

THIAGO DAVID ALVES PINTO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ROS1 EM CARCINOMAS LOBULARES
INVASORES DE MAMA**

Brasília, 2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THIAGO DAVID ALVES PINTO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ROS1 EM CARCINOMAS LOBULARES
INVASORES DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Diêgo Madureira de Oliveira

Brasília, 2023

THIAGO DAVID ALVES PINTO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ROS1 EM CARCINOMAS LOBULARES
INVASORES DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 28 de agosto de 2023

BANCA EXAMINADORA

Presidente - Diêgo Madureira de Oliveira - Universidade de Brasília

Fábio Pittella Silva - Universidade de Brasília

**Romualdo Barroso de Sousa - Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital
Sírio-Libanês**

Paula Elaine Diniz dos Reis - Universidade de Brasília

Rodrigo Santa Cruz Guindalini - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Dedico a minha esposa Andressa e a meus filhos Maria Antônia, Luisa e Miguel

Dedico a meu pai Antônio e minha mãe Edlair

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar vida e saúde a mim e a meus familiares.

Agradeço a Universidade de Brasília e ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por propiciar esta oportunidade.

Agradeço a meu orientador Diêgo pelos ensinamentos e pelo grande apoio, sobretudo pela perspicácia nas etapas finais e na análise estatística.

Agradeço aos meus pais pelo amor e esforço incondicional em oferecer boas condições de estudo, saúde e bem estar.

Agradeço a minha esposa pelo amor e cuidado a mim e a nossa família, por ser minha principal consultora, pela compreensão e suporte nas diversas ocasiões.

Agradeço aos meus filhos Maria Antônia, Luisa e Miguel por serem meu combustível, minha grande razão de viver e por amenizarem os meus dias.

Agradeço ao Hospital de Base do Distrito Federal por abrir as portas para esse trabalho e em nome da Dra Sandra Coutinho, a todos os colegas pela convivência e por contribuírem com minha formação.

Agradeço ao Laboratório Diagnose, por abrir as portas e apoiar esse trabalho em diversas etapas.

Agradeço aos amigos Alesso, não só por participar no projeto, mas conjuntamente a Luiz Eduardo e Willian pelo companheirismo, parceria, amizade e excelente convivência profissional, além da grande contribuição com a minha formação.

Agradeço ao meu tio Sebastião pelos ensinamentos em patologia, vida pessoal e profissional.

Agradeço minhas irmãs pelo convívio saudável na juventude e agora na vida familiar.

Agradeço à minha irmã Thaís pelo apoio no mestrado e pela convivência na especialidade de Patologia.

Agradeço a família da minha esposa, em nome do meu sogro Marcos e da minha sogra Alzira, por sempre nos apoiar.

Agradeço a Hugo Cavalcanti e Luiz Araújo por participarem das etapas iniciais do projeto.

Agradeço aos médicos, amigos e parceiros, na figura da mastologista Miriam Alvares e do oncologista e cirurgião oncológico João Nunes que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade de Brasília, do Hospital de Base e do Laboratório Diagnóstico, especialmente a Jacilene, Júnior, Gustavo, Caio, Maykon, Dinaldo, Hércules, Gabriel, Val Ramos, Bruno e João, por contribuírem direta ou indiretamente com o trabalho.

Agradeço a banca de qualificação pelas excelentes ponderações e sugestões que permitiram a evolução desta tese.

Agradeço a Mariana Bracciali pelo apoio na coleta dos dados *in silico*, sob a tutela do professor Fábio Pittella.

*Na vida, não há nada a se temer,
apenas a ser compreendido.*

Marie Curie

RESUMO

O carcinoma lobular invasivo (CLI), tipo especial de câncer de mama, representa cerca de 10% dos carcinomas desse órgão. Associado a mutações nos genes *BRCA2* e *CDH1*, possui fenótipo de descoesão celular, decorrente de alterações genéticas no gene *CDH1*, que codifica a molécula de adesão E-caderina. Mais de 90% deles expressam receptores de estrógeno e progesterona. Em regra, têm baixa expressão de Ki67 e não expressam HER2, pertencendo ao subtipo molecular Luminal A, e exibindo bom prognóstico ao serem tratados aos moldes de carcinoma de tipo não especial. Apesar de até o momento não haver tratamento específico para os carcinomas lobulares, há descrição pré-clínica de aumento de expressão de ROS1 e letalidade sintética quando da deficiência de E-caderina e inibição dessa tirosina-kinase, respectivamente, implicando inibidores de ROS1 na indução de apoptose. Entretanto, não há dados na literatura sobre a expressão de ROS1 em CLIs de humanos, tampouco sobre a correlação entre essa expressão e a perda de E-caderina, ou outros dados clínico-patológicos. O objetivo do estudo foi determinar a expressão de ROS1 em CLIs de humanos, por meio de imuno-histoquímica em amostra representativa desse tipo de câncer no Brasil, e testar eventuais correlações com variáveis de interesse clínico, reforçando os achados por análise *in silico* de expressão de RNA em CLIs em bancos de dados abertos internacionais. O trabalho se constituiu em duas etapas, sendo a primeira um estudo transversal analítico com 78 casos de CLI, dos arquivos de duas instituições, privada e pública, de Brasília, entre os anos de 2015 e 2019. A idade média das pacientes foi de 58,9 anos, com achados de lateralidade, localização e multicentricidade semelhantes aos já descritos na literatura. O ROS1, principal biomarcador do estudo, contrariando as expectativas, foi expresso em apenas 3 casos (4,6%), com H-escore variando de 15 a 240. Todos os três apresentaram Ki67 maior ou igual a 20% ($P=0,026$) e expressão de receptor de estrógeno em menos de 20% das células neoplásicas ($P=0,000015$). Não foi evidenciada significância estatística entre expressão do ROS1 e tipo histológico, grau histológico, invasão linfovascular, *status* da margem, estadió linfonodal, estadió TNM, expressão de receptor de progesterona (RP), hiperexpressão ou baixa expressão de HER2 ou padrão de expressão de E-caderina ou p120-Catenina. Apesar do pequeno número

de casos com expressão de ROS1 no estudo, sugerindo um padrão diferente de homeostase celular entre humanos e roedores diante da perda de expressão de E-caderina, a correlação com maiores índices de proliferação celular pode corresponder a um pior prognóstico para os potenciais pacientes expressores. A segunda etapa do estudo, de correlação com dados *in silico*, ratificou a baixa frequência de expressão de ROS1 em CLI (0,97 a 2,05%), mas não confirmou as supostas associações prognósticas encontradas nas análises de correlação da primeira etapa. Ademais, os dados dessas análises permitiram inferir que possa haver uma expressão compensatória conjunta entre ROS1, MET, ALK, IGF1R e PTK2 em CLIs com perda de E-caderina, algo que pode ser testado em estudos posteriores.

Palavras-Chave (português): Carcinoma lobular invasor, e-caderina, ROS-1, crizotinib

ABSTRACT

Invasive lobular carcinoma (ILC), a special type of breast cancer, represents about 10% of carcinomas of this organ. Associated with the *BRCA2* and *CDH1* genes mutations, it has a discohesive cellular phenotype, as a result of genetic alterations in the *CDH1* gene, which encodes the E-cadherin adhesion molecule. More than 90% of them express estrogen and progesterone receptors. As a rule, they have low Ki67 expression and do not express HER2, belonging to the Luminal A molecular subtype, and exhibiting a good prognosis when treated by non-special type carcinoma models. Although so far there is no specific treatment for lobular carcinomas, there is a preclinical description of increased expression of *ROS1* and synthetic lethality by E-cadherin deficiency and suppression of this tyrosine kinase, respectively, implicating *ROS1* inhibitors in the induction of apoptosis. However, there is no data in the literature on *ROS1* expression in human CLIs, neither between this expression and E-cadherin loss, nor other clinicopathological data. The aim of the study was to determine the expression of *ROS1* in human CLIs, through immunohistochemistry in a Brazilian representative sample of this type of cancer, and to test adverse correlations with variables of clinical interest, verifying the findings by *in silico* analysis of CLI RNA expression in international open databases. The work consisted of two stages, the first being an analytical cross-sectional study with 78 cases of CLI, from the archives of two institutions, private and public, in Brasília, between 2015 and 2019. The average age of the patients was 58.9 years, with findings of laterality, location and multicentricity similar to those already described by the literature. *ROS1*, the main biomarker of the study, contrary to expectations, was expressed in only 3 cases (4,6%), with an H-score ranging from 15 to 240. All three had Ki67 greater than or equal to 20% ($P=0.026$) and estrogen receptor expression in less than 20% of neoplastic cells ($P=0.000015$). No statistical significance was found between *ROS1* expression and histological type, histological grade, lymphovascular invasion, margin status, lymph node stage, TNM stage, progesterone receptor expression, HER2 overexpression or low expression, or expression pattern of E-cadherin or p120-Catenin. Despite the small number of cases with *ROS1* expression in the study, suggesting a different pattern of cellular homeostasis between humans and rodents, as a restitution way to the loss of E-cadherin expression, the correlation with higher

rates of cell proliferation might correspond to a worse prognosis for the patients who come to present it. The second stage of the study, of correlation with *in silico* data, confirmed the low frequency of ROS1 expression in CLI (0,97 to 2,05%), but did not confirm the supposed prognostic associations found in the correlation analyses. Furthermore, the data from these analyzes allowed us to infer that there may be a joint compensatory expression of ROS1, MET, ALK, IGF1R and FAK in CLIs bearing loss of E-cadherin, something that can be tested in further studies.

Keywords: “Lobular breast cancer, e-cadherin, ROS1, Crizotinib”

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma. Adaptado de (1)	21
Figura 2 - Número global de casos de câncer em 2020, ambos os sexos. todas as idades. Adaptado de (8)	23
Figura 3 - Exemplo de grau de Nottingham - formação tubular. Adaptado de (3)	28
Figura 4 - Exemplo de grau de Nottingham - pleomorfismo nuclear. Adaptado de (3)	29
Figura 5 - Interpretação da marcação de receptores hormonais em carcinoma invasor da mama. Adaptado de (3)	31
Figura 6 - Algoritmo para interpretação da reação de imuno-histoquímica de <i>ERBB2</i> (HER2) em carcinoma invasivo de mama. Adaptado de (3)	32
Figura 7 - Espectro de mutações somáticas através das regiões codificantes da E-caderina no banco de dados do cBioPortal. Adaptado de (137)	40
Figura 8 - Ilustração dos principais componentes do complexo de caderina-catenina em junções aderentes maduras e os eventos de sinalização nuclear mediados por cateninas. Adaptado de (138)	42
Figura 9 - Marcação de IHQ para E-caderina e demais componentes do complexo de ligação em CLIs. Adaptado de (137)	43
Figura 10 - Representação esquemática de ROS e seus homólogos em invertebrados. Adaptado de (147)	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 11 - Letalidade sintética de E-caderina <i>in vivo</i> em tumores de mama com deficiência de E-caderina. Adaptado de (163)	49
Figura 12 - Esquema explicativo de letalidade sintética. Adaptado de (166)	51
Figura 13 - Ensaios clínicos utilizando a premissa de letalidade sintética por inibição de ROS1 em células E-caderina deficientes. Adaptado de https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03620643	52
Figura 14 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do RE (receptor de estrógeno) na amostra EC22000006.....	74
Figura 15 - A - Fotomicrografia de marcação por IHQ do RP (receptor de progesterona) na amostra EC22000006. B - Fotomicrografia de marcação por IHQ do HER2 na amostra EC22000006	75
Figura 16 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do Ki67 na amostra EC22000006.	77
Figura 17 - Fotomicrografia de marcação por IHQ da E-caderina na amostra EC22000006.....	79
Figura 18 - Fotomicrografia de marcação por IHQ da p120-catenina em tecido normal (A) e da p120-catenina (B), E-caderina (C) e beta-catenina (D) na neoplasia da amostra EC22000006	80
Figura 19 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do ROS1 (D4D6) na amostra EC22000006	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 20 - Fotomicrografia de marcação por IHQ da ROS1 (D4D6) na amostra EC22000006	82
Figura 21 - Fotomicrografias de H&E (400x) de CLI e de reação imuno-histoquímica para ROS1 (D4D6) exibindo H-score 15 - amostra EC22000020.	83
Figura 22 – Resultado de quantificação e análise de integridade de ácidos nucleicos	91
Figura 23 - Fotomicrografia de hibridização <i>in situ</i> por fluorescência no caso EC22000006 (ROS1 IHQ = H240)	92
Figura 24 - Análise qualitativa (visual) de mapa de calor da relação entre os genes <i>ROS1</i> , <i>ALK</i> , <i>MET</i> e <i>KDR</i>	98
Figura 25 - Gráfico de comparação entre as expressões de <i>ESR1</i> nos casos <i>ROS1</i> hiperexpressos (z-escore > 1,8) e nos pertencentes ao 1º quartil (inferior) de expressão do <i>ROS1</i> (<i>in silico</i>).....	99
Figura 26 - Gráfico de comparação entre as expressões de <i>MKI67</i> nos casos <i>ROS1</i> hiperexpressos (z-escore > 1,8) e nos pertencentes ao 1º quartil (inferior) de expressão do <i>ROS1</i> (<i>in silico</i>).....	100
Figura 27 - Associação de correlação (teste de Pearson) combinatória positiva entre <i>CDH1</i> e <i>IGF1R</i> . (<i>in silico</i>)	101
Figura 28 - Resultados da análise combinatória de correlação de dados de expressão de RNA por z-escore dos genes <i>ROS1</i> , <i>IGF1R</i> , <i>PTK2</i> , <i>MKI67</i> , <i>MET</i> , <i>KDR</i> , <i>ALK</i> e <i>CDH1</i> (<i>in silico</i>)	102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 29 - Gráfico de dispersão das principais correlações encontradas na análise combinatória de correlação de dados de expressão por z-score dos genes do banco de dados dos quatro estudos do CBioPortal 103

Figura 30 - Gráfico de distribuição de expressão relativa dos genes *ROS1*, *IGF1R*, *PTK2*, *MKI67*, *MET*, *KDR*, *ALK* e *CDH1* (*in silico*) 105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Método semiquantitativo para avaliação de grau histológico em tumores de mama	26
Quadro 2 - Método semiquantitativo para avaliação de grau histológico em tumores de mama	29
Quadro 3 - Principais características das pacientes com mais de uma amostra incluídas no trabalho	69
Quadro 4 - Critérios de exclusão aplicados para a relação dos 25 estudos de câncer de mama inicialmente selecionados no CBioPortal	94
Quadro 5 - Principais características dos estudos do CBioPortal que seguiram para análise de expressão de RNA por z-score	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas de todas as pacientes	69
Tabela 2 - Características clínicas de todas as amostras	70
Tabela 3 - Características patológicas em todas as amostras	72
Tabela 4 - Características de estadiamento AJCC (7 ^a ed) de todas as amostras	73
Tabela 5 - Características imuno-histoquímicas e estimativas de expressão das pacientes com CLIs	76
Tabela 6 - Características imuno-histoquímicas referentes a expressão das proteínas do complexo de adesão celular, em todas as amostras	78
Tabela 7 - Padrão de expressão do ROS1 nas 66 amostras testadas por IHQ	81
Tabela 8 - Correlação entre a expressão do ROS1 por IHQ e o tipo histológico registrado nos arquivos pesquisados	84
Tabela 9 - Correlação entre a expressão do ROS1 e da E-caderina, da p120-catenina e da beta-catenina	85
Tabela 10 - Correlação entre a expressão do ROS1 e de receptor de estrógeno	86
Tabela 11 - Correlação entre expressão do ROS1 e achados patológicos	86
Tabela 12 - Correlação entre a expressão do ROS1 e do Ki67, por amostras	87
Tabela 13 - Frequência de z-escore elevado (%) em CLIs nos quatro estudos avaliados para os genes <i>ROS1</i> , <i>MET</i> , <i>KDR</i> , <i>ALK</i>	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

alfa-AML - Actina de músculo liso alfa
ASCO - *American Society of Clinical Oncology*
CAAE - Certificado de apresentação de apreciação ética
CAP - *College of American Pathologists*
CDI - Carcinoma ductal invasor
CDIS - Carcinoma ductal *in situ*
CEP - Comitê de ética em pesquisa
CK - Citoqueratina
CLI - Carcinoma lobular invasor
CMI - Carcinoma mamário invasor
CMDL - Carcinoma misto ducto-lobular
CMLGDH - Câncer de Mama Lobular e do Câncer Gástrico Difuso Hereditário
CMTN - Carcinoma de mama triplo negativo
CTLI - Carcinoma túbulo-lobular
DF - Distrito Federal
EGF - Fator de crescimento epitelial
ESR1 - gene do receptor de estrogênio
EUA - Estados Unidos da América
FAK - Quinase de adesão focal
FISH - Hibridização “in situ” por fluorescência
FS – Faculdade de Saúde
GCNT2 - glucosaminil (N-acetil) transferase 2
HER2 – Receptor de fator de crescimento epidérmico 2
H&E – Hematoxilina e eosina
IHQ – Imuno-histoquímica
IKWG - Grupo de trabalho internacional para Ki67 em câncer de mama
ISH - Hibridização *in situ*
JA - Junções aderentes
Ki67 – Marcador de proliferação celular codificado pelo gene *MKI67*
LS - Letalidade sintética
MKI67 - gene do Ki67

PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PCR - Reação polimerase em cadeia

qPCR - PCR em tempo real

RA - Receptor de andrógeno

RE – Receptor de estrógeno

RNA - Ácido ribonucléico

RP – Receptor de progesterona

RT-qPCR - reação polimerase em cadeia em tempo real pós transcriptase reversa

si-RNA - microRNA interferente

TIL - Linfócitos infiltrando tumor

TCGA - “The Cancer Genome Atlas”

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNE - Tipo não-especial

UnB – Universidade de Brasília

ZA - Zônula aderente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 CARCINOMA MAMÁRIO	21
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA MAMÁRIO INVASOR	22
1.3 PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS	24
1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS	25
1.4.1 Perfis de Mutação dos Carcinomas Mamários Invasores	26
1.5 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA MAMÁRIO	27
1.5.1 Subtipos e graus histológicos de carcinomas mamário	28
1.5.2 Imuno-histoquímica dos carcinomas mamários	30
1.6 CORRELAÇÃO ENTRE PADRÕES HISTOLÓGICOS E IHQ	32
1.7 CARCINOMA LOBULAR INVASIVO	33
1.7.1 Patogênese do Carcinoma Lobular Invasivo	34
1.7.2 Histopatologia do Carcinoma Lobular Invasivo	35
1.7.3 Imuno-histoquímica de Carcinoma Lobular Invasivo	37
1.7.4 Prognóstico e sobrevida dos CLIs	38
1.8 GENE <i>CDH1</i> E A E-CADERINA	39
1.8.1 E-caderina, Gene <i>CDH1</i> e o complexo de adesão celular	40
1.8.2 Expressão da E-caderina e Alterações Somáticas no <i>CDH1</i>	41
1.9 GENE <i>ROS1</i>	45
1.9.1 Expressão de <i>ROS1</i> em Carcinomas Mamários	46
1.10 <i>ROS1</i> E CARCINOMA LOBULAR INVASIVO	48
2. OBJETIVOS	56
2.2 OBJETVO GERAL	56
2.1 OBJETVOS ESPECÍFICOS	56
3. METODOLOGIA	57
3.1 DESENHO DO ESTUDO	57
3.2 AMOSTRA	57
3.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO	58
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	58

3.4.1 Etapa Transversal Análítica	58
3.4.2 Etapa <i>In Silico</i>	59
3.5 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	59
3.6 TESTES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	60
3.7 AVALIAÇÃO MORFO-MOLECULAR	61
3.8 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	62
3.9 ANÁLISE DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> POR FLUORESCÊNCIA	63
3.10 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	65
3.11 ASPECTOS ÉTICOS	66
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 DEMOGRAFIA E DESCRIÇÃO DE DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS ..	68
4.2 ESTIMATIVAS DE EXPRESSÃO E DE FATORES PREDITIVOS EM CLI	73
4.3 ANÁLISE DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E EXPLORATÓRIA	78
4.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E EXPLORATÓRIA	93
5. CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/UnB	132
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	142
ANEXO 3 - RELATÓRIO DETALHADO DA LÂMINA - E-CADERINA	143
ANEXO 4 - RELATÓRIO DETALHADO DA LÂMINA - ROS1	144
ANEXO 5 - RELATÓRIO DETALHADO DA LÂMINA - P120-CATENINA ..	145
ANEXO 6 - RELATÓRIO DETALHADO DA LÂMINA - BETA-CATENINA .	146
ANEXO 7 - RELATÓRIO DETALHADO DA LÂMINA - ALK	147
ANEXO 8 - RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO - IHQ ROS1	148
ANEXO 9 - LÂMINAS IHQ - EC22000006, EC22000020 e EC220000021	155
ANEXO 10 - DADOS RNA - EC22000006, EC22000020 e EC220000021	156

1 INTRODUÇÃO

O câncer primário de mama é o tipo mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo. Para o triênio 2023-2025 são esperados 73.610 novos casos, a cada ano, no Brasil (Figura 1) (1) e 281.550 novos casos foram esperados nos Estados Unidos da América para o ano de 2021 (2).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma - Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: Adaptado de Estimativa 2023 (1).

1.1 CARCINOMA MAMÁRIO

Carcinoma mamário invasivo (CMI) é um grande e heterogêneo grupo de neoplasias epiteliais malignas dos elementos glandulares da mama. Os CMIs são categorizados em subtipos, morfologicamente. É importante observar que todos os CMIs são agrupados nos seguintes subtipos/grupos definidos por biomarcadores para fins de tratamento com base no status de receptor de estrógeno (RE) e do gene *ERBB2* (HER2): RE-positivo, HER2-negativo; RE-positivo, HER2-positivo; RE-negativo, HER2-positivo; RE-negativo, HER2-negativo. Apesar de suas características morfológicas sobrepostas, esses subtipos definidos por biomarcadores mostram resultados e respostas distintas à terapia, bem como diferenças em seus perfis genômicos e transcriptômicos (3).

