



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAEL CORRÊA COELHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE TROP2 E ALDH1A1  
EM TUMORES LUMINAIS NÃO METASTÁTICOS DA MAMA

Porto Alegre

2023

RAFAEL CORRÊA COELHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE TROP2 E  
ALDH1A1 EM TUMORES LUMINAIS NÃO METASTÁTICOS DA MAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Silveira Graudenz

Co-Orientadora: Prof. Dra. Rubia Denise Ruppenthal

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

COELHO, RAFAEL CORREA

Avaliação da expressão imunohistoquímica de TROP2 e ALDH1A1 em tumores luminais não metastáticos da mama / RAFAEL CORREA COELHO. -- 2023.

83 f.

Orientadora: MARCIA SILVEIRA GRAUDENZ.

Coorientadora: RUBIA DENISE RUPPENTHAL.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Câncer de mama. 2. TROP-2. 3. ALDH1A1. 4. Luminal. 5. Não metastático. I. GRAUDENZ, MARCIA SILVEIRA, orient. II. RUPPENTHAL, RUBIA DENISE, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RAFAEL CORRÊA COELHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE TROP2 E  
ALDH1A1 EM TUMORES LUMINAIS NÃO METASTÁTICOS DA MAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para a obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em: 5 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

PhD Adriana Vial Roehe  
UFCSPA

PhD Daniela Dornelles Rosa  
UFRGS

PhD José Bines  
INCA

*Dedico esta tese àqueles que sempre me incentivaram e enriquecem minha vida com carinho, amor e afeto: minha esposa Anna Carolina, meu filho Benjamin, meus pais Gilson e Raquel e meus sogros Edson e Heloysa.*

*"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados". – **Mahatma Gandhi***

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Marcia Graudenz, pelos seus ensinamentos, paciência, apoio, incentivo, dedicação e competência. Muito grato sou por ter perseverado e acreditado junto a mim que conseguiríamos chegar até aqui.

À minha co-orientadora, professora Rubia Ruppenthal, por sua expertise, incentivo, críticas construtivas e ensinamentos.

À banca, Prof. Adriana Roehe, Prof. Daniela Rosa, Prof. Jonas Saute e Prof. José Bines.

À Gabriela Remonnato e Emily Pilar pelo seu fundamental apoio na área de execução técnica e organização metodológica, viabilizando a realização deste trabalho.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por seu apoio financeiro e cessão de sua estrutura para executar as técnicas e análises necessárias.

Ao Serviço de Patologia do HCPA por sua receptividade e disponibilizar sua estrutura para execução do projeto.

Aos grandes mentores que tive ao longo de minha trajetória médica e acadêmica que certamente me auxiliaram com seus ensinamentos e exemplos a chegar até aqui.

À minha família que sempre me apoia e incentiva de forma irrestrita.

À minha avó, Generoza, que em momento de dúvida em minha adolescência afirmou que eu deveria ser médico por esta ser minha vocação.

## RESUMO

**Introdução:** Trop-2 é uma glicoproteína transmembrana transdutora de sinal de cálcio expressa em células epiteliais humanas e tem sido associada ao crescimento tumoral e mau prognóstico no câncer de mama (CM). A isoenzima ALDH1A1 oxida o retinaldeído em ácido retinóico, regulando a expressão gênica de células-tronco tumorais e induzindo o crescimento tumoral bem como resistência às terapias antineoplásicas. As expressões de ALDH1A1 e Trop-2 têm sido associadas à transição epitelial-mesenquimal (EMT), a qual está relacionada à migração, invasão, disseminação e resistência tumoral. Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão proteica de Trop-2 e ALDH1A1 no CM luminal-like inicial. Verificar-se-á se existe relação entre a expressão de ambos biomarcadores. Determinar-se-á eventual correlação entre os biomarcadores e variáveis clínico-patológicas.

**Métodos:** Estudo transversal avaliando os níveis de expressão das proteínas Trop-2 e ALDH1A1 por imuno-histoquímica (IMQ) em tissue microarrays (TMAs). Para avaliação da IMQ, se utilizou o H-score. As seguintes categorizações foram usadas: Trop-2 H-Score 0-<100 baixo, H-Score 100-200 intermediário e H-Score >200-300 alto; ALDH1A1 H-Score 0-9 negativo, H-Score 10-49 baixo, H-Score 50-149 médio e H-Score >149 alto.

**Resultados:** Oitenta e quatro pacientes foram incluídas. Cinquenta e cinco (65,5%) pacientes possuíam 50 anos ou mais, 70% apresentavam carcinomas ductais invasores, 75% possuíam tumores T2 e 51,2% apresentavam linfonodos positivos. Cinquenta e dois pacientes (61,9%) apresentavam doença estadio II. Trop-2 apresentou elevada expressão IMQ em 56% e expressão intermediária em 38% dos pacientes. Não houve correlação de Trop-2 e ALDH1A1 com as características clínico-patológicas estudadas, incluindo idade, subtipo histológico, grau, Ki67, tamanho do tumor, estado nodal, invasão linfovascular, subtipo tumoral, estadiamento patológico e estadiamento prognóstico. Não houve associação entre a expressão de Trop-2 e ALDH1A1. A expressão de ALDH1A1 foi significativamente mais intensa no estroma tumoral quando comparada ao citoplasma das células tumorais (TCC) (teste de McNemar,  $p < 0.0001$ ). Nenhum paciente com estadio anatômico I expressou ALDH1A1 no TCC e/ou estroma.



Conclusão: A expressão proteica de Trop-2 é característica do CM luminal-like inicial, não devendo ser utilizada como biomarcador nesta população. A expressão de ALDH1A1 é significativamente maior no estroma tumoral do que no citoplasma e talvez a função de ALDH1A1 nas vias oncogênicas possa variar de acordo com esta característica. A expressão de Trop-2 é consistentemente alta e independe da expressão de ALDH1A1.

**Palavras chave:** Trop-2; ALDH1A1; câncer de mama; neoplasia de mama; receptor estrogênio; luminal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Trop-2 protein is present in human epithelial cells and has been associated with tumor growth and poor prognosis in breast cancer. Similarly, ALDH1A1 isozyme is involved in regulating gene expression in tumor-initiating stem-like cells, tumor growth, and drug resistance. Both these proteins are associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is linked to cancer migration, invasion, distant dissemination, and treatment resistance. This study aims to analyze the expression of Trop-2 and ALDH1A1 proteins in early luminal-like breast cancer, establish a possible connection between the two biomarkers, and determine whether expression and clinicopathologic features are interrelated.

**Methods:** A cross-sectional study evaluating Trop-2 and ALDH1A1 protein expression by immunohistochemistry (IHC) in tissue microarrays (TMAs) and their correlations to the clinicopathological factors in early luminal-like BC. For IHC analysis, the H-score was determined. The following categorizations were used: Trop-2 H-Score 0-<100 low, H-Score 100-200 intermediate, and H-Score >200-300 high; ALDH1A1 H-Score 0-9 negative, H-Score 10-49 low, H-Score 50-149 medium, and H-Score >149 high.

**Results:** In the study, 84 patients were analyzed, with the majority (65.5%) being over 50 years old. Invasive ductal carcinomas were the most common type of cancer, accounting for 70% of cases. Tumor size T2 was prevalent, affecting 75% of patients, and more than half (51%) had positive lymph nodes. Most patients (61.9%) were categorized as stage II. Trop-2 expression was high in 56% of patients, with 38% showing intermediate levels. No correlation was found between Trop-2 or ALDH1A1 and clinicopathologic characteristics. ALDH1A1 expression was significantly higher in tumor stroma compared to tumor cell cytoplasm (TCC) ( $p < 0.0001$ ). ALDH1A1 expression in tumor cells was mainly weak or negative, with only a few cases showing strong expression. Patients in anatomic stage I did not exhibit ALDH1A1 expression in either the TC or stroma. There was no correlation observed between Trop-2 and ALDH1A1 expression.

**Conclusion:** In early luminal-like breast cancer, TROP2 is highly expressed independently of clinicopathologic characteristics and should not be used as a biomarker for this patient's subset. ALDH1A1 serves as an EMT marker that

shows a more significant presence in the stroma than in the cytoplasm of tumor cells. Its expression in the tumor microenvironment may have varying effects on tumor development. Trop-2 expression is consistently high and unrelated to ALDH1A1 expression.

**Keywords:** Trop-2; ALDH1A1; breast cancer; breast neoplasm; estrogen receptor; luminal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de revisão de literatura.....	Pág 18
Figura 2 - Mecanismos de sinalização celular e funções de TROP-2 .....	Pág 21
Figura 3 - Avaliação imuno-histoquímica de TROP-2 em cânceres humanos .....	Pág 22
Figura 4 - Marco conceitual esquemático.....	Pág 30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos clínicos avaliando Sacituzumabe Govitecana.....	Pág 25
Tabela 2 - Strobe checklist do artigo principal.....	Pág 83
Tabela 3 - Strobe checklist do segundo artigo.....	Pág 84

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CM – Câncer de mama  
IMQ – Imuno-histoquímica  
IHC – Imuno-histoquímica  
RH – Receptores hormonais  
HER2 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2  
KI67- Índice de proliferação celular  
TROP 2 - Antígeno 2 de superfície celular para trofoblastos  
EMT - Transição epitelial-mesenquimal  
TWIST – Família Twist bHLH fator de transcrição 1  
ALDH1 - Família de aldeído desidrogenase 1  
ALDH1A1 – Família aldeído desidrogenase 1 membro A1  
GA733-1- Antígeno gastrointestinal 733-1  
EGP-1 - Glicoproteína epitelial-1  
TACSTD2 - Transdutor de sinal de cálcio associada a tumor 2  
CSCs - Células tronco tumorais  
RNA – Ácido ribonucleico  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
CD 133 – Proeminina-1  
SOX 9 – Fator de transcrição SRY-Box 9  
EPCAM - Molécula de adesão celular epitelial  
E-caderina – Caderina epitelial  
M1S1 - Componente de membrana cromossomo 1 marcador de superfície 1  
PKC – Proteína quinase C  
PIP2 - Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato  
IGF-1 - Fator de crescimento relacionado à insulina-1  
HER3 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 3  
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno  
RAF – Quinase específica para Serina/Treonina  
NF-κB - Fator nuclear kappa B  
ERK - Quinases reguladas por sinal extracelular  
WNT – Sítio de integração relacionada a Wntless  
AP-1 – Proteína ativadora-1

