



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

JAILSON DE SOUSA OLIVEIRA

**RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TROP2 COM FATORES CLÍNICO-
PATOLÓGICOS, SOBREVIDA E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

FORTALEZA

2024

JAILSON DE SOUSA OLIVEIRA

RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TROP2 COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS,
SOBREVIDA E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA TRIPLO NEGATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

FORTALEZA

2024

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

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

- O47r Oliveira, Jailson de Sousa.
Relação da expressão de trop2 com fatores clínico- patológicos, sobrevida e resposta à quimioterapia em pacientes com câncer de mama triplo negativo / Jailson de Sousa Oliveira. – 2024.
50 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior.
1. Neoplasias da mama. 2. Trop2. 3. Fatores clínico-patológicos. 4. Biomarcador tumoral. I. Título.
CDD 615.1
-

JAILSON DE SOUSA OLIVEIRA

RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TROP2 COM FATORES CLÍNICO- PATOLÓGICOS,
SOBREVIDA E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA TRIPLO NEGATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 20 de maio de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Flávio da Silveira Bitencourt
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
Aos meus pais e a minha tia Lúcia (*in
memorian*)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pelo apoio acadêmico e oportunidade de estudar em uma Instituição de grande renome nacional.

Ao Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) pela oportunidade de trabalhar e conseguir aliar a prática ao academicismo em um mesmo lugar.

Ao Prof. Dr. Roberto César pela excelente orientação, que contribuiu desde o início desse trabalho com a idealização do Projeto de Pesquisa e esteve presente em todas as etapas de efetivação dele, auxiliando na construção de cada etapa desse trabalho. Além disso, foi um grande mentor e incentivador da minha carreira acadêmica e realmente eu não teria chegado até aqui sem o seu apoio.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Pedro Filho e Prof. Dr. Raimundo Fernandes pelo tempo demandado na leitura do trabalho, pelas valiosas colaborações, e em especial à Profa. Dra. Deysi Viviana que contribuiu não apenas com seu vasto conhecimento, mas também com dados amostrais de pacientes para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus colegas da turma de Mestrado e Doutorado, que estiveram presentes e compartilharam momentos, aulas, práticas em laboratório durante esses dois anos, especialmente às doutorandas Gisely, Aurilene e Bianca que foram fundamentais na construção e elaboração das amostras estudadas nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro (*in memoriam*), que me proporcionou os primeiros ensinamentos na área de Farmacologia aplicada à Oncologia e Pesquisa Clínica e que me deu as primeiras ideias para realização desse trabalho.

A cada paciente que fez parte desse trabalho como amostra e contribuiu para avanço da ciência e estudo de melhorias nos tratamentos.

“O verdadeiro conhecimento é aquele que capacita as pessoas a se transformarem.”(Paulo Freire)

RESUMO

RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TROP2 COM FATORES CLÍNICO- PATOLÓGICOS, SOBREVIDA E RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

INTRODUÇÃO: O Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) é um subtipo que não expressa receptores hormonais e nem o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). Essas características tornam o CMTN mais agressivo e mais difícil de tratar. A TROP2 (Antígeno 2 da Superfície Celular Trofoblástica) é uma proteína transmembrana que pode estar expressa no CMTN e tem se associado com fatores clínico-patológicos de maior agressividade tumoral e piores desfechos de sobrevida. No entanto, os dados sobre o papel da TROP2 no Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) localizado e seu potencial como fator prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento ainda são limitados. **OBJETIVOS:** Analisar a expressão de TROP2 no Câncer de Mama Triplo Negativo Localizado, correlacionando essa expressão com características clínico-patológicas, resposta ao tratamento neoadjuvante e resultados de sobrevivência. A amostra foi composta por 54 pacientes selecionados a partir de técnica não-probabilística por conveniência, no período de 01 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2020. Para coleta dos dados, foram utilizados prontuários eletrônicos, material de biópsia do tumor primário e um formulário elaborado pelos autores. **RESULTADOS:** A idade média das pacientes foi 51 anos com uma faixa variando de 28 a 86 anos. Dos tumores, 62,9% foram classificados como carcinoma ductal, correspondendo a 34 pacientes. A invasão linfovascular (ILV) e a invasão perineural (IPN) foram observadas em 46,2% (25/45) e 18,5% (10/54) dos pacientes, respectivamente. Com relação ao estadiamento clínico ao diagnóstico observou-se que a maioria dos pacientes apresentou Estágio III correspondendo a 27 pacientes (50%). Outros 22 pacientes (40,7%) estavam no Estádio II e apenas 5 pacientes (9,2%) Estádio I. A avaliação por imunohistoquímica revelou que a coloração TROP2 mostrou positividade membranosa. Na maioria dos casos essa imunomarcagem variou de intensidade ao longo do tumor, sendo a marcação exclusivamente em células tumorais. A avaliação da expressão de TROP2 por imunofluorescência nos 54 pacientes mostrou que 39 (72,2%) pacientes apresentavam baixa expressão enquanto 15 (27,8%) pacientes tinham alta expressão de TROP2. A avaliação global da expressão de TROP2 mostrou que 90,7% (n=49/54) dos pacientes apresentavam alguma expressão de TROP2. A alta expressão de TROP2 foi significativamente associada à presença de invasão vascular linfática, ao tamanho do tumor e a um maior

estadiamento. Ao avaliar as amostras de 26 pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante, observou-se uma associação significativa entre a alta expressão de TROP2 (>37,5%) e uma maior taxa de resposta patológica completa. **CONCLUSÃO:** A expressão de TROP2 apresentou associação com fatores clínico- patológicos e contribuiu para uma maior resposta à quimioterapia em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Palavras-chave: neoplasias da mama; trop2; fatores clínico-patológicos; biomarcador tumoral.

ABSTRACT

RELATIONSHIP OF TROP2 EXPRESSION WITH CLINICAL-PATHOLOGICAL FACTORS, SURVIVAL AND RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

INTRODUCTION: Triple Negative Breast Cancer (TNBC) is a subtype that does not express hormone receptors and HER-2 protein, which makes it more aggressive. TROP2 is a transmembrane protein that may be expressed in TNBC and has been associated with clinicopathological factors of greater tumor aggressiveness and worse survival outcomes. There are limited data on the role of TROP2 in the setting of Localized TNBC and its possible value as a prognostic factor and predictor of response to treatment. **OBJECTIVES:** To analyze the expression of TROP2 in Triple Negative Breast Cancer at early and locally advanced stages and explore possible relationships with clinicopathological characteristics, response to neoadjuvant treatment and survival outcomes **MATERIAL AND METHODS:** The study followed a cross-sectional, retrospective model, with the target population being patients diagnosed with TNBC Stages I, II or III from January/2012 to December/2020. The sample consisted of 54 patients selected using a non-probabilistic technique for convenience, from January 1, 2012 to December 31, 2020. To collect the data, electronic medical records, biopsy material from the primary tumor and a form prepared by the authors. **RESULTS:** The average age of the patients was 51 years with a range from 28 to 86 years. The majority of tumors in our study were classified as ductal carcinoma histological subtype, which corresponded to 34 patients (62.9%). The presence of lymphovascular invasion (ILV) and perineural invasion (IPN) were present in 46.2% (n=25) and 18.5% (n=10) of patients. Regarding clinical staging at diagnosis, it was observed that the majority presented Stage III corresponding to 27 patients (50%) while 22 patients (40.7%) presented Stage II and only 5 patients (9.2%) presented Stage I. Immunohistochemical evaluation showed that TROP2 staining showed membranous positivity, and in most cases it was of variable intensity throughout the tumor, with staining being exclusively in tumor cells. Evaluation of TROP2 expression by immunofluorescence in the 54 patients showed that 39 (72.2%) patients had low TROP2 expression and 15 (27.8%) patients had high expression. The global assessment of TROP2 expression showed that 90.7% (n=49/54) of patients had some TROP2 expression. High TROP2 expression was significantly associated with the presence of lymphatic vascular invasion, tumor size and higher staging. When samples from 26 patients who underwent neoadjuvant chemotherapy were evaluated, a

significant association was observed between high TROP2 expression (>37.5%) and a high rate of complete pathological response. **CONCLUSION:** TROP2 expression was associated with clinicopathological factors and contributed to a greater response to chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer.

Keywords: breast neoplasms; trop2; clinicopathological factors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 –	Curva ROC para estimativa de ponto de corte de expressão por imunofluorescência como preditor de resposta terapêutica.....	34
Gráfico 2 –	Expressão de TROP2 de acordo com o Estadiamento.....	37
Gráfico 3 –	Taxa de Resposta Patológica Completa de acordo com a expressão TROP2.....	38
Gráfico 4 –	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença com base na imunoexpressão para TROP2.....	39
Tabela 1 –	Características clínico-patológicas dos pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo.....	30
Tabela 2 –	Estudo da associação entre dados clínico-patológicos, o padrão de imunofluorescência de TROP2 e a resposta patológica completa.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da TROP2 nas vias sinalização associadas ao câncer.....	17
Figura 2 – Mecanismos de ação de terapias direcionadas a TROP2.....	32
Figura 3 – Imagem representativa da expressão de TROP2 por imuno-histoquímica..	33
Figura 4 – Imagem representativa da expressão de TROP2 por imunofluorescência..	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
TROP2	Antígeno 2 da Superfície Celular Trofoblástica
ILV	Invasão Linfovascular
IPN	Invasão Perineural
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
BRCA	<i>Breast Cancer Gene</i>
TILs	Linfócitos Tumorais Infiltrantes
CM	Câncer de Mama
IM	Imunomodulador
MES	Mesenquimal
LAR	Receptor de Andrógeno Luminal
KI-67	Índice de proliferação celular
TACSD	<i>Tumor Associated Calcium Signal Transducer</i>
CSCs	Células Tronco Cancerosas
IMC	Índice de Massa Corporal
ADC	Conjugado Droga-Anticorpo
SN-38	Inibidor de Topoisomerase I
SG	Sacituzumabe Govitecan
DatoDx	Datopotamabe Deruxtecan
SLD	Sobrevida Livre de Doença
HHJ	Hospital Haroldo Juaçaba
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
TNE	Tipo não especial
OR	Razão de chances
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Câncer de mama triplo negativo.....	14
1.2	Glicoproteína TROP.....	16
1.3	Terapias anti-TROP2.....	19
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	23
3.1	Modelo do estudo, local e amostra.....	23
3.2	Procedimentos de coleta de dados.....	23
3.2.1	<i>Produção de tissue microarray (tma).....</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Análise da expressão de trop2 por imunohistoquímica.....</i>	<i>25</i>
3.2.3	<i>Análise da expressão de trop2 por imunofluorescência.....</i>	<i>26</i>
3.3	Análise dos dados.....	27
3.4	Aspectos éticos.....	28
4	RESULTADOS.....	29
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença complexa que apresenta um grande grau de heterogeneidade inter e intratumoral. Por esse motivo, é necessária uma abordagem personalizada para obter as melhores respostas nos pacientes ao administrar as modalidades de tratamento (Marusyk *et al*, 2012). A estratificação histológica do câncer de mama com base principalmente na expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor ERBB2 (HER2) lançou as bases para a classificação do câncer de mama em quatro subtipos moleculares distintos (ou seja, Luminal A, Luminal B, enriquecido com Her2, triplo negativo) e tem sido útil para o direcionamento do melhor tratamento. (Lehmann *et al*, 2011)

A prevalência do Câncer de Mama no Brasil assim como as características clínico-patológicas dos pacientes foi avaliada no estudo AMAZONA III que avaliou um total de 2.950 pacientes, indicando que a maioria dos pacientes (68,6%) apresenta câncer de mama em estágio II-III e histologia carcinoma ductal <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36418703/> (80,9%). O subtipo de câncer de mama mais comum foi luminal A (48,0%), seguido por luminal B-HER2 positivo (17,0%) e triplo negativo (15,6%). Além disso, também evidenciou que apenas 34% dos pacientes foram diagnosticados por exames de triagem. (Rosa *et al*, 2020)

1.1 Câncer de mama triplo negativo

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) foi responsável por 12% dos cânceres de mama diagnosticados nos Estados Unidos de 2012 a 2016, com uma sobrevivência de 5 anos 8% a 16% menor do que a doença com receptor hormonal positivo, o que mostra que é um subtipo de câncer de pior prognóstico. Apesar de considerado um subtipo de pior prognóstico, o CMTN apresenta alta taxa de resposta à quimioterapia, justificada pela alta taxa de renovação celular. (Howard, *et al*, 2021)

O Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) é definido pela ausência do receptor de estrogênio, receptor de progesterona (RP) e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e é responsável por quase 15% dos tumores de mama. Os pacientes geralmente são jovens (<50 anos), têm menos tempo para recidiva nos estágios iniciais e têm maior risco de metástases viscerais, incluindo metástases cerebrais. A maioria dos CMTN tem alto grau histológico patológico e altas taxas de proliferação, especialmente carcinoma ductal invasivo, metaplásico, apócrino e carcinoma medular. (Foulkes *et al*, 2010)

