico e baixa sobrevida global. Tumores de mama apresentam uma frequência de MSI de 0-2% (DUDLEY et al. 2016), entretanto, nos CIM já foram relatadas altas taxas de mutações em genes da via de MMR (HAMM et al. 2016). Nossos achados mostraram uma frequência de 28,5%, corroborando com os achados de HAMM et al. (2016). Estes autores sugeriram que os CIM portadores de mutações somáticas nos genes MMR contribuem para o grande número de outras mutações e instabilidade genômica observada nos tumores.

Estudos recentes sugerem que tumores com MSI obtêm excelentes respostas a terapia com inibidores anti-PD1. HAMM et al. (2016) detectaram que os CIM possuem um aumento no número de linfócitos TCD8+/PDL+ e que o tratamento com inibidores de anti-PD-1 beneficiaria esses pacientes.

Em relação aos genes da via de HR, foram encontradas mutações em 15 casos nos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51B*, *RAD51D*, *PALB2*, *POLD1* e *MUS81*. A via de HR é um processo de reparo que usa a cromátide-irmã (ou cromossomo homólogo) para alinhar e reparar as extremidades, e é o modo preferido de reparo de dupla fita nas fases S / G2 do ciclo celular (quando estão presentes cromátides irmãs). Por outro lado, o NHEJ compreende processos propensos a erros que unem duas extremidades quebradas. Portanto, as altas taxas de mutações em genes da

via de HR levariam a célula a escolher a via NHEJ, acumulando uma série de aberrações cromossômicas. O *BRCA1* desempenha um papel fundamental no reparo de dupla fita e, em particular, no direcionamento do reparo para a via homóloga (SCULLY et al. 2004). No contexto da mutação do *BRCA1*, a deficiência do reparo da HR (HRD) levaria a um aumento do reparo sujeito a erros, resultando em rearranjos cromossômicos e alterações de número de cópias. Curiosamente, o *BRCA1* também parece regular a diferenciação de células-tronco epiteliais de mama ER-negativas em progenitores luminais ER-positivos (LIU et al. 2008). Portanto, uma hipótese levantada é que os tumores de mama esporádicos, semelhantes aos basais, abrigam uma disfunção do *BRCA1* (ou das vias associadas ao *BRCA1*), levando a um padrão complexo de alteração genômica e a um fenótipo ER-negativo basal. Nossas análises identificaram apenas dois casos com mutação em *BRCA1*, porém como descrito acima, em muitos casos de nosso estudo, foram encontradas mutações somáticas no gene *BRCA2*, estas mutações também podem levar à disfunção telomérica, mecanismo que foi proposto para explicar, em parte, a instabilidade cromossômica observada na deficiência de *BRCA2* (BADIE et al. 2010).

O perfil de alterações somáticas é denominado de *BRCAness*, termo utilizado para definir tumores que apresentam deficiência na via de HR sem, entretanto, apresentarem mutações em *BRCA1/2* na linhagem germinativa (TURNER et al. 2004). Além das mutações somáticas, *BRCAness* pode ser explicado por silenciamento epigenético de *BRCA1/2* ou a inativação de vários outros genes associados à via de HR, como *PTEN*, *ATM*, *ATR*,

AURKA, *PALB2*, *BRIP*, família de genes *RAD51*, e outros. Nesse contexto, nós também detectamos variantes somáticas nos genes *ATM* (2 casos), *AURKA* (1 caso) e *RAD51* (2 casos).

Considerando a grande quantidade de alterações cromossômicas detectadas e diversas mutações em vias de HR, optamos por calcular os índices de instabilidade genômica em cada um dos casos de CIM. Diversos mecanismos moleculares foram associados à origem da instabilidade genômica no câncer, incluindo estresse de replicação, disfunção telomérica, reparo do DNA deficiente e vários defeitos na segregação cromossômica (KWEI et al. 2010). Esta instabilidade pode ser induzida durante ao descontrole da replicação do DNA nas células tumorais, dando origem a paradas frequentes nas forquilhas replicação. Conseqüentemente, torna-se sobrecarregado o reparo de fitas homólogas, a qual é a principal via do reparo das quebras de duplas fitas durante a replicação (WILHELM et al. 2014). A presença de HRD aumenta a frequência de eventos errôneos, induzida por estresse de replicação. Estes erros quando quantificados por meio de escores tAI, LST e HRD-LOH são indicativos de HRD (WATKINS et al. 2014).

Os CIM apresentaram altos valores de tAI para 11 casos (valor mediano de cut off: 23) dos quais todos possuíam mutações em genes da via de HR. Altos escores de tAI foram mostrados prever sensibilidade a agentes de platina em linhagens de células de câncer de mama, em tumores de ovário e tumores triplo negativos (BIRKBAK et al. 2012). Além disso, tumores com mutação, metilação do promotor ou baixos níveis dos

transcritos *BRCA1* ou *BRCA2* apresentaram maior escore de tAI do que tumores sem deficiência de *BRCA1/2*. Os autores encontraram diferença estatisticamente significativa entre altos valores de tAI e mutações nesses genes (BIRKBAK et al. 2012). Quatro dos nossos casos apresentaram mutação em genes da via de HR, mas não apresentaram valores acima da mediana para os tAI nos CIM, porém analisando os valores dos três escores, apenas um caso (CIM14) com mutação não apresentou nenhum dos escores acima dos limites. No estudo de BIRKBAK et al. (2012) os valores de tAI conseguem prever a sensibilidade a platina com 90% de sensibilidade.

O escore LST, utilizando o limiar de 15 (POPOVA et al. 2012), apresentou valores acima deste valor em 14 casos, dos quais 13 eram mutados para os genes da via de HR e um (CIM08) não apresentou mutação, mas seu valor de escore de LST estava acima do valor limite. Este caso, poderia, portanto, ter outro mecanismo de inativação de *BRCA1/2*, como metilação. A comparação entre os grupos com altos valores de LST e mutação apresentou diferença significativa. A medida de LST foi relacionada a HRD e este limiar de 15 proposto por POPOVA et al. (2012) foi capaz de prever a inativação (por mutação ou evento epigenético) de *BRCA1/2* em tumores e linhagens celulares do tipo *basal-like*. Portanto, o caso CIM08, no qual não foram encontradas mutações, pode estar sofrendo inativação por metilação ou silenciamento pós-transcricional.