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular  
CDKs- Quinases dependentes de ciclinas  
BCL2 – Linfoma de células B 2  
FasL – Ligante Faz  
CD33- Siglec-3  
FOXO 3 - The forkhead box O 3  
MDM2- Murine double minute 2  
CREB1 - Proteína de ligação do elemento responsivo a AMP cíclico  
Rb – Retinoblastoma  
STAT - Transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição  
MEK – Quinase serina/tirosina/treonina  
FAB - Fragmentos de ligação ao antígeno  
ADCs - Anticorpos conjugados a medicamentos  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
CD 20 - Antígeno de linfócito B CD20  
PARP – Poli ADP-ribose polimerase  
BRCA 1/2 – Câncer de mama 1/2  
ATP- Adenosina trifosfato  
IMMU-32 - Sacituzumabe Govitecana  
Dato-Dxd – Datopotamabe Deruxtecana  
CMTN – Câncer de mama triplo negativo  
CPNPC - Câncer de pulmão não pequenas células  
CPPC - Câncer de pulmão pequenas células  
TPC - Tratamento quimioterápico de acordo com a escolha do investigador  
TCC - Citoplasma das células tumorais  
MT - Microambiente tumoral  
NAD - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
IL-6 – Interleucina 6  
sIL-6R - Interleucina 6 ligada ao receptor solúvel

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	14
INTRODUÇÃO.....	17
METODOLOGIA DE BUSCA .....	20
REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA .....	22
Câncer de mama e subtipos .....	22
Transição epitelial-mesenquimal.....	22
TROP-2.....	23
TROP 2 e terapia antineoplásica .....	25
Sacituzumabe Govitecana .....	26
Datopotamabe Deruxtecana .....	29
Expressão de TROP2 e reposta antitumoral .....	29
ALDH1A1 .....	30
JUSTIFICATIVA .....	32
MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO E DESENHO DO ESTUDO .....	33
OBJETIVOS .....	34
Objetivo primário .....	34
Objetivos secundários .....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	35
PRIMEIRO ARTIGO .....	44
SEGUNDO ARTIGO .....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
ANEXOS .....	49
STROBE .....	49
PARECER CONSUBSTANCIADO CEP .....	51
COMPROVANTE DE SUBMISSAO DO PRIMEIRO ARTIGO.....	52



## INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é um dos principais problemas de saúde no mundo ultrapassando o câncer de pulmão em incidência no ano de 2020, com uma estimativa de 2.3 milhões de novos casos, representando 11.7% de todos os cânceres e correspondendo à quinta causa de morte no mundo com 685.000 mortes associadas. (1) O número estimado de casos novos de CM no Brasil, para o triênio de 2023 a 2025, é de 73.610 casos, correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres. (2) Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminina é o mais incidente no país e em todas as regiões brasileiras. (2)

O CM é uma doença heterogênea em sua história natural, prognóstico e tratamento. No ano 2000, Perou e colaboradores publicaram trabalho avaliando justificativas a nível molecular para as referidas diferenças, e, conseqüentemente, criando subgrupos: “Luminal A ou B” quando a assinatura genética se assemelha à célula luminal do ducto mamário, “Basal-símile” quando se assemelha à célula basal, “Her-2” quando os tumores apresentavam um perfil com hiperexpressão do gene Her2 ou moléculas por ele reguladas em sua via de sinalização celular. (3) No entanto, a classificação molecular ainda é pouco utilizada devido ao acesso restrito e custo elevado, sendo a imuno-histoquímica (IMQ) utilizada na prática clínica rotineiramente. Cabe salientar, que a correlação entre a classificação molecular e IMQ não é perfeita; desta forma, deve-se ter cautela ao interpretar os dados quando a IMQ é utilizada. (3)

Na busca pelo maior entendimento do comportamento biológico do CM, estudos têm sido realizados para avaliar processos associados à carcinogênese, com destaque para a transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo caracterizado por alterações nas células tumorais relacionadas a maior capacidade de invasão, disseminação à distância e resistência aos tratamentos antineoplásicos. (4–7) As células epiteliais que se encontram no processo de EMT apresentam alterações fenotípicas e moleculares que as tornam com características de células mesenquimais. As modificações fenotípicas incluem a transformação de uma morfologia cuboidal/paralelepípedo para alongada e em

fuso, semelhante a um fibroblasto e a perda de moléculas epiteliais de adesão como as caderinas. (7–9)

Trop-2 é uma glicoproteína transmembrana transdutora de sinal de cálcio expressa em células epiteliais humanas. A maior expressão de Trop-2 tem sido associada à EMT, progressão e pior prognóstico em CM luminal e triplo-negativo. (10–15) A fosforilação da serina-303 pode estar relacionada à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o qual pode ativar as vias de sinalização Raf, NF- $\kappa$ B e MAPK bem como estimular a progressão do ciclo celular. TROP-2 pode aumentar a ciclina D1 e ciclina E, as quais juntamente com ERK1/2 podem mediar a progressão do ciclo celular. Estudos pré-clínicos demonstraram que a estimulação de MAPK bem como a ativação de ERK1/2 podem induzir o fator de transcrição de AP-1 o qual está relacionado com diversos genes associados a processos que induzem à tumorigênese como angiogênese (via VEGF), proliferação (via ciclinas e CDKs), apoptose (via BCL-2 e FasL), invasão e metástase (via metaloproteinases, podoplanina, Ezrin e CD33) bem como à EMT que interagem com a  $\beta$ -catenina para induzir o crescimento celular. O aumento da atividade de ERK pode induzir a fosforilação de FOXO3 seguido de sua ubiquitinação por MDM2 com subsequente degradação levando à sobrevivência celular. (11,13) Entretanto, apesar do racional biológico referido e dados históricos relacionando a expressão de Trop-2 com piores desfechos, evidências atuais não conseguiram documentar a relação entre pior prognóstico e expressão de TROP-2 em CM. (10,13,14,16–18)

A família de aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) é uma enzima responsável pelo metabolismo de vários aldeídos alifáticos e aromáticos, catalisando aldeídos a ácidos carboxílicos. (19,20) A isoenzima da família aldeído desidrogenase 1, membro A1 (ALDH1A1), oxida retinaldeído a ácido retinóico, regulando a expressão gênica em células-tronco tumorais (CSCs), o crescimento e a resistência terapêutica. (19,20) ALDH1A1 é um marcador de EMT relacionado à progressão tumoral e ao desenvolvimento de CSCs nos cânceres de mama, pulmão e colorretal. (9,21–23) Althobiti M et al. demonstraram a ligação entre a proteína ALDH1A1 e a expressão do RNA mensageiro (mRNA) com fatores de mau prognóstico e piores desfechos clínicos. (9) A expressão de ALDH1A1 se correlaciona com marcadores de CSCs e EMT atrelados à capacidade de autorrenovação, fenótipo pluripotente e progressão tumoral,

como CD 44, CD24, CD 133, SOX9, EPCAM e TWIST. (9,24,25) Elegeu-se o ALDH1A1 como biomarcador a ser estudado em conjunto com TROP-2 devido à evidência prévia o relacionando positivamente e de forma significativa com diversos biomarcadores de EMT bem como ser um biomarcador de pior prognóstico em neoplasia mamária. (9)

Durante o protocolo de padronização das leituras de IMQ, os pesquisadores observaram uma diferença potencial na expressão de ALDH1A1 entre o citoplasma da célula tumoral (TCC) e o estroma. Apesar de extensa pesquisa, não se encontrou evidência abordando tal variação de expressão deste biomarcador através das estruturas do microambiente tumoral em CM luminal-like inicial ou eventual relação com variáveis clínico-patológicas.

ALDH1A1 e Trop-2 são biomarcadores da EMT; no entanto, nunca foram avaliados de forma concomitante na mesma população de pacientes, existindo racional para eventual correlação. (9-15, 18-20) Uma associação positiva pode estimular investigação quanto a inter-relação entre ambas as vias e ampliar o entendimento sobre tais biomarcadores.

A pesquisa atual foi projetada para investigar a expressão proteica de Trop-2 e ALDH1A1 no CM luminal inicial, sua inter-relação e correlação com variáveis clínico-patológicas. Durante os protocolos de padronização de leituras, os pesquisadores perceberam possíveis diferenças de expressão de ALDH1A1 entre as células tumorais e as do estroma; desta forma, resolveu-se avaliar adicionalmente as diferenças na expressão de ALDH1A1 no microambiente tumoral e sua correlação com as características clínico-patológicas.

## METODOLOGIA DE BUSCA

Esta revisão da literatura está focada nas funções do receptor TROP-2 e ALDH1A1, prevalência e intensidade de expressão bem como sua relação com os processos de carcinogênese e de EMT nos diversos tipos de câncer, com ênfase para estudos relacionados ao CM. A estratégia de busca envolveu os dados epidemiológicos divulgados no site do Instituto Nacional de Câncer e as seguintes bases de dados: LILACS, EMBASE e PUBMED.

A estratégia de busca sobre estudos avaliando a expressão concomitante de Trop-2 e ALDH1A1 ocorreu nas bases de dados PUBMED, EMBASE e LILACS. Nenhum estudo avaliando os dois biomarcadores de forma simultânea foi encontrado.