O CMTN apresenta características que o diferenciam de outros subtipos de Câncer de Mama (CM), como maior infiltração tumoral linfócitos (TILs) e maior porcentagem de mutações germinativas como BRCA1/2. As curvas de sobrevida no CMTN, diferente de outros subtipos de Câncer de Mama, são caracterizadas por um aumento da recidiva e uma diminuição da sobrevida durante os primeiros 3 a 5 anos após o diagnóstico. As recorrências tardias são mais frequentes em CM estrogênio positivo do que em CMTN. (Stanton *et al*, 2016)

Uma classificação molecular do CMTN identificou 6 subtipos usando assinaturas de expressão gênica: *basal-like 1*, *basal-like 2*, imunomodulador (IM), mesenquimal (MES), mesenquimal *stem-like* e receptor de andrógeno luminal (LAR). Cada subtipo é enriquecido em distintas ontologias gênicas e padrões de expressão gênica. (Lehmann *et al*, 2011)

A correlação entre subtipo molecular, expressão gênica e via celular é essencial para identificar agentes alvos. Em relação ao prognóstico, o subtipo imunomodulador está associado a um melhor prognóstico e o subtipo receptor de andrógeno luminal (LAR) a um prognóstico ruim. Burstein e colaboradores, por outro lado, classificaram os CMTN em quatro subtipos: LAR, MES, imunossuprimidos do tipo basal e imunoativados do tipo basal. (Burstein *et al*, 2015)

Os atuais preditores de sobrevida global no Câncer de Mama são o tamanho do tumor, a classificação, o índice de proliferação celular (Ki-67) e a invasão vascular, ligando inevitavelmente a determinação do prognóstico do tumor aos indicadores tardios. Por outro lado, marcadores moleculares como p53 e Receptor de Estrógeno (RE) mostram pouco impacto na sobrevida do paciente. Além disso, os receptores hormonais são preditores fracos do resultado do paciente, apenas a ausência combinada de RE, RP e HER-2 está associada a cânceres de mama triplo-negativos, subtipo considerado mais agressivo. (Ambrogi *et al*, 2014)

Os marcadores prognósticos tradicionais no Câncer de Mama são indicadores insuficientes da agressividade do tumor e não discriminam adequadamente entre os diferentes resultados biológicos e clínicos, tornando imprescindível a descoberta de novos indicadores prognósticos no Câncer de Mama. As proteínas que desempenham papéis no crescimento, diferenciação, invasão e/ou metástase do câncer de mama podem influenciar o progresso biológico dos tumores e, assim, fornecer informações prognósticas importantes (Carvalho, 2023).

1.2 Glicoproteína TROP

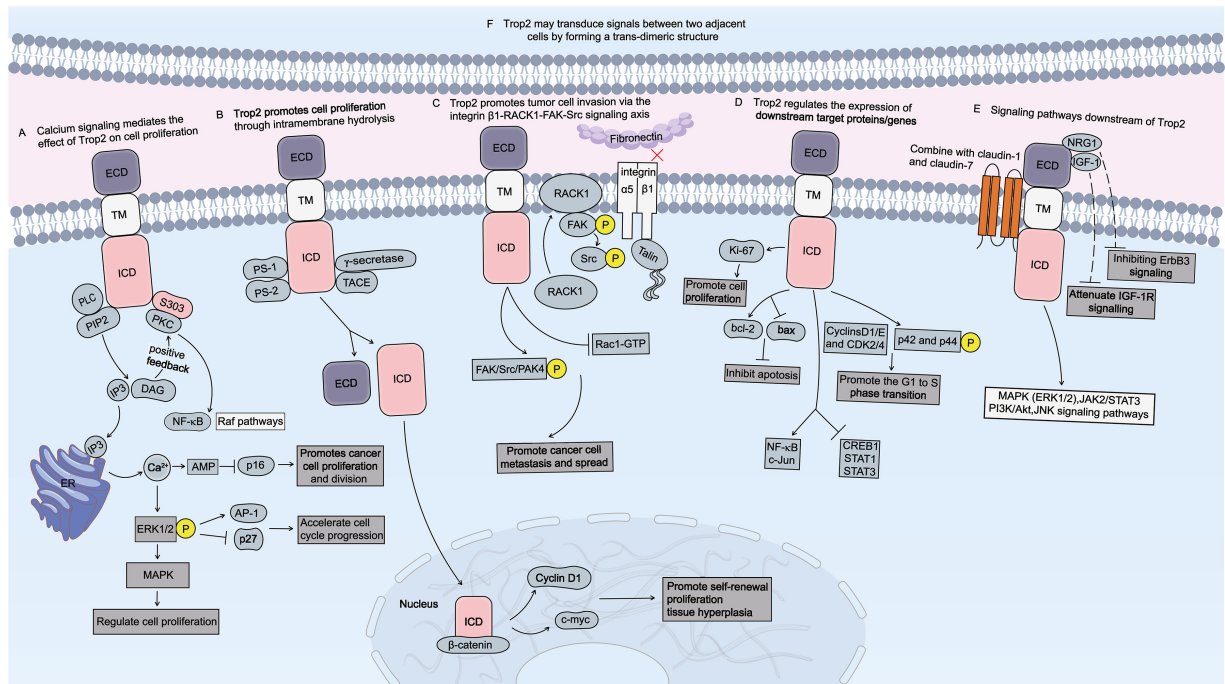
A TROP2 (antígeno 2 da superfície celular trofoblástica) é uma glicoproteína transmembrana codificada pelo gene *TACSTD2* (*tumor associated calcium signal transducer 2*). É um transdutor de sinal de cálcio intracelular que é expresso diferencialmente em muitos tipos de câncer. Ele sinaliza às células para autorrenovação, proliferação, invasão e sobrevivência, possuindo características semelhantes às das células-tronco. A TROP2 pode estar expressa em tecidos normais, embora, em contraste, apresente alta expressão em muitos tipos de câncer e a superexpressão de TROP2 tenha significado prognóstico. (Shvartsur *et al*, 2015)

A TROP2 foi inicialmente identificada em uma linhagem celular de câncer trofoblástico e é superexpressa em muitos cânceres epiteliais. Ela desempenha um papel celular multifuncional, incluindo a transdução de cálcio citoplasmático que depende de um sítio específico de fosforilação da proteína quinase C específica. Além disso, não há evidências de mutações TROP2 associadas a tumores, nem de indução de transformação oncogênica por TROP2 por si só. A expressão aumentada de TROP2 de tipo selvagem é um fator-chave para o crescimento do câncer. (Trerotola *et al*, 2013)

Importante destacar que a TROP2 ativa diversas vias de sinalização associadas ao desenvolvimento tumoral, como as vias Wnt/ β -catenina e MAPK/ERK, além da PI3K/Akt, que estão ligadas ao receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Adicionalmente, sua influência se estende às metaloproteinases de matriz, que promovem a invasão das células cancerosas e também desempenha um papel na manutenção das células-tronco cancerosas (CSCs), conhecidas por sua associação com a recorrência do tumor e resistência aos tratamentos. (Yao *et al*, 2023) (Lombardi *et al*, 2023) (Shvartsur *et al*, 2015).

Os receptores na superfície das células são moléculas essenciais para a transdução de sinais, regulando vias oncogênicas que influenciam o crescimento, a proliferação e a metástase de tumores. Na prática clínica, diversos medicamentos antitumorais que têm como alvo esses receptores, como a proteína 1 de morte celular programada (PD-1), o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e o CD33, são frequentemente utilizados. Pesquisas atuais demonstraram que a TROP2 atua como um novo receptor de superfície celular, integrando-se em muitas vias de sinalização fundamentais. O esquema a seguir demonstra a participação multifacetada da TROP2 em várias vias de sinalização relacionadas ao câncer. (Xinlin *et al*, 2022)

Figura 1 - Mecanismo de ação da TROP2 nas vias sinalização associadas ao câncer



(A) Os resíduos de serina no domínio intracelular da TROP2 podem ser fosforilados pela proteína quinase C (PKC), resultando em um aumento na concentração intracelular de cálcio. Isso ativa a via MAPK, acelerando o ciclo celular e promovendo a proliferação de células cancerígenas. A mudança na concentração de cálcio mediada pela TROP2 inibe a expressão de p16 através da via da proteína quinase ativada por AMP cíclico. O aumento da fosforilação de ERK1/2 eleva a atividade de AP-1 e reduz p27, acelerando a progressão do ciclo celular. O Diacilglicerol (DAG) ativa mais PKC em um mecanismo de feedback positivo, levando à fosforilação da TROP2 e ativação das vias RAF e NF- κ B. (B) TROP2 é hidrolisada em CDI pela ação conjunta de TACE, γ -secretase e PS-1/2. Acoplando-se com a β -catenina no núcleo, a TROP2 pode induzir a regulação positiva da expressão de ciclina D1 e do proto-oncogene c-myc, controlando a auto-renovação, proliferação e hiperplasia tecidual. (C) TROP2 pode promover o acúmulo de RACK1 na membrana celular, interagindo com a integrina β 1 e talina, promovendo a localização do complexo integrina α 5 β 1/talina na borda da célula. Além disso, TROP2 pode aumentar a fosforilação de FAK, Src e PAK4, mas regula negativamente os níveis de Rac1-GTP. (D) TROP2 aumenta os níveis de marcadores de proliferação (Ki-67) e proteínas/genes chave (ciclina D1/E, CDK2/4, p42/44 fosforilado). TROP2 inibe a apoptose das células cancerígenas ao aumentar a expressão de bcl-2 e reduzir a expressão de bax. Além disso, a TROP2 também regula vários fatores de transcrição, alguns dos quais (NF- κ B e c-Jun) são regulados positivamente, enquanto outros (CREB1, STAT1 e STAT3) são regulados negativamente. (E) A TROP2 está envolvida em várias vias de sinalização a jusante, incluindo MAPK (ERK1/2), JAK2/STAT3, PI3K/Akt e JNK. A TROP2 pode se ligar às proteínas transmembrana claudina-1 e claudina-7, que se correlacionam com a expressão e localização subcelular de proteínas associadas às junções estreitas. Ao interagir com NRG1 e IGF-1, a TROP2 inibe as sinalizações de ErbB3 e IGF-1R, respectivamente. (F) A TROP2 pode transmitir sinais entre duas células adjacentes formando uma estrutura transdimérica.

Fonte: Xinlin, *et al.* (2022)

A TROP2 pode desempenhar um papel na progressão tumoral, dado o envolvimento em diversas vias moleculares tradicionalmente associadas ao desenvolvimento do câncer. A alta expressão de TROP2 tem se correlacionado com pior prognóstico no colangiocarcinoma, câncer de pâncreas, câncer cervical, câncer gástrico, câncer de mama e

outros. O aumento da expressão de TROP2 foi associado a menores taxas de sobrevida global e livre de doença em vários tumores sólidos. Dado o padrão de expressão de TROP2 e os resultados prognósticos ruins associados, a TROP2 pode ser um valioso biomarcador preditivo de prognóstico e um potencial alvo terapêutico em tumores sólidos humanos. (Zeng et al, 2016)

A superexpressão de TROP2 de tipo selvagem mostra-se necessária e suficiente para impulsionar o crescimento do câncer, levando a alterações a jusante na proliferação celular, migração, invasão e sobrevivência de células cancerígenas. A superexpressão de TROP2 se correlaciona com um mau prognóstico em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama. (Shvartsur *et al*, 2015)

Os tumores de Mama Receptor Hormonais negativos e HER2-positivos apresentam níveis mais elevados de TROP2 do que os casos Receptores Hormonais positivos e HER2-negativos, sugerindo que a superexpressão de TROP2 pode estar associada a um fenótipo de câncer de mama menos favorável. (Huang *et al*, 2005).

No entanto, traduzir o potencial do TROP2 em estratégias terapêuticas eficazes tem sido um desafio. A heterogeneidade na expressão de TROP2 nos subtipos de câncer de mama pode afetar a resposta ao tratamento e os resultados clínicos. (Guo et al, 2023). Estudos sobre a associação entre a expressão de TROP2 e características clínico- patológicas no Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) apresentam resultados conflitantes.

Enquanto alguns estudos não encontraram correlação significativa entre os níveis de TROP2 e fatores clínicos e patológicos no câncer de mama, como idade, subtipo histológico, grau do tumor, estágio, invasão linfovascular ou níveis de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), o valor da TROP2 como um fator prognóstico no câncer de mama tem se mostrado importante. (Jeon *et al*, 2022).

Em outros estudos que avaliaram a correlação da expressão de TROP2 com aspectos clínico-patológicos foi evidenciado que a maior expressão de TROP2 foi correlacionada com presença de invasão linfovascular e envolvimento linfonodal mas não foram observadas correlações significativas entre a expressão de TROP2 e o tamanho e grau do tumor. (Izci *et al*, 2022).