O último escore calculado foi o HRD-LOH, cujo valor limite de 10 foi estabelecido por ABKEVICH et al. (2012), o qual permitiria determinar a

presença da mutação em *BRCA* em 90% das pacientes com câncer de mama e ovário. Interessantemente, apenas três casos apresentaram valores acima de 10. Entretanto, se compararmos os valores deste escore obtidos em pacientes com mutação e os valores de escore em pacientes sem mutação para qualquer gene da via de HR, é observada uma diferença significativa entre os grupos. Estes dados sugerem que um novo valor limiar para HRD-*LOH* deveria ser estabelecido para os CIM ou que esta medida não é a melhor para caracterizar os CIM.

Nós também comparamos os valores medianos dos escores encontrados nos CIM do nosso estudo (nTAI=20,5; LST=23 e HRD-*LOH*=2,5) com aqueles descritos por MARQUARD et al. (2015) para carcinomas de mama (nTAI=12; LST=8 e HRD-*LOH*=8). Nessa análise, todos exceto HRD-*LOH* eram superiores nos CIM o que sugere que estes tumores apresentam uma assinatura de deficiência de recombinação homóloga diferente dos demais carcinomas de mama. Este achado pode abrir novas oportunidades de tratamento para os CIM.

Embora os valores dos escores para os CIM não tenham atingido a sensibilidade descrita na literatura para câncer de mama, a análise dos valores em conjunto, sugerem que estes escores são preditores de deficiência da via de recombinação homóloga nos CIM, independente do gene mutado e portanto, a terapia com agentes de platina seria uma alternativa terapêutica para estes tumores.

Como a HRD pode também desencadear outras formas de reparo, que são propensas a erros, incluindo junção terminal não homóloga

canônica (C-NHEJ) e junção de extremidade não homóloga alternativa (Alt-NHEJ), também chamada de junção terminal mediada por microhomologia (MMEJ), podendo levar a translocações e alterações no número de cópias e a um padrão característico de reparo, formando uma cicatriz genômica.

O estudo das cicatrizes genômicas (*genomic scars*), como um indicador de instabilidade genômica gerada por HRD, tem atraído interesse nos últimos anos após o reconhecimento de sua relevância na avaliação dos tumores quanto sua heterogeneidade, resistência ao tratamento e resposta do paciente (WATKINS et al. 2014). Em uma análise de comparação (curva de Kaplan-Maier) entre os pacientes que apresentaram mutação nos genes da via de HR e pelo menos um valor de escore acima do limite, com os pacientes sem mutação e nenhum valor de escore acima do limite, as curvas de sobrevida global mostraram diferença significativa quanto ao escore HRD, indicando que além dos escores apresentarem valor preditivo, também podem ter valor prognóstico nos CIM.

O cálculo dos escores de HRD é uma ferramenta que tem sido utilizada para orientar novas opções terapêuticas. A observação de que as células tumorais deficientes na recombinação homóloga são sensíveis ao tratamento com platina e com os inibidores de PARP (BRYANT et al. 2005; FARMER et al. 2005) pode levar ao desenvolvimento de terapias PARP específicas para os CIM, por sugerir o fenótipo *BRCAness* (TURNER et al. 2004). Assim, mesmo os casos negativos para mutações em *BRCA1/2* mas com altos escores podem se beneficiar do tratamento.

Em nosso estudo, também foi calculado o Índice de Instabilidade

Genômica (GII), o qual apresentou uma mediana de 0,363 e 14 casos apresentaram valores superiores a esta mediana. MARQUARD et al. (2015), analisando os dados de GII do TCGA, relataram um valor mediano de 0,435 para os carcinomas de mama. Apesar de encontrarmos uma mediana menor para o GII, foram detectados altos valores naqueles casos com mutações em genes da via de HR e MMR. BONNET et al. (2012) encontraram uma relação entre os valores alterados de GII e o prognóstico desfavorável em tumores de mama, além de uma correlação positiva entre os valores de GII e a ocorrência de mutações em *TP53*. Em nossos casos, altos valores de GII foram observadas tanto nos casos com mutação em *TP53* como nos sem mutação, observando-se, também que tanto os casos com sobrevida baixa como aqueles com alta apresentavam valores altos de GII. Um exemplo, foi o CIM04, que apresentou mutação em *ATM*, $GII=0,640$, vivo ao follow-up (71 meses de sobrevida até a presente data) e ausência de metástase ao diagnóstico. Por outro lado, o caso CIM13, que também apresentou mutação em *ATM*, $GII=0,043$, foi a óbito 7 meses após o diagnóstico onde já foi identificada metástase. Nossos resultados sugerem que nos CIM, a correlação sugerida por BONNET et al. (2012) não é aplicável.

6 CONCLUSÃO

- 1 Foram identificadas alterações genômicas previamente descritas nos CIM, incluindo ganhos em 1q32.1, 8q21.3-8q24 e perdas em 17p13.1-p13.3. Entre as alterações mapeadas em 8q, encontra-se ganhos do oncogene *MYC* e *SQLÉ*. O gene *SQLÉ* codifica uma proteína que participa da via da biossíntese do colesterol, recentemente relatada como envolvida nos CIM.
- 2 As *cnLOHs* foram comuns, principalmente em 3p26.3 e 6q22.31. Estas regiões foram também detectados em perdas e ganhos, sugerindo o envolvimento de genes supressores de tumor e oncogenes aí mapeados e que podem contribuir para o fenótipo dos CIM.
- 3 Foram identificadas várias moléculas que podem estar contribuindo com o escape tumoral à resposta imunológica inata e adaptativa. Entre elas estão a amplificação dos genes *CD46*, *CD55* e *CR1*. Estes genes podem estar diretamente relacionados com a resposta imunológica nos CIM. Estudos funcionais devem ser delineados para explorar estes achados como potenciais alvos terapêuticos.
- 4 As deleções homozigotas, um raro evento, foram observadas para os genes *TP63*, *ADAM3A*, *ADAM5* e *CSMD1*. Em especial, o gene *TP63* tem potencial para atuar como supressor de tumor nos CIM.