Todos os artigos publicados até 20 de fevereiro de 2023 foram incluídos, data da última atualização da revisão. (Figura 1) Foram realizadas buscas através dos termos:

### PUBMED

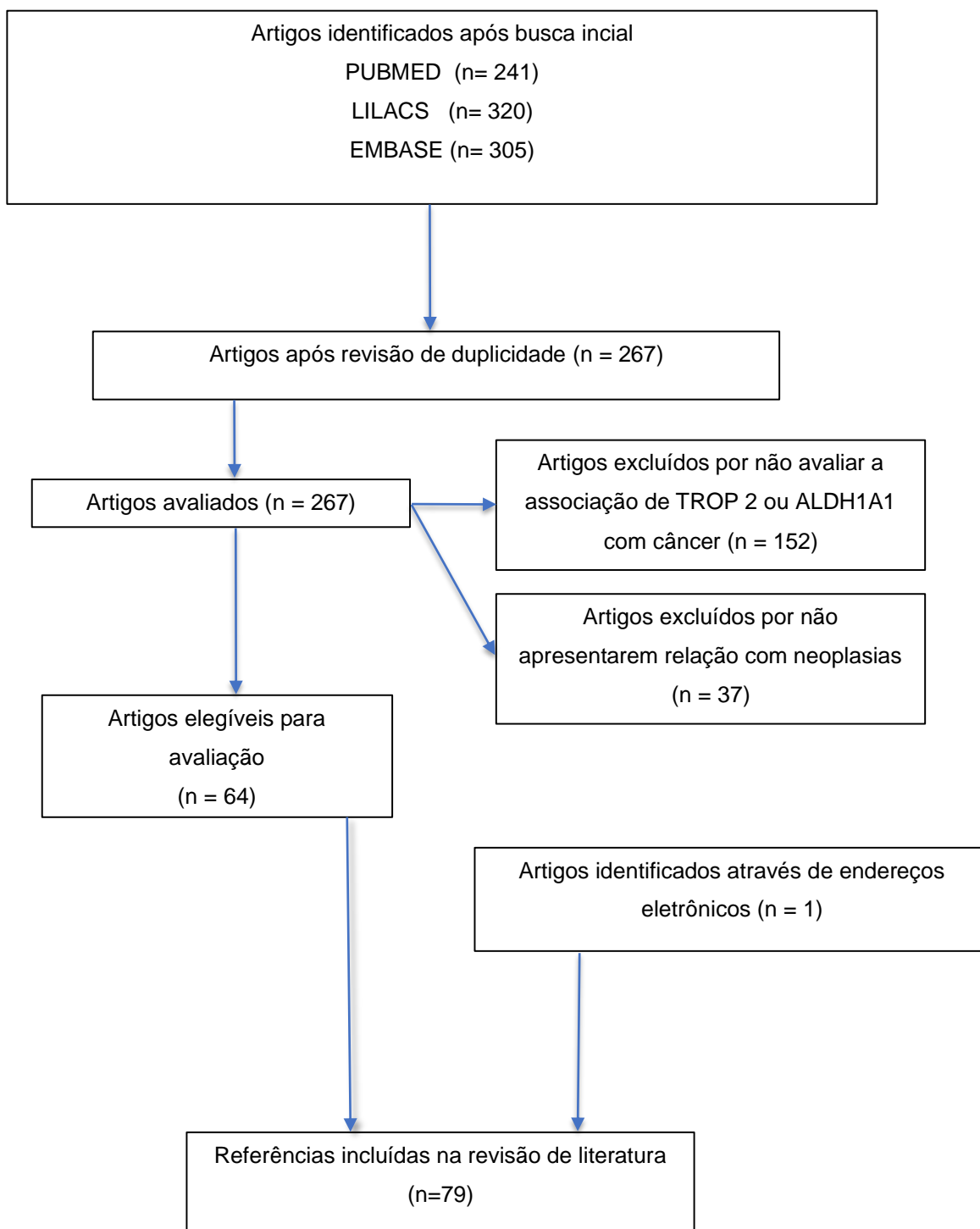
("Carcinogenesis"[Mesh]) AND "TACSTD2 protein, human" [Supplementary Concept]; ("TACSTD2 protein, human" [Supplementary Concept]) AND "Neoplasms"[Mesh] ("TACSTD2 protein, human" [Supplementary Concept]) AND "Epithelial-Mesenchymal Transition"[Mesh]; ("Neoplasms"[Majr]) AND "Aldehyde Dehydrogenase 1 Family"[Majr]; Trop2 and ALDH1A1; "TACSTD2 protein, human" [Supplementary Concept] AND "Aldehyde Dehydrogenase 1 Family"[Majr]

### LILACS

(trop2) AND (cancer); (trop2) AND (aldh1); (trop2) AND (aldh1a1); (aldh1a1) AND (cancer);

### EMBASE

('trop2 protein'/exp OR 'trop2 protein' OR 'trop2 gene') OR ( tacstd2 )  
( 'trop2 protein'/exp OR 'trop2 protein' OR 'trop2 gene' ) OR ( tacstd2 ) AND (aldh1)  
( 'trop2 protein'/exp OR 'trop2 protein' OR 'trop2 gene' ) OR ( tacstd2 ) AND  
(aldh1a1) OR (aldh1a1)



**Figura 1. Fluxograma de revisão de literatura.** Descrição esquemática da revisão bibliográfica realizada para a presente tese.

## REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

### Câncer de mama e subtipos

O CM é uma doença heterogênea com múltiplas apresentações, características, prognósticos e tratamentos. Avaliações através da IMQ têm classificado os tumores da mama em quatro categorias principais: luminal A, luminal B, HER2-hiperexpresso e triplo-negativo. (3,31)

A evolução no entendimento da biologia do CM, bem como novas ferramentas de avaliação, como as plataformas multigênicas, tem permitido determinar com maior precisão as características específicas de cada tumor a partir do padrão de expressão gênica. Desta forma, muitos tumores que antes eram considerados semelhantes, dadas as suas características imunohistoquímicas, hoje, podem ser tratados de forma personalizada e, conseqüentemente, obtendo-se melhores desfechos. (3,31,32) Desta forma, a identificação de novos biomarcadores são importantes para maior entendimento da fisiopatologia do CM bem como seu tratamento.

### Transição epitelial-mesenquimal

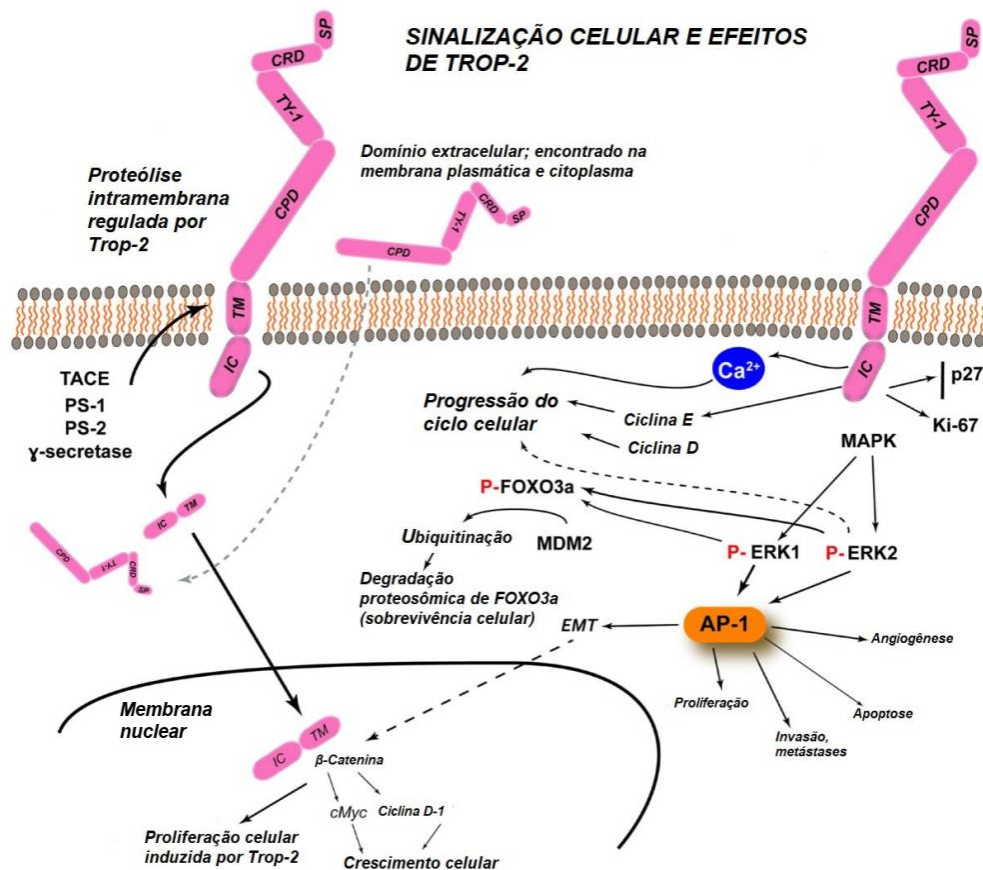
A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo fisiológico relacionado à inflamação, fibrose e cicatrização de feridas, pois é responsável pela perda de adesão celular, aumento da motilidade celular e desdiferenciação. (7,8) Na carcinogênese, a EMT é fundamental para progressão tumoral visto que está relacionada à maior capacidade de migração, invasão, disseminação à distância e resistência aos tratamentos antineoplásicos. (4–8) EMT também está relacionada à resistência a medicamentos e a tratamentos com radiação ionizante. (6)

Os programas de regulação gênica que controlam a EMT modulam as moléculas de adesão celular e suas vias de sinalização, sendo importantes determinantes para progressão tumoral e formação de células tronco tumorais (CSCs). (6,33,34) Diversos fatores interagem para esta regulação como vias de sinalização extracelulares, fatores de crescimento, fatores de transcrição e efetores. (24) A elucidação dos mecanismos moleculares que levam à EMT em

CM pode auxiliar na prevenção dos processos de metastatização, consequentemente melhorando o prognóstico dos pacientes. (6,25)