A maioria dos cânceres de mama, cerca de 90%, é unifocal e pode ocorrer em qualquer quadrante da mama, com maior frequência no quadrante superior externo (4). Um tumor contralateral sincrônico é encontrado em aproximadamente 2% das pacientes. Cerca de 0,1% dos cânceres de mama se apresentam como uma metástase axilar sem primário de mama claro (5).

Todos os sinais e sintomas do câncer de mama (massa palpável, retração da pele, inversão do mamilo, secreção mamilar, eventual mudança no tamanho, cor, textura ou formato da mama, dentre outros) também podem ser causados por doença benigna, portanto, a avaliação com imagem e amostragem histológica são fundamentais para estabelecer um diagnóstico definitivo (3). De fato, a taxa de falsos negativos de mamografia e ultrassonografia combinadas, por exemplo, varia de semente de 0% a 3% (6,7), mas a menos que a presença de um diagnóstico inequivocamente benigno, como um cisto, seja estabelecida com base na imagem, a amostragem de tecido geralmente é necessária para pesquisa de carcinoma.

A ressonância magnética, por sua vez, é o método de imagem mais sensível, mas não o mais específico, para detectar o câncer de mama; portanto, seu uso é restrito à triagem de mulheres com muito alto risco (por exemplo, portadoras de mutações *BRCA1* ou *BRCA2*) e em alguns centros após um diagnóstico inicial de carcinoma lobular ou como parte do estadiamento do câncer de mama (3).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA MAMÁRIO INVASOR

O câncer de mama é o mais comumente diagnosticado em mulheres, representando cerca de 24 a 30% de todos os cânceres femininos, e a principal causa de morte por câncer feminino em todo o mundo (8) e representa 11,7% de todos os cânceres em ambos os sexos combinados (Figura 2), tornando-se o câncer mais comum em geral (1,8,9,10). O carcinoma lobular invasor (CLI) é um tipo especial de câncer de mama e representa de 5,0 a 15,0% dos casos no mundo (3) e cerca de 2,6 a 10,0% dos casos de câncer de mama no Brasil (11,12,13,14,15,16,17,18,19).

As taxas de incidência de CMI têm aumentado na maioria dos países de baixa e média renda nas últimas décadas. Em países de alta renda, como Estados

Unidos da América (EUA), Canadá, Reino Unido, França e Austrália, as taxas de incidência diminuíram no início dos anos 2000, o que foi parcialmente atribuído à diminuição do uso de tratamento hormonal pós-menopausa após a publicação do ensaio da *Women's Health Initiative* que ligava o uso de hormônio em mulheres pós-menopáusicas ao aumento do risco de câncer de mama (20,21,22). No entanto, com o envelhecimento da população, a carga global aumentou em geral. Em 2020, foram estimados 2,2 milhões de novos casos de câncer de mama e 684.000 mortes em todo o mundo (8). A incidência também varia em mais de 10 vezes geograficamente. Os grupos de maior risco são as populações de países desenvolvidos como Austrália, Europa e América do Norte, onde 8 a 9% das mulheres são diagnosticadas com CMI antes dos 75 anos de idade (3). Variações geográficas, tendências temporais e estudos de populações que migram de áreas de baixo para alto risco mostram que o risco em populações migrantes se aproxima do risco do país anfitrião em uma ou duas gerações; isso sugere um papel importante para fatores ambientais na etiologia desse câncer.

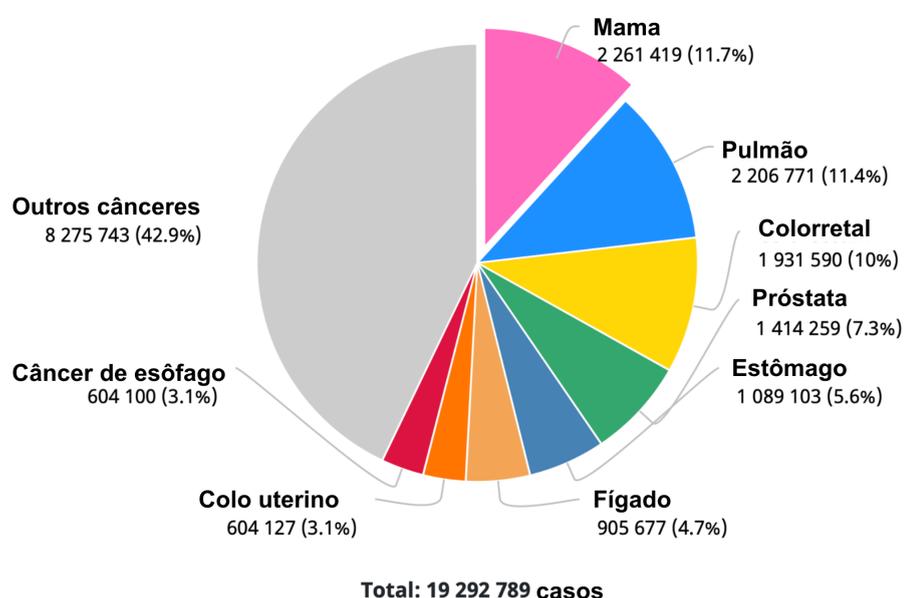


Figura 2 - Número global de casos de câncer em 2020, ambos os sexos, todas as idades. Fonte: Adaptado de Globocan 2020 (8).

Estudos de variações nos subtipos de câncer de mama nos EUA mostraram que as frequências dos subtipos clínicos / de biomarcadores variam de acordo com as características da população. Em populações rastreadas, o câncer receptor

hormonal positivo é o subtipo mais comum, com cânceres HER2-positivos constituindo 10-15% e tumores RE-negativos/HER2-negativos respondendo por 13-17%; em populações não rastreadas, a frequência é diferente, com proporções mais altas de cânceres RE-negativos/HER2-negativos (20–40%) e cânceres HER2-positivos (15–25%) (23,24).

1.3 PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

Modelos lineares de iniciação, transformação e progressão foram descritos para câncer de mama baseados principalmente na morfologia e no estado dos receptores hormonais. O modelo RE-positivo reconhece atipia epitelial plana, hiperplasia ductal atípica e carcinoma ductal *in situ* (CDIS) RE-positivo como os precursores não obrigatórios de carcinoma de mama invasivo e metastático. O modelo RE-negativo reconhece CDIS RE-negativo e adenose microglandular como precursores de cânceres RE-negativos (25).

Dados moleculares demonstraram que os cânceres de mama RE-positivos e RE-negativos são doenças fundamentalmente distintas (26,27), contudo mutações *PIK3CA* ocorrem comumente em ambas as vias (28).

A via RE-positiva é caracterizada por ganhos de 1q, perda de 16q, amplificação pouco frequente de 17q12 e uma assinatura de expressão gênica própria a esse fenótipo. Apesar de expressarem receptores hormonais, carecem de hiperexpressão de HER2 e de marcadores basais e têm cariótipos relativamente simples. Em geral, são neoplasias de grau baixo a intermediário, além de um pequeno subconjunto, cerca de 9%, de tumores de alto grau definidos pela morfologia (26).

A via RE-negativa é mais comumente caracterizada pela perda de 13q, ganho da região cromossômica 11q13, amplificação de 17q12 (HER2) e uma assinatura de expressão gênica constituída por genes associados à proliferação celular e fases do ciclo celular. Inclui os grupos HER2-positivo e HER2-negativo. Os tumores são, predominantemente, de grau intermediário a alto (26), geneticamente instáveis, aneuploides e mutações no gene *TP53* são frequentes (28).

Por outro lado, progressão para alto grau se dá preferencialmente em tumores de fenótipo luminal (29). No grupo RE-negativo e HER2-negativo há alta atividade proliferativa, maior infiltrado imune tumoral, fenótipo basal e mesenquimal, além de deficiência na recombinação homóloga (3).

1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

Há diferentes padrões de expressão gênica levando a diferenças de comportamento e prognóstico (28). Análises de expressão gênica, especialmente de genes envolvidos na regulação do crescimento celular e invasão, resultaram na identificação de subtipos moleculares intrínsecos de relevância biológica e clínica, além de assinaturas gênicas preditivas de resultado ou resposta à terapia (3).

A análise hierárquica de grupos (*clusters*) dos genes que variam mais entre diferentes tumores do que entre amostras repetidas do mesmo tumor, ou seja, genes intrínsecos, revelou a existência de quatro subtipos intrínsecos principais de câncer de mama: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido e tipo basal (28,30). Outros subtipos raros, como o mama normal-símile e o *claudin-low* também foram adicionados (30,31). Foi proposto um teste baseado de expressão de RNA por reação polimerase em cadeia em tempo real pós transcriptase reversa (RT-qPCR), com uma lista selecionada de 50 genes, a assinatura gênica PAM50, para classificar entre os quatro grupos principais (31). Contudo, por questões de acesso e custo-benefício uma classificação baseada em biomarcadores imuno-histoquímicos mencionados acima foi desenvolvida, classificando os tumores nos cinco subtipos mostrados no Quadro 1 (32).

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é definido pela ausência de expressão de RE, PR e HER2 por imuno-histoquímica, contendo opções terapêuticas específicas limitadas. Este é um grupo heterogêneo de tumores com diferentes determinantes moleculares e prognósticos (33,34), pode ser classificado por expressão gênica em quatro subtipos (*TNBCtype-4*) (35): basal-símile 1 e basal-símile 2 (que diferem na resposta imune), mesenquimal e luminal RA; ou por análise conjunta de RNA e DNA em outros quatro subtipos distintos: receptor de andrógeno (RA) luminal, mesenquimal, tipo basal imunossuprimido e tipo basal imunoativado (36).

Quadro 1 - Definição clinicopatológica alternativa aos subtipos moleculares de carcinoma de mama invasivo precoce adotada pelo Painel de Especialistas da 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama de St. Gallen (2013), com base em achados de imuno-histoquímica (IHQ) de RE, Receptor de progesterona (RP), *ERBB2* (HER2) e Ki-67 com confirmação por hibridização *in situ*. (Adaptado de 3 e 32).

Subtipos	Características - IHQ e/ou amplificação
Luminal A-símile	RE: positivo RP: positivo HER2: negativo Ki-67 - índice de proliferação: baixo
Luminal B-símile (HER2-negativo)	RE: positivo HER2: negativo Pelo menos um dos seguintes: ○ Ki-67 - índice de proliferação: alto ○ RP: negativo ou baixo
Luminal B-símile (HER2-positivo)	RE: positivo HER2: hiperexpresso ou amplificado Ki-67 - índice de proliferação: qualquer um RP: qualquer um
HER2-positivo (não-luminal)	HER2: hiperexpresso ou amplificado RE: negativo RP: negativo
Triplo-negativo	RE: negativo RP: negativo HER2: negativo

1.4.1 Perfis de Mutação dos Carcinomas Mamários Invasores

Os tumores luminais A têm uma alta prevalência de mutações *PIK3CA* (49%), enquanto os tumores basais têm principalmente mutações *TP53* (84%) (37). Há aprovação para pesquisar mutação *PIK3CA*, por PCR em tempo real (qPCR), para

determinar se pacientes com câncer de mama RE-positivo avançado são elegíveis para tratamento com alpelisibe, inibidor de PI3K (38).

Entre os subtipos moleculares de CMTN o subtipo basal-like 1 é instável geneticamente, com alta taxa de mutação *TP53* (92%) e deleções de cópias em *BRCA2*, *MDM2*, *PTEN*, *RB1* e *TP53*, já os RA luminais apresentam maior carga mutacional, com mutações em *PIK3CA* (55%), *AKT1* (13%) e *CDH1* (13%) (3,39). Pacientes com câncer recorrente ou estágio 4 HER2-negativo e mutação germinativa *BRCA1* ou *BRCA2* conhecida são considerados candidatos a terapias que visam essa deficiência - ou seja, inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (iPARP) (40,41).

A carga mutacional de um tumor, a qual está associada à resposta terapêutica à imunoterapia, tende a ser maior no CMTN (1,68 mutações/Mb) do que nos tumores luminais (0,84–1,38 mutações/Mb) (28,42).

1.5 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA MAMÁRIO

CMI tem um amplo espectro de aparências histológicas. Quatro características histológicas são descritas para caracterizar ainda melhor a biologia: [1] subtipo histológico baseado na arquitetura do tumor, características citonucleares e características estromais; [2] Grau de Nottingham (detalhado abaixo); [3] a presença ou não de disseminação nos espaços angiolinfáticos; e [4] um componente *in situ* associado. Outras características de importância na classificação incluem tamanho do tumor, distância às margens, alterações estromais e linfócitos infiltrando tumor (TILs) (3).

Também é importante reconhecer quando as características histológicas de um carcinoma de mama são incomuns ou discrepantes com os achados de receptor hormonal ou status HER2 (43). Por exemplo, um câncer de baixo grau com RE negativo ou HER2 positivo seria altamente incomum/discordante, e uma investigação adicional seria recomendada para garantir tipagem histológica, classificação e *status* de biomarcador precisos. Os CMIs são organizados por seus subtipos morfológicos, embora a maioria dos casos seja de tipo não-especial (TNE) e cerca de 5,0 a 15,0% sejam CLIs (3).

1.5.1 Subtipos e graus histológicos de carcinomas mamários

Os carcinomas de mama que apresentam um padrão histológico especial em $\geq 90\%$ do tumor são designados como um tipo de tumor especial puro, como os carcinomas lobular, mucinoso e tubular, entre outros. Os demais são designados como carcinoma invasivo de TNE (3).

Para a definição de grau histológico, três características são avaliadas: formação de túbulos como expressão de diferenciação glandular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (44,45). O Quadro 2 sumariza as informações para definição de grau histológico (3).

A proporção de túbulos e de formação glandular/acinar são avaliados microscopicamente em todo o tumor em objetiva de pequeno aumento (Figura 3). O número total de mitoses por 10 campos de grande aumento é registrado na área que exibe a maior frequência de mitoses.

O pleomorfismo nuclear (Figura 4) é avaliado na área que mostra o maior grau de pleomorfismo. Os núcleos de pontuação 1 são muito semelhantes em tamanho aos núcleos de células epiteliais pré-existentes benignas ($< 1,5$ vezes o tamanho) (3).

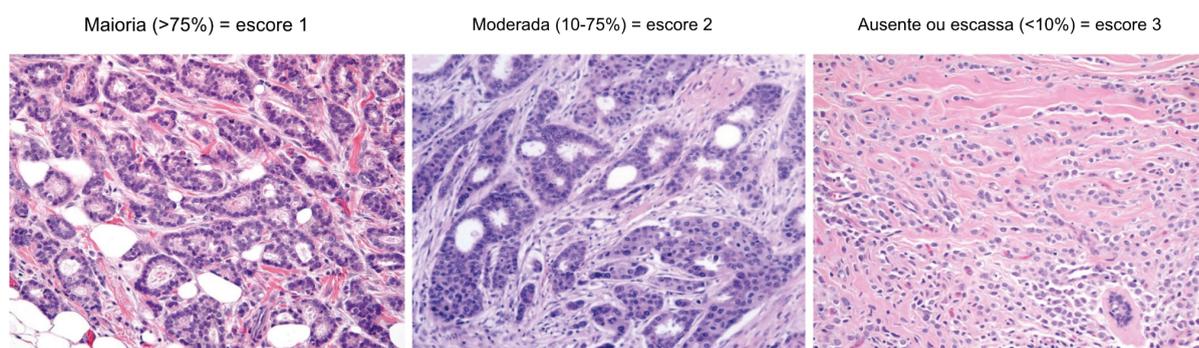


Figura 3 - Exemplo de grau de Nottingham - proporção de formação tubular. Adaptado de *WHO Classification of Tumours* (3)

Os núcleos de pontuação 2 são maiores (1,5 a 2 vezes o tamanho dos núcleos de células epiteliais benignas), com pleomorfismo leve a moderado. Núcleos de escore 3 são ainda maiores (> 2 vezes o tamanho dos núcleos de células

epiteliais benignas), com cromatina clara vesicular e frequentemente mostram nucléolos proeminentes (3)

Quadro 2 - Método semiquantitativo para avaliação de grau histológico em tumores de mama. Adaptado de *WHO Classification of Tumours* (3).

Característica	Escore
Formação tubular e glandular	
Maioria do tumor (> 75%)	1
Grau intermediário (10–75%)	2
Ausente ou escasso (< 10%)	3
Pleomorfismo Nuclear	
Células uniformes, regulares e pequenas	1
Moderado aumento em tamanho e pleomorfismo	2
Variação importante	3
Contagem mitótica	
Dependente da área do campo de grande aumento do microscópio	1–3
Escore total	Grau Final
3–5	Grau 1
6 or 7	Grau 2
8 or 9	Grau 3

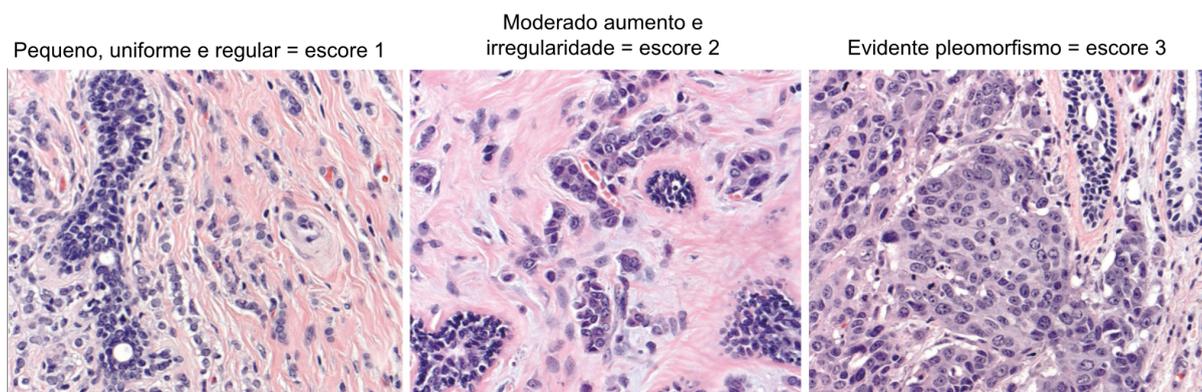


Figura 4 - Exemplo de grau de Nottingham - escore de pleomorfismo nuclear. Adaptado de *WHO Classification of Tumours* (3).

1.5.2 Imuno-histoquímica dos carcinomas mamários

Células de CMI são geralmente positivas para citoqueratinas (CK) de baixo peso molecular (CK7, CK8/18 e CK19) e fator de transcrição GATA3. No entanto, formas pouco diferenciadas podem perder a expressão de um ou mais desses marcadores. Uma proporção de CMIs, normalmente as formas bem diferenciadas, também é positiva para as proteínas GCDFP-15 e mamaglobina. A maioria dos cânceres de mama é negativa para outros marcadores específicos de outros tecidos, como CDX2, PAX8, WT1, TTF1, HMB45, melan-A, CD20 e CD3, mas pode ser positiva para CD138 (3).

A expressão nuclear de RE deve ser avaliada em CMI por ser fator preditivo de benefício clínico da terapia endócrina e utilizada em vários algoritmos de tratamento clínico para cânceres RE-positivos versus RE-negativos. A expressão de RP tende a variar mais do que a expressão de RE, e isso ajuda a explicar a eficácia de RP para estratificar ainda mais os casos RE-positivos em categorias de prognóstico (46). A atualização de 2019 das recomendações das diretrizes da *American Society of Clinical Oncology (ASCO) / College of American Pathologists (CAP)* para testes imuno-histoquímicos de RE e RP em câncer de mama reafirma a recomendação de 2010 de que os cânceres de mama com apenas 1% de células com fraca intensidade de coloração de RE devem ser considerados positivos, devido à evidência de benefício potencial da terapia endócrina (47,48). No entanto, cânceres invasores com 1-10% de positividade de RE devem ser relatados como RE baixo expressor, com adicionais recomendações de interpretação, visto que podem vir a se comportar como CMTN (3).

Na análise da lâmina de IHQ, um controle externo sempre deve ser avaliado, com tecidos positivos e negativos apropriados, e os controles internos também devem ser corados conforme o esperado, quando presentes (Figura 5). Diferentes sistemas de pontuação podem ser usados para combinar as informações de intensidade e porcentagem para uma pontuação geral, por exemplo, pontuação H-escore ou pontuação Allred (3).

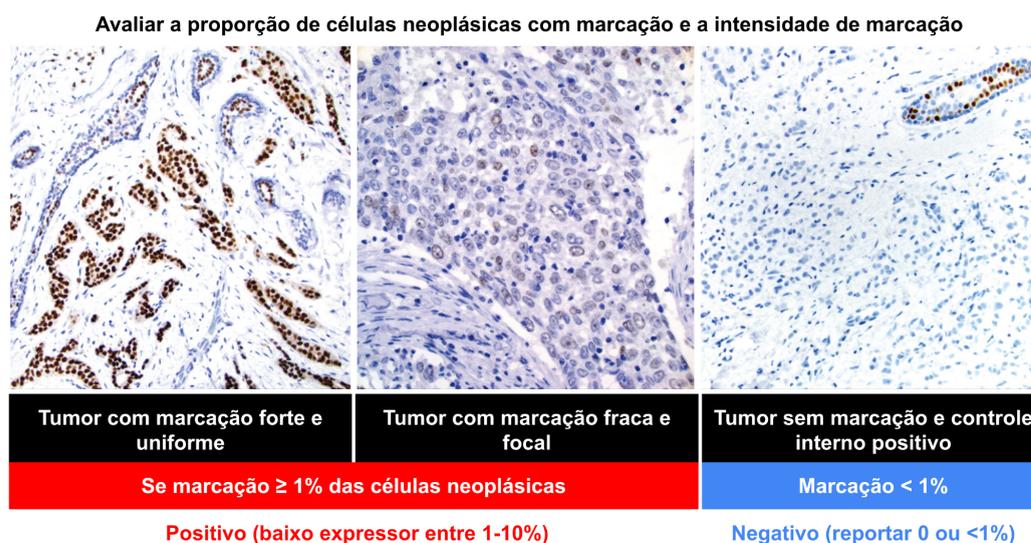


Figura 5 - Interpretação da marcação de receptores hormonais em carcinoma invasor da mama. Adaptado de *WHO Classification of Tumours* (3).