A expressão de TROP2 na membrana celular como tem sido vinculada a uma menorexpectativa de vida em pacientes com câncer, estando relacionada a um aumento na frequência de recidivas e a uma piora na sobrevida. Essas descobertas sugerem que o nível de expressão de TROP2 desempenha um papel determinante na progressão tumoral, sugerindo a possibilidade de utilizar o estado de ativação do TROP2 como um novo indicador prognóstico para o câncer de mama. (Ambrogi *et al*, 2014)

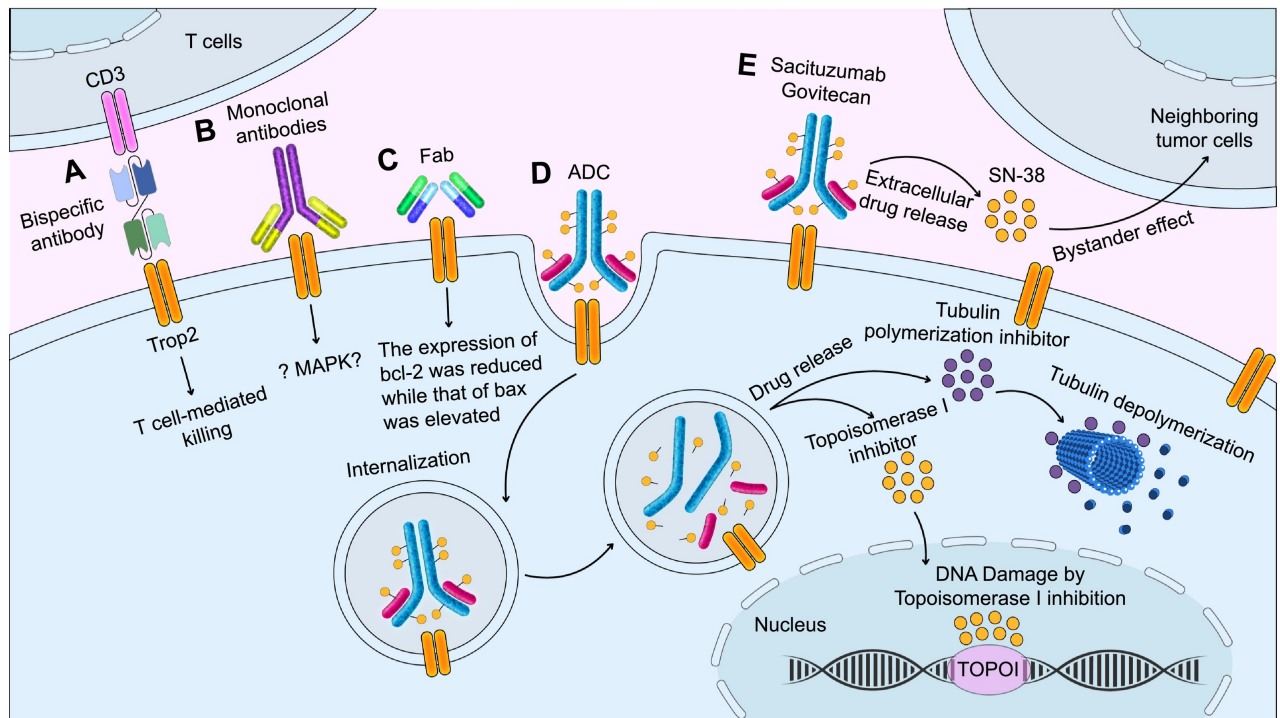
Com relação ao padrão de expressão de TROP2 na doença localizada e na doença metastática, tem se observado a expressão membranosa moderada a forte de TROP2 em pelo menos 10% das células tumorais, com um padrão de expressão semelhante de TROP2 independentemente do tratamento neoadjuvante ou tumor primário/metástase. (Jeon *et al*, 2022)

Embora o significado prognóstico da expressão de TROP2 no CMTN metastático tenha sido sugerido, é necessária uma avaliação adicional do valor preditivo da expressão de TROP2 para terapia direcionada. Nesse sentido, abordagens alternativas diagnósticas do marcador podem ser úteis, sendo a imunofluorescência uma técnica que apresenta maior sensibilidade que a imunohistoquímica, além de permitir o estudo de co-localização de alvos pesquisados. (Hussaini *et al*, 2022)

1.3 Terapias anti-TROP2

Dado o padrão de expressão de TROP2 nos tumores de mama, esta proteína foi avaliada como alvo terapêutico no Câncer de Mama Triplo Negativo Metastático. O sacituzumabe govitecan é um conjugado anticorpo-droga (ADC) composto por um anticorpo direcionado ao antígeno 2 da superfície celular do trofoblasto humano (TROP2) acoplado ao SN-38 (inibidor da topoisomerase I) por meio de um ligante hidrolisável. Esse medicamento foi avaliado em um estudo randomizado que avaliou pacientes com CMTN metastático que haviam progredido a uma primeira linha de tratamento paliativo, e mostrou ganho de sobrevida livre de progressão da ordem de 4 meses e ganho de sobrevida global de 6 meses em favor do sacituzumabe govitecan quando comparado a quimioterapia padrão [taxano/carboplatina ou dose densa de doxorubicina/ciclofosfamida densa (ddAC)]. Esse ganho importante de sobrevida no CMTN metastático estimulou a aprovação desse medicamento por agências regulatórias para uso em vários países, inclusive no Brasil. O esquema a seguir mostra o mecanismo de ação dos ADCs e outras terapias anti-TROP2 (Bardia *et al*, 2021)

Figura 2 - Mecanismos de ação de agentes direcionados ao Trop2



(A) Anticorpos biespecíficos direcionados a TROP2 e CD3 ativam células T e aumentam ou restauram potencialmente a atividade tumoricida de células T. (B) Os anticorpos monoclonais direcionados a TROP2 podem regular negativamente a via de sinalização da MAPK a jusante, mas o mecanismo de ação específico não foi totalmente compreendido. (C) Anticorpos Fab direcionados a TROP2 podem reduzir a expressão de bcl-2 e regular positivamente a expressão de bax. (D) Mecanismo de ação dos ADCs anti-Trop2 na prática clínica. De acordo com as cargas úteis, os ADCs atuais podem ser divididos em dois tipos principais. A primeira categoria, representada por SG, utiliza inibidores da topoisomerase I como cargas úteis, que promovem a apoptose através da indução de danos no DNA. A segunda categoria, JS-108 e PF-06664178, utiliza inibidores de polimerização de microtúbulos para bloquear a polimerização de microtúbulos. (E) SG mata células tumorais circundantes através de um efeito espectador exclusivo, que é atribuído ao seu ligante dependente de pH hidrolisado no ambiente ácido do câncer.

Fonte: Xinlin *et al.* (2022)

Um outro conjugado anticorpo-droga (ADC) anti-TROP2 também vem sendo avaliado no cenário do Câncer de Mama Metastático e de outros tumores sólidos. A segurança e eficácia desse novo ADC anti-TROP-2, datopotamab deruxtecan (Dato-Dxd), foi investigada no estudo de fase I TROPION-PanTUMOR01 entre pacientes com tumores sólidos avançados, incluindo CMTN refratário ao tratamento padrão. O Dato-Dxd é um inibidor da topoisomerase I (derivado de exatecano) ligado a um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G humanizada (IgG1) anti-TROP2 através de um ligante peptídico clivável. Os pacientes com CMTN inscritos no TROPION-PanTUMOR01 receberam uma mediana de 3 terapias anteriores. Os dados provisórios da coorte de 44 pacientes com CMTN avançado ou metastático demonstraram uma taxa de resposta global de 34% em um acompanhamento médio de 7,6 meses e uma taxa de

controle da doença de 77%. (Krop *et al*,2022)

As associações entre a expressão da proteína TROP2, características clínico-patológicas e desfechos no câncer de mama triplo-negativo (CMTN) localizado são limitadas, especialmente no contexto brasileiro, apesar do reconhecimento da importância da TROP2 como um biomarcador e importante alvo terapêutico no cenário do CMTN metastático. Ao explorar o papel da TROP2 no câncer de mama triplo-negativo localizado, nosso estudo busca preencher essa lacuna de conhecimento, potencialmente contribuindo para avanços significativos na identificação de pacientes com CMTN localizado que podem se beneficiar de terapias direcionadas e personalizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de TROP2 no Câncer de Mama Triplo Negativo Localizado e explorar possíveis relações com características clínico-patológicas, resposta ao tratamento neoadjuvante e resultados de sobrevivência.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão de TROP2 em amostras de Câncer de Mama Triplo Negativos comparando grupos sem expressão ou com baixa expressão de TROP2 com o grupo que apresenta alta expressão de TROP2;
- b) Correlacionar a expressão de TROP2 com parâmetros clínicos de agressividade tumoral como tamanho tumoral, presença de metástase linfonodal e Estadiamento Clínico;
- c) Correlacionar a expressão de TROP2 com parâmetros patológicos de agressividade tumoral como o grau histológico, índice de proliferação celular, invasão vascular linfática;
- d) Correlacionar a expressão de TROP2 com taxas de resposta patológica completa em pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante
- e) Correlacionar a expressão de TROP2 com taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo do estudo, local e amostra

O estudo seguiu um modelo retrospectivo, transversal, observacional e analítico.

Foram considerados elegíveis os pacientes que apresentassem os critérios

abaixo:

- a) Diagnóstico de Câncer de Mama Triplo Negativo Estágios I, II e III;
- b) Idade acima de 18 anos;
- c) Ter material de *core biopsy* disponível para realização de imuno-histoquímica e imunofluorescência

Foram excluídos os pacientes que apresentaram pelo menos um dos critérios:

- a) Pacientes com doença metastática ao diagnóstico;
- b) Pacientes que perderam seguimento no serviço

A amostra foi composta por 54 pacientes selecionados a partir de técnica não probabilística por conveniência, no período de 01 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2020.

3.2 Procedimentos de coleta de dados

Foram analisados os prontuários eletrônicos e material da *core-biopsy* do diagnóstico de pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ), após seleção por técnica não probabilística daqueles com diagnóstico de Câncer de Mama Triplo Negativo Estágios I, II e III no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2020.

Foram coletadas variáveis sociodemográficas, clínicas e terapêuticas, incluindo: idade, raça, história familiar de câncer de mama, patologia do tumor (subtipo, grau histológico, índice de proliferação celular (ki-67), presença de invasão linfovascular, presença ou não de invasão perineural), estadiamento Tumoral (T), Linfonodal (N) e estadiamento clínico ao diagnóstico (Estágios I, II ou III). Seguem a seguir as variáveis investigadas:

Variáveis Investigadas

- a) Variáveis Nominais
- b) Sexo (masculino / feminino)

- c) Raça (branca / parda / não especificada)
- d) História familiar de câncer de mama (sim / não / não especificada)
- e) Subtipo histológico
- f) Presença de invasão linfovascular (sim/não)
- g) Resposta patológica completa (pCR) (sim/não)

Variáveis Ordinais

- a) Expressão de TROP2 (< 37,5% / > ou igual 37,5%)
- b) Grau Histológico (1/2/3)
- c) Índice de proliferação celular ki-67 (< ou igual 20% / > 20%)
- d) Estadiamento Tumoral (T1/T2/T3/T4)
- e) Estadiamento Linfonodal (N0/N1/N2/N3)
- f) Estadiamento Clínico TNM ao diagnóstico (I / II / III)

Os dados patológicos dos pacientes foram obtidos através da análise dos resultados dos exames anatomopatológicos dos produtos de *core-biopsy* obtidos no departamento de Patologia do HHJ.

A avaliação dos dados clínicos de estadiamento, assim como do tipo de cirurgia realizadas foram feitos através da análise de evoluções médicas e boletins cirúrgicos, respectivamente.

Dentre as variáveis investigadas, foram consideradas como variável primária a expressão de TROP2, e variáveis secundárias os parâmetros clínico-patológicos, resposta ao tratamento neoadjuvante, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global.

A Sobrevida Livre de Doença (SLD) compreende o período desde o diagnóstico de Câncer de Mama até a data de detecção de uma recidiva de doença local ou sistêmica após o tratamento. A Sobrevida Global compreende o período desde o diagnóstico até a morte por qualquer causa.

Para estimar as probabilidades de sobrevida a cada tempo foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier, sem e com estratificação.

As amostras dos tumores foram obtidas através dos blocos de parafina de biópsias do diagnóstico do tumor primário realizadas pelos pacientes presentes no serviço de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba.

3.2.1 Produção de tissue microarray (TMA)

Os blocos de parafina contendo amostras representativas de biópsias por agulha grossa/*core biopsy* de mama do diagnóstico inicial dos casos selecionados devidamente registradas foram analisadas por um Patologista para determinação e marcação de duas áreas contendo os maiores percentuais de células tumorais. Uma agulha de 2 mm (Quick Ray, UNITMA®) foi utilizada para retirar um fragmento cilíndrico do bloco doador e colocação num bloco receptor de 60 poços. O bloco receptor foi organizado seguindo a sequência: 4 casos de controles negativos nos vértices, compostos por tecido apropriados indicados na bula dos anticorpos; adicionados de 54 casos. Isto gerou a confecção de 2 blocos de *Tissue Microarray* (TMA) contendo os casos da pesquisa.

3.2.2 Análise da expressão de TROP2 por imunohistoquímica

Foi realizada a microtomia com cortes histológicos de 2 µm de espessura em lâminas silanizadas. A imunohistoquímica foi efetuada usando o kit EnVision automatizado da Dako (Livre de biotina) (REF). Devido ao processo de fixação, foi aplicado um tratamento de recuperação antigênica para expor os epítomos através do calor.

As etapas básicas do processo imuno-histoquímico foram as seguintes: 1. Fixação e inclusão dos tecidos; 2. Corte e montagem das secções de tecido; 3. Desparafinização em xileno e reidratação dos cortes em etanol graduado e lavagem em água destilada; 4. Recuperação antigênica com tampão citrato, 10 mM, pH 6,0 com vapor; 5. Coloração imunohistoquímica; 6. Contracoloração; 7. Desidratação e estabilização com montagem; 8. Observação ao microscópio.