## TROP-2

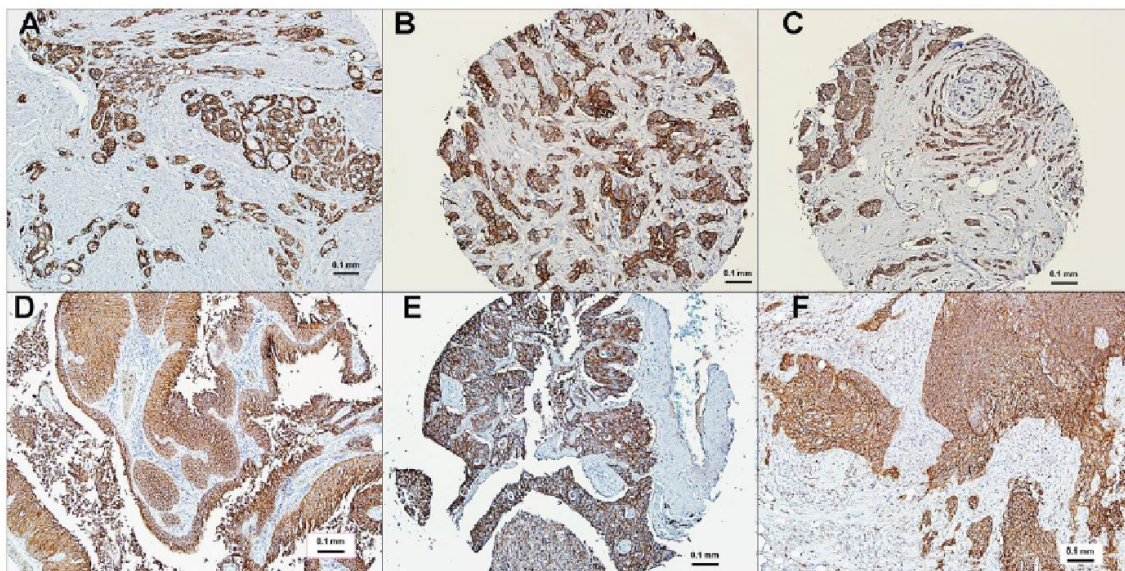
O antígeno 2 de superfície celular para trofoblastos (TROP-2) foi descoberto inicialmente há cerca de 40 anos como marcador de superfície celular de trofoblastos. (35) Posteriormente, foi redescoberto como transdutor de sinal de cálcio associada a tumor 2 (TACSTD2), componente de membrana cromossomo 1 marcador de superfície 1 (M1S1), antígeno gastrointestinal 733-1 (GA733-1) e glicoproteína epitelial-1 (EGP-1). (12,36,37) A expressão, funcionalidade e mecanismos de ação do TROP-2 se tornaram de interesse na década de 90, quando se desenvolveu um anticorpo monoclonal direcionado a esta glicoproteína expressa em diversos cânceres. (11,38) (Figura 2).



**Figura 2. Mecanismos de sinalização celular e funções de TROP-2 (adaptado de Shvartsur and Bonavida).** (13) TROP-2 realiza sua função através da interação com o fator de crescimento relacionado à insulina-1 (IGF-1) (39) e por interação com a neuroregulina 1 inibindo ErbB3

(HER3) em tumores de cabeça e pescoço. (40) Devido ao domínio HIKE, um sítio de ligação a PIP2 e uma serina fosforilada por proteína quinase C, TROP-2 está envolvido com os mecanismos de sinalização por cálcio. Acredita-se que a liberação de  $Ca^{2+}$  induz a sinalização pela proteína quinase MAPK e avanço do ciclo celular. (12) A fosforilação de TROP-2 por aumento da PKC pode ativar as vias de sinalização Raf e NF- $\kappa$ B. (41) TROP-2 ativa as vias de sinalização ERK1/2-MAPK contribuindo para o crescimento e divisão celular (39) e pode desregular funções relacionadas à sobrevivência através das vias Notch, Hedgehog and Wnt. (12) A ativação da via ERK tem sido demonstrada em diversos tumores com superexpressão da via TROP-2, promovendo sobrevivência tumoral através dos seus efeitos antiapoptóticos. (12)

A expressão aumentada de TROP-2 está presente no desenvolvimento embrionário e fetal (42), entretanto o foco de maior interesse no momento é o seu papel no câncer e sua relação como marcador prognóstico e preditivo. TROP-2 possui expressão aumentada em diversos dos cânceres epiteliais sólidos humanos como cavidade oral, cabeça e pescoço, tireoide, pulmão, esôfago, estômago, colorretal, pancreático, mama, renal, uterino, cervical, ovariano e gliomas (Figura 3). (11)



**Figura 3. (adaptado de Goldenberg et al. (11)): Avaliação imunohistoquímica de TROP-2 em cânceres humanos.** O anticorpo policlonal para TROP-2 humano foi usado para revelar a localização de TROP-2 em seções de tumor. (A) câncer de próstata, (B) câncer de mama triplo-negativo, (C) câncer de mama triplo positivo, (D) câncer de bexiga urinária, (E) câncer de pulmão não pequenas células, (F) câncer de pequenas células de pulmão. Todos os espécimes selecionados com base em sua expressão moderada (2+) a forte (3+) de TROP-2. A coloração é encontrada tanto na membrana quanto no citoplasma.



Avaliando a perspectiva funcional, é importante que o TROP-2 se ligue com a ciclina D1 (ciclina bicistrônica D1-TROP-2) para se tornar um oncogene. (43) Essa ligação afeta a estabilidade da ciclina D1 e, como quimera, pode aumentar a longevidade e a proliferação celular. (41) No câncer de mama ductal invasor, as expressões elevadas de TACSTD2 e ciclina demonstraram ser preditores independentes de pior prognóstico. (44,45)

TROP-2 também foi encontrado em células-tronco de diversos tecidos, particularmente, em células basais. Por exemplo, na próstata murina e humana, as células basais que expressam TROP-2 têm propriedades de auto-renovação, regeneração e diferenciação. (46) Células ovais indiferenciadas após injúria hepática e as células em regeneração endometrial expressam TROP-2. (47,48) Esses achados sustentam a teoria de que TROP-2 pode estar implicado na regulação do crescimento e regeneração de células-tronco em vários tecidos, assim desempenhando um papel no aumento da proliferação celular, como hiperplasia.

Meta-análise publicada por Zeng P et al. avaliou 16 estudos que, ao todo, incluíram 2.569 participantes. Concluiu-se que a superexpressão de TROP-2 está significativamente associada com pior sobrevida global (HR = 1,896, IC de 95% = 1,599-2,247,  $p < 0.001$ ) e menor sobrevida livre de doença (HR = 2,336, IC de 95% = 1,596–3,419,  $p < 0.001$ ). Os autores concluem referindo que TROP2 pode ser um biomarcador prognóstico valioso e um potencial alvo terapêutico em tumores sólidos humanos. (18)

## TROP 2 e terapia antineoplásica

Os primeiros estudos sobre o potencial terapêutico de TROP-2 focaram na apresentação do antígeno tumoral TROP-2 nativo no complexo principal de histocompatibilidade Classe I. (49) Mangino et al. demonstraram que linfócitos T citotóxicos específicos para TROP-2 foram capazes de neutralizar células de câncer de mama humano MCF7 expressando HLA-A \* 02: 01. (50)

Lin et al. demonstraram que os fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) direcionados ao Trop-2 têm efeitos inibitórios no desenvolvimento do CM em modelos de camundongo com xenoinxerto de células MDA-MB-231. Ademais, o mesmo grupo demonstrou que o Fab TROP-2 foi capaz de induzir apoptose in

vivo, evidenciado pelo aumento da expressão de Caspase-3 e diminuição da expressão de bcl2. (15)

Seguindo o desenvolvimento de anticorpos anti-TROP-2, desenvolveram-se anticorpos conjugados a medicamentos (ADC). (11) Por exemplo, os anticorpos anti-TROP-2 conjugados com nanopartículas carregadas com doxorubicina demonstraram maior toxicidade para células de câncer de mama triplo-negativas MDA-MB-231 quando comparados com nanopartículas de controle carregadas com doxorubicina sem o conjugado de anticorpo anti-TROP-2. (51) Goldenberg et al. apresentaram o IMMU-132, um conjugado de SN-38, metabólito do irinotecano, com um anticorpo anti-TROP-2. Estudos pré-clínicos iniciais demonstraram que o IMMU-132 foi capaz de fornecer até 136 vezes mais SN-38 a um modelo de camundongo com xeno enxerto quando comparado ao irinotecano isolado, com menor frequência de toxicidades como diarreia. (52,53) Goldenberg et al. demonstraram que há aumento das quebras de fita dupla de DNA in vitro nas células que expressam TROP-2 tratadas com IMMU-132 quando compara-se a outro SN-38 ADC, o hA20-SN-38, sendo este último direcionado para CD20. (52)

Demonstrou-se que outros conjugados anti-TROP-2 IgG-SN-38 humanizados, como o ADC anti-TROP-2 hRS7-CL2A-SN-38, apresentam efeitos antineoplásicos significativos em modelos de xeno enxerto de células oriundas de diversas linhagens tumorais (Calu-3, Capan-1, BxPC-3 e COLO 205). Ademais, este mesmo ADC anti-TROP-2 demonstrou ser bem tolerado em macacos, abrindo caminho para futuros ensaios clínicos em humanos. (54)

Embora a maioria das terapêuticas direcionadas a TROP-2 tenham se concentrado em ADCs, existem outras formas terapêuticas direcionadas a TROP-2. Farivar et al. demonstraram que lipossomas carregados com ativador de apoptose 2 direcionado ao antígeno de superfície celular TROP-2 é capaz de induzir apoptose em linhagem de células de adenocarcinoma gástrico. (55)

#### Sacituzumabe Govitecana

O IMMU-32 ou Sacituzumabe Govitecana é o anticorpo monoclonal humanizado hRS7, direcionado contra TROP-2, e ligado ao metabólito ativo do irinotecano, 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38). A porção de anticorpo de

sacituzumab govitecan liga-se seletivamente a TROP2 e, após internalização e clivagem proteolítica, o SN-38 estabiliza seletivamente os complexos covalentes da topoisomerase I-DNA, resultando em quebras de DNA que inibem a replicação do DNA e desencadeiam a apoptose. Resultados clínicos promissores tem sido obtidos com o uso deste medicamento em diversos tipos de neoplasia (Tabela 1). (17,28–30)

Após os resultados promissores do estudo fase 2, realizou-se estudo fase 3 avaliando o papel do IMMU-32 em CMTN previamente tratados. [79] No estudo ASCENT (NCT02574455), pacientes com CMTN que apresentavam doença recidivante/refratária após  $\geq 2$  quimioterapias anteriores no cenário metastático, com exposição prévia a taxanos, foram randomizados 1: 1 para receber IMMU-32 (10 mg / kg IV no D1 e D8 a cada 21 dias) ou tratamento quimioterápico de acordo com a escolha do investigador (TPC) (capecitabina, eribulina, vinorelbina ou gencitabina) até progressão da doença ou toxicidade inaceitável. O estudo recrutou 529 pacientes com idade mediana de 54 anos. O IMMU-32 (n = 235) em comparação com TPC (n = 233) aumentou significativamente a sobrevida livre de progressão (5,6 vs 1,7 meses; HR, 0,41; p <0.0001) e a sobrevida global (12,1 vs 6,7 meses; HR, 0,48; p <0.0001). A resposta global foi de 35% para IMMU-32 vs 5% para TPC (p <0.0001). (28)