Em 10-20% dos CMLs, o gene *ERBB2* (HER2) é amplificado, resultando em hiperexpressão da proteína HER2 na superfície celular, podendo resultar em uma biologia mais agressiva do câncer devido ao aumento da angiogênese e da proliferação e motilidade celulares. Em combinação ao trastuzumab, primeira, e ainda padrão, terapia biológica anti-HER2, há várias outras direcionadas a HER2 disponíveis atualmente (49,50). A hiperexpressão da proteína HER2 pode ser avaliada usando IHQ (Figura 6), ou a amplificação de *ERBB2* pode ser identificada por hibridização *in situ* (ISH). Em caso de resultado duvidoso (escore 2+) na IHQ, o caso deve ser avaliado por ISH. A atualização de 2018 das diretrizes ASCO/CAP HER2 recomenda maior ênfase no uso de IHQ para orientar a interpretação do teste de categorias incomuns de hibridização *in situ*, grupos 2, 3 e 4 (51).

A intensidade superestimada do HER2 é uma das causas mais comuns de discordância entre a imuno-histoquímica do HER2 (positiva) e a hibridização *in situ* (negativa) (52). A comparação da intensidade com os controles negativo (0-1+) e positivo (3+) deve servir como referência para as análises de intensidade. É necessário estar ciente de padrões de coloração incomuns, por exemplo, heterogeneidade clonal, e resultados discordantes, como um CMI de grau 1 com HER2 escore 3+ (53).

1.6 CORRELAÇÃO ENTRE PADRÕES HISTOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

CMI's positivos para receptores hormonais variam de cânceres bem diferenciados compostos por células de baixo grau formando estruturas tubulares/ductais, com maior frequência, a cânceres pouco diferenciados em menor proporção (54). Há também os tumores com mutações germinativas de *BRCA2* que são frequentemente RE-positivos (55,56).

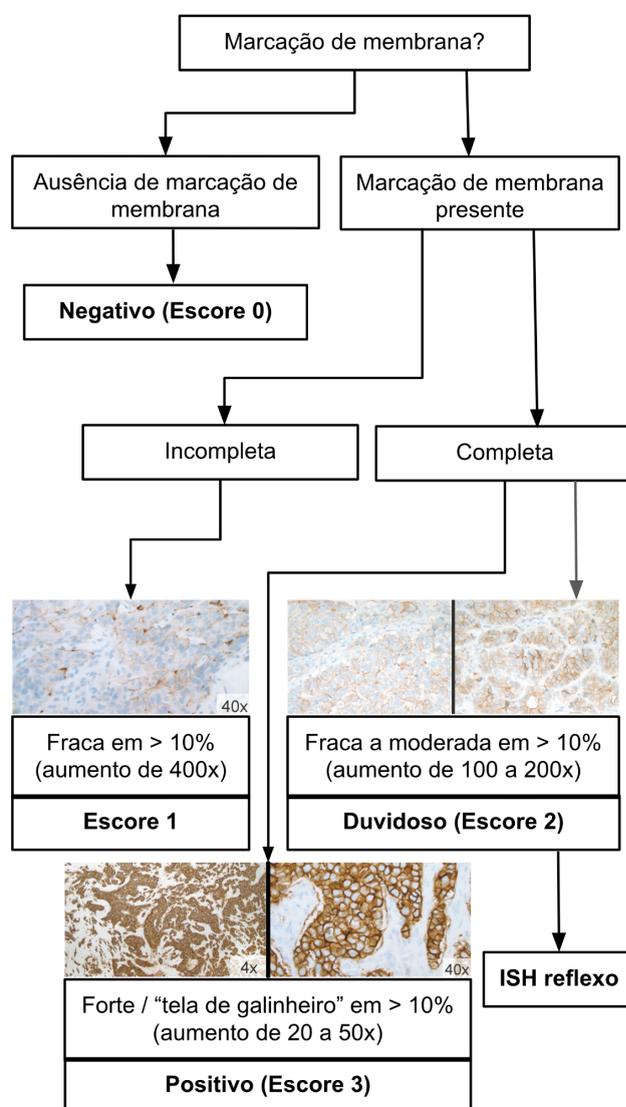


Figura 6 - Algoritmo para interpretação da reação de imuno-histoquímica de *ERBB2* (HER2) em CMI. ISH, hibridização in situ. Adaptado de *WHO Classification of Tumours* (3).

Apesar de os tumores de mama triplo-negativos, receptores hormonais negativos, HER2-negativos, terem um espectro de morfologias, incluindo tipos especiais, como carcinoma adenóide cístico, secretório e carcinoma metaplásico, a maioria desses CMIs são de alto grau (57,58). As contagens mitóticas são tipicamente muito altas, com índices de proliferação frequentemente maiores que 80% (33,59). Neoplasias associadas a mutações germinativas *BRCA1* são frequentemente triplo-negativas (55). Tumores com baixas porcentagens de células RE-positivas e negatividade HER2 frequentemente têm características histológicas mais semelhantes às dos cânceres triplo-negativos de alto grau (54)

Já os tumores HER2-positivos são tipicamente de alto grau histológico com núcleos muito pleomórficos e citoplasma eosinofílico mais abundante. O índice proliferativo é alto, mas menor em média do que nas neoplasias triplo-negativas, variando de 20 a 60% (3).

1.7 CARCINOMA LOBULAR INVASIVO

O carcinoma lobular invasivo (CLI) é um tipo especial de câncer de mama e representa cerca de 10% dos casos no Brasil e no mundo (3, 11,12,13,14,15,16,17,18,19). Está fortemente associado à exposição a hormônios femininos e a fatores de risco genéticos como mutações nos genes *BRCA2* e *CDH1*. Ao diagnóstico, se apresentam com massas maiores e estágio mais avançado (60). A partir da década de 1980, a incidência de CLI aumentou em relação à de CMI-TNE (61,62). Isso foi atribuído ao aumento do uso de terapia de reposição hormonal (61,63) ou aumento do consumo de álcool (64). A idade média dos pacientes com CLI é de 57 a 65 anos, ligeiramente superior à dos pacientes com CMI-TNE (65).

As células tumorais possuem um fenótipo próprio de descoesão, decorrente de alterações genéticas no gene *CDH1*, com padrão morfológico de infiltração em células isoladas e em fila indiana. Há relatos de uma incidência de tumores contralaterais, particularmente tumores síncronos, de 5–19%, que é maior do que para CMI-TNE (66,67).

Os achados mamográficos mais comuns são massa espiculada e distorção arquitetural, podendo ser subclínicos e já apresentar metástases. As

microcalcificações são raras. A mamografia tem uma sensibilidade mais baixa para a detecção de CLI (57–89%) do que CMI-TNE, com taxas de falsos negativos de até 19% (68,69). A ultrassonografia é mais sensível (78–95%), embora o tamanho do tumor possa ser subestimado (70).

A ressonância magnética é útil no diagnóstico de CLI, em particular em lesões multifocais, mas pode levar a falsos positivos e superestimar o tamanho do tumor (71). Por outro lado, é indicada pela maioria das diretrizes (72), sobretudo no contexto de planejamento de cirurgia conservadora, uma vez que permite a redução dos índices de re-excisão, pela maior sensibilidade na análise de extensão da lesão (73).

1.7.1 Patogênese do Carcinoma Lobular Invasivo (CLI)

A grande maioria dos CLIs clássicos expressa RE e RP, sendo desprovidos de amplificação/hiperexpressão do gene *ERBB2* (HER2). São classificados como subtipo luminal A pelo perfil de expressão gênica em até 85% dos casos (74,75,76). Perfis tumorais por expressão gênica (74,76,77,78) e estudos imuno-histoquímicos (79,80) demonstraram que os CLIs também podem ser classificados como luminais B e raramente como HER2-enriquecidos ou basal-símiles. Nesse sentido, CLIs pleomórficos / apócrinos podem ser negativos para receptores hormonais e hiperexpressar HER2 (81,82).

Os CLIs exibem um padrão característico de alterações genéticas somáticas, incluindo ganhos de 16q e 16p e perdas de 16q, que abrangem o locus do gene *CDH1* em 16q22.1 (74,75,76,81,82). A perda de função da E-caderina demonstrou ser responsável pela clássica falta de coesão e padrão cordonal de invasividade das células de carcinoma lobular (83). Na verdade, a grande maioria dos CLIs abriga mutações deletérias que afetam *CDH1*, muitas vezes associadas à perda de heterozigosidade do alelo de tipo selvagem (74,75,76). Em uma minoria de casos sem mutações *CDH1*, foram relatadas alterações que afetam a α -catenina e potencialmente outros componentes da família caderina-catenina (84). Inversamente, o papel da metilação do promotor do gene *CDH1* na perda da expressão da E-caderina em CLIs permanece uma questão controversa (74,75,86).

Em análises retrospectivas, os classificadores de recorrência multigênicos baseados em expressão gênica atribuíram apenas uma pequena proporção de CLIs aos grupos de alto risco (87,88,89,90). Subgrupos distintos de CLIs foram identificados no nível de expressão gênica por análises de agrupamento, com um deles rotulado como “relacionado ao sistema imunológico” (74,91). No entanto, sua definição precisa ser padronizada. Neste contexto, um estudo recente demonstrou que o CLI apresenta níveis mais baixos de linfócitos infiltrantes tumorais do que o CMI-TNE RE-positivo e HER2-negativo, com apenas 15% dos casos apresentando mais de 10% de linfócitos infiltrando o estroma tumoral (92).

As alterações genômicas somáticas identificadas com mais frequência são a perda do braço longo do cromossomo 16 (16q), observada em quase todos os casos, mutações de *CDH1* (em 50–80%) e mutações de *PIK3CA* (em cerca de 45%) (74,75,78,91,93,94,95). Outros genes com mutação recorrente incluem *RUNX1*, *TP53*, *TBX3*, *PTEN*, *FOXA1*, *MAP3K1*, *ERBB2* (HER2) e *ERBB3* (HER3). Em comparação com os CMIs-TNE luminais A, os CLIs apresentam com mais frequência mutações somáticas de *CDH1*, *PTEN*, *TBX3*, *ERBB2* (HER2), *ERBB3* (HER3), *ARID1A* e *FOXA1*, e mostram menos frequentemente mutações de *GATA3*, *MAP2K4* e *CTCF* (74,75). Tumores com mutações de *AKT1* ou *ERBB2* (HER2) foram associados a um risco aumentado de recaída precoce (75). De interesse terapêutico, os agentes direcionados a HER2 mutado, e não hiperexpresso, podem ser usados para tratar tumores com variantes patogênicas de significado clínico de *ERBB2* (HER2) e possivelmente *ERBB3* (HER3), a maioria dos quais não possui amplificação de *ERBB2* (HER2), mas apresenta uma mutação de *CDH1* (96).

1.7.2 Histopatologia do Carcinoma Lobular Invasivo (CLI)

O padrão clássico do CLI é caracterizado por uma proliferação de pequenas células sem coesão e que aparecem individualmente dispersas por um tecido conjuntivo fibroso ou dispostas em cordões lineares em fila única que invadem o estroma / tecido adiposo (97,98,99). Esses cordões infiltrantes reiteradamente apresentam um padrão concêntrico ao redor dos ductos normais. Frequentemente, há pouca reação do estroma ou distorção da arquitetura de fundo. As células

neoplásicas têm núcleos ovóides redondos ou com fendas e uma fina borda de citoplasma, com ocasional lúmen intracitoplasmático (100), muitas vezes abrigando uma inclusão mucoide central, com aspecto de células em “anel de sinete”. Mitoses são pouco frequentes. Essas características citológicas clássicas são as mesmas observadas na hiperplasia lobular atípica e no carcinoma lobular *in situ*, que está associado a CLI em 58–98% dos casos (101,102). A invasão angiolímfática é incomum. Em se considerando microambiente tumoral, há relatos de que lesões de tipo luminal abrigam uma proliferação muito maior de fibroblastos associados ao câncer, conforme definido pela IHQ para actina de músculo liso alfa (α -AML), e uma maior neovascularização do tumor, mas vasos tumorais menos maduros, em comparação com CMI-TNE do tipo luminal, após ajuste de idade e grau (103). Portanto, apesar de ter um perfil de expressão gênica semelhante ao do CMI-TNE, o CLI demonstra um padrão diferente de microambiente tecidual (3).

Há descrição de vários padrões de CLI que compartilham o padrão citológico ou o padrão de crescimento do CLI clássico, mas todos carecem de coesão célula a célula. O padrão sólido é caracterizado pelas típicas células não coesas e pequenas de morfologia lobular, mas essas células crescem em lençóis e têm maior frequência de mitoses do que no tipo clássico (104,105). Os tumores de padrão alveolar exibem células dispostas principalmente em agregados globulares de pelo menos 20 células (106,107). O carcinoma lobular pleomórfico (CLP) retém o padrão de crescimento distinto do carcinoma lobular, mas exibe um maior grau de pleomorfismo, definido como células maiores com pleomorfismo nuclear acentuado, mais de 4 vezes o tamanho dos linfócitos / equivalente ao do carcinoma ductal de alto grau *in situ*, com ou sem características apócrinas (108,109) e uma contagem mitótica mais elevada do que a CLI clássico (110). Este padrão é frequentemente associado com carcinoma lobular *in situ* mostrando as mesmas características citológicas pleomórficas. O CLP pode apresentar diferenciação apócrina (111) ou histiocitoide (112) e pode ser composto por células em “anel de sinete”(100). Já, o padrão túbulo-lobular é composto pela mistura de um padrão de crescimento tubular e pequenas células uniformes dispostas em um padrão linear (113). Carcinoma lobular *in situ* é observado em cerca de um terço dos carcinomas túbulo-lobulares. Em contrapartida, o carcinoma com morfologia histiocitoide também pode ser citologicamente inocente e, portanto, pode ser confundido com histiócitos ou, caso presente alterações apócrinas, com tumor de células granulares (112).

1.7.3 Imuno-histoquímica de Carcinoma Lobular Invasivo (CLI)

Apesar da literatura sugerir que apenas 80-95% dos CLIs são positivos para RE, na prática atual os CLIs clássicos são quase invariavelmente positivos para RE (3). Em comparação, apenas 70-80% dos CMIs-TNE são RE-positivos. A positividade de RP é encontrada em 60–70% de ambos os tipos de tumor (65,66). O RE é expresso na forma clássica e nos diversos padrões histológicos, sendo a taxa de positividade maior no padrão alveolar de cerca de 100% (106) e menor no CLP (cerca de 10%) (114,115). A amplificação e hiperexpressão de *ERBB2* (HER2) são raras em CLI (65,66), embora evidente em alguns CLPs (81,116).

Uma das alterações moleculares mais consistentes no CLI é a perda de expressão da molécula de adesão célula-célula E-caderina, que contribui para a natureza discoesiva característica das células lobulares, devido ao rompimento do complexo aderente (82,117). A alteração na integridade do complexo aderente também pode ser devida à perda de outros componentes, como α -catenina, β -catenina e γ -catenina, resultando na localização incorreta de p120-catenina da membrana celular para o citoplasma (117,118). A análise da expressão de E-caderina, α -catenina, β -catenina e p120 pode ajudar a diferenciar entre CMI-TNE de baixo grau e CLIs que sejam difíceis de classificar com base em critérios morfológicos. No entanto, cerca de 15% dos CLIs, e a maioria dos cânceres túbulo-lobulares, expressam E-caderina, portanto, marcação positiva não deve ser usada para reclassificar uma lesão lobular como CMI-TNE (117). Inversamente, tumores com morfologia TNE também podem apresentar perda da expressão da E-caderina (102).

A expressão de p53, marcadores basais como CK14, CK5/6 e EGFR (HER1) e marcadores mioepiteliais (AML e p63) é rara em CLI (65). O índice proliferativo, mensurado pela marcação MIB1/Ki-67, é geralmente baixo em CLI clássico (menor que 10%), embora mais alto em demais padrões morfológicos (119).

1.7.4 Prognóstico e sobrevida dos Carcinomas Lobulares Invasores

Apesar das características prognósticas favoráveis do CLI, isto é, baixo grau, positividade de RE, negatividade de HER2 e baixo índice proliferativo, ainda há controvérsia sobre se o resultado difere entre pacientes com CLI e aqueles com CMI-TNE (120). Há relatos de resultado mais favorável para CLI do que CMI-TNE (120), mas outros não encontraram diferenças significativas (122,123) ou até mesmo pior prognóstico para CLI (121). Em grandes séries, CLIs eram mais propensos a ser de maiores tamanhos, ultrapassando 5 cm, e estágio tumoral mais avançado (estadio III/IV), com positividade mais frequente em linfonodos do que CMI-TNE, e tendiam a ocorrer em pacientes mais velhos (123,124). Uma observação importante feita em duas séries é que os pacientes com CLI têm um resultado melhor ou semelhante ao dos pacientes com CMI-TNE nos primeiros 10 anos após o diagnóstico. No entanto, o resultado a longo prazo associado ao CLI é pior do que o associado ao CMI-TNE (65,67). Os eventos que apresentam maior incidência, por exemplo, metástases à distância, recorrências e mortalidade, no CLI são aqueles de longo prazo após o diagnóstico. Quando os padrões histológicos de CLI foram analisados separadamente, um resultado mais favorável foi relatado para o tipo clássico do que para padrões histológicos definidos, ou seja, pleomórfico e sólido (111,119,121). No entanto, carcinoma túbulo-lobular e CLI alveolar foram considerados, também, tumores de baixo grau (106). Isso se correlaciona com os subtipos moleculares de câncer de mama, com CLIs clássicos sendo tumores predominantemente luminais A (79).

Sugere-se que o grau é um preditor independente do resultado do paciente em CLI (125). A maioria dos CLIs clássicos, aproximadamente 76%, são de grau 2, enquanto os CLIs de grau 3 são primordialmente de tipo não clássico (119). Dos três componentes da graduação do tumor, a contagem mitótica é o preditor mais útil do resultado. Uma alta contagem mitótica está associada a um pior prognóstico (125). Alguns autores sugerem que o grau 2 em CLI é comparável prognosticamente ao grau 3 CMI-TNE (126). Uma análise exploratória dos valores de corte do índice de proliferação de Ki-67 concluiu que, para CLI, um ponto de corte mais baixo (4%) prognostica melhor a progressão da doença do que o ponto de corte de 15% usado para CMI-TNE (127).

Após a quimioterapia neoadjuvante, taxas mais baixas de resposta patológica completa foram observadas para CLI do que para CMI-TNE (128), possivelmente favorecendo a terapia hormonal neoadjuvante. No entanto, essa relativa resistência

à terapia citotóxica pode estar mais relacionada às características moleculares e, essencialmente, ao menor índice proliferativo do CLI do que ao padrão histológico (129).

O padrão de metástases de CLI metastático difere daquele dos CMIs-TNE. Há relatos divergentes de uma menor frequência de metástase nodal axilar em CLI do que em CMI-TNE, com a diferença variando de 3% a 10% (121). Metástases de CLI clássico em linfonodos podem ser imperceptíveis, e até mesmo um grande número de células isoladas pode ser perdido apenas na coloração de hematoxilina e eosina (H&E); portanto, a IHQ para citoqueratinas aumenta a precisão de detecção (130). Uma maior frequência de metástases para o osso, pele, trato gastrointestinal, útero, meninges e ovário, bem como de envolvimento seroso difuso, é observada no CLI, enquanto a extensão para o pulmão é mais frequente no CMI-TNE (66,121,130). IHQ usando anticorpos para GCDFP-15, GATA3, CK7, RE, RP, E-caderina e p120-catenina pode ajudar a diagnosticar um tumor intra-abdominal como CLI metastático (118). Apesar de estudos de perfil de expressão gênica concomitante terem revelado três padrões moleculares de CLI com relevância prognóstica, sendo eles o tipo reativo, o tipo relacionado ao sistema imunológico e o tipo proliferativo, há uma relevante falta de correlação com os subtipos moleculares amplamente aceitos de câncer de mama e, alternativamente, sugere-se a classificação imuno-histoquímica convencional mais econômica (3, 88,131).

1.8 GENE *CDH1* E A E-CADERINA

O gene *CDH1*, localizado no cromossomo 16q22.1, com 16 éxons, codifica a proteína E-caderina, sendo que variantes patogênicas germinativas neste gene são altamente prevalentes em pacientes com síndrome do Câncer de Mama Lobular e do Câncer Gástrico Difuso Hereditário (CMLGDH) (*HDGLBC*; MIM# 137215), em padrão de herança autossômica dominante e penetrância incompleta. (132,133).

A mutação germinativa no gene *CDH1* possui uma incidência populacional de 5-10 / 1.000.000 nascidos vivos (134). Essa síndrome foi primeiramente confirmada em uma família Maori na Nova Zelândia em 1998 (135). Segundo Hansford S. et al., aos 80 anos, a incidência cumulativa de câncer gástrico difuso (CGD) foi 70% (95%

CI, 59%-80%) para homens e 56% (95% CI, 44%-69%) para mulheres, e o risco de câncer de mama para mulheres foi de 42% (95% CI, 23%-68%) (132). Variantes germinativas em uma outra proteína de junção aderente, alfa-catenina (*CTNNA1*), foram encontradas em uma minoria dos casos de CMLGDH (136).