A imunocoloração foi feita de acordo com a recomendação do fabricante. Os tecidos foram incubados em temperatura de 2 – 4°C, overnight, com o anticorpo primários coelho anti-TROP2 (1:400, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA).

As diluições foram determinadas por métodos de titulação padrão para uma coloração final com menos manchas de fundo. O protocolo de imuno-histoquímica utilizou sistema de detecção universal de alta sensibilidade (REF), incluindo bloqueador pré-diluído, anticorposecundário além do tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

A análise imunohistoquímica (IHQ) foi realizada por Patologista especializado nas amostras dos pacientes selecionados. Foi utilizado um anticorpo primário para TROP2, obtido comercialmente.

3.2.1 Análise da expressão de TROP2 por imunofluorescência

Foram obtidos cortes a partir de tecidos fixados em parafina de material procedente de core biopsy do diagnóstico. As lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa por 1 hora a 60°C, seguido por dois banhos em Xilol por 10 minutos para desparafinação dos tecidos. A remoção do excesso de Xilol e a rehidratação dos tecidos foram realizados por meio de banhos sucessivos de etanol em concentrações decrescentes, a saber: 2 banhos de 10 min de etanol absoluto; 1 banho de etanol a 90%, 70%, 50% por 5 minutos, nessa ordem. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente por 10 min, seguido por 3 banhos de PBS por 5 min, cada. A recuperação antigênica foi feita em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95 °C, por 30 minutos (microondas, steamer panela de pressão???, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após essa etapa, foram realizados 3 banhos de 5 min de PBS. Apermeabilização das membranas foi feita em solução contendo 200 µL de PBS, 4 mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 200 µL de triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) durante 10 min. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS de 5 min cada. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com Glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em BSA 5% por 30min. Os tecidos foram incubados em temperatura de 2 – 4°C, *overnight*, com o anticorpo primário feito em coelho anti-TROP2 (1:400, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Completado o tempo de incubação do anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens de 5 min cada com PBS para posterior incubação com o anticorpo secundário *donkey, anti-rabbit*, Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 hora e 30 min na mesma concentração estabelecida para o anticorpo primário (1:400). A partir desse ponto, as etapas que sucedem foram feitas protegidos da luz. Após o término da incubação do anticorpo secundário, foram feitas 3 lavagens com PBS durante 5 min cada. Os núcleos celulares foram marcados a partir de incubação com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 µL em 200 mL de PBS) durante 30 min, seguido por lavagens sucessivas em água destilada, totalizando 3 lavagens de 5 min cada. Para montagem das lâminas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, EUA).

Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado um microscópio de fluorescência com câmera digital acoplado (ByoTekCytation Imaging, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), como descrito na literatura (Hussaini *et al*, 2022)

As imagens obtidas foram analisadas utilizando um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). A quantificação da área fluorescente foi feita por diferenciação dos pixels fluorescentes relacionados a fluorescência vermelha (Alexa Fluor 568) e a coloração azul para a identificação dos núcleos celulares marcados com o DAPI (em 100% das células). Limiares de detecção de cores foram estabelecidos e padronizados em todas as análises. Os resultados foram expressos em percentual da intensidade de fluorescência do marcador alvo.

3.3 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada com um estudo descritivo da população, através da análise das medidas de tendência central, dispersão e distribuição de frequência para as categorias de desfecho e demais variáveis independentes.

Os dados de imunofluorescência foram submetidos a curva ROC para estimativa de ponto de corte tendo como *cut-off* a resposta patológica. O ponto de corte definido foi >37.5 . Neste caso, foram considerados com baixa expressão de TROP2 os que tivessem valores $<$ ou iguais a 37,5% e com alta expressão de TROP-2 os que tivessem valores $>37,5\%$.

Os dados foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e associados com a resposta patológica e com a imunofluorescência por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. A magnitude de cada associação foi estimada pela Razão de Chances (Odds Ratio, OR). As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade da hipótese nula (p) for menor do que 5% ($P < 0,05$).

Adicionalmente curvas de Kaplan-Meier foram realizadas para comparação da sobrevida livre de recorrência comparadas por meio do teste de Log-Rank Mantel-Cox.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS versão 20.0 para Windows adotando uma confiança de 95%.

3.4 Aspectos éticos

O Projeto de Pesquisa deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará / Hospital Haroldo Juaçaba tendo sido aprovado (Número do Parecer: 5.614.936 / CAAE: 61146122.8.0000.5528).

A utilização das amostras do arquivo foi feita após a assinatura do Termo de Fiel Depositário das Amostras. Os possíveis riscos relacionados diretamente ao manuseio de blocos de parafina, tais como risco de perda do material e de se exaurirem as amostras foram minimizados pela adoção de técnicas seguras como manuseio somente no mesmo local de processamento das amostras para o ensaio de imuno-histoquímica e imunofluorescência (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer da Universidade Federal do Ceará).

Adicionalmente, os pesquisadores tiveram o cuidado para não exaurir o material biológico do paciente (bloco de parafina). O risco à exposição aos solventes para processamento dos cortes histológicos foi minimizado pelo uso de equipamento de proteção individual e equipamentos de exaustão de gases apropriados. Foram obtidas, ainda, informações dos prontuários para análise de associação clínico-patológica com os marcadores em estudo.

De forma a minimizar todos esses riscos, apenas os pesquisadores envolvidos no projeto manipularam o material biológico (blocos de parafina) e prontuários dos pacientes. Com o objetivo de minimizar os riscos de perda de dados dos prontuários. Foram tomados os devidos cuidados na preservação de condições de biossegurança, incluindo a prevenção de acidentes em laboratório, bem como o manejo e acondicionamento corretos dos materiais usados. Durante todo o estudo, os procedimentos empregados resguardaram a confidencialidade das informações bem como o cuidado ético com os dados.

4 RESULTADOS

Os resultados foram obtidos da análise de uma amostra de 54 pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo Estágios I, II e III entre janeiro de 2012 e dezembro de 2020. A totalidade das pacientes era do sexo feminino.

Conforme apresentado na **Tabela 1**, a idade média das pacientes foi 51 anos com uma faixa variando de 28 a 86 anos. Quando agrupadas por faixa etária, observou-se que 42,5% das pacientes tinham menos de 50 anos, e 31 pacientes (57,5%) tinham 50 anos ou mais.

Com relação à raça 27 pacientes eram pardas (50%), 16 pacientes eram brancas (29%) e 11 pacientes (20%) não foi reportado no prontuário. Já no tocante à história familiar foi observado histórico familiar de câncer de mama em 17 pacientes (31,4%).

A maioria dos tumores em nosso estudo foi classificada com o subtipo histológico carcinoma ductal, que correspondeu a 34 pacientes (62,9%), enquanto outros subtipos histológicos foram menos comuns: carcinoma invasivo tipo não especial (TNE) em 19 pacientes (35%), e apenas 1 paciente (1,85%) com carcinoma papilar. A presença de invasão linfovascular (ILV) e invasão perineural (IPN) estiveram presentes em 46,2% (n=25) e 18,5% (n=10) dos pacientes, respectivamente.

Com relação ao estadiamento clínico ao diagnóstico observou-se que a maioria apresentou Estágio III correspondendo a 27 pacientes (50%) enquanto 22 pacientes (40,7%) apresentaram Estágio II e apenas 5 pacientes (9,2%) apresentaram Estágio I. Os tumores T1 representaram 12,9% (n=7) dos casos, T2 representaram 38,8% (n=21), T3 representaram 29,6% (n=16) e T4 18,5% (n=10) dos casos.

O envolvimento clínico dos linfonodos foi observado em 59% (n=32) dos pacientes. No tocante ao grau histológico, 32 pacientes (59,2%) eram grau 3, 21 pacientes (38,8%) eram grau 2 e apenas 1 paciente (1,8%) era grau 1.

Referente à avaliação molecular por imuno-histoquímica dos pacientes, o índice de proliferação celular ki-67 foi maior que 20% em 47 pacientes (87%), e menor ou igual a 20% em apenas 7 pacientes (13%).

Tabela 1- Características clínico-patológicas dos pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo

Parâmetro	N=54 (100%)
Sexo (%)	
Masculino	0
Feminino	54 (100%)
Idade (Anos)	
Mediana	51 (22-86)
Faixa etária (%)	
< 50 a	23 (42,5%)
50 a ou mais	31 (57,5%)
Raça (%)	
Parda	27 (50%)
Branca	16 (29%)
Não reportada	11 (20%)
História Familiar n (%)	
Sim	17 (31,4%)
Não	37 (68,6%)
Tipo Histológico n (%)	
Ductal	34 (62,9%)
TNE	19 (35%)
Papilar	1 (1,8%)
Invasão vascular linfática n (%)	
Sim	25 (46%)
Não	29 (54%)
Invasão perineural n (%)	
Sim	10 (18,5%)
Não	44 (81,5%)
Estadiamento n (%)	
I	5 (9,2%)
II	22 (40,7%)
III	27 (50%)
Estadiamento T n (%)	
T1	7 (12,9%)
T2	21 (38,8%)
T3	16 (29,6%)
T4	10 (18,5%)

Estadiamento N n (%)	
N0	22 (40,7%)
N+	32 (59%)
Índice de proliferação ki67 n (%)	
>20%	47 (87%)
< ou igual 20%	7 (13%)

Avaliação dos parâmetros clínicos e patológicos de 54 pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo estágios I-III.

Fonte: elaboração do autor.

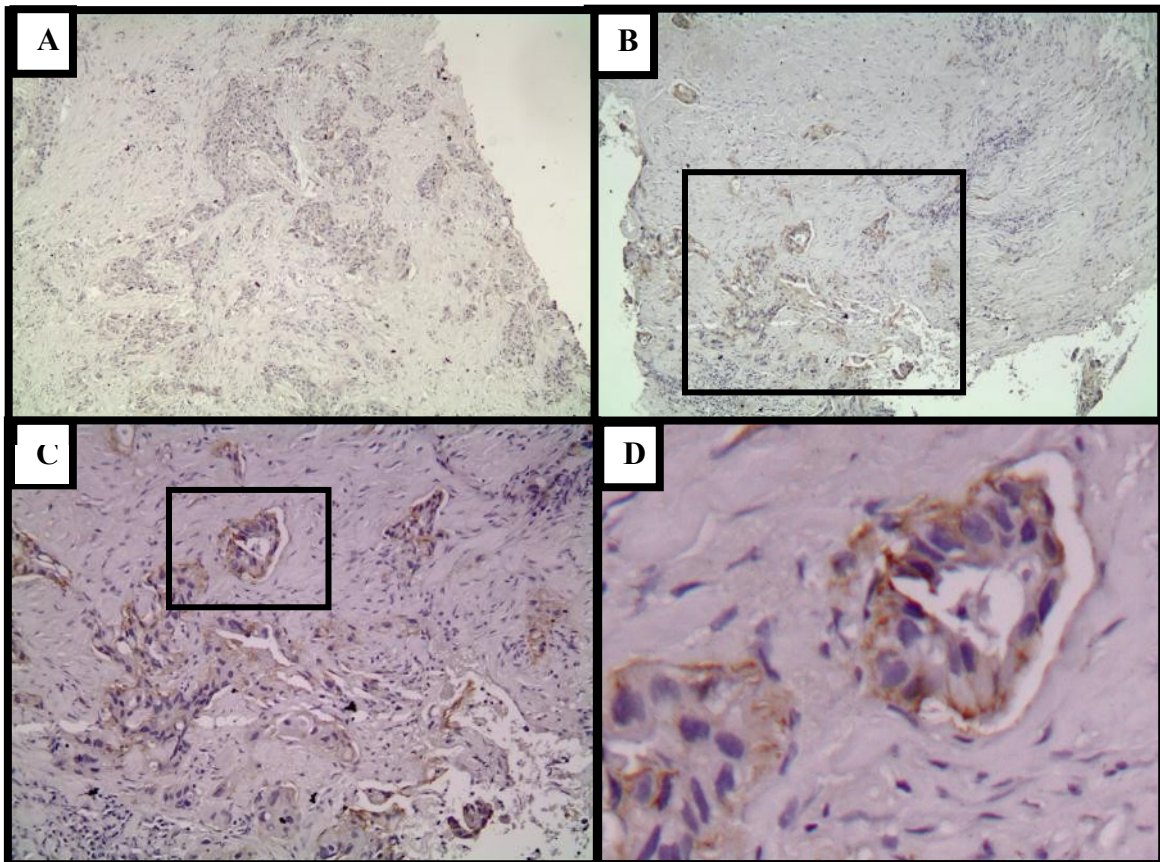
AVALIAÇÃO DE TROP2 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

De forma a se determinar o compartimento celular de localização da expressão de TROP2, bem como se a expressão teria perfil restrito a células tumorais e/ou microambiente tumoral, realizou-se a coloração por imuno-histoquímica. A avaliação por imuno-histoquímica mostrou que a coloração TROP2 apresentou positividade membranosa, e na maioria dos casos foi de intensidade variável em todo o tumor (**Figura 2**). A coloração TROP2 foi observada exclusivamente em células tumorais. A **Figura 2A** ilustra um caso de baixa expressão, enquanto a **Figura 2B** evidencia um caso de alta expressão. Destaques são apresentados em regiões marcadas e amplificados (**Figura 2C e 2D**).