- 5 Foram observados eventos de cromotripsis os quais foram relacionados a estresse na replicação implicando na ativação de oncogenes e erros de reparo de dupla fita.
- 6 A comparação entre as alterações genômicas com as características clínicas e histopatológicas, revelou o envolvimento de alguns genes como *CHD1L* e *S100* nos CIM triplo negativos; *MCM4* e *CEPD* nos CIM com história familiar positiva; *PFKM* nos CIM que foram diagnosticados na pré-menopausa; *PVT1* nos CIM com metástase ao diagnóstico; *HLX* e *PKIA* foram associados a morte em menos de dois anos.
- 7 A análise do perfil mutacional revelou variantes patogênicas no gene *TP53*, corroborando com os estudos em CIM. Foi também observada alta frequência de variantes patogênicas em *BRCA2*, pouco frequente nos relatos da literatura.
- 8 Foram detectadas mutações nos genes da via do reparo por mal pareamento (MMR) em um número significativo de casos, o que justificaria o uso de inibidores de PD-1 nestas pacientes.
- 9 Altos valores dos escores nTAI, LST e HRD-LOH, preditores de deficiência da via de recombinação homóloga, foram associados com prognóstico desfavorável e baixa sobrevida. Estes achados foram concordantes com as mutações detectadas nos genes da via de HR. Com isso, pacientes CIM são candidatos a tratamento com análogos de platina e inibidores de *PARP*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abkevich V, Timms KM, Hennesy BT, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. **Br J Cancer** 2012; 107:1776-82.

Ahomadegbe JC, Tourpin S, Kaghad M, et al. Loss of heterozygosity, allele silencing and decreased expression of p73 gene in breast cancers: prevalence of alterations in inflammatory breast cancers. **Oncogene** 2000; 19:5413-8.

Akay CL, Ueno NT, Chisholm GB, et al. Primary tumor resection as a component of multimodality treatment may improve local control and survival in patients with stage IV inflammatory breast cancer. **Cancer** 2014; 120:1319-28.

Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12, 439 patients. **Ann Oncol** 2014; 25:1536-43.

Almal SH, Padh H. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. **J Hum Genet** 2012; 57:6-13.

Alpaugh ML, Tomlinson JS, Shao ZM, Barsky SH. A Novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. **Cancer Res** 1999; 59:5079-84.

Alpaugh ML, Tomlinson JS, Kasraeian S, Barsky SH. Cooperative role of E-cadherin and sialyl-Lewis X/A-deficient MUC1 in the passive dissemination of tumor emboli in inflammatory breast carcinoma. **Oncogene** 2002; 21:3631-43.

Amin MB, Edge SB, Greene F, et al. **AJCC cancer staging manual**. 8th ed. New York: Springer; 2017. Breast neoplasms; p.1032.

Ahsan H, Halpern J, Kibriya MG, et al. A genome-wide association study of early-onset breast cancer identifies PFKM as a novel breast cancer gene and supports a common genetic spectrum for breast cancer at any age. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:658-69.

Aziz SA, Pervez S, Khan S, Kayani N, Azam SI, Rahbar MH. Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. **Breast J** 2001; 7:398-404.

Badie S, Escandell JM, Bouwman P, et al. BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. **Nat Struct Mol Biol** 2010; 17:1461-9.

Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. **J Pathol** 2001; 195:422-8.

Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, Wang SA. The genetic association database. **Nat Genet** 2004; 36:431-2.

Bekhouche I, Finetti P, Adelaïde J, et al. High-resolution comparative genomic hybridization of inflammatory breast cancer and identification of candidate genes. **PLoS One** 2011; 6:e16950.

Bellazzo A, Sicari D, Valentino E, Del Sal G, Collavin L. Complexes formed by mutant p53 and their roles in breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)** 2018; 10:101-12.

Benson JR, Jatol I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. **Lancet** 2009; 373:1463-79.

Beroukhi R, Mermel CH, Porter D. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature** 2010; 463:899-905.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. **Cancer Res** 2004; 64:8558-65.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. **Cancer Res** 2005; 65:2170-8.

Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Viens P. Gene expression profiling of inflammatory breast cancer. **Cancer** 2010; 116(11 suppl):2783-93.

Bertucci F, Finetti P, Vermeulen P, et al. Genomic profiling of inflammatory breast cancer: a review. **Breast** 2014; 23:538-45.

Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. **Oncotarget** 2015; 30:6.

Bianchini G, Kiermaier A, Bianchi GV, et al. Biomarker analysis of the NeoSphere study: pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel versus trastuzumab plus docetaxel, pertuzumab plus trastuzumab, or pertuzumab plus docetaxel for the neoadjuvant treatment of HER2- positive breast cancer. **Breast Cancer Res** 2017;19:16.

Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY, et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. **Cancer Discovery** 2012; 2:366-75.

Blaas L, Pucci F, Messal HA, et al. Lgr6 labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. **Nat Cell Biol** 2016; 18:1346-56.

Boersma BJ, Reimers M, Yi M, et al. A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. **Int J Cancer** 2008; 122:1324-32.

Bonnet F, Guedj M, Jones N, et al. An array CGH based genomic instability index (G2I) is predictive of clinical outcome in breast cancer and reveals a subset of tumors without lymph node involvement but with poor prognosis. **BMC Med Genomics** 2012; 5:54.

Boussen H, Bouzaine H, Hassouna JB, Gamoudi A, Benna F, Rahal K. Inflammatory breast cancer in Tunisia: reassessment of incidence and clinicopathological features. **Semin Oncol** 2008; 35:17-24.

Braun I, Mietzsch F, Seibold P, et al. Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. **Modern pathol** 2013; 26:1161-71.

Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1849:506-16.

Brown DN, Caffa I, Cirmena G, et al. Squalene epoxidase is a bona fide oncogene by amplification with clinical relevance in breast cancer. **Sci Rep** 2016; 6:19435.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **Nature** 2005; 434:913-7.

Cai H, Kumar N, Bagheri HC, von Mering C, Robinson MD1, Baudis M. Chromotripsis-like patterns are recurring but heterogeneously screens. **BMC Genom** 2014; 15-82.

Caldarella A, Cuzzoni C, Crocetti E, et al. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:617-23.

Cancer Research UK. **Breast cancer incidence (invasive) statistics**. Available from: <URL:<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/incidence-invasive#-heading-One>> [2018 jan 12]

Chang S, Parker SM, Pham T, et al. Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the Surveillance, Epidemiology, and End Results program of the National Cancer Institute, 1975±1992. **Cancer**. 1998; 82:2366±2372.

Chang LY, Liu LY, Roth DA, et al. The major prognostic features of nuclear receptor NR5A2 in infiltrating ductal breast carcinomas. **Int J Genomics** 2015; 2015:403576.

Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Viens P, Bertucci F. Defining the molecular biology of inflammatory breast cancer. **Semin Oncol** 2008; 35:41-50.

Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression. **Expert Rev Anticancer Ther** 2008; 8:1689-98.

Chen Y, Peng Y, Fan S, Li Y, Xiao ZX, Li C. A double dealing tale of p63: an oncogene or a tumor suppressor. **Cell Mol Life Sci** 2018; 75:965-973.

Chen YY, Li CF, Yeh CH, Chang MS, Hsing CH. Interleukin-19 in breast cancer. **Clin Dev Immunol** 2013; 2013:294320.

Chen Q, Zhang XH, Massagué J. Macrophage binding to receptor VCAM1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. **Cancer Cell** 2011; 20:538-54.

Chen Y, Xu J, Borowicz S, Collins C, Huo D, Olopade OI. c-Myc activates BRCA1 gene expression through distal promoter elements in breast cancer cells. **BMC Cancer** 2011; 11:246.

Cheng C, Cui H, Zhang L, et al. Genomic analyses reveal FAM84B and the NOTCH pathway are associated with the progression of esophageal squamous cell carcinoma. **Gigascience** 2016; 5:1.

Chevallier B. Inflammatory breast cancer. **Bull Cancer** 1993; 80:1024-34.

Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, et al. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. **Genome Biol** 2007; 8:R215.

Cingolani P, Platts A, Wang le L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly (Austin)** 2012; 6:80-92.

Cohen EN, Gao H, Anfossi S, et al. Inflammation mediated metastasis: immune induced epithelial-to-mesenchymal transition in inflammatory breast cancer cells. **PLoS ONE** 2015; 10:e0132710.

Colak D, Nofal A, Albakheet A, et al. Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women. **PLoS One** 2013; 8:e63204.

Conrad DF, Bird C, Blackburne B, et al. Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. **Nat Genet** 2010; 42:385-91.

Corben AD. Pathology of invasive breast disease. **Surg Clin North Am** 2013; 93:363-92.

D'Arcy M, Fleming J, Robinson WR, Kirk EL, Perou CM, Troester MA. Race-associated biological differences among Luminal A breast tumors. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 152:437-48.

Datta J, Berk E, Xu S, et al. Anti-HER2 CD4(+) T-helper type 1 response is a novel immune correlate to pathologic response following neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer Res** 2015; 17:71.

Dawood S, Merajver SD, Viens P, et al. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. **Ann Oncol** 2011; 22:515-23.

Dawood S, Cristofanilli M. IBC as a rapidly spreading systemic disease: clinical and targeted approaches using the neoadjuvant model. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2015; 2015:56-9.

Depreeuw J, Stelloo E, Osse EM, et al. Amplification of 1q32.1 refines the molecular classification of endometrial carcinoma. **Clin Cancer Res** 2017; 23:7232-41.

DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet** 2011; 43:491-8.

Debeb BG, Gong Y, Atkinson RL, et al. EZH2 expression correlates with locoregional recurrence after radiation in inflammatory breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res** 2014; 33:58.

Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:105-13.

Dirix LY, Van Dam P, Prove A, Vermeulen PB. Inflammatory breast cancer: current understanding. **Curr Opin Oncol** 2006; 18:563-71.

Djurovic S, Gustafsson O, Mattingsdal M, et al. A genome-wide association study of bipolar disorder in Norwegian individuals, followed by replication in Icelandic sample. **J Affect Disord** 2010; 126:312-6.

Drygin D, Ho CB, Omori M, et al. Protein kinase CK2 modulates IL-6 expression in inflammatory breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 415:163-7.

Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 Blockade. **Clin Cancer Res** 2016; 22:813-20.

Edwards D, Handsley M, Pennington C. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med** 2008; 29:258-89.

Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. **Adv Exp Med Biol** 2017; 960:571-606.

Ellsworth RE, Ellsworth DL, Patney HL, et al. Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. **BMC Cancer** 2008; 8:297.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature** 2005; 434:917-21.

Felicio PS, Bidinotto LT, Melendez ME, et al. Genetic alterations detected by comparative genomic hybridization in BRCA1 breast and ovarian cancers of Brazilian population. **Oncotarget** 2018; 9:27525-34.

Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J, Tlsty T, Bishop JM. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:10544-8.

Fontana MC, Marconi M, Feenstra JDM, et al. Chromothripsis in acute myeloid leukemia: biological features and impact on survival. **Leukemia** 2018; 32:1609-20.

Fouad TM, Ueno NT, Yu RK, 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** 2018; 13(9): e0204372.

Fouad TM, Barrera AMG, Reuben JM, et al. Inflammatory breast cancer: a proposed conceptual shift in the UICC-AJCC TNM staging system. **Lancet Oncol** 2017; 18:e228-e32.

Gabitova L, Gorin A, Astsaturov I. Molecular pathways: sterols and receptor signaling in cancer. **Clin Cancer Res** 2014; 20:28-34.

Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Ghosh Choudhury G. Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NFkappaB to inhibit breast cancer cell growth. **Cell Signal** 2010; 22:749-58.

Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. **Lancet Oncol** 2016; 17:791-800.

Glendenning J, Tutt A. PARP inhibitors--current status and the walk towards early breast cancer. **Breast** 2011; 20 Suppl 3:S12-9.

Goh JY, Feng M, Wang W, et al. Chromosome 1q21.3 amplification is a trackable biomarker and actionable target for breast cancer recurrence. **Nat Med** 2017; 23:1319-30.

Gopalan A, Yu W, Sanders BG, Kline K. Simvastatin inhibition of mevalonate pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. **Cancer Lett** 2013; 329:9-16.

Groen JN, Capraro D, Morris KV. The emerging role of pseudogene expressed non-coding RNAs in cellular functions. **Int J Biochem Cell Biol** 2014; 54:350-5.

Groheux D, Giacchetti S, Delord M, et al. 18F-FDG PET/CT in staging patients with locally advanced or inflammatory breast cancer: comparison to conventional staging. **J Nucl Med** 2013; 54:5-11.

Guo X, Keyes WM, Papazoglu C, et al. TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. **Nat Cell Biol** 2009; 11:1451-7.

Hall CS, Debeb BG, Xu W, et al. Novel inflammatory breast cancer cell line, MDA-IBC-1 expresses and secretes WISP3, a putative tumor suppressor in inflammatory breast cancer [abstract]. **Cancer Res** 2009; 69(Suppl.):1051. [Presented at AACR Annual Meeting; 2009 Apr 18-22; Denver, CO].