Em relação à segurança, avaliaram-se os pacientes que receberam  $\geq 1$  dose do medicamento do estudo; n = 482); os principais eventos adversos relacionados aos tratamentos com grau  $\geq 3$  com IMMU-32 (n = 258) vs TPC (n = 224) foram neutropenia (51% vs 33 %), diarreia (10,5% vs <1%), anemia (8% vs 5%) e neutropenia febril (6% vs 2%). Nenhuma neuropatia de grau > 3 ou doença pulmonar intersticial, e nenhuma morte relacionada ao tratamento foi relatada com IMMU-32. (28)

Tipo tumoral	N	Resposta global %	Sobrevida livre de progressão (meses)	Sobrevida global (meses)
<b>CMTN (26)</b>	69	30	6.0	16.6
<b>RH+/HER2- (27)</b>	54	31	5.5	12
<b>CPNPC (56)</b>	54	19	5.2	9.5
<b>CPPC (57)</b>	50	14	3.7	7.5
<b>UROTELIAL (58)</b>	41	34	7.2	15.5
<b>CMTN FASE III (28)</b>	468	35	5.6 vs 1.7 (HR 0.41; P<0.001)	12.1 vs 6.7 (HR 0.48; P<0.001)
<b>RH+/HER2- FASE III (29,30)</b>	543	21	5.5 vs 4.0 (HR 0.66; P= 0.0003)	14.4 vs 11.2 (HR 0.79; =0.020)

CMTN, câncer de mama triplo negativo; RH, receptores hormonais; HER2, receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; CPNPC, câncer de pulmão não pequenas células; CPPC, câncer de pulmão pequenas células.

**Tabela 1. Estudos clínicos avaliando Sacituzumabe Govitecana.** Estudos clínicos demonstrando a importância dos agentes anti-TROP-2 na prática clínica e seus desfechos favoráveis em diversos tipos tumorais.

O estudo fase 3 TROPiCS-02 está em andamento e avalia o papel do IMM-132 versus TPC (capecitabina, eribulina, vinorelbina ou gencitabina) em pacientes com neoplasia de mama metastática receptor hormonal positivo (RH +), HER 2 negativo e que falharam a pelo menos dois regimes anteriores de quimioterapia. (29,30) O IMM-132 apresentou melhores desfechos em relação ao braço controle do estudo. A sobrevivida livre de progressão foi de 5.5 vs 4.0 meses (HR, 0.66; 95% CI, 0.53-0.83;p= 0.0003); a sobrevivida livre de progressão em 6 e 12 meses foi de 46% vs 30% e 21% vs 7%, respectivamente. (29)

Os dados de sobrevivida global evidenciaram ganho de 3.2 meses (14.4 vs 11.2 meses; HR, 0.79; p=0.020). As taxas de resposta global foram de 21% vs 14% e os índices de benefício clínico de 34% vs 22%. O tempo mediano de duração de resposta também foi maior para o braço experimental com 7.4 vs 5.6 meses, respectivamente. Quanto ao perfil de segurança, 74% vs 60% dos pacientes (IMMU-132 vs TPC) apresentaram eventos adversos grau  $\geq 3$ ; neutropenia (51% vs 39%) e diarreia (10% vs 1%) foram os mais comuns. A taxa

de descontinuação do tratamento devido a eventos adversos foi baixa com IMMU-132 vs TPC (6% vs 4%). (29,30)

#### Datopotamabe Deruxtecana

Datopotamabe deruxtecana (Dato-DXd) é um ADC com três componentes: um anticorpo monoclonal humanizado anti-TROP-2 IgG1 ligado a um inibidor da topoisomerase 1 através de um ligante clivável baseado em tetrapeptídeo. Ele foi desenvolvido com três atributos principais: inibição da topoisomerase 1 como mecanismo de ação, razão droga-anticorpo otimizada e efeito antitumoral contra células adjacentes às quais o Dato-DXd se ligou. (59)

O estudo fase I TROPION-PanTumor01 trial recrutou 43 pacientes com câncer de mama triplo negativo sendo que 41 (95%) haviam recebido pelo menos linhas prévias de tratamento. Após um segmento de 3.9 meses, as taxas de reposta objetiva foram de 39% e a taxa de controle de doença de 84%. Dato-Dxd tem um perfil de segurança manejável com os eventos adversos mais frequentes sendo náuseas, mucosite, vômitos e fadiga. Não foram reportados casos de doença pulmonar intersticial e eventos adversos  $\geq 3$  ocorreram em 35% dos pacientes. (60)

#### Expressão de TROP2 e reposta antitumoral

O estudo ASCENT trouxe dados relevantes quanto a expressão de TROP-2 e resposta antitumoral do ADC IMMU-132. O referido estudo estratificou em 3 níveis a expressão de TROP-2 através do H-Score: alta expressão (H-Score 200-300), expressão intermediária (H-Score 100-200) e baixa expressão (H-Score <100). Os resultados mostraram que a sobrevida livre de progressão de IMMU-132 versus TPC foi de 6.9, 5.6 e 2.7 meses versus 2.5, 2.2 e 1.6 meses para os pacientes com alta, intermediária e baixa expressão de TROP-2, respectivamente. A sobrevida global foi de 14.2, 14.9 e 9.3 meses versus 6.9, 6.9 e 7.6 meses; as taxas de resposta objetiva foram de 44%, 38% e 22% versus 1%, 11% e 6%, respectivamente. (16)

Os desfechos no estudo acima referido foram melhores numericamente nos grupos com expressão intermediária e alta de TROP-2 quando comparados

ao grupo de menor expressão, podendo este ser um fator preditor de melhor resposta ao tratamento com IMMU-132. Entretanto, cabe salientar o reduzido número de baixos expressores de TROP-2 no estudo, e, que o referido grupo também apresentou benefício quando exposto ao medicamento. A maior expressão de TROP-2 não se traduziu em pior prognóstico, dado divergente aos estudos previamente publicados. (11,13,18,61)

## ALDH1A1

A família de aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) é uma enzima responsável pelo metabolismo de vários aldeídos alifáticos e aromáticos, catalisando aldeídos a ácidos carboxílicos.(19,20) A isoenzima da família aldeído desidrogenase 1, membro A1 (ALDH1A1), oxida retinaldeído a ácido retinóico, regulando a expressão gênica em CSCs, o crescimento e a resistência terapêutica. (19,20)

O gene ALDH1A1 está localizado na sub-região 13 da região 21, no braço longo do cromossomo humano 9. ALDH1A tem um sítio de ligação NAD<sup>+</sup> (aminoácidos 8–135 e 159–270), um sítio catalítico (aminoácidos 271–470) e um domínio de oligomerização (aminoácidos 140–158 e 486–459). ALDH1A1 pode existir em formas monoméricas, diméricas ou tetraméricas. As formas tetramérica e monomérica de ALDH1A1 são as mais abundantes, sendo a atividade de sua forma monomérica a mais alta. (24,62) ALDH1A1 é altamente expresso em células de CM, e a sua ausência pode sensibilizar à quimioterapia e à radioterapia. (19) Wang et al. demonstraram que o tamoxifeno pode promover a ligação de REa36 e a ativação de elementos responsivos ao estrogênio no promotor ALDH1A1, aumentando a transcrição de ALDH1A1, mecanismo responsável pela resistência à terapia hormonal e disseminação à distância do CM luminal. (63) CYP2C19 e ALDH1A1 estão envolvidos na farmacocinética da ciclofosfamida e significativamente associados a desfechos incluindo sobrevida global e risco de recidiva à distância em pacientes com CM submetidos à terapia adjuvante. (64) ALDH1A1 é capaz de atenuar a atividade da caspase-3/7 e a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por agentes citotóxicos, como paclitaxel, doxorubicina, sorafenibe e estaurosporina. (62,65)

ALDH1A1 é um marcador de EMT relacionado à progressão tumoral e ao desenvolvimento de CSCs nos cânceres de mama, pulmão e colorretal. (9,21–23) Althobiti M et al. demonstrou que a expressão proteica e de RNA mensageiro (mRNA) de ALDH1A1 está aumentada em 71% dos cânceres de mama. (9) Ademais, há correlação entre a expressão de ALDH1A1 e marcadores estabelecidos de CSCs e EMT como CD 44, CD24, CD 133, SOX9, EPCAM e TWIST, sendo estes relacionados à capacidade de auto renovação, fenótipo pluripotente e progressão tumoral. (9,66-69)

O desenvolvimento de terapias direcionadas a ALDH1A1 existe e pode ser em futuro próximo alternativa para melhores desfechos em pacientes com CM. (62) Kesharwani et al. demonstraram que o direcionamento de análogos de curcumina sintéticos contra ALDH1A pode reverter a resistência a tratamentos antineoplásicos. (70) A quercetina pode inibir a proliferação, expansão clonal e formação de CSCs CD44+/CD24- em CM, inibindo ALDH1A1, CXCR4, EpCAM e MUC1. (71) Condello et al. descobriram um novo inibidor de ALDH1A1 chamado A37, o qual pode sensibilizar células de câncer de ovário à cisplatina. (72) Liu et al. demonstrou que o NCT-501, um inibidor seletivo do ALDH1A1, aumenta a eficácia do olaparibe em câncer de ovário através de experimentos *in vitro* e em murinos. (73) O dissulfiram, inibidor de ALDH1A1, associado ao agente quimioterápico gencitabina inibe o crescimento tumoral em CM atuando sobre as células iniciadoras do tumor ALDH positivas e ativando a imunidade de células T. (74) Vacina alogênica composta por duas linhagens de células de melanoma transduzidas com cDNA que codificam a proteína de fusão composta por IL-6 ligada ao receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R) foi aplicada em pacientes com melanoma avançado e no cenário adjuvante, sendo evidenciados resultados promissores com redução do risco de recidiva, progressão e morte. Anticorpos anti-ALDH1 específicos estavam presentes em pacientes tratados indicando que esta modalidade terapêutica pode ganhar projeção para melanoma e outros subtipos tumorais. (75)

## JUSTIFICATIVA

TROP-2 tem sido estudado com maior frequência devido ao advento de ADCs direcionados a esta proteína e sua eficácia clínica comprovada em CM luminal e triplo negativo metastáticos. O presente estudo foi delineado por existirem dados limitados e conflitantes em relação à expressão de TROP-2 e sua relação com características clínico-patológicas no CM lumina-like inicial.