1.8.1 E-caderina, Gene *CDH1* e o complexo de adesão celular

A E-caderina, proteína de adesão transmembrana cálcio-dependente, codificada pelo gene *CDH1*, atua como supressor tumoral ao inibir invasão celular, sendo que variantes relacionadas a esse gene, como mutações somáticas (Figura 7) (137) e perda da heterozigiosidade, estão associadas ao CLI e seu fenótipo descoeso (138).

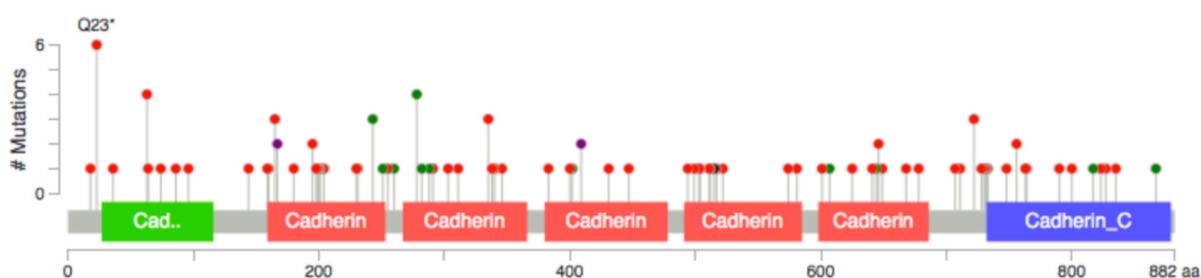


Figura 7 - Espectro de mutações somáticas através das regiões codificantes da E-caderina no banco de dados do cBioPortal. Note o pré-domínio da E-caderina em verde e o domínio citoplasmático em azul. Mutações missense em verde e nonsense em vermelho. Adaptado de (137).

As caderinas são glicoproteínas de superfície celular com funções importantes na adesão célula-célula, padronização tecidual e câncer. Caderinas clássicas, uma das cinco classes de proteínas contendo repetições de caderina, são uma classe proeminente de moléculas de adesão. Através de seus domínios extracelulares, elas interagem com caderinas de células adjacentes em um mecanismo Ca^{++} dependente, de maneira homofílica, para formar adesão célula-célula chamada junção aderente (JA). JAs maduras se formam nas regiões

apicais do epitélio polarizado, na zônula aderente (ZA). A E-caderina é um componente chave da ZA apical em epitélios de monocamada, e é considerada um mestre regulador do fenótipo epitelial, em parte devido à associação de ZA com um anel circunferencial de actina-miosina sub membrana, que estabiliza a arquitetura epitelial (138).

As caderinas clássicas contêm um domínio citoplasmático altamente conservado, que interage com proteínas que são coletivamente denominadas cateninas. As proteínas de repetição β -catenina (*CTNNB1*) ou γ -catenina se ligam ao domínio carboxi-terminal da caderina. Da mesma forma, o domínio justamembrana da caderina interage com membros da família p120-catenina (*CTNND1*) entre outros. Por meio dessas interações, as cateninas regulam a função e estabilidade da JA. Por exemplo, a β -catenina liga as caderinas à α -catenina, para promover a reorganização do citoesqueleto de actina (Figura 8) (138).

1.8.2 Expressão da E-caderina e Alterações Somáticas no *CDH1*

Variantes patogênicas somáticas no gene da E-caderina (Figura 7 - acima) e perda da heteroziguidade, estão associadas ao CLI e seu fenótipo descoeso (137, 139), cursando com perda da expressão da proteína E-caderina em cerca de 85% dos casos de CLI (Figura 9A e 9C). Apesar dessa característica em especial, cerca de 90% dos CLIs, expressam receptores de estrógeno e progesterona, assim como a maioria dos CMI-TNE, e tem baixa expressão de Ki67 (gene *MKI67*), e não expressam HER2, sendo mais propensos a pertencer ao subtipo molecular Luminal A dos cânceres de mama, com bom prognóstico (140), além de possuir subtipos moleculares, estadiamento, controle local e sobrevida semelhantes ao carcinoma ductal invasor (CDI). Portanto, são tratados com esquemas para CMI-TNE com boas respostas (60, 79, 141).

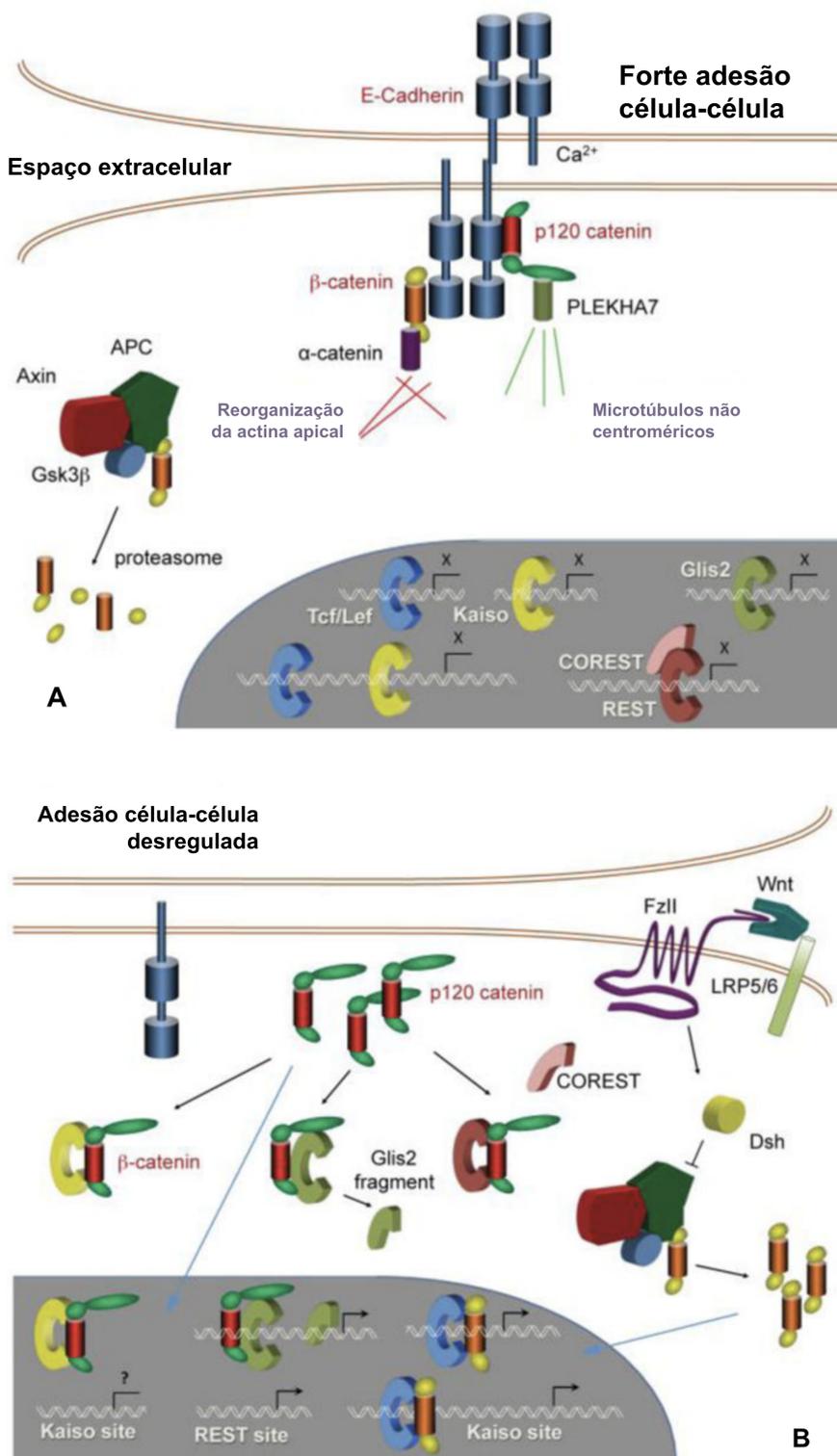


Figura 8 - Ilustração dos principais componentes do complexo de caderina-catenina em junções aderentes maduras e os eventos de sinalização nuclear mediados por cateninas. Em A, condição de forte adesão célula-célula, em que a sinalização nuclear pelas cateninas é suprimida. Em B, condição de desregulação do complexo caderina-catenina, em que β-catenin e p120 estão livres para se ligarem aos seus efetores nucleares. Adaptado de (138).

Contudo, mutações de perda de função direcionadas ao *CDH1* estão presentes em apenas 50% a 60% dos CLIs e acredita-se que sejam um evento precoce frequentemente observado em carcinoma lobular *in situ* (CLIS) sincrônico. As mutações de *CDH1* geralmente ocorrem em combinação com perda do cromossomo 16q homólogo, onde *CDH1* é localizado, induzindo assim a perda completa da proteína (74).

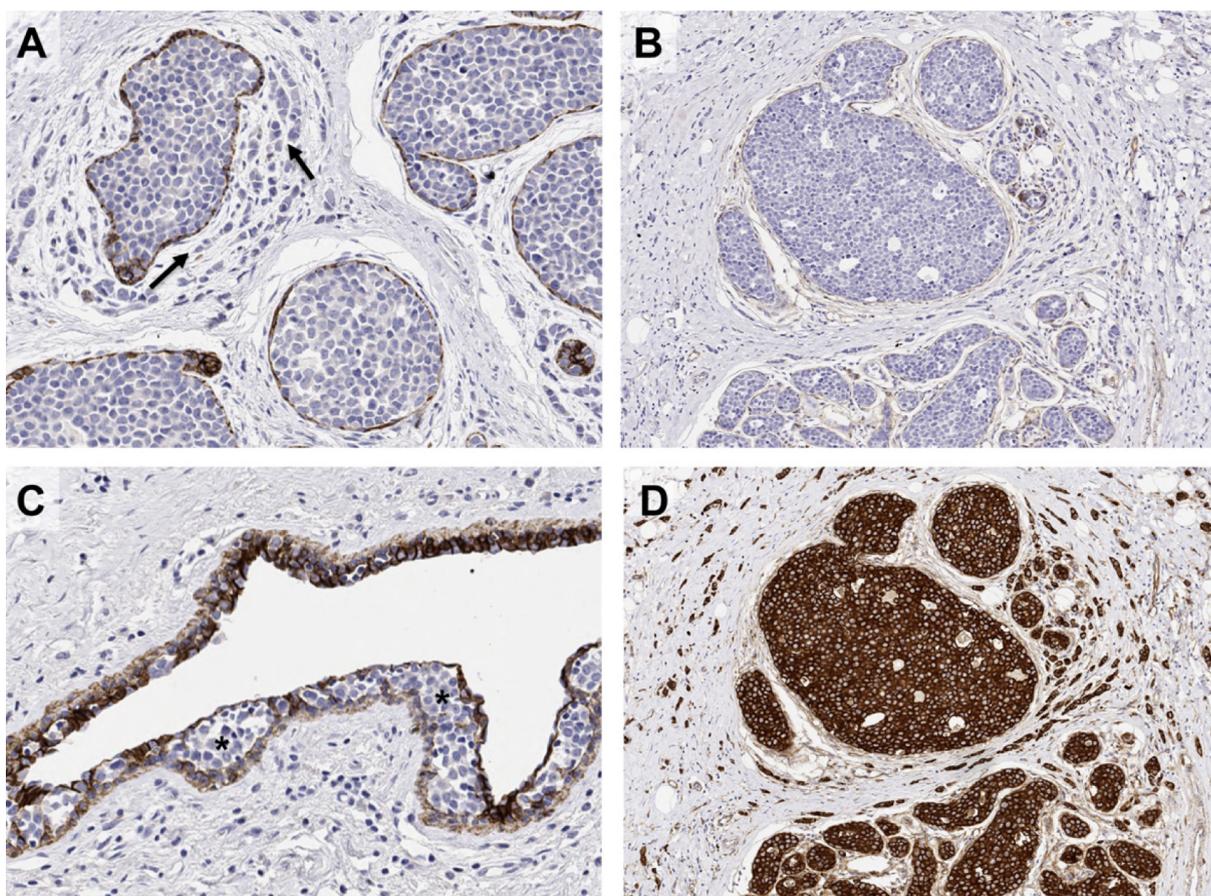


Figura 9 - Marcação de IHQ para E-caderina e demais componentes do complexo de ligação em CLIs. (A) Carcinoma lobular *in situ* (CLIS) e CLI: células neoplásicas infiltrantes (setas) distribuídas em padrão de “alvo”, envolvendo componente *in situ*. (A) E-caderina e (B) beta-catenina negativas em ambos, CLI e CLIS. (C) Disseminação pagetoide (asterisco) em que células neoplásicas de CLIS se proliferam de permeio a células luminiais e mioepiteliais de estrutura ductal normal. (D) Na ausência de expressão de E-caderina há realocação da p120-catenina para o citoplasma de células neoplásicas do CLIS e do CLI. Adaptado de (137).

Além disso, o fenótipo de descoesão e as alterações na integridade do complexo de adesão celular pode se dar também por perda em outros componentes como α -catenin, β -catenin (Figura 9B) e γ -catenin, resultando em localização citoplasmática anômala da p120-catenina, ao invés da membrana celular (Figura 9D). Em casos de difícil classificação morfológica, a análise do padrão de expressão de E-caderina, α -catenin, β -catenin e p120-catenina (Figura 9D) pode ajudar diferenciar entre CMLs de TNE de baixo grau de CLIs.(3)

Outros mecanismos podem estar relacionados a perda de expressão da molécula de adesão. Modificações epigenéticas também surgiram como uma possível causa para o comprometimento da expressão e função da E-caderina. Em particular, a hipermetilação do promotor de *CDH1* é mecanismo predominante de perda de E-caderina em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama. Apesar de dados conflitantes em CLI (74,85,86), há descrições da associação entre metilação do promotor de *CDH1* e expressão de E-caderina em 50 casos de câncer de mama ductal e suas respectivas amostras de mama normal pareadas. Foi observado que 94% dos cânceres ductais de mama tinham hipermetilação do promotor de *CDH1*. Além disso, descobriu-se que não havia expressão detectável de E-caderina em todos os casos exibindo metilação completa do promotor. Clinicamente, a associação entre metilação de *CDH1* e progressão do câncer também foi relatada (142).

Mais recentemente, mecanismos pós-translacionais, como glicosilação, têm sido implicados no nível de expressão da E-caderina. Em câncer de mama, foi demonstrado que *GCNT2* - glucosaminil (N-acetil) transferase 2 que desempenha um papel crítico na glicosilação da E-caderina e em sua função de adesão e de estabilidade na membrana celular, está relacionado a fenótipos metastáticos em ambas as linhagens de células de câncer de mama de humanos e de camundongos (142).

Portanto, molecularmente, os padrões de perda de E-caderina parecem seguir o padrão clássico da hipótese de Knudsen para os genes supressores de tumor, envolvendo mutação *CDH1* (50-60% dos casos), metilação do gene (21-77% dos casos) e/ou perda de heterozigiosidade na região de 16q22.1 ou de todo o braço cromossômico (143).

1.9 GENE *ROS1*

O gene *ROS1*, localizado no cromossomo 6q22.1, codifica uma proteína com 2.347 resíduos de aminoácidos, receptor tirosina-kinase transmembrana da família de receptores de insulina, sem ligantes ativadores conhecidos (receptor órfão) até o momento e exibe conservação evolutiva (Figura 10) (144).

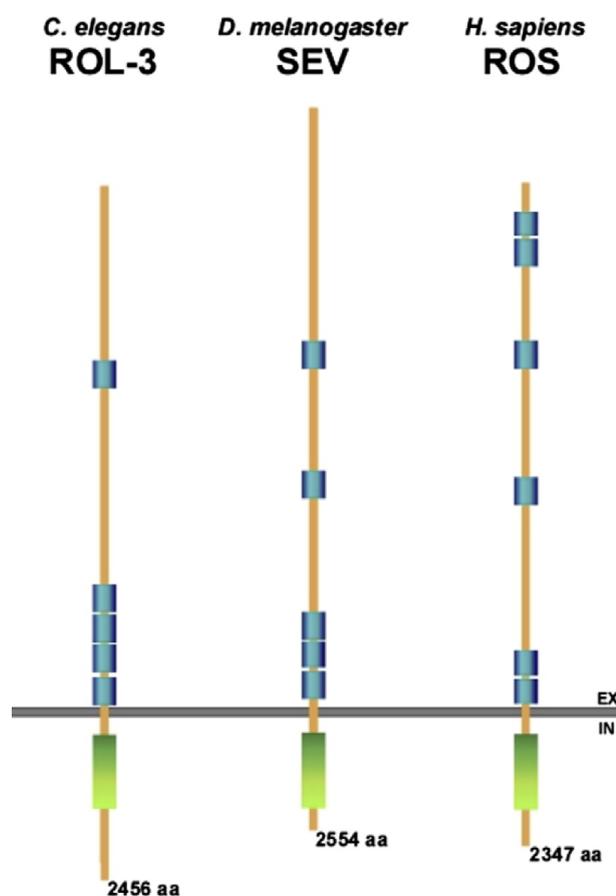


Figura 10 - Representação esquemática de ROS e seus homólogos em invertebrados. Repetições fibronectina-III-símile estão ilustradas em caixas azuis. O domínio transmembrana e o cinase em retângulos verdes. O número de aminoácidos também está indicado. Adaptado de (144).

O receptor é envolvido em processos de crescimento e de diferenciação celular. Pode ser expresso naturalmente em pulmão, rim e segmentos do epidídimo, localizado em vesículas intracitoplasmáticas, entretanto há divergências entre os

trabalhos a depender da metodologia de detecção, especialmente em relação à expressão em pulmão.

A função do ROS1 é pouco conhecida, devido não haver até o momento ligantes ativadores conhecidos. Em pesquisas da sinalização intracelular do ROS1, utilizando receptores quiméricos com domínio extracelular de receptor de fator de crescimento epitelial (EGF), moléculas das vias de regulação de proliferação e crescimento celular do PIK3/AKT e da MAPK foram ativadas (144,145,146). Seu domínio extracitoplasmático apresenta sequências encontradas em moléculas de adesão celular e em proteínas da matriz extracelular como fibronectina-III-símile (Figura 10 - acima), suscitando uma função relacionada, também, à adesão celular (147).

1.9.1 Expressão de ROS1 em Carcinomas Mamários

A literatura apresenta poucos estudos avaliando especificamente a expressão de *ROS1* em carcinomas mamários e os mesmos são conflitantes, sobretudo em se tratando de CLI. Apesar de não fazer análise específica de CLIs, Eom M. et al. em 2013 reporta análise de expressão protéica de *ROS1*, semiquantitativa, por imunistoquímica de 203 casos de CDI, utilizando microarranjos teciduais, e de expressão gênica por qPCR em tecido a fresco de 46 casos da amostra, correlacionando os achados com fatores prognósticos. Foi encontrada expressão de ROS1 em cerca de 55% dos casos, sendo significativamente menor em casos com maior grau histológico, maior contagem mitótica, menor expressão do receptor de estrogênio, gene *ESR1*, e um maior índice de proliferação de Ki-67, embora a expressão de *ROS1* não tenha sido significativamente associada à sobrevida global. O resultado do qPCR revelou tendências semelhantes, porém sem significância estatística. Sugeriu-se que a expressão de ROS1 poderia estar associada a fatores prognósticos favoráveis de CDI e sua expressão no CDI estaria relacionada com a proliferação de células tumorais (148).

Apesar de em nossa revisão não termos encontrado outros trabalhos avaliando a expressão do *ROS1* em CMIs e CLIs como fator prognóstico ou preditivo, há relato de relação entre a via de ROS1 e ação de doxorrubicina, com

retardo de crescimento celular quando camundongos modelos de câncer de mama 4T1-induzidos foram tratados com microRNA interferente (siRNA) e Dox-bound aplicados em nanopartículas, sugerindo assim que o silenciamento do gene *ROS1* poderia sensibilizar as células de câncer de mama de camundongos *in vitro* e *in vivo* à doxorrubicina como resultado do efeito sinérgico do silenciamento do gene e a ação da droga, eventualmente impedindo ativação da proteína da via de sobrevivência, AKT1 (149).

Em paralelo, recentemente, um estudo usando tecnologia de sequenciamento de próxima geração e bases de dados abertas de exoma e transcriptoma sugeriram que até 0,2% de carcinomas de mama abrigam a translocação *FIG::ROS1*, sem relatos específicos sobre CLI (150). Embora em câncer de pulmão a expressão por imuno-histoquímica tenha se mostrado um método eficaz de triagem para translocações *ROS1*, poucos estudos foram feitos para avaliar sua aplicabilidade ao câncer de mama. Portanto, investigaram o papel da triagem imunoistoquímica para *ROS1* como um marcador potencial de terapia direcionada utilizando o anticorpo *ROS1* (clone D4D6) em microarranjos teciduais. Entretanto, diferentemente do trabalho de Eom M et al. (148) nenhum dos 631 pacientes (média de idade 61 anos, 99% de mulheres) com carcinomas de mama demonstraram qualquer coloração positiva. Sugeriu-se ainda que, diferentemente de Eom et al. (2013), a expressão de *ROS1* poderia se correlacionar com outras características associadas a piores resultados clínicos, como alto índice de proliferação (150).

Há, ainda, relato da fusão *CD74::ROS1* em uma paciente com carcinoma mamário inflamatório, contudo a mesma não foi submetida a tratamento com inibidores de tirosina quinase (151). Outro relato descreve excelente ação de crizotinib seguido de ceritinib em paciente com câncer de mama RE+ e HER2- com a fusão *GOPC::ROS1*. No mesmo estudo, análise dos dados do cBioPortal também revelou amplificações de *ROS1* em vários tipos de tumor, incluindo câncer de mama e sarcomas de tecidos moles, embora a relevância dessas amplificações como biomarcadores preditivos permaneça desconhecida, sobretudo em CLIs (152).