Hamm CA, Moran D, Rao K, et al. Genomic and immunological tumor profiling identifies targetable pathways and extensive CD8+/PDL1+ immune infiltration in inflammatory breast cancer tumors. **Mol Cancer Ther** 2016; 15:1746-56.

Han SL, Xu C, Wu XL, Li JL, Liu Z, Zeng QQ. The impact of expressions of CD97 and its ligand CD55 at the invasion front on prognosis of rectal adenocarcinoma. **Int J Colorectal Dis** 2010; 25:695-702.

Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:966-75.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. **Nat Rev Genet** 2009; 10:551-64.

He Z, Wu H, Jiao Y, Zheng J. Expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in pancreatic cancer. **Oncol Lett** 2015; 9:793-7.

Helms MW, Kemming D, Pospisil H, et al. Squalene epoxidase, located on chromosome 8q24.1, is upregulated in 8q+ breast cancer and indicates poor clinical outcome in stage I and II disease. **Br J Cancer** 2008; 99:774-80.

Hsing CH, Cheng HC, Hsu YH, et al. Upregulated IL-19 in breast cancer promotes tumor progression and affects clinical outcome. **Clin Cancer Res** 2012; 18:713-25.

Hsu YH, Hsing CH, Li CF, et al. Anti-IL-20 monoclonal antibody suppresses breast cancer progression and bone osteolysis in murine models. **J Immunol** 2012; 188:1981-91.

Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. **Nature** 2012; 491:259-63.

Il'yasova D, Siamakpour-reihani AI, Akushevich L, Akushevich L, Spector N, Schildkraut J. What can we learn from the age-and race/ethnicity-specific rates of inflammatory breast carcinoma? **Breast Cancer Res Treat** 2011; 130:691-7.

Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review. **J Clin Oncol** 1992; 10:1014-24.

Jalava SE, Porkka KP, Rauhala HE, Isotalo J, Tammela TL, Visakorpi T. TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells. **Int J Cancer** 2009; 124:95-102.

Jimenez AM, Growney A, Behrens G, et al. Comprehensive genomic profiling of inflammatory breast cancer cases reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 154:155-62.

Jones MJ, Jallepalli PV. Chromothripsis: chromosomes in crisis. **Dev Cell** 2012; 23:908-17.

Kamal M, Holliday DL, Morrison EE, Speirs V, Toomes C, Bell SM. Loss of CSMD1 expression disrupts mammary duct formation while enhancing proliferation, migration and invasion. **Oncol Rep** 2017; 38:283-92.

Kertmen N, Babacan T, Keskin O, et al. Molecular subtypes in patients with inflammatory breast cancer; a single center experience. **J BUON** 2015; 20:35-9.

Kesselring R, Thiel A, Pries R, et al. The complement receptors CD46, CD55 and CD59 are regulated by the tumour microenvironment of head and neck cancer to facilitate escape of complement attack. **Eur J Cancer** 2014; 50:2152-61.

Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. **Mol Oncol** 2010; 4:255-66.

Kim S, Moon BI, Lim W, Park S, Cho MS, Sung SH. Feasibility of classification of triple negative breast cancer by immunohistochemical surrogate markers. **Clin Breast Cancer** 2018; 18:e1123-e32.

Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. **Cell** 2013; 152:1226-36.

Korobeinikova E, Myrzaliyeva D, Ugenskiene R, et al. The prognostic value of IL10 and TNF alpha functional polymorphisms in premenopausal early-stage breast cancer patients. **BMC Genet** 2015; 16:70.

Kress TR, Sabò A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:593-607.

Kumar A1, Xu J, Brady S, et al. Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells. **PLoS One** 2010; 5:e13390.

Kumar Y, Yang J, Hu T, et al. Massive interstitial copy-neutral loss-of-heterozygosity as evidence for cancer being a disease of the DNA-damage response. **BMC Med Genomics** 2015; 8:42.

Lacerda L, Debeb BG, Smith D, et al. Mesenchymal stem cells mediate the clinical phenotype of inflammatory breast cancer in a preclinical model. **Breast Cancer Res** 2015; 17:42.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. **WHO classification of tumours of the breast**. 4th ed. Lion: World Health Organization; 2012. (WHO Classification of Tumours 2012 Volume 4. IARC WHO Classification of Tumours, No 4).

Langie SA, Koppen G, Desaulniers D, et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis** 2015; 1:S61-88.

Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. Quality of life during olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer. **Br J Cancer** 2016; 115:1313-20.

Lee J, Bartholomeusz C, Mansour O, et al. A class I histone deacetylase inhibitor, entinostat, enhances lapatinib efficacy in HER2- overexpressing breast cancer cells through FOXO3-mediated Bim1 expression. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 146:259-72.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature** 2016; 536:285-91.

Lerebours F, Bertheau P, Bieche I, et al. Evidence of chromosome regions and gene involvement in inflammatory breast cancer. **Int J Cancer** 2002; 102:618-22.

Lerebours F, Bertheau P, Bieche I, et al. Two prognostic groups of inflammatory breast cancer have distinct genotypes. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4184-9.

Letessier A, Birnbaum D, Debatisse M, Chaffanet M. Genome: does a paucity of initiation events lead to fragility? **Med Sci (Paris)** 2011; 27:707-9.

Levine P, Steinhorn S, Ries L, Aron JL. Inflammatory breast cancer. The experience of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. **J Natl Cancer Inst** 1985; 74:291-4.

Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Br J Cancer** 2007; 96:11-5.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 2009; 25:1754-60.

Li J, Gonzalez-Angulo AM, Allen PK, et al. Triple- negative subtype predicts poor overall survival and high locoregional relapse in inflammatory breast cancer. **Oncologist** 2011; 16:1675-83.

Li Y, Casey SC, Felsner DW. Inactivation of MYC reverses tumorigenesis. **J Intern Med** 2014; 276:52-60.

Liang X, Vacher S, Boulai A, et al. Targeted next-generation sequencing identifies clinically relevant somatic mutations in a large cohort of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res** 2018; 20:88.

Lim B, Woodward WA, Wang X, Reuben JM, Ueno NT. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. **Nat Rev Cancer** 2018; 18:485-99.