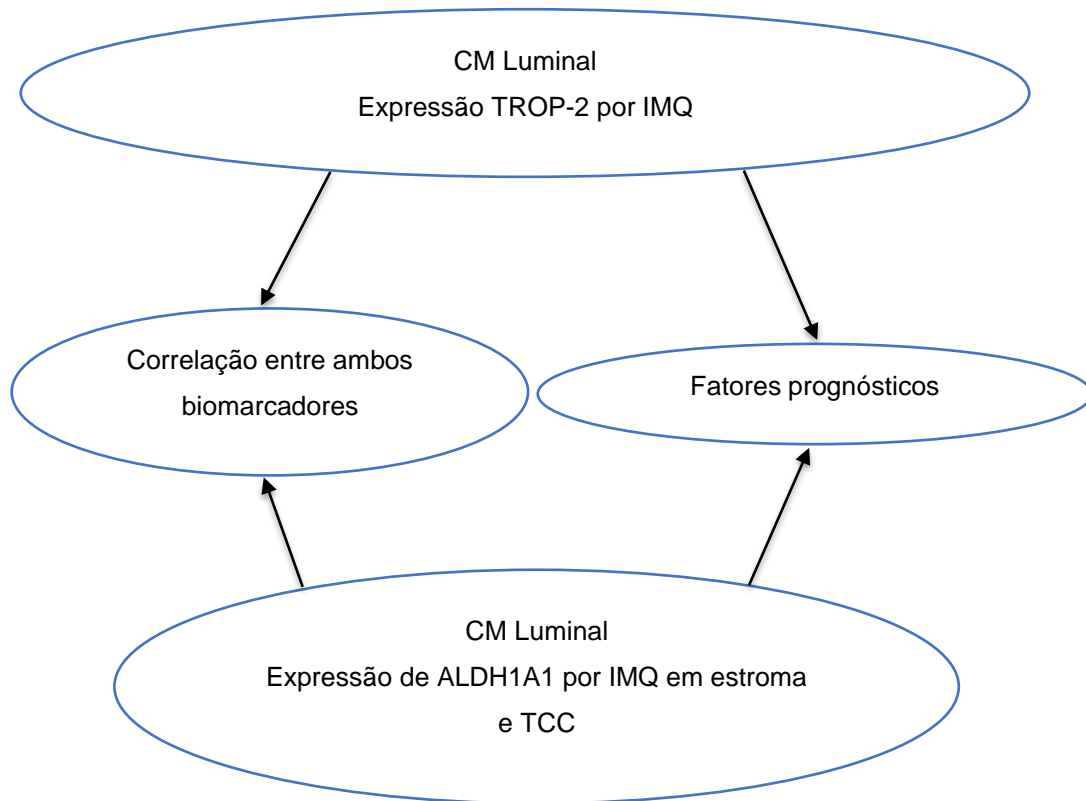
A expressão de ALDH1A1 está associada a pior prognóstico em CM e está associado de forma significativa a diversos marcadores relacionados à EMT; porém, não existem dados evidenciando se há variação de expressão através das estruturas do microambiente tumoral em CM luminal nem sua significância. Tal análise foi estimulada pela percepção inicial dos pesquisadores durante os protocolos de padronização de leituras das lâminas sobre as possíveis diferenças de expressão do referido biomarcador entre as células tumorais e as do estroma.

ALDH1A1 e TROP-2 nunca foram avaliados de forma concomitante na mesma população de pacientes, existindo racional para eventual correlação, uma vez que são biomarcadores relacionados à EMT e estão caracterizados como biomarcadores de pior prognósticos em neoplasia mamária. Demonstrar a referida associação pode suscitar racional para investigar de forma minuciosa a inter-relação entre ambas vias.

O presente trabalho contribui para um maior conhecimento dos biomarcadores TROP-2 e ALDH1A1 em CM luminal-like inicial e na elucidação de eventual associação entre ambos.



## MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO E DESENHO DO ESTUDO



CM – Câncer de mama

TROP-2 – antígeno 2 de superfície celular para trofoblastos

ALDH1A1 – aldeído desidrogenase família 1 membro A1

TCC – citoplasma de células tumorais

IMQ - imuno-histoquímica

## OBJETIVOS

### Objetivo primário

- ✚ Avaliar o nível de expressão de TROP-2 e ALDH1A1 por imunohistoquímica em tumores de mama luminais não metastáticos.

### Objetivos secundários

- ✚ Avaliar se há correlação entre os níveis de expressão de TROP-2 e de ALDH1A1 por IMQ com variáveis clínico-patológicas: idade, grau tumoral, subtipo histológico, nível de expressão de receptores hormonais, tamanho tumoral, comprometimento linfonodal, invasão angiolímfática, estadiamento anatômico e expressão de Ki67.
- ✚ Avaliar em pacientes com CM luminal inicial se há correlação e concordância entre a expressão proteica de TROP2 e ALDH1A1.
- ✚ Avaliar se existem diferenças na expressão de ALDH1A1 no microambiente tumoral através da determinação de expressão do biomarcador separadamente no estroma e TCC.
- ✚ Avaliar se há correlação entre os níveis de expressão de ALDH1A1 no estroma e TCC com variáveis clínico-patológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. estimativa-2023.pdf [Internet]. [cited 2023 Feb 18]. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>
3. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
4. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8319–26.
5. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*. 2009 May;174(5):1588–93.
6. Hashemi M, Arani HZ, Orouei S, Fallah S, Ghorbani A, Khaledabadi M, et al. EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions. *Biomed Pharmacother*. 2022 Nov 1;155:113774.
7. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442–54.
8. Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*. 2008 May;14(5):199–209.
9. Althobiti M, El Ansari R, Aleskandarany M, Joseph C, Toss MS, Green AR, et al. The prognostic significance of ALDH1A1 expression in early invasive breast cancer. *Histopathology*. 2020 Sep;77(3):437–48.
10. Ambrogio F, Fornili M, Boracchi P, Trerotola M, Relli V, Simeone P, et al. Trop-2 is a determinant of breast cancer survival. *PloS One*. 2014;9(5):e96993.
11. Goldenberg DM, Stein R, Sharkey RM. The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. *Oncotarget*. 2018 Jun 22;9(48):28989–9006.

12. Cubas R, Zhang S, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. *Mol Cancer*. 2010 Sep 21;9:253.
13. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes Cancer*. 2015 Mar;6(3–4):84–105.
14. Zhao W, Kuai X, Zhou X, Jia L, Wang J, Yang X, et al. Trop2 is a potential biomarker for the promotion of EMT in human breast cancer. *Oncol Rep*. 2018 Aug;40(2):759–66.
15. Lin H, Zhang H, Wang J, Lu M, Zheng F, Wang C, et al. A novel human Fab antibody for Trop2 inhibits breast cancer growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2014 Mar 1;134(5):1239–49.
16. Bardia A, Tolaney SM, Punie K, Loirat D, Oliveira M, Kalinsky K, et al. Biomarker analyses in the phase III ASCENT study of sacituzumab govitecan versus chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2021 Sep;32(9):1148–56.
17. Vidula N, Yau C, Rugo H. Trophoblast Cell Surface Antigen 2 gene (TACSTD2) expression in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2022 Aug;194(3):569–75.
18. Zeng P, Chen MB, Zhou LN, Tang M, Liu CY, Lu PH. Impact of TROP2 expression on prognosis in solid tumors: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Sep 20;6:33658.
19. Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*. 2012 Jan 5;195(1):52–60.
20. Ciccone V, Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Morbidelli L, Ziche M. Stemness marker ALDH1A1 promotes tumor angiogenesis via retinoic acid/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling in MCF-7 breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2018 Dec 12;37(1):311.
21. Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell PA, Prodanovic Z, Kumar B, et al. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1)

and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2013 Dec;68(12):1095–104.

22. Kong Y, Lyu N, Wu J, Tang H, Xie X, Yang L, et al. Breast cancer stems cell markers CD44 and ALDH1A1 in serum: distribution and prognostic value in patients with primary breast cancer. *J Cancer*. 2018;9(20):3728–35.

23. Yang W, Wang Y, Wang W, Chen Z, Bai G. Expression of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) as a Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer Using Immunohistochemistry. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2018 May 7;24:2864–72.

24. Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2400–7.

25. Sethi S, Sarkar FH, Ahmed Q, Bandyopadhyay S, Nahleh ZA, Semaan A, et al. Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Transl Oncol*. 2011 Aug;4(4):222–6.

26. Bardia A, Mayer IA, Diamond JR, Moroosse RL, Isakoff SJ, Starodub AN, et al. Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Jul 1;35(19):2141–8.

27. Kalinsky K, Diamond JR, Vahdat LT, Tolaney SM, Juric D, O'Shaughnessy J, et al. Sacituzumab govitecan in previously treated hormone receptor-positive/HER2-negative metastatic breast cancer: final results from a phase I/II, single-arm, basket trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2020 Dec;31(12):1709–18.

28. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, et al. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021 Apr 22;384(16):1529–41.

29. Rugo HS, Bardia A, Marmé F, Cortes J, Schmid P, Loirat D, et al. Primary results from TROPiCS-02: A randomized phase 3 study of sacituzumab govitecan (SG) versus treatment of physician's choice (TPC) in patients (Pts) with hormone

receptor-positive/HER2-negative (HR+/HER2-) advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2022 Jun 10;40(17\_suppl):LBA1001–LBA1001.

30. Rugo HS, Bardia A, Marmé F, Cortés J, Schmid P, Loirat D, et al. LBA76 Overall survival (OS) results from the phase III TROPiCS-02 study of sacituzumab govitecan (SG) vs treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with HR+/HER2- metastatic breast cancer (mBC). *Ann Oncol*. 2022 Sep 1;33:S1386.