Não seria interessante deixar o D como um destaque no canto superior direito do B?

Incluir as barras de escala.

Figura 2 - Imagem representativa da expressão de TROP2 por imuno-histoquímica em amostras de pacientes CMTN



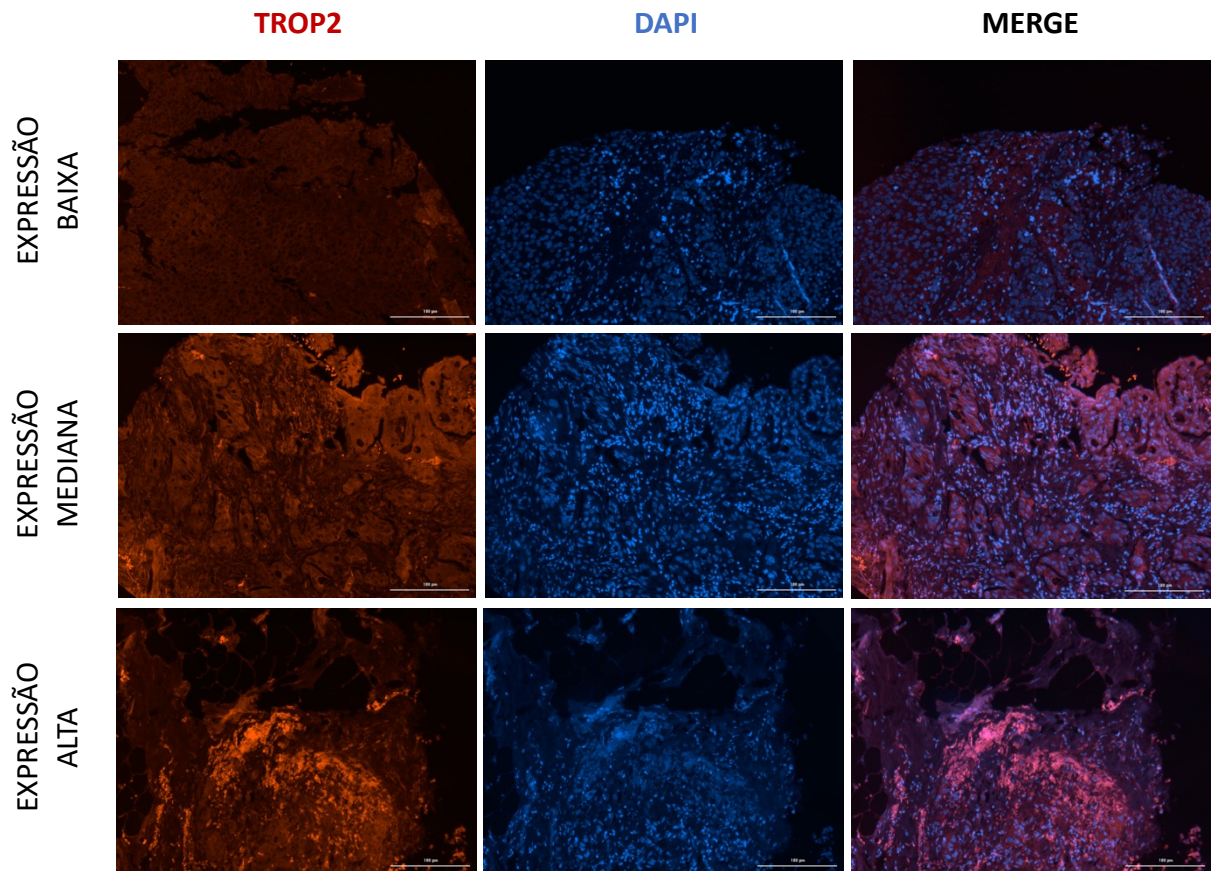
As amostras de tumor foram obtidas por core-biopsy dos tumores ao diagnóstico e processadas para análise por imuno-histoquímica para verificação do padrão de expressão e tipo celular envolvido. (A) Amostra tumoral ilustrando ausência de marcação para TROP2 (aumento 100 \times); (B) Amostra demonstrando padrão de expressão de TROP2 em membrana de células tumorais (aumento 100 \times); (C) Magnificação da região destacada em B (aumento 200 \times); (D) Magnificação da região destacada em C (Magnificação 400 \times).

Fonte: elaboração do autor.

AValiação DE TROP2 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A avaliação de TROP2 por imunofluorescência mostrou um padrão de expressão variável entre as amostras tumorais, sendo observados casos de amostras com expressão baixa, expressão mediana e expressão alta, conforme representado a seguir (**Figura 03**).

Figura 3 - Fotomicrografias de amostras de *core-biopsy* analisadas por imunofluorescência para TROP2 em pacientes com CMTN



A marcação em vermelho evidencia a expressão de TROP2 em três casos diversos representativos de expressão baixa, mediana e alta. Os núcleos foram marcados em azul (DAPI). As imagens foram obtidas em uma magnificação de 200 \times . A barra representa 100 μ m.

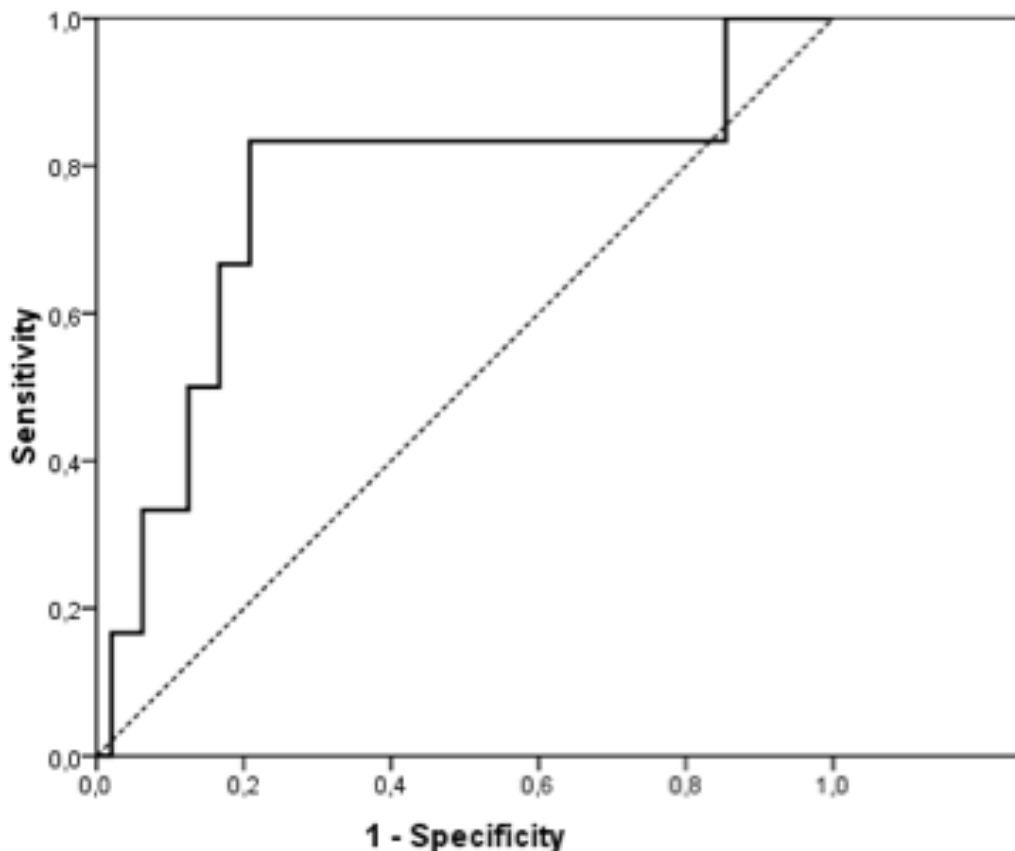
Fonte: elaboração do autor.

ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TROP2 E FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Ao avaliarmos a expressão de TROP2 por imunofluorescência observamos que houve expressão de TROP2 por imunofluorescência em cerca de 90,7% (n = 49/54) dos casos em nosso estudo, ao passo que apenas 9,3% (5/54) dos casos não expressavam TROP2.

Para avaliarmos a associação da expressão de TROP2 por imunofluorescência como preditor de resposta terapêutica e sua associação com fatores clínico-patológicos, submetemos os dados de imunofluorescência à curva ROC. A estimativa do ponto de corte, *cut-off*, para ser considerado alto expressor foi o valor de 37,5, com uma sensibilidade de 83,3% e especificidade de 79,2%. Neste caso, consideraram-se os casos com valor \leq ou igual a 37,5% com baixa expressão de TROP2, enquanto os casos com valores $>$ 37,5% foram tratados como de alta expressão de TROP2 (**Figura 4**).

Gráfico 1 - Curva ROC para estimativa de ponto de corte de expressão por imunofluorescência como preditor de resposta terapêutica



A área sob a curva foi $0,760 \pm 0,120$ (IC95% = $0,524-0,997$) $p=0,039$ com *cut-off* de 37,5.

Fonte: elaboração do autor.

A **Tabela 2** resume a análise de associação entre dados clínico-patológicos e o padrão de imunofluorescência de TROP2, além da relação com a resposta patológica completa.

A avaliação da expressão de TROP2 por imunofluorescência nos 54 pacientes mostrou que 39 (72,2%) pacientes tinham baixa expressão de TROP2 e 15 (27,8%) pacientes tinham alta expressão de TROP2. A avaliação de forma global da expressão de TROP2 mostrou que 90,7% ($n=49/54$) dos pacientes apresentavam alguma expressão de TROP2.

A alta expressão de TROP2 demonstrou uma associação significativa com a presença de invasão linfovascular (ILV) ($p=0,001$). Dos pacientes com invasão vascular linfática, 73,3% (11/15) apresentaram alta expressão de TROP2, enquanto apenas 35,9% (14/39) dos pacientes com baixa expressão de TROP2 exibiram ILV.

Com relação ao tamanho do tumor (T) também foi observada uma associação significativa com a alta expressão de TROP2 ($p=0,01$). Observou-se que entre os tumores

classificados como T3 e T4, 60% (9/15) dos casos apresentaram alta imunoposição de TROP2, enquanto 43% (17/39) dos casos apresentaram baixa expressão de TROP2.

Tabela 2 – Estudo da associação entre dados clínico-patológicos, o padrão de imunofluorescência de TROP2 e a resposta patológica completa

	Total	Resposta patológica completa		p-Valor	TROP2 Imunofluorescência		p-Valor
		Não	Sim		<37.5	>37.5	
Imunofluorescência							
Abaixo de <37.5	39 (72.2%)	38 (79.2%)	1 (16.7%)	0,001	-	-	-
>37.5	15 (27.8%)	10 (20.8%)	5 (83.3%)		-	-	
Raça							
Branca	14 (35.0%)	12 (34.3%)	2 (40.0%)	0,802	12 (40.0%)	2 (20.0%)	0,251
Parda	26 (65.0%)	23 (65.7%)	3 (60.0%)		18 (60.0%)	8 (80.0%)	
Histórico_familiar							
Não	37 (68.5%)	32 (66.7%)	5 (83.3%)	0,407	26 (66.7%)	11 (73.3%)	0,637
Sim	17 (31.5%)	16 (33.3%)	1 (16.7%)		13 (33.3%)	4 (26.7%)	
Tipo_histológico							
Ductal	34 (63.0%)	29 (60.4%)	5 (83.3%)	0,541	27 (69.2%)	7 (46.7%)	0,119
TNE	19 (35.2%)	18 (37.5%)	1 (16.7%)		12 (30.8%)	7 (46.7%)	
Papilar	1 (1.9%)	1 (2.1%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (6.7%)	
Grau_histológico							
I	1 (1.9%)	1 (2.1%)	0 (0.0%)	0,886	1 (2.6%)	0 (0.0%)	0,822
II	21 (38.9%)	19 (39.6%)	2 (33.3%)		15 (38.5%)	6 (40.0%)	
III	32 (59.3%)	28 (58.3%)	4 (66.7%)		23 (59.0%)	9 (60.0%)	
ILV							
Não	29 (53.7%)	28 (58.3%)	1 (16.7%)	0,054	25 (64.1%)	4 (26.7%)	0,013
Sim	25 (46.3%)	20 (41.7%)	5 (83.3%)		14 (35.9%)	11 (73.3%)	
IPN							
Não	44 (81.5%)	42 (87.5%)	2 (33.3%)	0,001	33 (84.6%)	11 (73.3%)	0,339
Sim	10 (18.5%)	6 (12.5%)	4 (66.7%)		6 (15.4%)	4 (26.7%)	
Estadiamento							
1	5 (9.3%)	4 (8.3%)	1 (16.7%)	0,420	4 (10.3%)	1 (6.7%)	0,314
2	22 (40.7%)	21 (43.8%)	1 (16.7%)		18 (46.2%)	4 (26.7%)	
3	27 (50.0%)	23 (47.9%)	4 (66.7%)		17 (43.6%)	10 (66.7%)	
T							
1	7 (13.0%)	6 (12.5%)	1 (16.7%)	0,015	5 (12.8%)	2 (13.3%)	0,344
2	21 (38.9%)	21 (43.8%)	0 (0.0%)		17 (43.6%)	4 (26.7%)	
3	16 (29.6%)	11 (22.9%)	5 (83.3%)		12 (30.8%)	4 (26.7%)	
4	10 (18.5%)	10 (20.8%)	0 (0.0%)		5 (12.8%)	5 (33.3%)	
N							
0	22 (40.7%)	20 (41.7%)	2 (33.3%)	0,596	16 (41.0%)	6 (40.0%)	0,465
1	15 (27.8%)	13 (27.1%)	2 (33.3%)		11 (28.2%)	4 (26.7%)	
2	14 (25.9%)	13 (27.1%)	1 (16.7%)		11 (28.2%)	3 (20.0%)	
3	3 (5.6%)	2 (4.2%)	1 (16.7%)		1 (2.6%)	2 (13.3%)	
pT							
0	6 (12.0%)	0 (0.0%)	6 (100.0%)	0,000	1 (2.8%)	5 (35.7%)	0,015
1	12 (24.0%)	12 (27.3%)	0 (0.0%)		10 (27.8%)	2 (14.3%)	
2	21 (42.0%)	21 (47.7%)	0 (0.0%)		17 (47.2%)	4 (28.6%)	
3	7 (14.0%)	7 (15.9%)	0 (0.0%)		6 (16.7%)	1 (7.1%)	