Liu C, Huang Z, Wang Q, et al. Usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in hormone-receptor-negative breast cancer. **Onco Targets Ther** 2016; 9:4653-60.

Liu J, Chen K, Jiang W, et al. Chemotherapy response and survival of inflammatory breast cancer by hormone receptor-and HER2-defined molecular subtypes approximation: an analysis from the National Cancer Database. **J Cancer Res Clin Oncol** 2017; 143:161-8.

Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:1680-5.

Liu W, Xu J, Zhang C. Prognostic role of chromodomain helicase DNA binding protein 1-like protein in human solid cancers: a meta-analysis. **Medicine (Baltimore)** 2018; 97:e11522.

Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. **Ann Oncol** 2014; 25:1544-50.

Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:110-20.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. **Nature** 2004; 432:307-15.

Maciejczyk A, Szelachowska J, Szynglarewicz B, et al. CD46 Expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2011; 19:540-6.

Manai M, Thomassin-Piana J, Gamoudi A, et al. MARCKS protein overexpression in inflammatory breast cancer. **Oncotarget** 2017; 8:6246-57.

Mani SA, Yang J, Brooks M, et al. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:10069-74.

Mariño-Enríquez A, Dal Cin P. ALK as a paradigm of oncogenic promiscuity: different mechanisms of activation and different fusion partners drive tumors of different lineages. **Cancer Genet** 2013; 206:357-73.

Marquard AM, Eklund AC, Joshi T, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar signatures associated with homologous recombination deficiency suggests novel indications for existing cancer drugs. **Biomark Res** 2015; 3:9.

Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al. Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. **Breast Cancer Res** 2013; 15:R112.

Masuda H, Brewer TM, Liu DD, et al. Long-term treatment efficacy in primary inflammatory breast cancer by hormonal receptor-and HER2-defined subtypes. **Ann Oncol** 2014; 25:384-91.

Matsuda N, Lim B, Wang Y, et al. Identification of frequent somatic mutations in inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 163:263-72.

Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:812-22.

Mccarthy NJ, Yang X, Linnoila IR, et al. Microvessel density, expression of estrogen Receptor MIB-1, p53, and c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3857-62.

Mego M, Gao H, Cohen E, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) are associated with defects in adaptive immunity in patients with inflammatory breast cancer. **J Cancer** 2016; 7:1095-104.

Meng ZW, Liu MC, Hong HJ, Du Q, Chen YL. Expression and prognostic value of soluble CD97 and its ligand CD55 in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317694319.

Menghi F, Inaki K, Woo X, et al. The tandem duplicator phenotype as a distinct genomic configuration in cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2016; 113:E2373-82.

Menta A, Fouad TM, Lucci A, et al. Inflammatory breast cancer: what to know about this unique, aggressive breast cancer. **Surg Clin North Am** 2018; 98:787-800.

Merajver SD, Weber BL, Cody R, et al. Breast conservation and prolonged chemotherapy for locally advanced breast cancer: the University of Michigan experience. **J Clin Oncol** 1997; 15:2873-81.

Mills D, Gordon EJ, Casano A, et al. The physiology of the normal human breast: an exploratory study. **J Physiol Biochem** 2011; 67:621-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2018. Disponível em: <URL:<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. [2018 fev 15]

Moslehi R, Freedman E, Zeinomar N, Veneroso C, Levine PH. Importance of hereditary and selected environmental risk factors in the etiology of inflammatory breast cancer: a case-comparison study. **BMC Cancer** 2016; 16:334.

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results program. **Radiation/Chemotherapy Databases**. Available from: <URL:<https://seer.cancer.gov/data/treatment.html>>. [2017 abr. 16].

Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. **Science** 2013; 342:1094-8.

Ni Choileain S, Hay J, Thomas J, et al. TCR-stimulated changes in cell surface CD46 expression generate type 1 regulatory T cells. **Sci Signal** 2017; 10:eaah6163.

Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. **Nature** 2016; 534:47-54.

Oladapo HO, Tarpley M, Sauer SJ, et al. Pharmacological targeting of GLI1 inhibits proliferation, tumor emboli formation and in vivo tumor growth of inflammatory breast cancer cells. **Cancer Lett** 2017; 411:136-49.

Orzol P, Nekulova M, Holcakova J, Muller P, Votsek B, Coates PJ. Δ Np63 regulates cell proliferation, differentiation, adhesion, and migration in the BL2 subtype of basal-like breast cancer. **Tumour Biol** 2016; 37:10133-40.

Paul S, Biswas A, Sasmal K, Mukherjee S, Biswas T, Biswas R. IL-10 alters prolactin receptor activity emulating that during breast cancer. **Cytokine** 2010; 51:144-50.

Parris TZ, Kovács A, Hajizadeh S, et al. Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. **Oncogenesis** 2014; 3:e95.

Parton M, Dowsett M, Ashley S, Hills M, Lowe F, Smith IE. High incidence of HER-2 positivity in inflammatory breast cancer. **Breast** 2004; 13:97-103.

Pico-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, et al. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA Cancer J Clin** 2017, 9;67(5):378-397.

Piotrowski A, Bruder CE, Andersson R, et al. Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. **Hum Mutat** 2008; 29:1118-24.

Piragyte I, Clapes T, Polyzou A, et al. A metabolic interplay coordinated by HLX regulates myeloid differentiation and AML through partly overlapping pathways. **Nat Commun** 2018; 9:3090.

Pitroda SP1, Khodarev NN, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:5837-41.

Pereira CB, Leal MF, de Souza CR , et al. Prognostic and predictive significance of MYC and KRAS alterations in breast cancer from women treated with neoadjuvant chemotherapy. **PLoS One** 2013; 8:e60576.

Pereira B, Chin SF, Rueda OM, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. **Nat Commun** 2016; 7:11479.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature (Lond)** 2000; 406:747-52.

Popova T, Manie E, Rieunier G, et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. **Cancer Res** 2012; 72:5454-62.

Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:R68.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 2011; 5:5-23.

Prat A, Cruz C, Hoadley KA, et al. Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 147:185-91.

Przybytkowski E, Lenkiewicz E, Barrett MT, et al. Chromosome-breakage genomic instability and chromothripsis in breast cancer. **BMC genomics** 2014; 15:579.

Putchá P, Yu J, Rodríguez-Barrueco R, et al. HDAC6 activity is a non-oncogene addiction hub for inflammatory breast cancers. **Breast Cancer Res** 2015; 17:149.