31. Schettini F, Brasó-Maristany F, Kuderer NM, Prat A. A perspective on the development and lack of interchangeability of the breast cancer intrinsic subtypes. *Npj Breast Cancer*. 2022 Jul 19;8(1):1–4.

32. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.

33. Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2010 Dec;26(6):553–67.

34. Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp Hematol*. 2005 Jul;33(7):738–46.

35. Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens are defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Aug;78(8):5147–50.

36. Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, Palka G, Guerra E, Alberti S. Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;92(1–2):164–5.

37. Wu Y, Zhang L, Zhang L, Wang Y, Li H, Ren X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2586–94.

38. Stein R, Basu A, Chen S, Shih LB, Goldenberg DM. Specificity and properties of MAb RS7-3G11 and the antigen defined by this pan carcinoma monoclonal antibody. *Int J Cancer*. 1993 Dec 2;55(6):938–46.

39. Lin JC, Wu YY, Wu JY, Lin TC, Wu CT, Chang YL, et al. TROP2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signaling in lung adenocarcinoma. *EMBO Mol Med*. 2012 Jun;4(6):472–85.
40. Zhang K, Jones L, Lim S, Maher CA, Adkins D, Lewis J, et al. Loss of Trop2 causes ErbB3 activation through a neuregulin-1-dependent mechanism in the mesenchymal subtype of HNSCC. *Oncotarget*. 2014 Oct 15;5(19):9281–94.
41. Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2: a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):309–14.
42. McDougall ARA, Tolcos M, Hooper SB, Cole TJ, Wallace MJ. Trop 2: from development to disease. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2015 Feb;244(2):99–109.
43. Huang H, Groth J, Sossey-Alaoui K, Hawthorn L, Beall S, Geradts J. Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4357–64.
44. Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, et al. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlates with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2013 Feb;94(1):73–8.
45. Kobayashi H, Minami Y, Anami Y, Kondou Y, Iijima T, Kano J, et al. Expression of the GA733 gene family and its relationship to prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2010 Jul;457(1):69–76.
46. Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20882–7.
47. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Dev Camb Engl*. 2009 Jun;136(11):1951–60.
48. Memarzadeh S, Zong Y, Janzen DM, Goldstein AS, Cheng D, Kurita T, et al. Cell-autonomous activation of the PI3-kinase pathway initiates endometrial cancer from adult uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5;107(40):17298–303.

49. Zaman S, Jadid H, Denson AC, Gray JE. Targeting Trop-2 in solid tumors: future prospects. *OncoTargets Ther.* 2019;12:1781–90.
50. Mangino G, Grazia Capri M, Barnaba V, Alberti S. Presentation of native TROP-2 tumor antigens to human cytotoxic T lymphocytes by engineered antigen-presenting cells. *Int J Cancer.* 2002 Oct 1;101(4):353–9.
51. Son S, Shin S, Rao NV, Um W, Jeon J, Ko H, et al. Anti-Trop2 antibody-conjugated bioreducible nanoparticles for targeted triple negative breast cancer therapy. *Int J Biol Macromol.* 2018 Apr 15;110:406–15.
52. Goldenberg DM, Cardillo TM, Govindan SV, Rossi EA, Sharkey RM. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC). *Oncotarget.* 2015 Sep 8;6(26):22496–512.
53. Sharkey RM, McBride WJ, Cardillo TM, Govindan SV, Wang Y, Rossi EA, et al. Enhanced Delivery of SN-38 to Human Tumor Xenografts with an Anti-Trop-2-SN-38 Antibody Conjugate (Sacituzumab Govitecan). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5131–8.
54. Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, Trisal P, Goldenberg DM. Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011 May 15;17(10):3157–69.
55. Farivar TN, Najafipour R, Johari P. Nano - drug Delivery of Apoptosis Activator 2 to AGS Cells by Liposomes Conjugated with Anti-TROP2 Antibody. *North Am J Med Sci.* 2012 Nov;4(11):582–5.
56. Heist RS, Guarino MJ, Masters G, Purcell WT, Starodub AN, Horn L, et al. Therapy of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With an SN-38-Anti-Trop-2 Drug Conjugate, Sacituzumab Govitecan. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2017 Aug 20;35(24):2790–7.
57. Gray JE, Heist RS, Starodub AN, Camidge DR, Kio EA, Masters GA, et al. Therapy of Small Cell Lung Cancer (SCLC) with a Topoisomerase-I-inhibiting Antibody-Drug Conjugate (ADC) Targeting Trop-2, Sacituzumab Govitecan. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Oct 1;23(19):5711–9.
58. Faltas B, Goldenberg DM, Ocean AJ, Govindan SV, Wilhelm F, Sharkey RM, et al. Sacituzumab Govitecan, a Novel Antibody--Drug Conjugate, in



Patients With Metastatic Platinum-Resistant Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Feb;14(1):e75-79.

59. Okajima D, Yasuda S, Maejima T, Karibe T, Sakurai K, Aida T, et al. Datopotamab Deruxtecan, a Novel TROP2-directed Antibody-drug Conjugate, Demonstrates Potent Antitumor Activity by Efficient Drug Delivery to Tumor Cells. *Mol Cancer Ther*. 2021 Dec;20(12):2329–40.

60. Meric-Bernstam F, Krop IE, Juric D, et al. Phase 1 Trop-PanTumor01 Study Eval Datopotamab Deruxtecan Dato-DXd Unresectable Metastatic Horm Recept Breast Cancer BC. :Presented at: 2022 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-10, 2022; San Antonio, TX. Abstract PD13-08.

61. Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, Tripaldi R, Aloisi AL, Bonasera V, et al. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene*. 2013 Jan 10;32(2):222–33.

62. Yue H, Hu Z, Hu R, Guo Z, Zheng Y, Wang Y, et al. ALDH1A1 in Cancers: Bidirectional Function, Drug Resistance, and Regulatory Mechanism. *Front Oncol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 11];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.918778>

63. Wang Q, Jiang J, Ying G, Xie XQ, Zhang X, Xu W, et al. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER $\alpha$ 36+ breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res*. 2018 Mar;28(3):336–58.

64. Kalra S, Kaur RP, Ludhiadch A, Shafi G, Vashista R, Kumar R, et al. Association of CYP2C19\*2 and ALDH1A1\*1/\*2 variants with disease outcome in breast cancer patients: results of a global screening array. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018 Oct 1;74(10):1291–8.

65. Allison SE, Chen Y, Petrovic N, Zhang J, Bourget K, Mackenzie PI, et al. Activation of ALDH1A1 in MDA-MB-468 breast cancer cells that over-express CYP2J2 protects against paclitaxel-dependent cell death mediated by reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*. 2017 Nov 1;143:79–89.

66. Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, Kobierzycki C, Olbromski M, Gomulkiewicz A, et al. Expression of EMT Markers SLUG and TWIST in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2015 Jul;35(7):3961–8.

67. González B, Denzel S, Mack B, Conrad M, Gires O. EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2009 Aug;27(8):1782–91.

68. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer*. 2006 Jan 16;94(1):13–7.
69. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 7;367(2):235–41.
70. Kesharwani RK, Srivastava V, Singh P, Rizvi SI, Adeppa K, Misra K. A Novel Approach for Overcoming Drug Resistance in Breast Cancer Chemotherapy by Targeting new Synthetic Curcumin Analogues Against Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1A1) and Glycogen Synthase Kinase-3  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 Aug 1;176(7):1996–2017.
71. Wang R, Yang L, Li S, Ye D, Yang L, Liu Q, et al. Quercetin Inhibits Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4), Mucin 1 (MUC1), and Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2018 Jan 21;24:412–20.
72. Condello S, Morgan CA, Nagdas S, Cao L, Turek J, Hurley TD, et al. Beta-Catenin Regulated ALDH1A1 is a Target in Ovarian Cancer Spheroids. *Oncogene*. 2015 Apr 4;34(18):2297.
73. Liu L, Cai S, Han C, Banerjee A, Wu D, Cui T, et al. ALDH1A1 contributes to PARP inhibitor resistance via enhancing DNA repair in BRCA2 $^{-/-}$  ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2020 Jan;19(1):199–210.
74. Liu C, Qiang J, Deng Q, Xia J, Deng L, Zhou L, et al. ALDH1A1 Activity in Tumor-Initiating Cells Remodels Myeloid-Derived Suppressor Cells to Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Res*. 2021 Dec 1;81(23):5919–34.
75. Kwiatkowska-Borowczyk E, Czerwińska P, Mackiewicz J, Gryśka K, Kazimierczak U, Tomela K, et al. Whole cell melanoma vaccine genetically modified to stem cells like phenotype generates specific immune responses to ALDH1A1 and long-term survival in advanced melanoma patients. *Oncol Immunology*. 2018 Nov 2;7(11):e1509821.
76. Bhatia S, Wang P, Toh A, Thompson EW. New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. *Front Mol Biosci*. 2020;7:71.

77. Pal AK, Sharma P, Zia A, Siwan D, Nandave D, Nandave M, et al. Metabolomics and EMT Markers of Breast Cancer: A Crosstalk and Future Perspective. *Pathophysiology*. 2022 Jun;29(2):200–22.
78. Aggarwal V, Montoya CA, Donnenberg VS, Sant S. Interplay between tumor microenvironment and partial EMT as the driver of tumor progression. *iScience*. 2021 Feb 19;24(2):102113.
79. Wang G, Xu D, Zhang Z, Li X, Shi J, Sun J, et al. The pan-cancer landscape of crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and immune evasion relevant to prognosis and immunotherapy response. *Npj Precis Oncol*. 2021 Jun 22;5(1):1–10.

## **PRIMEIRO ARTIGO**

Artigo em processo de publicação. Por tal motivo, não foi incorporado na versão parcial da tese.