4	4 (8.0%)	4 (9.1%)	0 (0.0%)		2 (5.6%)	2 (14.3%)	
pN							
0	31 (62.0%)	25 (56.8%)	6 (100.0%)	0,243	20 (55.6%)	11 (78.6%)	0,218
1	9 (18.0%)	9 (20.5%)	0 (0.0%)		8 (22.2%)	1 (7.1%)	
2	5 (10.0%)	5 (11.4%)	0 (0.0%)		5 (13.9%)	0 (0.0%)	
3	5 (10.0%)	5 (11.4%)	0 (0.0%)		3 (8.3%)	2 (14.3%)	
ki67_CAT							
Até 14%	4 (7.4%)	4 (8.3%)	0 (0.0%)	0,462	3 (7.7%)	1 (6.7%)	0,897
>14%	50 (92.6%)	44 (91.7%)	6 (100.0%)		36 (92.3%)	14 (93.3%)	
Mama							
D	25 (46.3%)	21 (43.8%)	4 (66.7%)	0,289	16 (41.0%)	9 (60.0%)	0,210
E	29 (53.7%)	27 (56.3%)	2 (33.3%)		23 (59.0%)	6 (40.0%)	
Cirurgia							
Não	4 (7.4%)	4 (8.3%)	0 (0.0%)	0,462	3 (7.7%)	1 (6.7%)	0,897
Sim	50 (92.6%)	44 (91.7%)	6 (100.0%)		36 (92.3%)	14 (93.3%)	
Cirurgia_tipo							
Não	4 (7.4%)	4 (8.3%)	0 (0.0%)	0,560	3 (7.7%)	1 (6.7%)	0,432
Mastectomia	32 (59.3%)	29 (60.4%)	3 (50.0%)		25 (64.1%)	7 (46.7%)	
Quadrantectomia	18 (33.3%)	15 (31.3%)	3 (50.0%)		11 (28.2%)	7 (46.7%)	
Linfadenectomia							
Não	10 (18.9%)	8 (17.0%)	2 (33.3%)	0,336	6 (15.8%)	4 (26.7%)	0,362
Sim	43 (81.1%)	39 (83.0%)	4 (66.7%)		32 (84.2%)	11 (73.3%)	
Linfonodo_sentinela							
Não	24 (52.2%)	21 (51.2%)	3 (60.0%)	0,711	18 (52.9%)	6 (50.0%)	0,861
Mastectomia	22 (47.8%)	20 (48.8%)	2 (40.0%)		16 (47.1%)	6 (50.0%)	
QT_neoadjuvante							
Não	28 (51.9%)	27 (56.3%)	1 (16.7%)	0,067	22 (56.4%)	6 (40.0%)	0,280
Sim	26 (48.1%)	21 (43.8%)	5 (83.3%)		17 (43.6%)	9 (60.0%)	
QTneoadjuvante_tipo							
Outros	4 (15.4%)	4 (19.0%)	0 (0.0%)	0,320	4 (23.5%)	0 (0.0%)	0,274
AC-T	19 (73.1%)	14 (66.7%)	5 (100.0%)		11 (64.7%)	8 (88.9%)	
AC-Carbo/Taxol	3 (11.5%)	3 (14.3%)	0 (0.0%)		2 (11.8%)	1 (11.1%)	
Resposta_clínica							
RC	5 (20.0%)	0 (0.0%)	5 (100.0%)	0,000	1 (6.3%)	4 (44.4%)	0,046
RP	12 (48.0%)	12 (60.0%)	0 (0.0%)		10 (62.5%)	2 (22.2%)	
PD	8 (32.0%)	8 (40.0%)	0 (0.0%)		5 (31.3%)	3 (33.3%)	
RCB							
0	5 (21.7%)	0 (0.0%)	5 (100.0%)	0,000	1 (6.7%)	4 (50.0%)	0,098
1	7 (30.4%)	7 (38.9%)	0 (0.0%)		6 (40.0%)	1 (12.5%)	
2	5 (21.7%)	5 (27.8%)	0 (0.0%)		4 (26.7%)	1 (12.5%)	
3	6 (26.1%)	6 (33.3%)	0 (0.0%)		4 (26.7%)	2 (25.0%)	
QT_adjuvante							
Não	29 (53.7%)	24 (50.0%)	5 (83.3%)	0,123	19 (48.7%)	10 (66.7%)	0,236
Sim	25 (46.3%)	24 (50.0%)	1 (16.7%)		20 (51.3%)	5 (33.3%)	
QT_ajudvante/protocolo							
AC	5 (20.0%)	4 (16.7%)	1 (100.0%)	0,244	4 (20.0%)	1 (20.0%)	0,901
AC-T	14 (56.0%)	14 (58.3%)	0 (0.0%)		11 (55.0%)	3 (60.0%)	
FEC	2 (8.0%)	2 (8.3%)	0 (0.0%)		2 (10.0%)	0 (0.0%)	
DC	4 (16.0%)	4 (16.7%)	0 (0.0%)		3 (15.0%)	1 (20.0%)	
RT							
Não	15 (28.3%)	13 (27.7%)	2 (33.3%)	0,771	12 (31.6%)	3 (20.0%)	0,399
Sim	38 (71.7%)	34 (72.3%)	4 (66.7%)		26 (68.4%)	12 (80.0%)	
Recidiva							

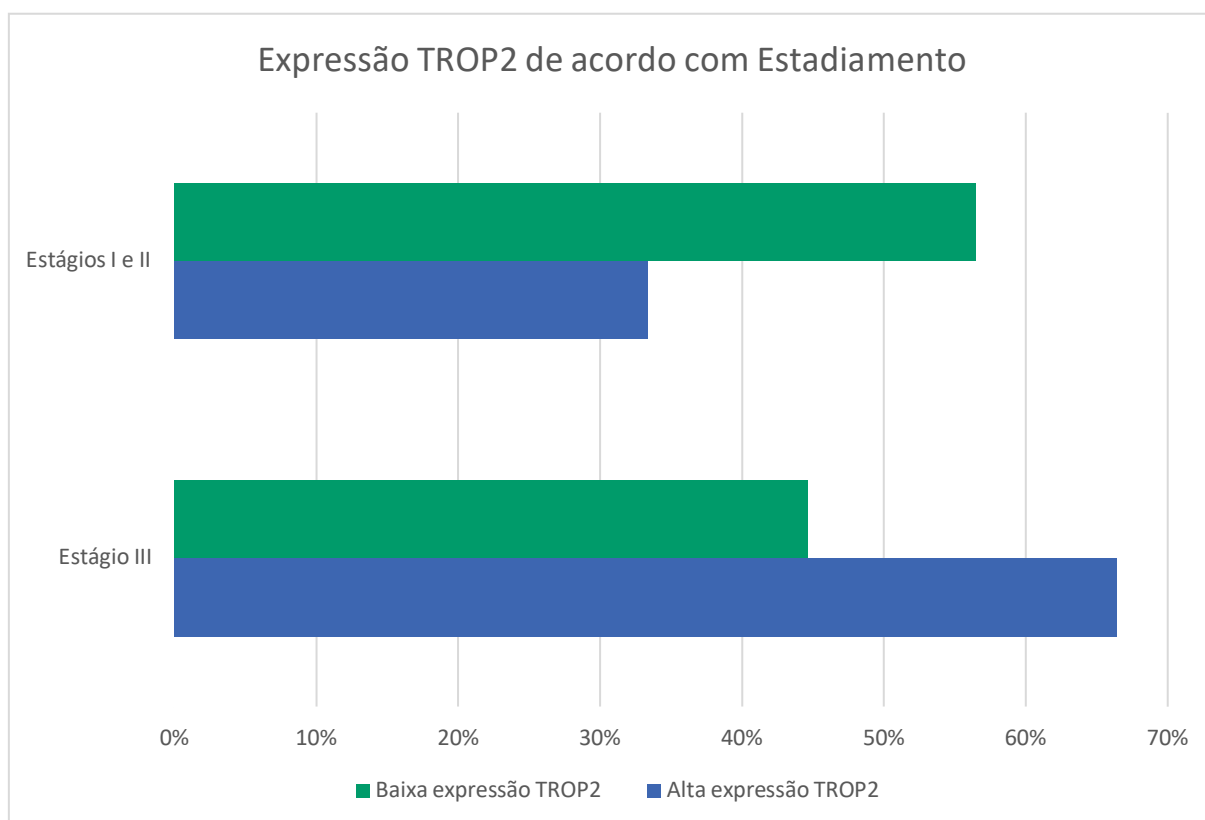
Não	25 (46.3%)	21 (43.8%)	4 (66.7%)	0,289	18 (46.2%)	7 (46.7%)	0,973
Sim	29 (53.7%)	27 (56.3%)	2 (33.3%)		21 (53.8%)	8 (53.3%)	

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher ou exato de Pearson (n, %).

Fonte: elaboração do autor.

Uma maior expressão de TROP2 também se correlacionou com um maior estadiamento, representado no **Gráfico 2 e Tabela 2**. Foi evidenciado que entre os tumores Estágios I e II a proporção de pacientes com baixa expressão de TROP2 foi de 56,5% (22/39) enquanto a proporção dos com alta expressão foi de 33,4% (5/15). Já entre os tumores Estágio III os com alta expressão de TROP2 respondem pela maioria (66,4% [10/15]) enquanto os com baixa expressão de TROP2 correspondem a menos da metade (44,6% [17/39]), observando-se uma maior proporção de altos expressores entre os tumores com estágios mais avançados.

Gráfico 2 - Expressão de TROP2 de acordo com Estadiamento



Nos Estágios I e II observou-se maior proporção de baixa expressão de TROP2. Já no Estágio III observou-se maior proporção de alta expressão de TROP2.

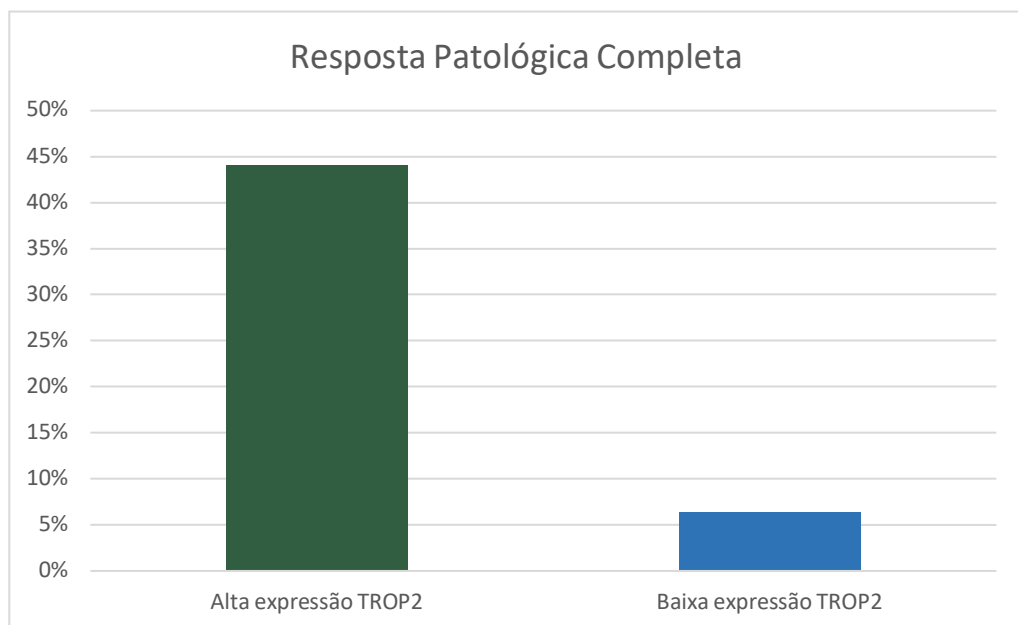
Fonte: elaboração do autor.

Não foram encontradas associações significativas entre a expressão de TROP2 e subtipo histológico, possivelmente devido ao fato de a maioria ser carcinoma ductal ou

tipo não especial (TNE). Além disso, também não foi evidenciada associação significativa da expressão de TROP2 com o grau histológico e nem com o acometimento linfonodal.