Sob outra perspectiva, em uma subcoorte de 40 pacientes chinesas com câncer de mama HER2-positivo, submetidas a quimioterapia neoadjuvante, todas 5 pacientes com amplificação do *ROS1* por testes moleculares tiveram resposta patológica completa, mas os tumores não exibiram hiperexpressão do *ROS1* por IHQ (153).

Há ainda descrição de que a regulação positiva de quinase de adesão focal (FAK), acompanharia o surgimento de resistência à terapia com inibidores de ROS1 em cânceres de estômago e mama deficientes em *CDH1*. Inibição de FAK, seja por inibidores de FAK ou por supressão de sua expressão, resultou em maior potência de citotoxicidade do inibidor de *ROS1* em linhas celulares de câncer deficientes em *CDH1*. Na mesma linha, co-tratamento de camundongos com o inibidor de FAK e inibidores de ROS1 também mostrou efeitos sinérgicos contra tumores deficientes em *CDH1*. Sugeriu-se que inibidores de ROS1 induziriam a sinalização FAK-YAP-TRX, diminuindo danos ao DNA relacionados ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, reduzindo seus efeitos anticancerígenos. Ao passo que o inibidor de FAK suprimiria a sinalização aberrante FAK-YAP-TRX, reforçando a citotoxicidade do inibidor *ROS1* (154). Há ainda publicação de Chen Y. et al (2022), identificando a expressão de RNA de FAK, gene *PTK2*, como fator de prognóstico adverso em análise integrada de bioinformática e experimental (155).

1.10 *ROS1* E CARCINOMA LOBULAR INVASIVO

Ainda que a ativação oncogênica e expressão do receptor ROS1, fruto de rearranjos cromossômicos, tenha sido relatada em uma pequena parcela de tumores, especialmente em carcinomas não-pequenas células de pulmão, predizendo resposta terapêutica a inibidores de ROS1 (147,156,157,158,159), há escassa e conflitante literatura a respeito do ROS1 em CMI, sobretudo em CLIs.

Sem relatar a expressão de ROS1 especificamente em CLIs ou carcinomas *CDH1* deficientes, Eom et al. em 2013 descreveu que em CDIs da mama a hiperexpressão de ROS1 foi relacionada a fatores de bom prognóstico como baixo grau histológico, especialmente a baixa contagem mitótica e baixos índices de ki-67 (148). De forma equivalente, em colangiocarcinomas há descrição de que a expressão de ROS1 estaria relacionada, também, a tumores menos agressivos, bem diferenciados e a padrões morfológicos de bom prognóstico (160). Entretanto, não foram encontrados dados na literatura analisando a relação entre a expressão de ROS1 por IHQ em material tumoral humano parafinado diante da perda de

expressão da E-caderina e correlacionando com dados clínico-patológicos, em pacientes com CLI.

Por outro lado, além de publicação evidenciando regulação positiva de receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R) em linhagens celulares *CDH1-knock-out*, mostrando que a homeostase celular de tumores com perda da proteína de adesão pode assumir outras vias divergentes a do ROS1 (161,162), há descrição de regulação positiva de FAK acompanhando o surgimento de resistência à terapia com inibidores de ROS1 em cânceres de estômago e mama deficientes em *CDH1* (145).

Entretanto, trabalho não-clínico de Ilirjana Bajrami et al. (2018) relata letalidade sintética (LS) entre E-caderina deficiente e inibição da tirosina-kinase ROS1, com importante atividade antitumoral “in vitro” e “in vivo” (Figura 11) (163), utilizando inibidores da tirosino-kinase ROS1, como a droga licenciada crizotinib. Inibidores de ROS1 causaram alterações na citoquinase, levando a anormalidades mitóticas, a multinucleação e a morte celular (apoptose) (163).

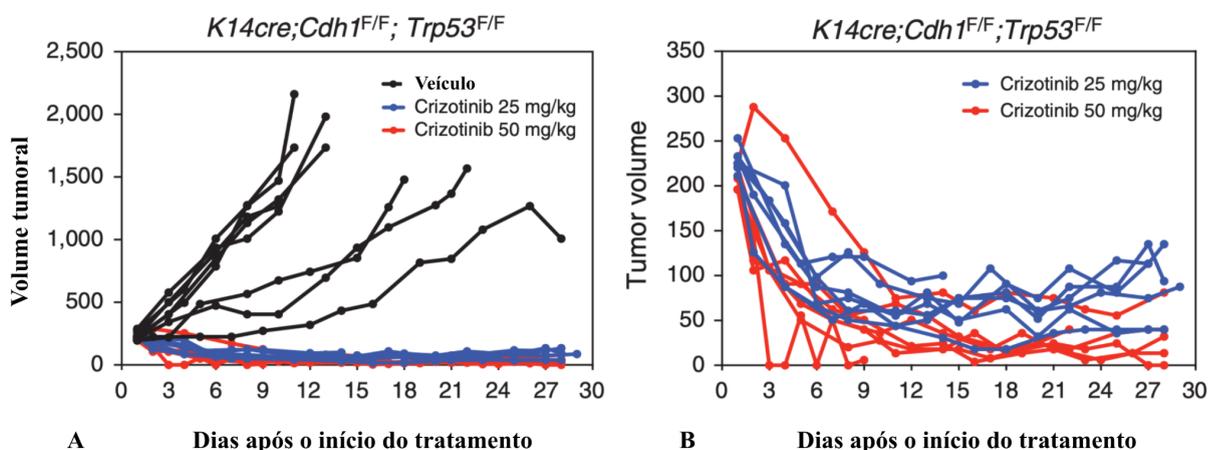


Figura 11 - Letalidade sintética de E-caderina *in vivo* em tumores de mama com deficiência de E-caderina. A. Resposta terapêutica ao tratamento com crizotinibe em camundongos KEP (*K14Cre; Cdh1^{F/F}; Trp53^{F/F}*) aloenxertos tumorais em comparação com camundongos tratados com veículo. B - Dados de A plotados para ilustrar redução do volume tumoral em ambas as coortes tratadas com crizotinibe. ANOVA $P < 0,0001$ para ambos os regimes de tratamento com crizotinibe em comparação com camundongos tratados com veículo. Adaptado de (163).

O conceito de letalidade sintética foi desenvolvido a partir de estudos genéticos em organismos modelo, como moscas-das-frutas (164) e leveduras (165). As observações iniciais feita há quase 100 anos pelo geneticista americano Calvin Bridges, de que ao cruzar moscas-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), a herança de pares de genes mutantes específicos foi letal em combinação, apesar da herança do gene mutante isolado resultar em viabilidade. Avanços no desenvolvimento contemporâneo de bibliotecas *knockout* e estudos sistemáticos de interação genética em sistemas modelo de levedura levou ao refinamento do conceito de letalidade sintética, conforme definido por letalidade em células ou organismos causada por alterações combinadas de pares de genes que são de outra forma individualmente viáveis (Figura 12) (166).

Em relação a terapia do câncer, a definição de LS desde então foi expandida para abranger a inibição farmacológica de um produto gênico com inativação do outro em células cancerígenas (167). Considerando-se que a inibição química de um produto gênico seria semelhante à perda genética de função do mesmo, pode-se pensar que o mecanismo LS tenha como alvo alterações genéticas através da modulação do produto de um segundo gene inalterado. Deve-se notar, no entanto, que o termo LS também tem sido usado na terapêutica do câncer para o direcionamento de alterações de ganho de função em células cancerígenas que não são passíveis de direcionamento direto (por exemplo, direcionamento de *KRAS* mutante ou amplificação de *CCNE1* (Cyclin E1) (168).

Nesse sentido, apesar da glicoproteína de adesão celular E-caderina (*CDH1*) estar comumente inativada em CLIs da mama, não há abordagens de medicina de precisão que explorem essa característica clinicamente, especialmente dentro do conceito de LS. Contudo, Ilirjana Bajrami et al. (2018), como parcialmente exposto acima, ao realizar rastreio de fármacos por ensaios de perturbação em células de tumor de mama com mutações *CDH1* projetadas por CRISPR/Cas9, identificou letalidade sintética (LS) entre a deficiência de E-caderina e a inibição da tirosina-quinase ROS1. Dados de triagem genética em larga escala em linhagens celulares de tumores de mama molecularmente diversas, estabeleceram que a LS entre E-caderina/ROS1 não era apenas robusta em face da considerável heterogeneidade molecular dos ensaios, mas também foi induzida por inibidores clínicos de ROS1, incluindo foretinibe e crizotinibe. A triagem de siRNA não

identificou outros alvos do crizotinibe ou foretinibe, por exemplo, *MET*, *ALK* e *KDR* como candidatos a efeitos letais sintéticos da E-caderina (163).

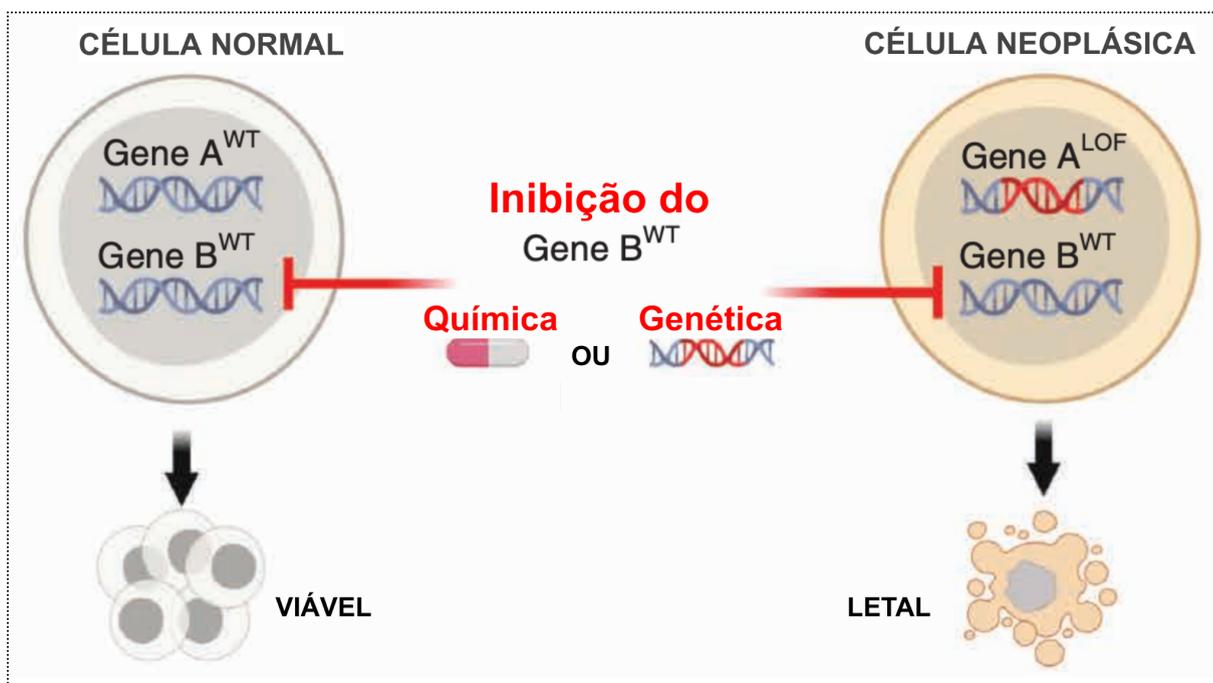


Figura 12 – Esquema explicativo de letalidade sintética. A letalidade sintética é definida pela morte celular ou orgânica causada por alterações combinadas de pares de genes que, de outra forma, são individualmente viáveis. Uma definição comumente usada e terapeuticamente relevante abrange a inibição farmacológica de um produto gênico com a inativação genética intrínseca do outro. Adaptado de (166).

Os inibidores de ROS1 induziram anormalidades mitóticas e multinucleação em células E-caderina deficientes, fenótipos associados a defeitos na citocinese, além de fosforilação e localização aberrante da p120-catenina. *In vivo*, os inibidores de ROS1 produziram efeitos antitumorais profundos em vários modelos de câncer de mama E-caderina deficiente (Figura 11 - acima) (163), de certa forma justificando a avaliação de inibidores de ROS1, como o medicamento licenciado crizotinibe, em pacientes com tumores E-caderina deficiente, adequadamente estratificados (163).

Vale ressaltar já estarem em andamento dois ensaios clínicos, com seus inerentes custos sócio-econômicos, amparados pela premissa pré-clínica de letalidade sintética resultante da inibição de ROS1 em culturas de células e tumores em roedores E-caderina deficientes (163). Um deles, ROSALINE (Figura 13A), é um estudo de neoadjuvância, fase 2, que avalia hormonioterapia em combinação com droga alvo para ROS1 (entrectinib) para CLIs, com recrutamento estimado de 65

pacientes. Teve início em setembro de 2020 e estimativa para término do estudo em julho de 2024 (169). O outro ensaio clínico, ROLo (Figura 13B), fase 2, avalia, no cenário de doença avançada, crizotinib em CLIs E-caderina negativo e RE positivo, câncer gástrico difuso, CLI triplo negativo ou tumores sólidos *CDH1*-mutados. Há um planejamento para recrutamento de 58 pacientes. Teve início em maio de 2019 e estimativa para término do estudo em julho de 2024 (170, 171).

A

U.S. National Library of Medicine
ClinicalTrials.gov

Find Studies ▾ About Studies ▾ Submit Studies ▾ Resources ▾ About Site ▾ PRS Login

Home > Search Results > Study Record Detail Save this study

Neoadjuvant Study of Targeting ROS1 in Combination With Endocrine Therapy in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast (ROSALINE)
(ROSALINE)

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04551495

Sponsor:
Jules Bordet Institute

Collaborator:
Hoffmann-La Roche

Information provided by (Responsible Party):
Jules Bordet Institute

Recruitment Status ⓘ : Recruiting
First Posted ⓘ : September 16, 2020
Last Update Posted ⓘ : April 18, 2023
See [Contacts and Locations](#)

Condition or disease ⓘ	Intervention/treatment ⓘ	Phase ⓘ
Invasive Lobular Breast Carcinoma	Drug: Entrectinib	Phase 2
ER+ Breast Cancer	Drug: Letrozole	
HER2-negative Breast Cancer	Drug: Goserelin	

B

U.S. National Library of Medicine
ClinicalTrials.gov

Find Studies ▾ About Studies ▾ Submit Studies ▾ Resources ▾ About Site ▾ PRS Login

Home > Search Results > Study Record Detail Save this study

Crizotinib in Lobular Breast, Diffuse Gastric and Triple Negative Lobular Breast Cancer or CDH1-mutated Solid Tumours (ROLo)

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03620643

Sponsor:
Royal Marsden NHS Foundation Trust

Collaborators:
Pfizer
Breast Cancer Now

Information provided by (Responsible Party):
Royal Marsden NHS Foundation Trust

Recruitment Status ⓘ : Recruiting
First Posted ⓘ : August 8, 2018
Last Update Posted ⓘ : January 6, 2023
See [Contacts and Locations](#)

Condition or disease ⓘ	Intervention/treatment ⓘ	Phase ⓘ
Lobular Breast Carcinoma	Drug: Crizotinib Oral Capsule [Xalkori]	Phase 2
Gastric Cancer	Drug: Fulvestrant 50 MG/ML Prefilled Syringe [Faslodex or generic]	
Triple Negative Breast Cancer		
CDH1 Gene Mutation		

Figura 13 - Ensaios clínicos utilizando a premissa de letalidade sintética por inibição de ROS1 em células E-caderina deficientes. (A) ROSALINE: ensaio clínico de neoadjuvância, fase 2, que avalia hormonioterapia em combinação com droga alvo para ROS1 (entrectinib) para CLIs. (B) ROLo: fase 2, cenário de doença avançada, avalia crizotinib em CLIs E-caderina negativo e RE positivo, câncer gástrico difuso, CLI triplo negativo ou tumores sólidos *CDH1*-mutados. (A) adaptado de <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04551495> e (B) adaptado de <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03620643>.

Entretanto, em revisão da literatura evidenciamos que até o momento esse é o único trabalho experimental com os achados de letalidade sintética entre ROS1 e E-caderina deficiente, em linhagens de células e murinos (163). Apesar de Ilirjana Bajrami et al. (2018) ter notado o aumento da expressão de ROS1 no contexto de perda da expressão de E-caderina, sugerindo uma resposta homeostática a perda de expressão da molécula de adesão, potencialmente suscetível a LS (163), não há descrição em humanos, por métodos experimentais ou *in silico*, da expressão de mRNA ou protéica da E-caderina correlacionada a expressão do ROS1.

Uma vez que há a possibilidade de tratamento oncológico personalizado utilizando o ROS1 como alvo terapêutico e que já se encontram em andamento ensaios clínicos baseados na premissa de LS entre ROS1 e E-caderina deficiente, analisar, em humanos, a expressão protéica e de RNA de ROS1 em CLIs torna-se de extrema relevância (154,163,169,170,171).

Um outro ponto relevante, fazendo uma análise regional, é a escassez de descrições demográficas e clínico-patológicas sobre CLIs na população brasileira, uma vez que na maioria dos trabalhos nacionais que reportam a incidência de CLIs não há detalhamento sobre esta histologia (11,12,13,15,16,17,18,19). Apenas Fabiana Makdissi et al. (2019) reporta faixas etárias, dados de estadio e de tratamento em CLIs, em um estudo de coorte retrospectivo dos arquivos de câncer do Hospital A.C.Camargo Cancer Center (14).

Em paralelo, não encontramos em nossa revisão trabalho que versasse sobre CLIs na população do Distrito Federal (DF). Uma vez que o DF apresenta o fato peculiar de sua população ser formada por pessoas de várias regiões do Brasil e também por aqueles que residiam nas terras antes pertencentes ao estado de Goiás, sua demografia se assemelha e representa dados gerais nacionais, especialmente pela constante imigração, sobretudo das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste, com menor representação das regiões norte e sul. Em 1957, segundo informações levantadas pelo censo experimental do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), havia apenas 12.283 habitantes no DF. Pouco mais de 50 anos depois, o censo de 2010 apontou 2.570.160 habitantes. Atualmente, Brasília é a quarta cidade mais populosa do Brasil com cerca de 3 milhões de habitantes, fruto de uma taxa de crescimento de aproximadamente 50% nos últimos 20 anos (172). Logo, análise de expressão de E-caderina e ROS1 por IHQ em população do DF pode refletir estimativas nacionais.

Quanto a expressão por RNA desses marcadores, o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) detém informações clínicas e de sequenciamento, além de resultados patológicos de milhares de pacientes de diferentes tipos de tumores, permitindo análises *in silico* abrangentes a um baixo custo, sem a necessidade de novos experimentos (28). O banco de dados CBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) é uma plataforma on-line abrangente para visualização e análise *in silico* de dados genômicos multidimensionais do câncer, contendo centenas de estudos de milhares de amostras de câncer, dentre eles 25 estudos em câncer de mama, vários deles ligados diretamente ao TCGA. Essa plataforma interativa possibilita explorar, visualizar e analisar dados genômicos multidimensionais do câncer. O portal concentra dados de perfil molecular de tecidos neoplásicos e linhagens celulares em eventos genéticos, epigenéticos, de expressão gênica e proteômicos, prontamente compreensíveis. A interface de consulta combinada ao armazenamento de dados personalizados permite que os pesquisadores explorem de forma interativa as alterações genéticas em amostras, genes e vias e, quando disponíveis, vinculá-los aos resultados clínicos. O portal oferece resumos gráficos de dados a nível gênico de várias plataformas, visualização e análise de interações intracelulares, análise de sobrevida, consultas centradas em pacientes específicos e acesso a programas computacionais (173).

A interface intuitiva do portal, em rede de internet, torna os perfis genômicos de câncer complexos acessíveis a pesquisadores e médicos sem a necessidade de experiência em bioinformática, facilitando assim as descobertas biológicas (174). Além disso o CBioPortal contém estudos, os quais apresentam dados de z-escore de expressão de RNA (RNA-seq v.2 RSEM), normalizados por todos os tumores, por amostras normais e / ou por amostras diploides, obtidos ou por sequenciamento de RNA (RNAseq) ou microarray, possibilitando as análises de expressão de genes de interesse de nosso trabalho como: *CDH1* (E-caderina), *ROS1*, *ESR1* (receptor de estrógeno), *MET*, *KDR*, *ALK*, *IGF1R*, *PTK2* e *MKI67* (Ki67) (175).

Portanto, a análise de expressão de ROS1 por IHQ em casos de CLIs, em população do DF, associada a avaliação *in silico* de bancos de dados internacionais para definição do padrão de expressão do ROS1 em CLIs e sua correlação com as vias de ativação nuclear relacionadas a E-caderina e aos inibidores de ROS1 podem trazer, além de informações demográficas originais de população de base brasileira, entendimentos inéditos e relevantes que, somados aos achados clínicos-patológicos

da literatura e aos dados pré-clínicos de Ilirjana Bajrami et al. (2018), orientem novas estratégias terapêuticas e estabeleçam correlações clínico-patológicas, de cunho prognóstico, específicas a expressão do ROS1 nesse subtipo histológico de tumor de mama (154,163).

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão dos principais biomarcadores relacionados a câncer de mama por imuno-histoquímica e *in silico*, incluindo ROS1, em carcinomas lobulares invasores (CLIs) da mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever características clínicas do grupo amostral.
- b) Estimar a frequência de positividade para RE, PR, HER2 e Ki67 na população diagnosticada com CLI a partir dos dados do grupo amostral
- c) Estabelecer a frequência de expressão membrano-citoplasmática da E-caderina, do ROS1, da p120-catenina e da beta-catenina por IHQ.
- d) Testar se há correlação entre a expressão dos dois marcadores (ROS1 e E-caderina).
- e) Testar possíveis correlações de dados clínico-patológicos com os resultados da E-caderina e do ROS1.
- f) Validar os achados por meio de abordagem *in silico*.
- g) Gerar hipóteses complementares a partir de análise exploratória dos dados *in silico*.