## **SEGUNDO ARTIGO**

Artigo em processo de publicação. Por tal motivo, não foi incorporado na versão parcial da tese.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo da presente tese foi somar informação aos dados conflitantes na literatura em relação à expressão de Trop-2 no CM luminal-like inicial. Nosso estudo demonstra que Trop-2 é altamente expresso no CM luminal-like inicial, independentemente de características clínicas e patológicas. Na população estudada, nenhum paciente apresentou ausência de expressão; setenta e nove (94%) demonstraram um H-Score entre 100-300. Esses dados estão em consonância com evidências indicativas de que a expressão de Trop-2 é frequente, intensa e pode não ter implicações prognósticas.(16,17)

A expressão de ALDH1A1 está associada a pior prognóstico em CM; contudo, não existiam dados evidenciando a existência de variação em sua expressão através das estruturas do microambiente tumoral (MT) em CM luminal. Nosso estudo demonstra que a expressão de ALDH1A1 é significativamente maior no estroma em relação ao citoplasma de células tumorais (TCC). Tal observação destaca a complexidade e a heterogeneidade do MT e levanta a hipótese de que a ALDH1A1 pode ter diferentes funções na evolução tumoral, a depender de seu local de expressão.

ALDH1A1 e Trop-2 nunca haviam sido avaliados de forma concomitante na mesma população de pacientes, existindo racional para eventual correlação visto que ambos são biomarcadores relacionados à EMT e evidências prévias os identificaram como marcadores de pior prognóstico em CM. O presente estudo demonstra que a expressão de Trop-2 independe da expressão de ALDH1A1.

Não conseguimos demonstrar nenhuma relação entre as características clínico-patológicas e a expressão de Trop-2 ou ALDH1A1; entendemos que a razão para a ausência de achados se deva a real falta de correlação ou o número restrito de pacientes incluídos em nossa amostra. No entanto, um dado relevante é a ausência de expressão de ALDH1A1 nos pacientes com estadió patológico I, sugerindo que ALDH1A1 pode ser um biomarcador para modificações experimentadas no MT durante o processo de carcinogênese e um indicador de evolução da doença. (62,76–79).

As limitações de nossa pesquisa são o número restrito de pacientes incluídos, a ausência de seguimento dos pacientes e a falta de dados sobre desfechos clínicos.

Entre as qualidades destacamos a robustez das metodologias aplicadas para avaliar a expressão de Trop-2 e ALDH1A1, o excelente desempenho dos anticorpos anti-Trop-2 e anti-ALDH1A1 escolhidos, o nível de concordância entre as leituras dos médicos avaliadores, a escolha de uma população representativa da prática diária em oncologia clínica e a avaliação de subgrupo de pacientes com melhor prognóstico menos explorado na literatura.

Trop-2 é um biomarcador comumente expresso no CM luminal-like inicial e sua utilidade neste subgrupo de pacientes é restrita. Devido à expressão forte e generalizada na maioria das amostras estudadas, existe racional para explorar tratamentos direcionados a esta proteína neste subgrupo de pacientes.

A expressão de ALDH1A1 é significativamente maior no estroma do que no TCC, e talvez a função de ALDH1A1 no processo de carcinogênese possa variar de acordo com esta característica.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

TROP-2 é uma proteína frequentemente presente no CM luminal-like inicial. Desta forma, a referida característica serve como estímulo para estudo de terapias direcionadas a este alvo. O estudo atual reforça a necessidade de se estudar o papel de ADCs anti-Trop2 em pacientes com CM luminal inicial de maior risco como tumores localmente avançados e/ou com pobre resposta às terapias convencionais como quimioterapia e endocrinoterapia. Ademais, caso futuros estudos sejam conduzidos no cenário luminal-like inicial de CM, devido à comum alta expressão encontrada, julgamos que a testagem de TROP-2 com intuito de selecionar pacientes pode ser desnecessária.

A variação de expressão de ALDH1A1 entre estroma e TCC existe, mas sua influência na evolução do CM ainda necessita de elucidação, podendo ser racional para pesquisas futuras.

A análise das lâminas de IMQ não demonstrou nenhum paciente com neoplasia de mama luminal inicial estágio I com ALDH1A1 presente tanto em estroma como TCC. Apesar de um pequeno número de pacientes avaliados neste contexto no presente estudo, o achado merece ser observado em análises futuras e, caso se confirme, eventualmente a expressão de ALDH1A1 possa se tornar um preditor da necessidade de intervenções mais agressivas como quimioterapia e/ou tratamentos antiestrogênicos mais potentes como, por exemplo, a associação de terapia hormonal a inibidores de ciclina. Ademais, o atual estudo reforça a necessidade de se continuarem as pesquisas com ALDH1A1 como alvo terapêutico em CM.



## ANEXOS

### STROBE

ÍTEM	N	PÁGINA
TÍTULO E RESUMO	1	Título ..... 40 Resumo ..... 41
INTRODUÇÃO		
CONTEXTO/JUSTIFICATIVA	2	Página ..... 42
OBJETIVOS	3	Página ..... 42
MÉTODOS		
DESENHO DO ESTUDO	4	Página ..... 42
PARTICIPANTES	5	Página ..... 42
TAMANHO AMOSTRAL	6	Página ..... 42
VARIÁVEIS	7	Página ..... 42
FONTES DE	8	Página ..... 43
DADOS/MENSURAÇÃO		
MÉTODOS ESTATÍSTICOS	9	Página ..... 46
RESULTADOS		
PARTICIPANTES	10	Página ..... 46
DADOS DESCRITIVOS	11	Página ..... 46
DESFECHO/RESULTADOS	12	Página ..... 47
PRINCIPAIS	13	Página ..... 48
DISCUSSÃO		
RESULTADOS PRINCIPAIS	14	Página ..... 50
LIMITAÇÕES	15	Página ..... 50
INTERPRETAÇÕES/	16	Página ..... 51
GENERALIZAÇÃO	17	Página ..... 51
OUTRAS INFORMAÇÕES		
FINANCIAMENTO	18	Página ..... 52

**Tabela 2. Strobe checklist do primeiro artigo.** Tabela evidenciando o cumprimento dos requisitos necessários para boa prática de pesquisa observacional em epidemiologia. (VERSÃO EM PORTUGUÊS PUBLICADA POR Malta M et al, Rev Saude Publica 2010, 44(3): 559-65.)

ÍTEM	N	PÁGINA
TÍTULO E RESUMO	1	Título ..... 55 Resumo ..... 56
INTRODUÇÃO		
CONTEXTO/JUSTIFICATIVA	2	Página ..... 57
OBJETIVOS	3	Página ..... 58
MÉTODOS		
DESENHO DO ESTUDO	4	Página ..... 58
PARTICIPANTES	5	Página ..... 58
TAMANHO AMOSTRAL	6	Página ..... 58
VARIÁVEIS	7	Página ..... 58
FONTES DE	8	Página ..... 59
DADOS/MENSURAÇÃO		
MÉTODOS ESTATÍSTICOS	9	Página ..... 64
RESULTADOS		
PARTICIPANTES	10	Página ..... 64
DADOS DESCRITIVOS	11	Página ..... 65
DESFECHO/RESULTADOS	12	Página ..... 66
PRINCIPAIS	13	Página ..... 66
DISCUSSÃO		
RESULTADOS PRINCIPAIS	14	Página ..... 74
LIMITAÇÕES	15	Página ..... 74
INTERPRETAÇÕES	16	Página ..... 74
GENERALIZAÇÃO	17	Página ..... 75
OUTRAS INFORMAÇÕES		
FINANCIAMENTO	18	Página ..... 75

**Tabela 3. Strobe checklist do segundo artigo.** Tabela evidenciando o cumprimento dos requisitos necessários para boa prática de pesquisa observacional em epidemiologia. (VERSÃO EM PORTUGUÊS PUBLICADA POR Malta M et al, Rev Saude Publica 2010, 44(3): 559-65.)

## PARECER CONSUBSTANCIADO CEP

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação da expressão imunohistoquímica de TROP 2 com marcadores de diferenciação mesenquimal e prognóstico de tumores luminais não metastáticos da mama

**Pesquisador:** MARCIA SILVEIRA GRAUDENZ

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 53053221.7.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.140.092

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 01 de Dezembro de 2021

---

**Assinado por:**  
**Têmis Maria Félix**  
**(Coordenador(a))**

# COMPROVANTE DE SUBMISSAO DO PRIMEIRO ARTIGO

22/05/2023, 00:01

Gmail - 2023-00075 MS Submitted to the Journal of Histochemistry & Cytochemistry



Rafael Coelho <rccmed@gmail.com>

---

## 2023-00075 MS Submitted to the Journal of Histochemistry & Cytochemistry

---

JHC Editorial Office <johc@histochemicalsociety.org>

21 de maio de 2023 às 23:57

Responder a: johc@histochemicalsociety.org

Para: rccmed@gmail.com

Cc: rconcologista@gmail.com

May 21, 2023

Rafael Correa Coelho  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Rua do Progresso  
Porto Alegre 97185000  
Brazil

Dear Dr. Coelho

Your manuscript entitled "Trop-2 expression by immunohistochemistry is characteristic in patients with early luminal-like breast cancer" by Rafael Coelho, Rubia Ruppenthal, and Marcia Graudenz has been successfully submitted online and is being considered for publication in the Journal of Histochemistry & Cytochemistry. The manuscript type is Article

The manuscript has been assigned the manuscript ID 2023-00075. Please use this manuscript ID in all future correspondence or when contacting the Editorial Office.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://jhc.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A4OZ1DRh2A7RDo2F5A9ftdaEzMaYXqNFOMnwZD8eWHqwZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

**\*STAY UP TO DATE WITH ALL THINGS JHC\***

Want to stay up to date with JHC and The Histochemical Society news and upcoming events? Like and follow our Twitter (<https://twitter.com/JHCnews>) and Facebook (<https://www.facebook.com/jhc.org>) pages and send us an email request to be added to our email list.

Please feel free to contact me if you have any questions.

Sincerely,

Editorial Office  
Journal of Histochemistry & Cytochemistry  
1801 Rockville Pike, Suite 350  
Rockville, Maryland 20852  
Phone (301) 634-7791  
E-mail [cgeorge@histochemicalsociety.org](mailto:cgeorge@histochemicalsociety.org)  
JHC Web <https://journals.sagepub.com/home/jhc>  
HCS Web [www.histochemicalsociety.org](http://www.histochemicalsociety.org)

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=484cbe51b3&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f:1766561427764496051&simpl=msg-f:1766561427764...> 1/1