Remo A, Simeone I, Pancione M, et al. Systems biology analysis reveals NFAT5 as a novel biomarker and master regulator of inflammatory breast cancer. **J Transl Med** 2015; 13:138.

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med** 2015; 17:405-24.

Robbins GF, Shah J, Rosen PP. Inflammatory carcinoma of the breast. **Surg Clin North Am** 1974; 54:801-10.

Robertson FM, Bondy M, Yang W, et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:351-75.

Robertson FM, Petricoin Iii EF, van Laere SJ, et al. Presence of anaplastic lymphoma kinase in inflammatory breast cancer. **Springerplus** 2013; 2:497.

Rodríguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: Possible role tumor progression. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1826:23-31.

Rody A, Holtrich U, Pusztai L, et al. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. **Breast Cancer Res** 2009; 11:R15.

Rosa FE, Silveira SM, Silveira CG, et al. Quantitative real-time RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. **BMC Cancer** 2009; 9:90.

Rosa FE, Santos RM, Rogatto SR, Domingues MA. Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. **Braz J Med Biol Res** 2013; 46:207-16.

Ross JS, Ali SM, Wang K, et al. Comprehensive genomic profiling of inflammatory breast cancer cases reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 154:155-62.

Safaei M, Clark AJ, Oh MC, et al. Overexpression of CD97 confers an invasive phenotype in glioblastoma cells and is associated with decreased survival of glioblastoma patients. **PLoS One** 2013; 8:e62765.

Santagata S, Thakkar A, Ergonul A, et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. **J Clin Invest** 2014; 124:859-70.

Santarpia L, Bottai G, Kelly CM, Gyórfy B, Székely B, Pusztai L. Deciphering and targeting oncogenic mutations and pathways in breast cancer. **Oncologist** 2016; 21:1063-78.

Schairer C, Li Y, Frawley P, et al. Risk factors for inflammatory breast cancer and other invasive breast cancers. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:1373-84.

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol** 2010; 23:S60–S4.

Scully R, Xie A, Nagaraju G. Molecular functions of BRCA1 in the DNA damage response. **Cancer Biol Ther** 2004; 3:521-7.

Shang Y, Chai N, Gu Y, et al. Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2014; 138:910-9.

Sherbenou DW, Aftab BT, Su Y, et al. Antibody-drug conjugate targeting CD46 eliminates multiple myeloma cells. **J Clin Invest** 2016; 126:4640-53.

Silvera D, Arju R, Darvishian F. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. **Nat Cell Biol** 2009; 11:903-8.

Singel SM, Cornelius C, Zaganjor E, et al. KIF14 promotes AKT phosphorylation and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer. **Neoplasia** 2014; 16:247-56.

Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, et al. A biallelic mutation in the homologous recombination repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 2017; 102:681-8.

Soliman AS, Banerjee M, Lo AC, et al. High proportion of inflammatory breast cancer in the population-based cancer registry of Gharbiah, Egypt. **Breast J** 2009; 15:432-4.

Sorlie T, Tibshirani R., Parker J. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8418-23.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirami, R, et al. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implication. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annu Rev Med** 2010; 61:437-55.

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell** 2011; 144:27-40.

Stopsack KH, Gerke TA, Sinnott JA, et al. Cholesterol metabolism and prostate cancer lethality. **Cancer Res** 2016; 76:4785-90.

Su X, Chakravarti D, Flores ER. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:136-43.

Sui Z, Zhou J, Cheng Z, Lu P. Squalene epoxidase (SQLE) promotes the growth and migration of the hepatocellular carcinoma cells. **Tumour Biol** 2015; 36:6173-9.

Tardivon AA, Viala J, Corvellec AR, Guinebretiere JM, Vanel D. Mammosgraphic patterns of inflammatory breast carcinoma: a retrospective study of 92 cases. **Eur J Radiol** 1997; 24:124-30.

Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, et al. Phase II study of gemcitabine, carboplatin, and iniparib as neoadjuvant therapy for triple-negative and BRCA1/2 mutation-associated breast cancer with assessment of a tumor-based measure of genomic instability: PrECOG 0105. **J Clin Oncol** 2015; 33:1895-901.

Tessema M, Willink R, Do K, et al. Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25. **Cancer Res** 2008; 68:1707-14.

Thomas LR, Foshage AM, Weissmiller AM, Tansey WP. The MYC-WDR5 nexus and cancer. **Cancer Res** 2015; 75:4012-5.

Thomas ZI, Gibson W, Sexton JZ, et al. Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration. **Br J Cancer** 2011; 104:1575-86.

Thompson PA, Brewster AM, Kim-Anh D, et al. Selective genomic copy number imbalances and probability of recurrence in early-stage breast cancer. **PLoS One** 2011; 6:1-14.

Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, et al. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. **Breast Cancer** 2012; 19:161-9.

Tubio JM, Estivill X. Cancer: when catastrophe strikes a cell. **Nature** 2011; 470:476-7.

Tuna M, Ju Z, Smid M, Amos CI, Mills GB. Prognostic relevance of acquired uniparental disomy in serous ovarian cancer. **Mol Cancer** 2015; 14:29.

Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:814-9.

van Golen KL, Davies S, Wu ZF, et al. A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoGTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2511e9.

van Laere SJ, van den Eynden GG, van der Auwera I. Identification of cell-of-origin breast tumor subtypes in inflammatory breast cancer by gene expression profiling. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 95:243-55.

van Uden DJ, van Laarhoven HW, Westenberg AH, de Wilt JH, Blanken-Peeters CF. Inflammatory breast cancer: an overview. **Crit Rev Oncol Hematol** 2015; 93:116-26.

Walshe JM, Swain SM. Clinical aspects of inflammatory breast cancer. **Breast Dis** 2005; 22:35-44.

Wang D, Xu J, Shi G, et al. Molecular markers' progress of breast cancer treatment efficacy. **J Cancer Res Ther** 2015; 11 Suppl 1:C11-5.

Wang J, Kitajima I. Pitavastatin inactivates NF-kappaB and decreases IL-6 production through Rho kinase pathway in MCF-7 cells. **Oncol Rep** 2007; 17:1149-54.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Res** 2010; 38:e164.

Wang YH, Wu WJ, Wang WJ, et al. CEBPD amplification and overexpression in urothelial carcinoma: a driver of tumor metastasis indicating adverse prognosis. **Oncotarget** 2015; 6:31069-84.