3 METODOLOGIA:

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O trabalho se constitui em um estudo com etapa transversal analítica, na qual os dados gerais clínico-patológicos foram obtidos através de arquivos físicos e digitais de um laboratório privado de anatomia patológica de Brasília e de hospital público terciário, entre os anos de 2015 e 2019. Os dados de IHQ para os anticorpos ROS1, E-caderina, p120-Catenina e beta-catenina foram extraídos de blocos de parafina provenientes de casos de CLI disponíveis em ambas as instituições. O intuito dos testes foi detectar o padrão de expressão dos marcadores, sobretudo a hiperexpressão de ROS1, molécula alvo de medicação já em uso comercial (crizotinib), em casos de CLI, ou seja, com E-caderina deficiente. A segunda etapa de validação dos achados analíticos iniciais se deu por investigação *in silico* de expressão de RNA por z-escore dos marcadores de interesse em ferramenta on-line contendo banco de dados público, seguida de descrição dos achados e correlação com os dados da primeira etapa.

3.2 AMOSTRA

O cálculo amostral foi realizado com a intenção de estabelecer o número mínimo de pacientes para cálculo de estimativas com nível de confiança de 95% e erro não superior a 12%, inicialmente para responder aos objetivos específicos “b” e “c”. Para isso, primeiramente foi necessário determinar a base populacional de cálculo, o que foi feito a partir do número de casos de câncer de mama esperados para o triênio 2023-2025 segundo estimativa do INCA (1), que é de 73.610. Sabendo que a proporção média de pacientes com CLI em estudos anteriores em população de portadores de carcinoma mamário é de aproximadamente 10% (3,60), o universo considerado para efeito de cálculo foi de 7361 pacientes, mesmo nas séries brasileiras os valores se apresentando entre 2,5 e 10,0%

(11,12,13,14,15,16,17,18,19). Considerando a distribuição heterogênea dos dados, o número amostral calculado foi de 67. O cálculo foi realizado utilizando-se a fórmula $n = Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q / E^2$, em que n é o número de indivíduos na amostra, $Z_{\alpha/2}$ é valor crítico que corresponde ao nível de confiança desejado e p é a proporção populacional de indivíduos que pertence à categoria que estamos interessados em estudar (CLI), “ q ” é a proporção populacional de indivíduos que não pertence à categoria que estamos interessados em estudar ($q = 1 - p$) e E representa o poder da amostra (42). As amostras foram de casos registrados no Distrito Federal, região cujo *background* genético da população se aproxima, qualitativamente, das demais regiões do Brasil, aumentando a robustez das estimativas inferidas.

Assim, foi encontrado um $n = 67$.

3.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Para a etapa transversal analítica foram selecionados pacientes e suas amostras de CLI da casuística de laboratório privado de anatomia patológica e de hospital público terciário, entre os anos de 2015 e 2019.

Para a etapa *in silico* foram incluídos para análise inicial os estudos do CBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) alocados dentro da aba mama (*Breast*).

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

3.4.1 Etapa Transversal Analítica

Casos obtidos dos arquivos das instituições sem registro de informações clínico-patológicas além do diagnóstico de CLI ou com histologia indefinida / conflitante.

Casos com material, blocos de parafina, já retirados dos serviços pelo paciente e que não foram devolvidos foram excluídos da análise referente aos objetivos específicos "c" a "g" .

Material com apenas um bloco para estudo foram excluídos da análise referente aos objetivos específicos "c" a "g". Os casos selecionados deveriam ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de IHQ. Sendo assim os blocos excedentes ficam resguardados para estudos futuros de necessidade dos pacientes. Os blocos estudados permanecem com material disponível para novas pesquisas.

Espécimes inadequados para estudo molecular e por IHQ foram excluídos da análise referente aos objetivos específicos "c" a "g".

3.4.2 Etapa *In Silico*

Estudos que não se tratavam especificamente de carcinomas mamários, identificados neste trabalho como "fora do escopo";

Estudos que não apresentavam divisão das amostras por tipo histológico, ao menos CDI e CLI;

Estudos com menos de 100 amostras de CLI;

Estudos que não possuíam z-escore de expressão de RNA por ao menos uma metodologia, RNAseq ou *microarray*.

3.5 DADOS CLÍNICOS PATOLÓGICOS

Os casos foram pesquisados em prontuários físicos e digitais, além de laudos histopatológicos arquivados nos setores de patologia das instituições, quanto ao diagnóstico / termo "carcinoma lobular invasor". Os casos positivos foram catalogados e dados clínico-patológicos como idade, sexo, estadiamento clínico, tipo de cirurgia, tipo histológico, grau histológico (formação tubular, grau nuclear e mitoses), invasão angiolinfática, invasão perineural, perfil imuno-histoquímico,

subtipo molecular, tratamento hormonal/quimioterápico, sobrevida livre de doença e sobrevida global, quando disponíveis, foram tabulados e analisados em comparação aos resultados da expressão do ROS1.

3.6 TESTES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Reações de IHQ: As reações de IHQ para detecção da expressão da E-caderina, do ROS1, da p120-catenina, da beta-catenina e do ALK foram realizadas pelo método automatizado DAKO Autostainer Link48 (Dako, Glostrup, Denmark), utilizando DAKO Flex Kit, recuperação antigênica através de exposição a calor controlado em solução de pH alto, utilizando PTLINK DAKO, bloqueio endógeno com peroxidase (150 microlitros - 5 minutos), incubação com anticorpos primários E-caderina (Clone NCH-38 - Anti-Human - Monoclonal Mouse - DAKO, diluição 1:100, 150 microlitros - 20 minutos)(resumo da reação no Anexo 3), ROS1 (clone D4D6 - Monoclonal Rabbit - Cellsignalling - diluição 1:250, 150 microlitros - 30 minutos) (resumo da reação no Anexo 4), p120-catenina (clone 98/PP120 - Biocare - diluição 1:200 - 150 microlitros - 30 min) (resumo da reação no Anexo 5), beta-catenina (clone β -catenin-1- DAKO - pronto-para-uso - 150 microlitros - 20 min) (resumo da reação no Anexo 6), ALK (clone 5a4, Biocare - diluição 1:100 - 150 microlitros - 30 min) (resumo da reação no Anexo 6), amplificação com LINKER (EnVision FLEX - DAKO)(150 microlitros - 15 minutos), exceto para beta-catenina, reação com polímero (EnVision Flex/HRP) (150 microlitros - 20 minutos), revelação com cromógeno (300 microlitros - 10 minutos) e contracoloração com Hematoxilina (EnVision FLEX - 300 microlitros - 5 minutos). Os controles constam na mesma lâmina/reação, sendo os “positivos” previamente determinados por imuno-histoquímica e método molecular (hibridização *in situ* por fluorescência - FISH, reação polimerase em cadeia - PCR e / ou sequenciamento de próxima geração - NGS) e os “negativos” de tecido normal presente no controle externo e na própria amostra.

As lâminas de IHQ foram analisadas pelo doutorando, médico patologista, e por patologista sênior da equipe de laboratório privado de anatomia patológica (Alesso Cervantes Sartorelli). Ambos participam e possuem certificação de

instituições de controle de qualidade nacionais (PICQ) no âmbito de patologia e possuem mais de 10 anos de atuação na área. Os casos foram analisados quanto ao padrão de expressão: membrana, citoplasma ou ambos; além da intensidade da expressão (fraca, moderada ou forte), além de anotar a proporção de células exibindo positividade, no intuito de estabelecer escore de classificação. Foram realizadas reações e avaliadas uma lâmina por marcador, por caso. Foram fotografados 3 campos em amostras selecionadas e representativas, em microscópio Leica DM100LED, utilizando câmera Leica ICC50W e programa computacional Leica Acquire versão 3.4.7 *Build* 9121. Para a classificação dos achados de IHQ foi utilizado o H-escore, metodologia de análise que soma os achados de intensidade e proporção de marcação, pontuando 1 para marcação fraca nas áreas de interesse, 2 para marcação moderada e 3 para marcação forte. Valor esse multiplicado pela proporção de células positivas, com resultado final variando de 0 a 300 (176). As análises do H-score da E-caderina, da p120-catenina e da beta-catenina foram realizadas para marcação de membrana e citoplasma separadamente.

3.7 AVALIAÇÃO MORFO-MOLECULAR

Na análise morfo-molecular o doutorando, patologista, avaliou os cortes de parafina das amostras que potencialmente iriam para extração, quantificação e análise de integridade de ácidos nucléicos (177). Em lâminas de H&E foram pesquisados sinais de autólise como retração tecidual, retração celular, cariopícnose em massa ou bloco, capacidade tintorial, ou seja, a adequabilidade de impregnação dos tecidos, estroma, citoplasmas e núcleos pelo H&E, sobretudo em áreas identificadas como não necróticas. Foi determinado a área da amostra tecidual em “mm²”, o tamanho da áreas neoplásica, também, em “mm²”, a pureza tumoral, ou seja, a proporção de núcleos neoplásicos em referência a totalidade de núcleos na amostra ou na área indicada para macrodissecção, considerando na proporção núcleos de células estromais, inflamatórias e endoteliais(178). A macrodissecção foi indicada para amostras com proporção ou pureza tumorais menores que 30%, sendo a área de interesse destacada pelo patologista em análise por microscopia.

Em seguida, a amostra era aprovada para seguir para a etapa de extração, uma vez que tivesse mais de 5,0mm² de área tumoral, mais de 10% de pureza tumoral e fosse possível a obtenção de ao menos 3 cortes de parafina com espessura de 10µm (179).

3.8 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

A extração de ácidos nucleicos foi realizada utilizando o kit MagMAXTM FFPE DNA/RNA Ultra (Applied BiosystemsTM), seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, os cortes de parafina foram desparafinados, lavados em solução de etanol, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e passaram por digestão em solução de protease. O DNA foi ligado a *beads* magnéticas, o RNA foi coletado junto ao sobrenadante. O DNA residual foi lavado das *beads* e eluído por coleta do sobrenadante após as *beads* serem atraídas pela placa magnética. O mesmo se repetiu para o sobrenadante de RNA para a eluição do mesmo, após tratamento com DNase.

A eletroforese automatizada foi realizada pelo sistema Agilent 4150 TapeStation, plataforma automatizada, composta por 3 elementos: [1] sistema 4150 TapeStation *Nucleic Acid* (G2965AA), [2] DNA ou RNA *ScreenTape*, com tampão de amostra de DNA ou RNA *ScreenTape* e DNA ou RNA *ScreenTape Ladder* (5067-5578) e [3] Pacotes de software Agilent (2200 TapeStation *Controller Software* e TapeStation *Analysis Software*). O ensaio *Genomic DNA ScreenTape* é projetado para avaliar a integridade de amostras de DNA genômico e analisar moléculas de DNA de fita dupla de 200 a mais de 60.000 pares de bases. Já o sistema RNA *ScreenTape* é projetado para analisar moléculas de RNA eucariotas e procariotas de 50 – 6000 nt (nucleotídeos). Em resumo, 1µl de DNA ou RNA da amostra foram diluídos em solução tampão de DNA ou RNA fornecidos pelo fabricante (Dako), passaram por agitação em vórtex, foram acondicionados no instrumento, juntamente com ponteiras e a *ScreenTape* e o mesmo realizou de forma automatizada as pipetagens, as análises de quantificação (ng/µl) e de número de integridade de DNA (DIN) e de número de integridade de RNA (RIN) das amostras, em conjunto com o pacote de programas computacionais listados. Os dados de concentração e

integridade foram visualizados e tratados em tela, a qual foi registrada ilustrando colunas de eletroforese, concentrações, números de integridade e curvas de detecção, para os casos analisados. Casos com concentração menor que 5,0ng/µl, DIN menor que 1,0 e RIN menor que 1,0 foram excluídos de todas as análises moleculares.

3.9 ANÁLISE DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Reações de FISH foram preparados reagentes do *Histology Kit* Dako. Foram acondicionados 50ml da solução de pré-tratamento, combinando 2,5ml de Dako solução de pré-tratamento 20x e 47,5ml de água destilada. Foram preparados 500 ml de tampão de lavagem Dako (*Wash Buffer*) combinando 25ml de tampão de lavagem 20x (*Wash Buffer*) Dako com 475 ml de água destilada. As amostras foram desparafinadas após o corte, incubando as lâminas com tecido fixado em formol e embebido em parafina (FFPE) a 80° durante 30/40 minutos em estufa, simultaneamente ao aquecimento da solução de pré-tratamento em PT Link a 85°C. Completou-se a desparafinação das amostras passando por bateria de xilol-álcool a 85°C: (4x) Xilol – 2 min cada, (4x) Álcool 99% - 1 min cada, encerrando a etapa com banho em tampão de lavagem por 3 min. O pré-tratamento ocorreu em PT Link, programado a temperatura de *preheat* para 85°C, o tempo de recuperação para 20 minutos e a temperatura de recuperação para 98°C. As lâminas resfriaram em temperatura ambiente por 10 min. Foram lavadas por duas vezes com tampão limpo, em *wash buffer* por 3 minutos cada lavagem. Para a digestão enzimática com Pepsina as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem, escoou-se o excesso e secas no contornando o corte com papel absorvente, tomando o cuidado de não deixar a amostra secar. Foram aplicados 5 a 8 gotas, ou o suficiente para cobrir a amostra, de Pepsina pronta para uso fria (frasco identificado como 2A) e incubado na placa do hibridizador a 37°C por 8 minutos ou a temperatura ambiente (20 – 25 graus) por 10 a 20 minutos. Ao fim o excesso de Pepsina foi removido das lâminas e as mesmas foram transferidas para um recipiente com tampão de lavagem fresco e troque o tampão e incube as por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em uma série graduada de álcool 99% (4 cubas)

respectivamente com incubações de 1 minuto. Deixando o tecido secar ao ar livre por 10 minutos. Foi preparada a mistura de hibridização com sonda, descongelando o frasco de IQFISH *Fast Hybridization Buffer* à temperatura ambiente. Misturou-se a solução completamente em vórtex por 15 segundos ou por pipetagem repetida. A sonda *ROS1* foi descongelada, agitada em vórtex durante 15 segundos e centrifugada brevemente em microcentrífuga. Foram utilizados 9 μL de IQFISH *Buffer* para diluir 1 μL de sonda *ROS1* para um volume final de 10 μL . Foram aplicados 10 μL da mistura de sondas sobre a amostra e cobertos com uma lamínula tomando cuidado para retirar qualquer possível bolha de ar, em seguida aplicou-se o selante. Para desnaturação e hibridização o hibridizador foi programado para temperatura de desnaturação a 80°C por 10 minutos e temperatura de hibridização de 45°C por 60 a 120 minutos. Duas tiras de controle de umidade (*Humidity Strips*) foram embebidas com água destilada e colocadas na tampa do hibridizador, em seguida as lâminas foram inseridas, fechou-se a tampa e iniciou-se o programa. Ao fim foi realizada lavagem estrigente, com 100 ml de *Dako Stringent Wash Buffer* preparada através da combinação de 5 ml de *Dako Stringent Wash Buffer 20x* e 95 ml de água destilada ou deionizada. A temperatura de *preheat* do PT Link foi ajustada para 63°C, encheu-se dois frascos com solução de estringência. Um deles foi mantido em temperatura ambiente e o outro colocado no PT Link. Iniciou-se o “Preheat 63” por aproximadamente 40 minutos. O selante das lâminas foi removido cuidadosamente e as mesmas colocadas na solução de estringência em temperatura ambiente. As lamínulas foram retiradas e as lâminas transferidas para a solução de estringência aquecida a 63°C (PT Link). As lâminas foram retiradas do tampão em 10 minutos e lavadas em *wash buffer* por 3 minutos, por duas vezes com tampão limpo. Em seguida os cortes foram desidratados em série graduada de álcool 99% (4 cubas) respectivamente com incubações de 1 minuto, secaram ao ar livre e ao abrigo da luz (10 minutos), foram pipetados 10 μL do *Dako Fluorescent Mounting Medium* sobre a amostra e cobertas imediatamente com uma lamínula. Após 15 minutos as lâminas estavam aptas para visualização em microscópio de fluorescência e foram armazenadas -20°C.

A análise das lâminas de FISH foi realizada em microscópio de dupla função, campo claro e fluorescência, Leica DM2500, utilizando câmera Leica DFC7000 T e filtros de fluorescência DAPI, FITC, CY3 e *Texas Red*. As imagens para a sonda *ROS1* foram obtidas em campos contendo células neoplásicas, identificadas pelo

doutorando, nos filtros DAPI, CY3 e *Texas Red*, avaliadas para adequabilidade de hibridização e sobrepostas para análise de translocação / rearranjo, utilizando o programa Leica LAS Core, versão 4.7.1 (*Build* 238). Campos representativos de três amostras, contendo células neoplásicas de CLI e sinais adequados para a sonda *ROS1* foram fotografados e sobrepostos para análise de rearranjo.

3.10 ANÁLISE *IN SILICO*

Para a análise *in silico* foi escolhida a ferramenta *on-line* *CBioPortal* (<http://www.cbioportal.org/>) que detém informações clínicas e de sequenciamento, além de resultados patológicos de milhares de pacientes de diferentes tipos de tumores, entre eles os do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), permitindo análises abrangentes a um baixo custo, sem a necessidade de novos experimentos (28). O banco de dados *CBioPortal* é uma plataforma *on-line* abrangente para visualização e análise *in silico* de dados genômicos multidimensionais do câncer, contendo centenas de estudos de milhares de amostras de câncer, dentre eles 25 estudos em câncer de mama, vários deles ligados diretamente ao TCGA. Essa plataforma interativa possibilita explorar, visualizar e analisar dados genômicos multidimensionais do câncer. O portal concentra dados de perfil molecular de tecidos neoplásicos e linhagens celulares em eventos genéticos, epigenéticos, de expressão gênica e proteômicos, prontamente compreensíveis (173).

A interface intuitiva do portal, em rede de internet, torna os perfis genômicos de câncer complexos acessíveis a pesquisadores e médicos sem a necessidade de experiência em bioinformática, facilitando assim as descobertas biológicas (174). Além disso o *CBioPortal* contém estudos, os quais apresentam dados de z-escore de expressão de RNA (RNA-seq v.2 RSEM), normalizados por todos os tumores, por amostras normais e / ou por amostras diploides, obtidos ou por sequenciamento de RNA (RNAseq) ou microarray, possibilitando as análises de expressão de genes de interesse de nosso trabalho como: *CDH1* (E-caderina), *ROS1*, *ESR1* (receptor de estrógeno), *MET*, *KDR*, *ALK*, *IGF1R*, *PTK2* e *MKI67* (Ki67) (175).

Foram selecionados inicialmente todos os 25 estudos referentes a câncer de mama disponíveis na plataforma. Foram excluídos da análise de expressão de RNA

os estudos que: [1] não se tratavam especificamente de carcinomas mamários, identificados neste trabalho como “fora do escopo”; [2] aqueles que não apresentavam divisão das amostras por tipo histológico, ao menos CDI e CLI; [3] estudos com menos de 100 amostras de CLI e / ou [4] os que não possuíam z-escore de expressão de RNA por ao menos uma metodologia, RNAseq ou microarray.

Para esses estudos foi anotada e avaliada a proporção de lobulares na população de cada estudo e a proporção de CLIs com mutação de *CDH1*, como estratégia para validar as populações amostrais. Para a coleta dos dados de expressão de RNA para todos os genes de interesse do trabalho (*ROS1*, *ALK*, *MET*, *KDR*, *PTK2*, *IGF1R*, *CDH1* e *ESR1*), utilizamos a ferramenta de geração de gráficos de expressão de RNA a partir de z-escores, a partir de dados de expressão provenientes de sequenciamento de RNA (RNASeq) e / ou microarray, disponíveis para cada estudo. Os gráficos foram arquivados em arquivo PowerPoint para fins de registro e conferência. Do material suplementar dos gráficos foram obtidas as tabelas de expressão de todas as amostras para cada gene, em cada um dos estudos. Dessas tabelas foram extraídos os z-escores e tabulados por amostra, por estudo, em um segundo arquivo Excel para cada um dos 4 estudos, denominados "Heatmap", os quais foram a base para os testes estatísticos de associação.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

Os princípios enunciados na Declaração de Helsinque 31 foram respeitados, mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados são identificados apenas pelo número de registro no trabalho. Os mesmos não foram submetidos a procedimentos invasivos para obtenção de amostras uma vez que as mesmas são blocos de parafina arquivados no laboratório privado de anatomia patológica e do hospital público terciário e são provenientes de procedimentos cirúrgicos prévios com indicação específica. Portanto, não houve custos para os pacientes e em casos em que surgiram foram garantidos pelo pesquisador responsável. As amostras

foram utilizadas com parcimônia, resguardando os critérios de exclusão que visam proteger a reserva de material para estudos futuros de interesse do paciente.

Foi aplicado Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), solicitando autorização para acesso ao prontuário e ao material biológico para realização da pesquisa. Salvo os casos em que não foi possível aplicar o TCLE, para os quais foi obtida autorização do CEP/FS/UnB para dispensa de aplicação do termo. Foram considerados casos sem possibilidade de aplicação do TCLE, aqueles em que o paciente não tinha registros de número de telefone ou e-mail, ou que havendo, não foi obtida resposta após três contatos (telefônicos ou e-mail) em um intervalo de 15 dias, devidamente registrados nos arquivos da pesquisa.

Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente são acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.