Quando se avaliaram as amostras de 26 pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante, observou-se uma associação significativa entre a alta expressão de TROP2 (>37,5%) e a uma maior taxa de resposta patológica completa ($p=0,01$, **tabela 2**). Foi evidenciado que entre os com alta expressão de TROP2 a taxa de resposta patológica completa foi 44% (4/9) ao passo que os com baixa expressão de TROP2 a taxa de resposta patológica foi apenas 6,3% (1/16), conforme o **Gráfico 3**.

Gráfico 3 - Taxa de Resposta Patológica Completa de acordo com a expressão TROP2

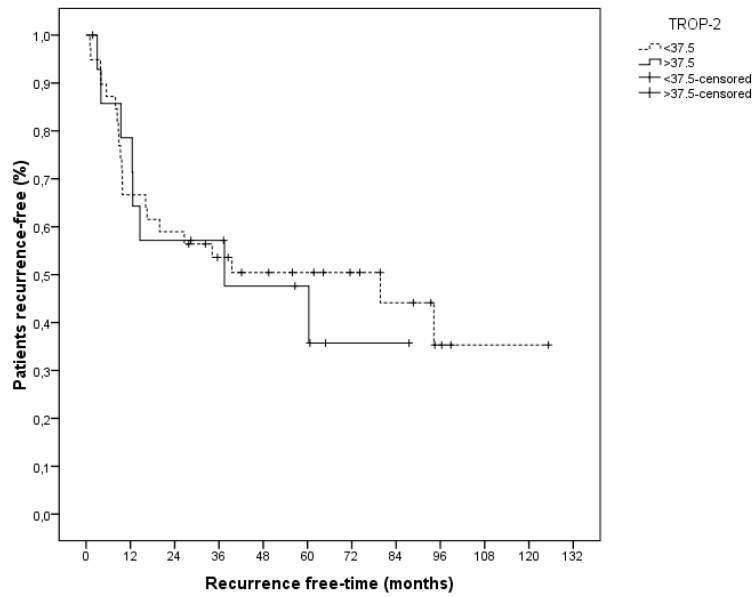


A taxa de RPC de 44% em amostras com alta expressão de TROP2 enquanto a taxa de RCP foi de 6,3% em amostras com baixa expressão de TROP2. ($p=0,046$)

Fonte: elaboração do autor.

A avaliação de sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com a expressão de TROP2 mostrou que entre os altos expressores de TROP2 a sobrevida livre de doença mediana foi de 37,5 meses (IC95% = 0,00-96,3) ao passo que entre os pacientes com baixa expressão de TROP2 a SLD foi de 79,3 meses (IC95% = 1,2-158,2), conforme representado no **Gráfico 4**.

Gráfico 4 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença com base na imunoeexpressão para TROP2



As medianas de sobrevida foram 79,3 meses (IC95% = 1,2- 158,2) para baixa expressão e 37,5 meses (IC95% = 0,00-96,3) ($p=0,760$).

Fonte: elaboração do autor.

5 DISCUSSÃO

A TROP2 é um marcador biológico promissor que tem despertado interesse como alvoterapêutico para conjugados de droga-anticorpo (ADCs), como o Sacituzumabe Govitecan (SG), que atualmente é aprovado para o tratamento do câncer de mama triplo negativo (CMTN) em estágio avançado e está sendo investigado em uma variedade de outros tipos de câncer. Em nosso estudo, analisamos a expressão de TROP2 em pacientes com CMTN em estágios iniciais e tratados em um hospital de referência. Correlacionamos esses achados com características clínico-patológicas, como a presença de invasão linfovascular, grau histológico, índice de proliferação celular, acometimento linfonodal, tamanho do tumor e desfechos a longo prazo.

Observou-se que a idade média das pacientes foi de cinquenta e um anos e a maioria das pacientes tinha mais de cinquenta anos, o que diferencia de alguns estudos que mostram prevalência de tumores de mama triplo negativos em populações mais jovens, além de relacionar o diagnóstico antes dos quarenta anos a um pior prognóstico da doença, com piores taxas de sobrevida. (Liedtke *et al*, 2013)

Com relação ao estadiamento ao diagnóstico foi observado que a maioria dos pacientes eram Estágio III (50%) e alto grau ao diagnóstico (59,2%), o que está de acordo com dados de literatura que mostram que o CMTN é responsável por 10-20% de todos os cânceres de mama invasivos e está associado à idade mais jovem, grau e índice mitótico mais elevados e estágio mais avançado no momento do diagnóstico. (Kumar *et al*, 2016)

O índice de proliferação celular (Ki-67) foi maior que 20% em mais de 80% das pacientes avaliadas em nosso estudo. Tal achado é indicativo de que uma parcela importante de pacientes apresentou tumores com alto potencial proliferativo. O índice de proliferação celular tem se mostrado um importante biomarcador que tem sido utilizado para identificação de tumores de mais alto risco, sendo também um dos fatores observados na decisão de utilização de determinadas terapias como o abemaciclibe no tratamento adjuvante do Câncer de Mama Receptor Hormonal positivo (Najjar *et al*, 2022). De fato, cerca de 40-50% de todos os pacientes com câncer de mama triplo negativo (CMTN) alcançam uma resposta patológica completa após tratamento com quimioterapia neoadjuvante e a expressão de Ki-67 tem sido implicada como um dos biomarcadores mais frequentemente relatados associados a esse padrão de resposta patológica (Van den Ende *et al*, 2023).

A avaliação da expressão de TROP2 por imuno-histoquímica revelou que o padrão de expressão da TROP2 foi exclusivamente em células tumorais e predominantemente na membrana celular. Esse achado está em consonância com estudos anteriores que demonstraram

a expressão restrita de TROP2 à membrana celular. Além disso, o mesmo estudo associa a expressão de TROP2 a um fator prognóstico desfavorável para sobrevida global. (Ambrogi *et al.*, 2014)

Quanto à avaliação de TROP2 por imunofluorescência no presente estudo, foi evidenciado que o padrão de expressão foi variável entre as pacientes, abrangendo desde baixa e média expressão até alta expressão. Em nosso estudo a imunofluorescência mostrou-se um método mais sensível na detecção de expressão de TROP2 comparado a imuno-histoquímica, sendo, portanto, um método bastante útil na detecção de TROP2. Tal achado é corroborado em outros estudos que têm avaliado o papel da imunofluorescência como um método de detecção do nível de expressão de TROP2 e HER-2 na doença metastática, no intuito de direcionar qual o melhor conjugado droga-anticorpo (ADC) a ser utilizado, a depender do nível expressão na imunofluorescência. (Robbins *et al.*, 2023)

Observamos que houve expressão de TROP2 por imunofluorescência em cerca de 90,7% (n = 49/54) dos casos em nosso estudo. Esta grande proporção de positividade para TROP2 é consistente com a literatura atualmente relatada. (Lenárt *et al.*, 2020). Quando avaliado o ponto de corte de expressão para separação entre alto expressores e baixo expressores, observamos uma proporção menor (27,8%) de altos expressores. Pesquisas anteriores indicaram uma maior expressão gênica e proteica de TROP2 em CMTN em comparação com outros tipos de câncer ou subtipos de câncer de mama. No entanto, em casos de CMTN avançado, a proporção de pacientes com alta e média expressão de TROP2, conforme analisado pelos biomarcadores do estudo ASCENT, que avaliou pacientes com CMTN metastático, foi consideravelmente maior do que em nossa amostra. A diferença na proporção de pacientes com alta e média expressão de TROP2 entre os estudos pode ser atribuída às diferenças na população avaliada. Enquanto nosso estudo excluiu pacientes com metástases no momento do diagnóstico, o estudo ASCENT focou especificamente em pacientes com câncer de mama triplo negativo metastático. Essa distinção na população estudada pode influenciar os resultados, uma vez que a expressão de TROP2 pode variar entre os estágios precoce e avançado do câncer de mama triplo negativo. Além disso, diferenças na sensibilidade e especificidade dos anticorpos utilizados em cada estudo também podem contribuir para as discrepâncias nos resultados observados (Bardia *et al.*, 2021).

Nossa pesquisa identificou uma associação entre a elevada expressão de TROP2 e a presença de invasão linfovascular (ILV). Esta descoberta é respaldada pela literatura, que sugere um possível papel da TROP2 na angiogênese, o que pode fornecer uma explicação para a associação observada entre ILV e a alta expressão de TROP2. (Goldenberg *et al.*, 2018). De

fato, o papel central da angiogênese no crescimento e metástase do câncer de mama tem sido amplamente reconhecido. Estudos apontam que a invasão microvascular é um fator prognóstico no câncer de mama invasivo. Além disso, há evidências sugerindo que pacientes com CMTN podem se beneficiar da terapia baseada em antiangiogênicos, como o bevacizumabe (Ribatti et al, 2016). Diante disto, pode-se supor que a modulação farmacológica de TROP2 se constitua como fator adicional na inibição de mecanismos patogênicos associados ao câncer, como a angiogênese.

A associação entre a alta expressão de TROP2 e o tamanho do tumor também foi observada em nosso estudo. Além disso, observamos que a alta expressão de TROP2 foi mais prevalente nos pacientes em estágio III, sugerindo uma possível relação entre essa maior expressão e uma maior proliferação celular, o que pode resultar em estágios mais avançados da doença. Essa associação entre alta expressão de TROP2 e estágios mais avançados também foi demonstrada em um estudo abrangente que avaliou tumores de cólon, mama, urotelial e próstata. Este estudo revelou que a alta expressão de TROP2 está relacionada com estágios mais avançados da doença e a presença de metástases linfonodais. (Dum *et al*, 2022).

Em nosso estudo não evidenciamos correlações significativas entre a expressão de TROP2 e o grau histológico, índice de proliferação celular (ki-67) e acometimento linfonodal.

Esses dados diferem da literatura vigente que tem mostrado que a expressão de TROP2 pode ser usada como um biomarcador prognóstico único de metástase linfonodal, grau de diferenciação e tamanho do tumor. A superexpressão de TROP2 também está aumentada nos tumores de Cabeça e Pescoço e está relacionada ao grau de diferenciação tecidual e metástase linfonodal (Redlich *et al*, 2018). Além disso, alta expressão da proteína TROP2 também tem sido relacionada à alta agressividade no câncer de ovário e mama e com desfechos piores para os pacientes e um curso clínico mais agressivo no câncer de próstata (Hsu et al, 2020). Essa aparente divergência entre nossos achados e a literatura pode estar associada ao baixo número de amostras em análise ou mesmo ao perfil de idade mais alto dos pacientes incluído na presente investigação.

Em nosso estudo observou-se que entre os pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante houve uma associação significativa entre a alta expressão de TROP2 e a uma maior taxa de resposta patológica completa (pCR), sendo considerada um possível preditor de maior resposta a terapia neoadjuvante. Um estudo anterior que avaliou 50 pacientes com CMTN submetidos a tratamento neoadjuvante sacituzumabe govitecan (SG) mostrou dados divergentes dos encontrados em nossa pesquisa, uma vez que sugeriu que a expressão de TROP2 não é preditiva de pCR (Spring *et al*, 2023). Essa falta de associação e concordância entre os estudos

pode ser devida a fatores analíticos (tipo de ensaio, método de pontuação) ou fatores estatísticos (pequeno tamanho da amostra) ou realmente não biológicos. Notavelmente, no estudo ASCENT que analisou o papel do SG para CMTN metastático, não houve associação linear entre expressão de TROP2 e desfechos de sobrevida, e o SG foi aprovado no cenário de câncer de mama triplo negativo metastático, independentemente da expressão de TROP2 (Bardia *et al*, 2021).

Observamos em nosso estudo que a alta expressão de TROP2 esteve relacionada a uma tendência a piores medianas de sobrevida quando comparada aos baixo expressores de TROP2, mas sem significância estatística. Esses dados estão de acordo com estudos que mostram que, em geral, a superexpressão de TROP2 frequentemente se correlaciona com um prognóstico desfavorável e aumento do risco de metástase nos tumores de mama (Zhao *et al*, 2018). Além disso, outros estudos têm mostrado que alta expressão de TROP2 se relaciona a um pior prognóstico em tumores de pâncreas (Fong *et al.*, 2008) e tumores gástricos (Mühlmann *et al*, 2009).

Um estudo prévio conduzido em casos iniciais de câncer de mama destacou um prognóstico desfavorável em situações com alta expressão membranar de TROP2 (Ambroggi, *et al*, 2014). Nossa pesquisa, por outro lado, apesar de ter mostrado uma diferença numérica de sobrevida livre de doença de 41,8 meses, mostrando que os altos expressores recorrem bem mais precocemente que os baixo expressores, não encontrou associações significativas entre a expressão de TROP2 e os desfechos relacionados ao tempo até o evento, não podendo, assim, confirmar o impacto negativo prognóstico da expressão de TROP2 nos estágios 1 a 3 do CMTN. Além disso, o número limitado de eventos em nosso estudo e o tamanho amostral ressalta a necessidade de cautela ao interpretar o valor prognóstico da expressão de TROP2.