Wang Y, Yang YJ, Wang Z, et al. CD55 and CD59 expression protects HER2-overexpressing breast cancer cells from trastuzumab-induced complement-dependent cytotoxicity. **Oncol Lett** 2017; 14:2961-9.

Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt AN. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. **Breast Cancer Res** 2014; 16:211.

Wen M, Kwon Y, Wang Y, Mao JH, Wei G. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. **Oncotarget** 2015; 6:25226-39.

Wilhelm T, Magdalou I, Barascu A Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:763-8.

Wilke CM, Braselmann H, Hess J, et al. A genomic copy number signature predicts radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. **Int J Cancer** 2018; 143:1505-15.

Wingo PA, Jamison PM, Young JL, Gargiullo P. Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States). **Cancer Causes Control** 2004; 15:321-8.

Wolfe AR, Debeb BG, Lacerda L, et al. Simvastatin prevents triple-negative breast cancer metastasis in pre-clinical models through regulation of FOXO3a. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 154:495-508.

Wolfe AR, Trenton NJ, Debeb BG, et al. Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models. **Oncotarget** 2016; 7:82482-92.

Wong N, Gu Y, Kapoor A, et al. Upregulation of FAM84B during prostate cancer progression. **Oncotarget** 2017; 8:19218-35.

Woodward WA, Krishnamurthy S, Yamauchi H, et al. Genomic and expression analysis of microdissected inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 138:761-72.

Wu J, Lei L, Wang S, Gu D, Zhang J. Immunohistochemical expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in primary gallbladder carcinoma. **J Biomed Biotechnol** 2012; 587672.

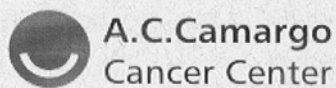
Wu J, Zong Y, Fei X, et al. Presence of CHD1L over-expression is associated with aggressive tumor biology and is a novel prognostic biomarker for patient survival in human breast cancer. **PLoS One** 2014; 9:e98673.

Yamauchi H, Woodward WA, Valero V, et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn. **Oncologist** 2012; 17:891-9.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell** 2004; 117:927-39.

Zheng M, Bocangel D, Doneske B, et al. Human interleukin 24 (MDA-7/IL-24) protein kills breast cancer cells via the IL-20 receptor and is antagonized by IL-10. **Cancer Immunol Immunother** 2007; 56:205-15.

**Anexo 1 - Cartas de aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa-CEP
(A.C.Camargo Cancer Center e Hospital de Câncer de Barretos)**



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 04 de maio de 2016.

À
Dra. Silvia Regina Rogatto

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2121/15
"Identificação de marcadores moleculares no carcinoma inflamatório de mama".**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 19/04/2016, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

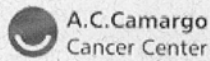
- Emenda ao projeto, em documento datado de 01 de abril de 2016.

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



A.C. Camargo
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores moleculares no carcinoma inflamatório de mama

Pesquisador: Silvia Regina Rogatto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 49669615.5.1001.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.528.105

Apresentação do Projeto:

não se aplica

Objetivo da Pesquisa:

não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foi encaminhado ao CEP solicitação de mudança da Instituição co-participante Hospital do Câncer de Barretos para centro participante, enquadrando o projeto como Multicêntrico.

Houve inclusão no projeto de pesquisa da avaliação da expressão transcricional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP aprovou a Emenda ao projeto, em documento datado de 01 de abril de 2016.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 1.528.105

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_688913E1.pdf	01/04/2016 11:19:18		Aceito
Outros	levantamento_amstras_sistema_2013_2015.pdf	01/04/2016 11:14:33	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	levantamento_registro_cancer_hospitalar_Barretos.pdf	01/04/2016 11:13:15	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	declaracao_disponibilidade_Patologia_Barretos.pdf	01/04/2016 11:12:35	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	declaracao_ciencia_estudo.pdf	01/04/2016 11:11:46	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	levantamento_amstras_biobanco_Barretos.pdf	01/04/2016 10:55:27	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	declaracao_co_responsabilidade_estudo.pdf	01/04/2016 10:53:10	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	declaracao_responsabilidade_pesquisador.pdf	01/04/2016 10:52:03	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	CadastroProjeto_Pesquisa.pdf	01/04/2016 10:49:13	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	MABIN_atual.pdf	01/04/2016 10:48:37	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	declaracao_fonte_financiamento_Barretos.pdf	01/04/2016 10:47:06	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	Projeto_mama_infla_alterado_emenda1.pdf	01/04/2016 10:45:27	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	carta_emenda.pdf	01/04/2016 10:44:41	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	BIOBANCO_HCB.pdf	03/02/2016 22:44:55	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	TCLE_Barretos.pdf	03/02/2016 22:43:55	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	resposta_USP_Ribeirao.jpg	03/02/2016 22:41:49	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	Carta_resposta_parecer_2.jpg	03/02/2016 22:41:22	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	FORMULARIO_alterado.pdf	03/02/2016 22:39:51	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Outros	Carta_resposta_referente_parecer.pdf	09/12/2015 15:40:24	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_alterado_referente_parecer.docx	09/12/2015 15:36:50	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 07:41:04	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de	DECL_CIENC_COMP_BARRETOS.pdf	09/12/2015	Silvia Regina	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 1.528.105

Pesquisadores	DECL_CIENC_COMP_BARRETOS.pdf	07:39:53	Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECL_CIEN_COMP_PATOLOGIA.pdf	09/12/2015 07:39:28	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto.pdf	30/09/2015 09:36:13	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_destino_material.pdf	24/08/2015 16:53:26	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	24/08/2015 16:52:43	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_masto.pdf	24/08/2015 16:42:44	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculos.pdf	24/08/2015 16:41:55	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_publicacao_dados.jpg	24/08/2015 16:40:57	Silvia Regina Rogatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	24/08/2015 16:40:08	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_conselho.pdf	24/08/2015 16:39:12	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_dados_coletados.jpg	24/08/2015 16:38:39	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_colaborador.pdf	24/08/2015 16:37:44	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	24/08/2015 16:36:59	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	24/08/2015 16:36:12	Silvia Regina Rogatto	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	24/08/2015 16:35:39	Silvia Regina Rogatto	Aceito

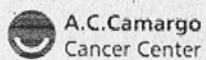
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 1.528.105

SAO PAULO, 04 de Maio de 2016

Assinado por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br