A proposta foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/FS-UnB) na sob número CAAE: 28419920.3.0000.0030 (Número do Parecer: 4.326.978 - ANEXO 1).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi feita por meio de cálculo de medidas de tendência central relativas. As estimativas incluíram intervalo de confiança (com nível de confiança de 95% em todos os casos) ajustado para cada número amostral (que variou conforme disponibilidade de dados para cada análise). Para análises de inferência, todos os dados de variáveis quantitativas foram testados quanto à normalidade e os testes correspondentes, paramétricos ou não, empregados. Os dados categóricos foram expressos por frequência absoluta e relativa e analisados por meio do teste χ^2 . Análise exploratória adicional foi realizada por meio de análises combinatórias de correlação para os dados *in silico*. Os valores de p adotados como significantes foram aqueles iguais ou inferiores a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídas no estudo 78 pacientes, todas do sexo feminino, resultando em 89 amostras avaliadas, sendo que dessas pacientes, 8 apresentavam lesões multifocais, bilaterais ou uma segunda amostra da mesma neoplasia em tempos distintos. Do serviço público terciário foram obtidas 53 amostras e do serviço privado 36, assim como em outros estudos, representando a diversidade de acesso da população brasileira (11,13,17).

Ao sistematizar os dados, analisar os prontuários e perceber que algumas amostras eram de mesmas pacientes, representando lesões multifocais, bilaterais ou o mesmo tumor em tempo distinto, utilizamos grupos diferentes para as análises. Em relação a dados demográficos e estimativas de expressão de RE, RP, HER2 e Ki67 em CLIs na população brasileira, consideramos os achados por paciente disponíveis nos arquivos. Para achados clínico-patológicos ligados diretamente a neoplasia e para os testes de qui-quadrado, descrevemos e analisamos por amostra, excluindo os tumores duplicados e o caso de CDI sincrônico, a partir dos dados disponíveis nos laudos e prontuários pesquisados.

4.1 DEMOGRAFIA E DESCRIÇÃO DE DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A idade média das pacientes foi de 59,1 anos, com mediana de 58 anos, variando de 38 a 84 anos, mostrando incidência 5 a 10 anos mais tardia que a média de CMI-TNEs de estudos de carcinoma mamário de forma geral (Tabela 1) (65). Dessas, 21 (26,8%) apresentaram neoplasia antes dos 50 anos de idade, para as quais estaria indicado rastreamento clínico e laboratorial genético de síndromes de predisposição hereditária ao câncer como a síndrome CLMGDH, assim como descrito por Blair V.R. et al (2020) (133), porém não identificamos dados relativos a esse tipo de acompanhamento nos prontuários do serviço público analisados. Isso mostra o grande potencial de evolução em medicina preventiva e no cuidado e rastreamento de síndromes de predisposição ao câncer. Em compensação, evidenciou-se,

tal qual dados da literatura, menor proporção de incidência em pacientes jovens do que acontece em CMI-TNE (11,13,17,65).

Tabela 1 - Características demográficas de todas as pacientes.

Característica	Todas as pacientes* (n / %)
Faixa etária - anos	
< 40	3 / 3,8
40 a 49	18 / 23,0
50 a 59	22 / 28,2
60 a 69	15 / 19,2
≥70	20 / 25,6
Sexo feminino	78 / 100

*n=78

Das 8 pacientes com mais de uma amostra (Quadro 3), 2 apresentavam 2 amostras pareadas de um mesmo CLI, 1 apresentava 2 amostras de recidivas em plastrão de CLI multifocal, 1 possuía 4 amostras, sendo duas amostras pareadas de dois CLIs bilaterais, 1 apresentou 2 amostras pareadas de um mesmo carcinoma túbulo-lobular invasor (CTLI), 1 apresentava duas histologias em distribuição multifocal em uma mesma mama, ou seja, um CLI e um CTLI, a penúltima exibiu 2 histologias em mamas distintas, ou seja, um CLI e na outra mama CDI e a última apresentou, também, duas histologias distintas bilateralmente, ou seja, um CLI e na mama contralateral um carcinoma misto ducto-lobular (CMDL) (Quadro 3).

Quadro 3 - Principais características das pacientes com mais de uma amostra incluídas no trabalho.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Tipo histológico	CLI	CLI	CLI	CLI	CTLI	CLI/CTLI	CLI/CDI	CLI/CMDL
Lateralidade*	Unifocal	Unifocal	Multifocal	Bilateral	Unifocal	Multifocal	Bilateral	Bilateral
Biópsia incisional / excisional	1	1	2	2	1	-	-	-
Peça Cirúrgica	1	1	-	2	1	2	2	2
Nº de amostras	2	2	2	4	2	2	2	2

*Multifocal=mesma mama; paciente 5 = duas recidivas em plastrão

Excetuando-se os casos para os quais não foram obtidos os dados nos arquivos investigados, quanto à lateralidade (Tabela 1), foram catalogadas 40

(55,5%) lesões à direita e 29 (40,2%) à esquerda, sendo que outras 3 pacientes (4,2%) apresentaram lesões bilaterais, bem próximo aos 5-19% descritos na literatura (66,67). O quadrante superior lateral foi o mais acometido, assim como em CMIs-TNE (4), cursando com 20 (34,4%) das 58 lesões avaliadas, ao passo que 18 (34,6%) de todas lesões eram multifocais, fato relevante por estar associado a maiores índices de reabordagem cirúrgica e já estar bem consolidado em CLIs, como descrito por Christgen M. et al (2016) e diversos outros autores (73,120,121,122).

Em relação ao estadiamento clínico, foram obtidos dados de apenas 17 pacientes (Tabela 1). Refletindo a dificuldade de detecção e palpação clínica dessa lesão e em linha com dados da literatura (68,69,70), apenas 10,5% tiveram sua lesão detectada em estadio cT1. Por outro lado, o estadio cT3 foi o mais frequente, representando 36,8% dos casos, seguido do cT2 com 31,5%. Ou seja, lesões maiores que 20,0 mm (78,8%) foram as mais detectadas clinicamente (Tabela 2). Em contrapartida, ao avaliar o estadio patológico definitivo o grupo pT1 passou a representar 48,6% e as lesões maiores que 20,0 mm 51,3% (Tabela 3), ainda de acordo com dados prévios que mostraram que os CLIs se apresentam um pouco maiores ao diagnóstico do que CMIs-TNE (60,123,124).

Tabela 2 - Características clínicas de todas as amostras *.

Característica	Todas as amostras (N / %)
Lateralidade	
Mama direita	40 / 55,5
Mama esquerda	29 / 40,2
Bilateral	3 / 4,2
Total	72 / 100,00
Quadrante	
QSL	20 / 34,4
QIL	4 / 6,9
QSM	3 / 5,1
QIM	2 / 3,4
RRA	6 / 10,3
UQL	11 / 18,9
UQM	2 / 3,4
UQS	7 / 12,0
UQI	3 / 5,1
Total	58 / 100,0
Estadiamento (cT)	
cT1	2 / 10,5
cT2	6 / 31,5
cT3	7 / 36,8
cT4	2 / 10,5
Total	17 / 100,0

**n=disponibilidade de dados para cada um dos achados

Margens cirúrgicas positivas na primeira abordagem foram evidenciadas em 21,7% das amostras analisadas (Tabela 3), valor de certa forma explicável pelo padrão de infiltração típico dos CLIs, cursando com elevada proporção de lesões de difícil palpação e delimitação, além da multifocalidade da lesão também descrita em nossa população em 18 pacientes (34,6%), algo que pode interferir em sua identificação e excisão no ato cirúrgico (73,120,121,122).

A pesquisa de metástase em linfonodo sentinela foi realizada em 25 casos, sendo positiva em 20% deles, todos pT2 ou pT3. Nos esvaziamentos axilares foram avaliados uma média de 10,59 linfonodos, sendo em média 3,44 comprometidos, com até 23 linfonodos comprometidos em um único esvaziamento. Esse padrão extenso e curioso de acometimento linfonodal em uma proporção das pacientes com CLI já havia sido descrito por outros autores, como Viale G. et al. (2009) (122). Dos 10 casos avaliados quanto extravasamento extranodal, 50% exibiu essa característica. Informação ainda não reportada em CLIs especificamente para CLIs na literatura que levantamos.

Considerando o estadiamento linfonodal patológico final (linfonodo sentinela em conjunto com a análise do esvaziamento axilar), 68,7% não apresentaram doença axilar clinicamente significativa, índice cerca de 10 a 15% maior que o encontrado por Loibl S. et al (2014) e Kwast A.B.G et al (2012), com 21,8% exibindo pequena carga de doença nodal e apenas 3 pacientes (9,3%) exibiram o padrão peculiar de alguns CLIs de metástase difusa para praticamente todos os linfonodos de cadeias axilares (Tabela 3) (122,123,124). Informação que veio em sintonia com os 19,6% de invasão angiolinfática, visto que 31,3% das pacientes apresentavam acometimento da axila clinicamente significativo, muito provavelmente, fruto da invasão linfática no sítio tumoral.

Quanto ao grau histológico (Tabela 3) nossa população também representa as previamente descritas (106,120) com lesões grau 1 e grau 2 representando 95,6% dos casos e aquelas grau 3 meramente 4,6%, coincidentes com casos de CLP. Assim como para os subtipos de CLI (108,109,110), o padrão clássico representou 77,3% dos casos, seguido pelo CLIS (12,0%) e pelo CLP (6,6%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características patológicas em todas as amostras*.

Característica	Todas as amostras (N / %)
Grau histológico (n/%)	
G1	27 / 39,1
G2	39 / 56,5
G3	3 / 4,3
Total	69 / 100,0
Tipo Histológico (n/%)	
CLI	58 / 77,3
CTLI	2 / 2,6
CMDL	1 / 1,3
CLIS	9 / 12,0
Pleomórfico	5 / 6,6
Total	75 / 100,0
Invasão linfática (n/%)	
Presente	41 / 78,8
Ausente	11 / 26,8
Total	52 / 100,0
Margem (n/%)	
Positiva	10 / 21,7
Negativa	36 / 78,2
Total	46 / 100,0
Linfonodos regionais (n/%)	
Negativos	12 / 63,1
Positivos (inclui N0i+)*	7 / 36,8
Total	19 / 100,0

*n=disponibilidade de dados para cada um dos achados; N0i+:células tumorais isoladas

Ao avaliarmos o estadió AJCC (7^a edição), visto que a grande maioria dos casos da coorte antecedem a implementação da 8^a edição nas rotinas dos serviços analisados, 67,3% das 43 pacientes com esses dados disponíveis se apresentaram com até estadió precoce IIB, contudo 18,5% cursaram com estadió III, ou seja localmente avançado, e 13,9% com doença à distância (estadió IV), sobretudo com metástases para sítios não convencionais como estômago e jejuno, além de medula óssea, fígado e linfonodos. Esse padrão de disseminação sistêmica para órgãos pouco convencionais tem sido previamente relatado por diversos autores (3, 121, 124, 130).

Foram obtidos dados de neoadjuvância para 13 lesões, sendo que para apenas 9 foi possível comparar com o estadió clínico inicial. Dessas, 4 mantiveram o estadió inicial, apenas 3 apresentaram resposta parcial e 2 apresentaram potencial progressão da doença ou haviam tido seu estadió pré-tratamento subestimado. Nenhuma das 13 pacientes apresentou resposta completa à neoadjuvância. Apesar do pequeno número de pacientes, esses achados seguem a linha de taxas mais baixas de resposta patológica completa observadas para CLI em comparação com

CMIs-TNE em outros estudos (128,129), algo que pode favorecer a terapia hormonal neoadjuvante nesses casos.

Tabela 4 - Características de estadiamento AJCC (7ªed) de todas as amostras.

Característica	Todas as amostras (N / %)
Estadio AJCC (7ªed.) - n° (%)	
IA	17 / 39,5
IIA	7 / 16,2
IIB	5 / 11,6
IIIA	4 / 9,3
IIIB	3 / 6,9
IIIC	1 / 2,3
IV	6 / 13,9
Total	43 / 100
Estadio AJCC (7ªed.) pós-QT - n° (%)	
IA	1 / 7,7
IB	1 / 7,7
IIA	4 / 30,7
IIB	3 / 23,0
IIIA	2 / 15,4
IIIB	1 / 7,7
IIIC	1 / 7,7
Total	13 / 100,0

*n=disponibilidade de dados para cada um dos achados

4.2 ESTIMATIVAS DE EXPRESSÃO DE FATORES PREDITIVOS EM CARCINOMA LOBULAR INVASIVO

Ao reportar a expressão de RE, RP, HER2 e Ki67 em CLIs, em população brasileira, os dados desse trabalho permitem estimar que dentre as pacientes com CLIs esperam-se as frequências abaixo descritas, com seus devidos intervalos de confiança, calculados pelo número de amostras para cada uma das variáveis, pela estimativa de 7.361 casos de CLI esperados para os anos de 2023-2025 no Brasil, considerando dados do INCA de 73.610 casos de câncer de mama por ano, sendo os CLIs 10% desses casos (3, 11,12,13,14,15,16,17,18,19, 60).

O receptor de estrógeno (Tabela 5) foi expresso em 60 das 61 pacientes avaliadas, portanto estima-se que 98,3% das pacientes brasileiras com CLI venham a expressar esse marcador. A proporção de expressão estava disponível em 46 amostras, com 97,7% dos casos com mais de 10% das células expressando o RE (Figura 14A e B), em linha com descrições em CLIs, especialmente em se

considerando a última edição da classificação de tumores da OMS (2019) que se refere a expressão em, praticamente, todos os casos de CLI clássicos (3) e em maior proporção do que identificado em CMIs-TNE, que apresentam cerca de 70 a 80% de positividade para RE.

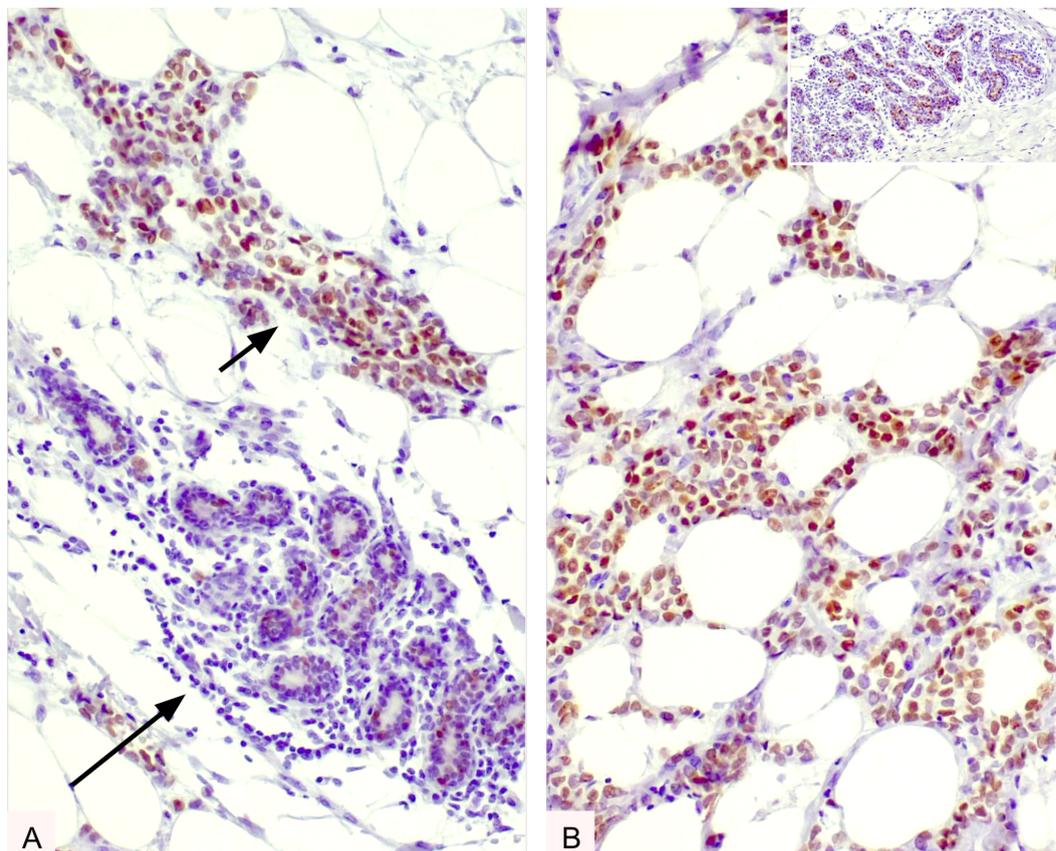


Figura 14 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do RE (receptor de estrógeno) na amostra EC22000006, mostrando RE positivo (A) em mais de 90% das células neoplásicas (seta curta), contendo de permeio ácinos normais (seta longa) com expressão de RE em pequena subpopulação de células benignas (controle interno). Controle externo positivo (mama normal), no canto superior direito - reação em mesma lâmina.

Já o receptor de progesterona (RP) foi expresso por 59 dos 64 casos avaliados (Figura 15A), sendo que estima-se que 92,1% dos casos dos casos de CLI em brasileiras venham a expressar esse marcador, com 79,0% dos casos expressando em mais de 30% das células neoplásicas, até um pouco acima do que vem sendo descrito na literatura, algo em torno de 60 a 70% (Tabela 5) (65,66).

Dos 65 casos catalogados para HER2, apenas 1, classificado como CLI clássico, apresentava registro de hiperexpressão (Tabela 5). Escore 1 foi identificado em 6 casos (10,5%) e escore 0 na grande maioria dos casos (87,7%) (Figura 15B).

Resultado duvidoso (escore 2) foi identificado em 1 caso, CLI clássico, sem registro de pesquisa de amplificação por FISH.

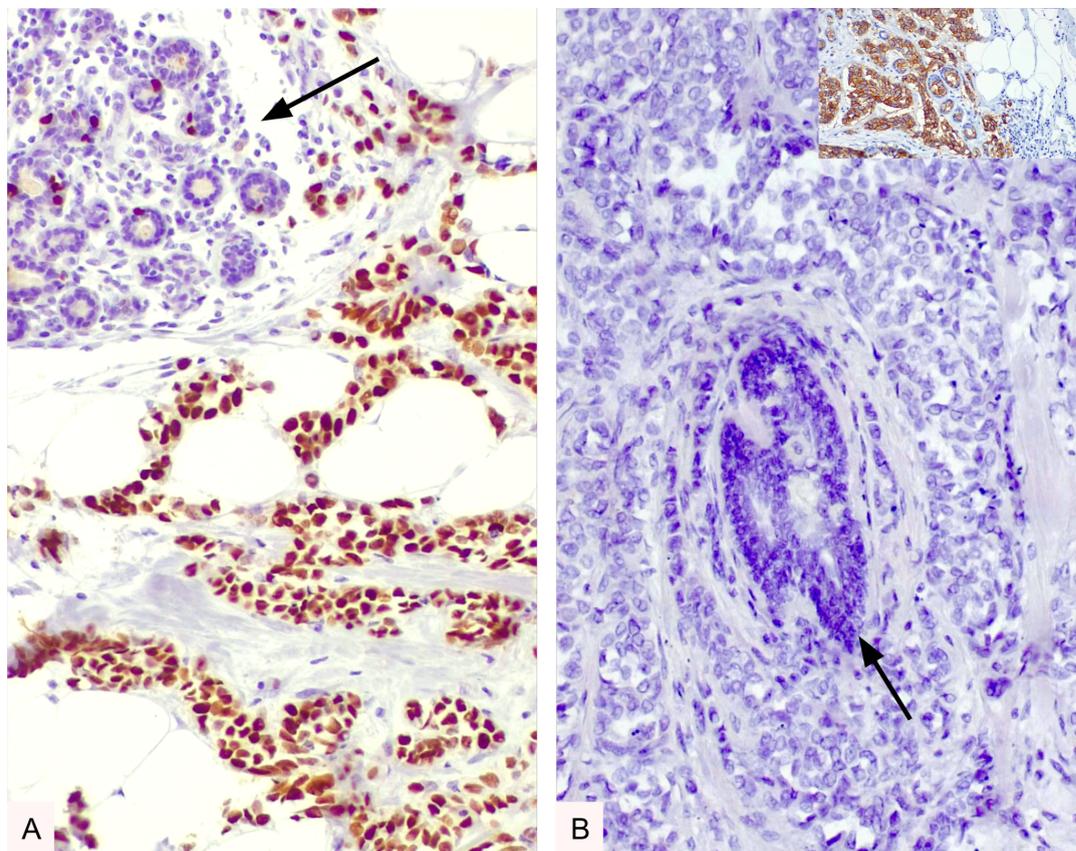


Figura 15 - A - Fotomicrografia de marcação por IHQ do RP (receptor de progesterona) na amostra EC22000006, mostrando RP positivo (A) em mais de 90% das células neoplásicas, contendo de permeio lóbulo mamário normal (seta) com expressão de RP em pequena subpopulação de células ductais benignas, assim como esperado (controle interno). B - Fotomicrografia de marcação por IHQ do HER2 na amostra EC22000006, mostrando HER2 escore 0 nas células neoplásicas, contendo de permeio ducto mamário normal (seta) também sem evidências de expressão, assim como esperado (controle interno negativo). Nota no canto superior direito da imagem controle positivo de caso sabidamente HER2 hiperexpresso - reação em mesma lâmina.

Portanto, estima-se que 98,4% das pacientes brasileiras a desenvolverem CLI entre os anos de 2023-2025 venham a apresentar ausência de hiperexpressão de HER2 em seus tumores. Esses dados se assemelham aos de publicações prévias que relatam raros casos hiperexpressos ou amplificados (65,66,81,116). Contudo, nenhum dos nossos casos de CLP hiperexpressou HER2, em oposição a dados da literatura que referem até 20 a 30% de hiperexpressão nesse subtipo (3,81,82,116).

O índice de proliferação celular pelo Ki67 apresentou média de expressão de 16,2% (mediana de 15%), com 78,5% das amostras expressando o marcador em até 20% das células neoplásicas (Tabela 5) (Figura 16).