Outro estudo importante que avaliou a correlação da expressão de TROP2 com desfechos de sobrevida não mostrou diferença significativa na sobrevida livre de doença entre os altos expressores e baixo expressores de TROP2. Essa ausência de diferença na sobrevida livre de doença foi explicada pelo fato de o anticorpo empregado no estudo corava tanto o TROP2 de membrana quanto o citoplasmático, o que poderia justificar essa ausência de valor prognóstico para a expressão de TROP2. (Izci *et al*, 2022)

Nossa pesquisa possui pontos fortes, como o uso de uma amostra homogênea de pacientes com câncer de mama triplo negativo nos estágios I a III, o que nos permitiu analisar suas características iniciais e prognóstico ao longo do tempo. Além disso, conseguimos acompanhar a maioria dos pacientes por um período prolongado.

Entretanto, nosso estudo tem limitações, como seu desenho retrospectivo e o

tamanho relativamente pequeno da amostra, o que nos obriga a ser cautelosos na interpretação dos resultados prognósticos. Não há, até o momento, diretrizes internacionais padronizadas para o uso do teste de imuno-histoquímica ou de imunofluorescência de TROP2.

Em nossa amostra de pacientes com câncer de mama triplo negativo em estágios iniciais e localmente avançados, observamos que uma maior expressão de TROP2 estava relacionada a certas características tumorais, como tamanho tumoral, presença de invasão vascular linfática, assim como a uma maior taxa de resposta patológica completa. No entanto, são necessárias mais pesquisas para confirmar essas associações entre características iniciais e expressão de TROP2. Não encontramos correlação entre a expressão de TROP2 e a presença de metástase linfonodal, índice de proliferação celular (ki-67) ou desfechos clínicos, mas devido ao número limitado de casos, devemos interpretar esses resultados com cautela. O valor prognóstico da expressão de TROP2 em câncer de mama triplo-negativo em estágio inicial poderá ser avaliado com estudos futuros com maior amostra de pacientes e acompanhamento mais prolongado.

Com o desenvolvimento de terapias direcionadas ao TROP2, como os anticorposconjugados, e sua possível aplicação em estágios mais precoces da doença, futuros estudos devem explorar o potencial preditivo da expressão de TROP2 para essas terapias em câncer de mama triplo negativo em estágios iniciais e avançados.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a expressão elevada de TROP2 está correlacionada com fatores clínico-patológicos relevantes, como invasão vascular linfática e tamanho do tumor. Esses achados, juntamente com o fato de que pacientes com alta expressão de TROP2 apresentaram uma maior taxa de resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante, sugerem um papel significativo da TROP2 no câncer de mama triplo negativo localizado e na resposta ao tratamento. Isso destaca a relevância potencial da TROP2 como biomarcador prognóstico e terapêutico nesse contexto clínico. Apesar de ter sido evidenciado um perfil de menor sobrevida livre de doença em pacientes com alta expressão de TROP2, não houve associação estatística na amostra estudada.

REFERÊNCIAS

- AMBROGI, F, et al. TROP2 is a determinant of breast cancer survival. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96993, 2014.
- ASSELAIN, B.; BARLOW, W.; BARTLETT, J. et al. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. **Lancet Oncol.**, v. 19, p. 27-39, 2018.
- BARDIA A, et al. ASCENT Clinical Trial Investigators. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **N Engl J Med.**, v. 384, n. 16, p. 1529-1541, 2021.
- BARDIA A, 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.**, v. 32, p. 1148–1156, 2021.
- BURSTEIN, M.D.; TSIMELZON, A.; POAGE, G.M. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res.**, v.21, p. 1688-1698, 2015.
- CARVALHO FM. Triple-negative breast cancer: from none to multiple therapeutic targets in two decades. **Front Oncol.**, v. 13, p. 1244781, 2023.
- CORTAZAR, P.; ZHANG, L.; UNTCH, M. et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet.**, v. 384, p. 164-172, 2014.
- DE SANTIS, M.C.; GULLUNI, F.; CAMPA, C.C.; MARTINI, M.; HIRSCH, E. Targeting PI3K signaling in cancer: Challenges and advances. **Biochim Biophys Acta - Rev Cancer**, v. 1871, p. 361–366, 2019.
- DUM, D, et al. Trophoblast Cell Surface Antigen 2 Expression in Human Tumors: A Tissue Microarray Study on 18,563 Tumors. **Pathobiology**, v. 89, n. 4, p. 245-258, 2022.
- FONG, D.; MOSER, P.; KRAMMEL, C. et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. **Br J Cancer**, v. 99, p. 1290–1295, 2008.
- FORNARO, M.; DELL'ARCIPRETE, R.; STELLA, M.; BUCCI, C.; NUTINI, M.; CAPRI, M.G.; ALBERTI, S. Cloning of the gene encoding TROP2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. **Int J Cancer**, v. 62, n. 5, p. 610-618, 1995.
- FOULKES, W.D.; SMITH, I.E.; REIS-FILHO, J.S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med.**, v. 363, p. 1938-1948, 2010.
- GOLDENBERG, D.M.; STEIN, R.; SHARKEY, R.M. The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. **Oncotarget.**, v. 9, p. 28989–29006, 2018.

GUO, L.; KONG, D.; LIU, J.; ZHAN, L.; LUO, L.; ZHENG, W. et al. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. **Exp Hematol Oncol.**, v. 2, n. 3, 2023.

HIRSCH, E.; NOVELLI, F. Cancer: Natural-born killers unleashed. **Nature**, v. 510, p. 342–343, 2014.

HOWARD, F.M.; OLOPADE, O.I. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review. **Cancer J.**, v. 27, n. 1, p. 8-16, 2021.

HSU, E.C.; RICE, M.A.; BERMUDEZ, A. et al. Trop2 is a driver of metastatic prostate cancer with neuroendocrine phenotype via PARP1. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 117, p. 2032-2042, 2020.

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. **Clinical Cancer Research.**, v. 11, p. 4357–4364, 2005.

HUSSAINI, H.M.; SEO, B.; RICH, A.M. Immunohistochemistry and Immunofluorescence. **Methods Mol Biol.**, v. 2588, p. 439-450, 2023.

INSTITUTE NACIONAL CANCER. **Cancer Therapy Evaluation Program: Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 4.0.** Bethesda: National Cancer Institute, 2010

ISAKOFF S.J., ENGELMAN J.A., IRIE H.Y., LUO J., BRACHMANN S.M., PEARLINE R.V., CANTLEY L.C., BRUGGE J.S. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. **Cancer Res.**, v. 65, p. 10992–11000, 2005.

IWAMOTO, S.; MORI, Y.; YAMASHITA, T.; OJIMA, K.; AKITA, K.; TOGANO, S. et al. Trophoblast cell surface antigen-2 phosphorylation triggered by binding of galectin-3 drives metastasis through down-regulation of E-cadherin. **J Biol Chem**, v. 299, n. 8, p. 104971, 2023.

IZCI, H, et al. Correlation of TROP2 expression with clinical-pathological characteristics and outcome in triple-negative breast cancer. **Sci Rep.**, v. 12, n. 1, p. 22498, 2022.

JEON, Y.; JO, U.; HONG, J.; GONG, G.; LEE, H.J. Trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP2) expression in triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1014, 2022.

JEON, Y.; JO, U.; HONG, J.; GONG, G.; LEE, H.J. Trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop2) expression in triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1014, 2022.

KOBOLDT, D.C.; FULTON, R.S.; MCLELLAN, M.D. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, p. 61-70, 2012.

KROP I., JURIC D., SHIMIZU T., TOLCHER A., SPIRA A., MUKOHARA T., LISBERG A.E., KOGAWA T., PAPADOPOULOS K.P., HAMILTON E., et al. Abstract GS1-05: Datopotamab deruxtecan in advanced/metastatic HER2- breast cancer: Results from the phase 1 TROPION-PanTumor01 study. **Cancer Res.**, v. 82, p. GS1-05, 2022.

KUMAR, P.; AGGARWAL, R. An overview of triple-negative breast cancer. **Arch Gynecol Obstet.**, v. 293, n. 2, p. 247-269, 2016.

LEE, J.S.; YOST, S.E.; YUAN, Y. Neoadjuvant Treatment for Triple Negative Breast Cancer: Recent Progresses and Challenges. **Cancers**, Basel, v. 12, n. 6, p. 1404, 2020.

LEHMANN, B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest.**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011.

LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest.**, v. 121, p. 2750-2767, 2011.

LENÁRT, S. et al. Trop2: Jack of all trades, master of none. **Cancers**, Basel, v. 12, p. 1–28, 2020.

LIEDTKE, C.; HESS, K.R.; KARN, T. et al. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 138, p. 591–599, 2013.

LIN, J.C.; WU, Y.Y.; WU, J.Y.; LIN, T.C.; WU, C.T.; CHANG, Y.L. et al. Trop2 is epigenetically inactivated and modulates igf-1r signalling in lung adenocarcinoma. **EMBO Mol Med.**, v. 4, n. 6, p. 472–485, 2012.

LIU, X. Advances in Trop2-targeted therapy: Novel agents and opportunities beyond breast cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 239, 2022.

LOMBARDI P, FILETTI M, FALCONE R, ALTAMURA V, PARONI STERBINI F, BRIA E, et al.. Overview of TROP2 in cancer: from pre-clinical studies to future directions in clinical settings. **Cancers**, Basel, v. 15, n. 6, 2023.

MARUSYK A, et al. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 2012.

MÜHLMANN, G.; SPIZZO, G.; GOSTNER, J. et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. **J Clin Pathol.**, v. 62, p. 152-158, 2009.

NAJJAR, S.; ALLISON, K.H. Updates on breast biomarkers. **Virchows Arch**, v. 480, n. 1, p. 163-176, 2022.

PÉREZ, T. G. et al. PIK3CA Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive in Breast Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 1, Jun 2007.

PETRUCELLI, N.; DALY, M.B.P.T. **BRCA1- | BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer**. GeneReviews. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>. Acesso em: 5 jul. 2023.

POGGIO, F.; BRUZZONE, M.; CEPPI, M., et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol.**, v. 29, p. 1497-1508, 2018.

REDLICH, N.; ROBINSON, A.M.; NICKEL, K.P. et al. Anti-Trop2 blockade enhances the therapeutic efficacy of ErbB3 inhibition in head and neck squamous cell carcinoma. **Cell Death Dis.**, v. 9, n. 5, 2018.

RIBATTI, D.; NICO, B.; RUGGIERI, S.; TAMMA, R.; SIMONE, G.; MANGIA, A. Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. **Transl Oncol.**, v. 9, n. 5, p. 453-457, 2016.

ROBBINS, C.; HE, M.; KHAIMOVA, R. et al. Quantitative multiplex immunofluorescence assay for TROP2 and HER2 expression in breast cancer: Towards guiding patient selection for antibody drug conjugate therapies Presented at the 2023. In: SAN ANTONIO BREAST CANCER SYMPOSIUM, 1., 2023. San Antonio, **Anais...** San Antonio, Texas: Abstract PO3, 2023.

ROSA, D.D., BINES, J., WERUTSKY, G. et al. The impact of sociodemographic factors and health insurance coverage in the diagnosis and clinicopathological characteristics of breast cancer in Brazil: AMAZONA III study (GBECAM 0115). **Breast Cancer Res Treat**, v. 183, p. 749–757, 2020.

SAAL, L H et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. **Cancer Res.**, v. 21, 2005.

SHVARTSUR, A.; BONAVIDA, B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. **Genes Cancer**, v. 6, n. 3-4, p. 84-105, 2015.

SIKOV, W.M.; BERRY, D.A.; PEROU, C.M. et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). **J Clin Oncol.**, v. 33, p. 13-21, 2015.

SPRING, LM. et al. Response-guided neoadjuvant sacituzumab govitecan for localized triple-negative breast cancer: results from the NeoSTAR trial. **Ann Oncol.**, v. 35, n. 3, p. 293-301, 2024.

STANTON, S.E.; ADAMS, S.; DISIS, M.L. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. **JAMA Oncol.**, v. 2, p. 1354-1360, 2016.

TREROTOLA, M.; CANTANELLI, P., GUERRA, E. et al. Upregulation of TROP2 quantitatively stimulates human cancer growth. **Oncogene**, v. 32, p. 222–233, 2013.

VAN DEN ENDE, N.S.; NGUYEN, A.H.; JAGER, A.; KOK, M.; DEBETS, R.; VAN DEURZEN, C.H. M. Triple- Negative Breast Cancer and Predictive Markers of Response to Neoadjuvant Chemotherapy: A Systematic Review. **Int J Mol Sci.**, v. 24, n. 3, p. 2969, 2023.

VON MINCKWITZ, G.; SCHNEEWEISS, A.; LOIBL, S., et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol.**, v. 15, p. 747-756, 2014.

YAO, L.; CHEN, J.; MA, W. Decoding TROP2 in breast cancer: significance, clinical implications, and therapeutic advancements. **Front Oncol.**, v. 13, p. 1292211, 2023.

ZENG, P.; CHEN, M.B.; ZHOU, L.N.; TANG, M.; LIU, C.Y.; LU, P.H. Impact of TROP2 expression on prognosis in solid tumors: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 6, p. 33658, 2016.

ZHAO, W.; KUAI, X.; ZHOU, X. et al. Trop2 is a potential biomarker for the promotion of EMT in human breast cancer. **Oncol Rep.**, v. 40, p. 759-766, 2018.