Tabela 5 - Características imuno-histoquímicas e estimativas de expressão das pacientes com CLLs*.

Característica	Pacientes N /% (IC)
Receptor de estrógeno - nº (%)	
Positivo	60 / 98,3 (85,8-100,0)
Negativo	1 / 1,6 (0,01-14,1)
Total	61 / 100
Receptor de estrógeno - nº (%)	
Negativo (<1%)	1 / 2,1 (0,01-14,4)
até 10%	0 / 0 (0,0-14,4)
entre 10 e 50%	6 / 13,0 (0,08-27,4)
> 50%	39 / 84,7 (70,3-99,1)
Total	46 / 100,0
Receptor de progesterona - nº (%)	
Positivo	59 / 92,1 (79,9-100,0)
Negativo	5 / 7,8 (0,06-20,0)
Total	64 / 100,0
Receptor de progesterona - nº (%)	
Negativo (<1%)	5 / 11,6 (0,06-26,5)
até 10%	4 / 9,3 (0,05-24,2)
entre 10 e 30%	5 / 11,6 (0,06-26,5)
> 30%	29 / 67,4 (52,5-82,3)
Total	43 / 100,0
HER2 - nº (%)	
Negativo (escores 0, 1 e 2 não amplificado)	63 / 98,4 (86,2-100,0)
Positivo (escores 3 e 2 amplificado)	1 / 1,5 (0,01-13,7)
Total	64 / 100,0
HER2 - nº (%)	
Escore 0	49 / 85,9 (73,0-98,8)
Escore 1	6 / 10,5 (0,08-23,4)
Escore 2	1 / 1,7 (0,01-14,63)
Escore 3	1 / 1,7 (0,01-14,63)
Total	57 / 100,0
Ki67 - (%)	
< 5%	6 / 10,7 (0,08-23,7)
5 a 30%	48 / 85,7 (72,7-98,7)
>30%	2 / 3,5 (0,02-16,5)
Total	56 / 100,0
Ki67 - (%)	
≤ 20%	44 / 78,5 (65,5-91,5)
>20%	12 / 21,4 (8,4-34,4)
Total	56 / 100,0

*N = disponibilidade de dados para cada um dos achados; para pacientes com múltiplas amostras foram expostos na tabela e utilizados para os cálculos resultados de receptores hormonais ao diagnóstico, o HER2 de maior escore e o maior Ki67 reportado.

Utilizando ponto de corte mais baixo, 10,7% dos casos expressou Ki67 em menos de 5,0%, podendo fruir melhor prognóstico que as demais pacientes. Assim como descrito por Carboognin L. et al. em 2017, utilizar ponto de corte de 4% para Ki67 em pacientes com CLI, ao invés dos 15% utilizados para CMI-TNE, pode prognosticar melhor esses tumores (127).

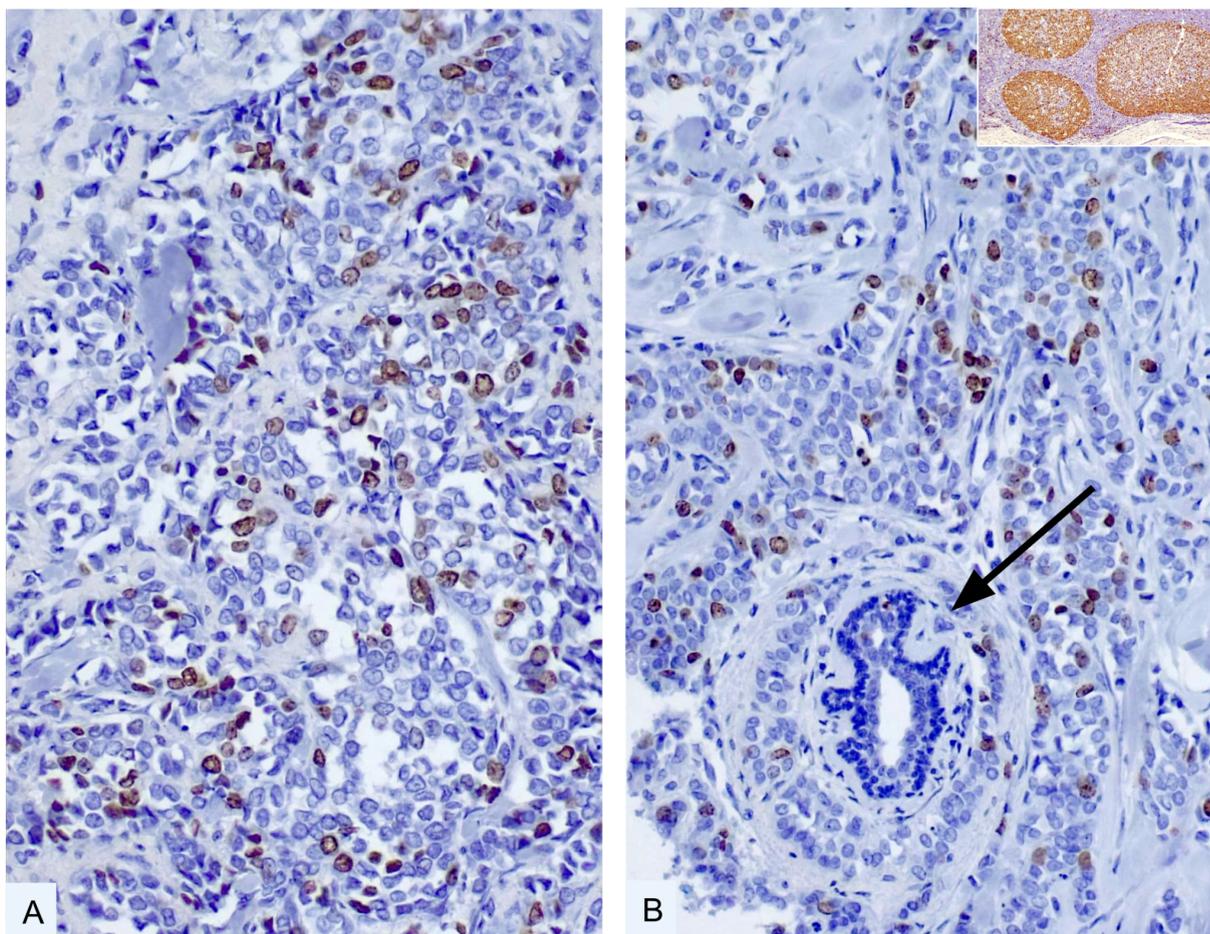


Figura 16 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do Ki67 na amostra EC22000006, mostrando Ki67 positivo em 25-30% das células neoplásicas em A e, em B, o mesmo padrão de marcação no tumor, contendo de permeio ducto normal (seta) com, praticamente, ausência de expressão de Ki67 nas células benignas (controle interno). Controle externo positivo (amigdalina), no canto superior direito - reação em mesma lâmina.

Com base em nossos dados, o número de casos de CLI com expressão de Ki67 acima de 30,0% foi estimado em 3,5% da população, condizentes com pior prognóstico, assim como sugerido pelo grupo de trabalho internacional para Ki67 em câncer de mama (IKWG)(3,180).

Portanto, os padrões de resultados imuno-histoquímicos para os marcadores RE, RP, HER2 e Ki67 da população deste estudo refletem padrões anteriormente descritos (3,65,66).

Vale ressaltar que a descrição das variáveis demográficas e de perfil clínico-patológico deste estudo ajudam a validar nosso grupo amostral como qualitativamente representativo da população de interesse, ou seja CLIs, uma vez que a validação quantitativa (n amostral) foi feita matematicamente e corrigida nos intervalos de confiança das estimativas. Assim sendo, os valores apresentados, juntamente com seus intervalos de confiança representam a primeira descrição detalhada desse subtipo de câncer mamário em brasileiras.

4.3 ANÁLISE DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E EXPLORATÓRIA

Para a realização das reações de IHQ foram coletadas 67 amostras conforme estabelecido na metodologia, com disponibilidade de bloco de parafina para a análise por IHQ, oriundas do serviço público terciário e de serviço privado.

Quanto à expressão de E-caderina, nossos dados possibilitam estimar que 90,9% de CLIs em população brasileira seriam negativos (H-score de membrana de 0 a 15) (Tabela 6), visto que dos 66 casos avaliados, 60 não exibiram expressão da molécula de adesão celular (Figura 17).

Tabela 6 - Características imuno-histoquímicas referentes à expressão das proteínas do complexo de adesão celular, em todas as amostras.

Característica	Todas as amostras* n / % (IC)
E-caderina	
Negativa	60 / 90,9 (78,9-100,0)
Positiva (H-score > 15 Membrana)	6 / 9,0 (0,08-21,1)
p120-catenina	
Negativa	13 / 19,6 (7,6-31,6)
Citoplasma - anômala	48 / 72,7 (47,4-84,7)
Membrana e citoplasma - anômala	3 / 4,5 (0,04-16,5)
beta-catenina	
Negativa	49 / 74,2 (62,2-86,2)
Citoplasma - anômala	14 / 21,2 (9,2-33,2)
Membrana e citoplasma - anômala	3 / 4,5 (0,04-16,5)

*n=66; IC= intervalo de confiança

Por outro lado, estima-se que 9,0% dos CLIs no triênio 2023-2025 no Brasil venham a expressar a E-caderina com padrão de membrana (H-escore maior que 15), uma vez que 6 dos 66 casos avaliados expressaram a proteína. Dados semelhantes aos de diversas publicações que relatam perda da expressão de E-caderina em cerca de 90% das amostras (74,117,163).

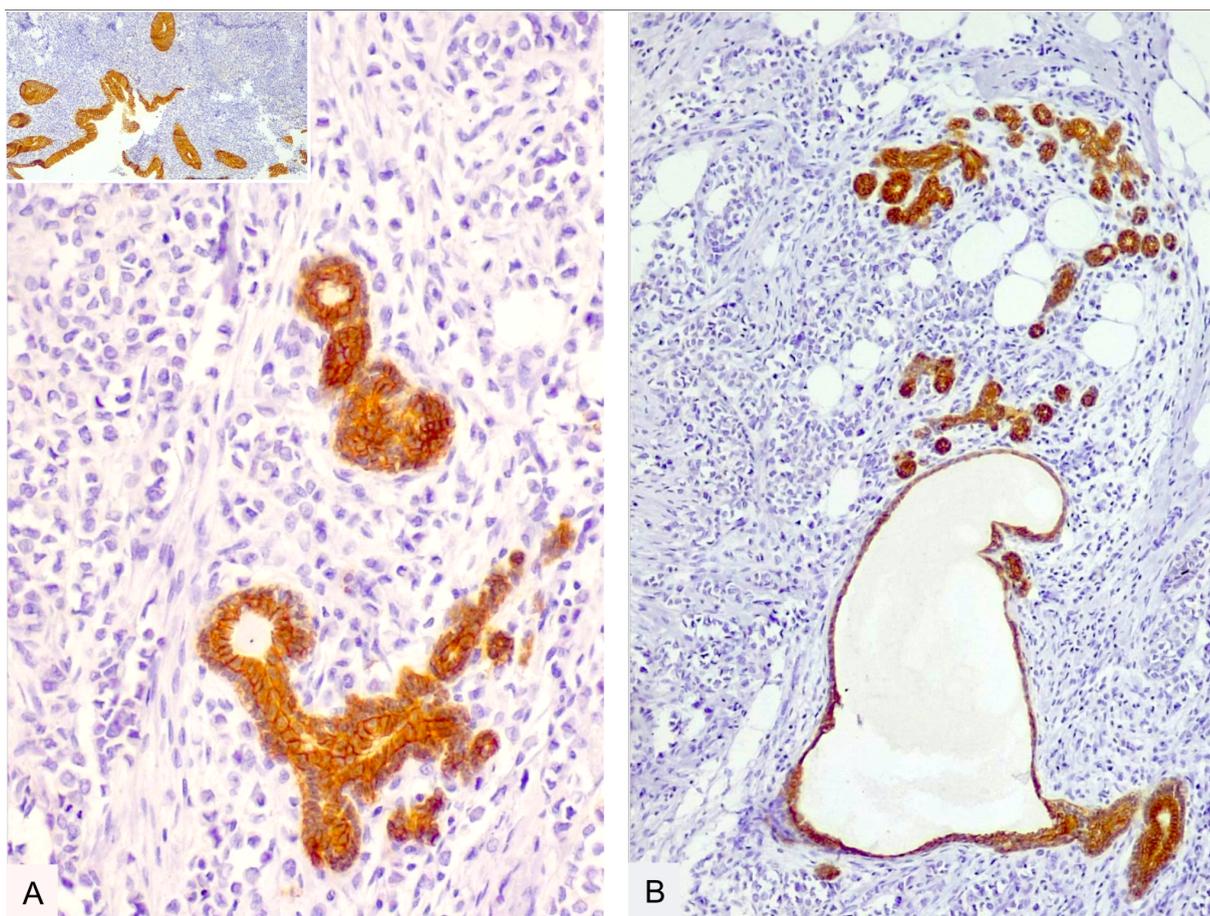


Figura 17 - Fotomicrografia de marcação por IHQ da E-caderina na amostra EC22000006, mostrando, em A e B, ausência de expressão em todas as células neoplásicas difusas pelo tecido, ao passo que ductos e lóbulos normais apresentam marcação acastanhada de membrana habitual. Controle externo positivo (mucosa de apêndice cecal), no canto superior esquerdo - reação em mesma lâmina.

Dos 6 casos positivos (9,0%) para E-caderina 3 deles apresentaram perda de expressão de membrana de p120-catenina e / ou beta-catenina (h-score de 0 a 15), sendo que os outros 3, apesar de apresentarem apenas perda de expressão parcial de membrana (H-escore variando de 20 a 180), diferente do evidenciado em tecido normal (Figura 18A), cursaram com aumento anômalo de expressão citoplasmática (H-escore variando de 140 a 280) das proteínas p120-catenina (Figura 18B),

E-caderina (Figura 18C), e / ou beta-catenina (Figura 18D), demonstrando uma perda de função e /ou perda da ancoragem do complexo de adesão celular, justificando o fenótipo de descoesão da neoplasia à análise morfológica em microscopia de campo claro pelo H&E, assim como descrito previamente em estudos de Dabbs D.J. (2007) e Rakha E.A. (2010) (117,118), além de proporcionarmos a frequência dos padrões de expressão anômala das proteínas de ancoragem citoplasmáticas esperados para os casos de CLI a serem diagnosticados no Brasil de 2023 a 2025.

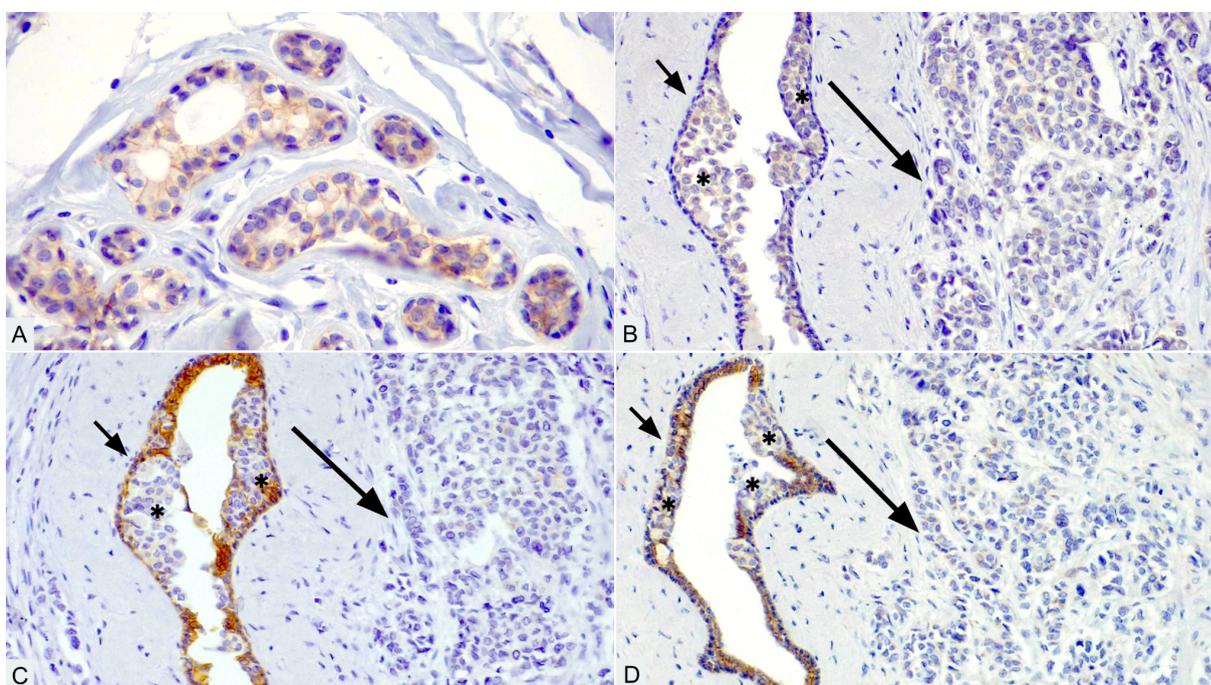


Figura 18 - Fotomicrografia de marcação por IHQ da p120-catenina em tecido normal da amostra EC22000006, mostrando expressão de padrão membrana, refletindo complexo de adesão celular funcional (A). IHQ para p120-catenina (B), E-caderina (C) e beta-catenina (D), em uma mesma área do tumor, mostrando ausência de expressão de membrana em todas as células neoplásicas infiltrantes (seta longa), ao passo que ductos e lóbulos normais (controle interno) apresentam marcação acastanhada de membrana habitual, em intensidades variáveis, contudo estão permeados por células de carcinoma lobular *in situ* (asterisco) com perda da expressão das proteínas do complexo de adesão.

O ROS1, principal biomarcador do estudo, foi expresso em apenas 3 amostras de 65 avaliadas, logo estima-se que apenas 4,6% dos CLIs a serem diagnosticados no triênio 2023-2025 no Brasil expressariam esse marcador (Tabela

7). Um dos casos expressores de ROS1 exibiu H-escore de 240 (Figuras 19 e 20), correspondente a CLP, catalogado a partir do serviço público, com bloco datado de 2015. Os dois outros casos com H-score de 15 (Figura 21) representam dois tumores distintos, CLIs clássicos, bilaterais, de uma mesma paciente, originária do serviço público, de blocos datados de 2016. Ao todo foram testadas 66 amostras para ROS1, de 53 pacientes diferentes, correspondendo a 59 CLIs distintos, uma vez que havia amostras de diversos tempos, além de tumores bilaterais, um deles CDI (H-score = 0) e multifocais em uma mesma paciente.

Tabela 7 - Padrão de expressão do ROS1 nas 65 amostras de CLI testadas por IHQ.

Característica		Todas as amostras* n / % (IC)
ROS1	Negativo (H-escore < 15)	62 / 95,4 (83,3-100,0)
	Positivo	3 / 4,6 (0,04-16,7)

*n=65; IC= intervalo de confiança

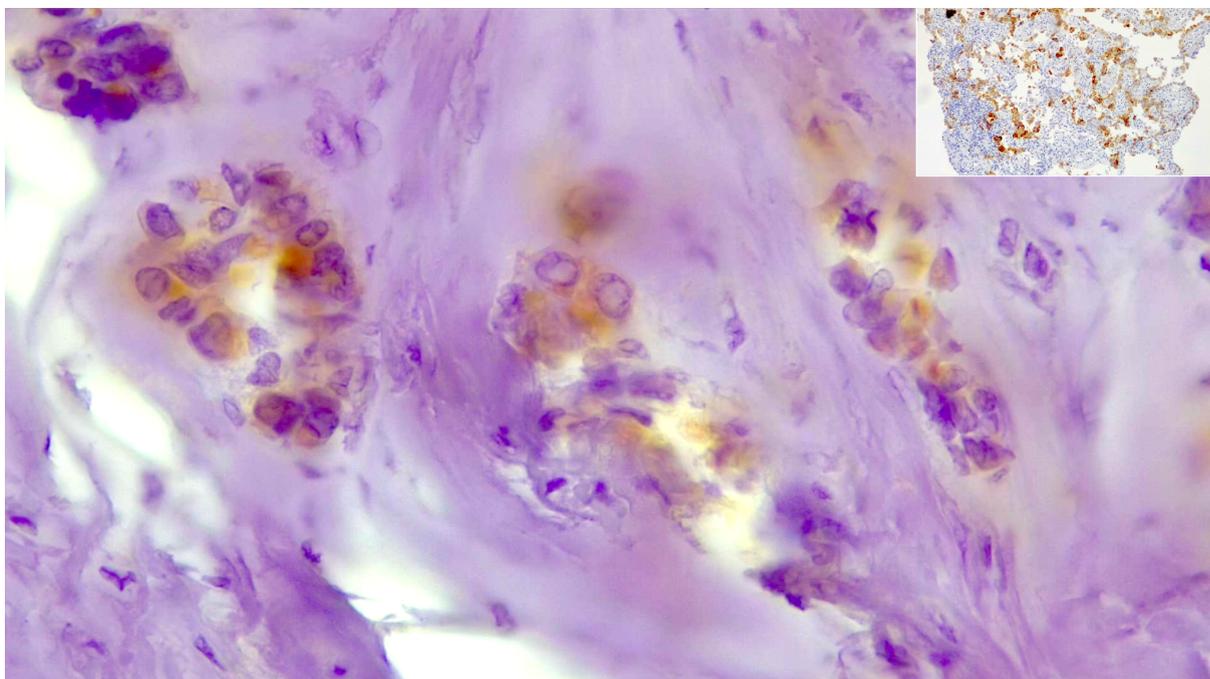


Figura 19 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do ROS1 (D4D6) na amostra EC22000006, mostrando H-escore de 240 (forte intensidade - 3 pontos; multiplicados pela proporção de 80,0% das células positivas - 80 pontos, totalizando o H-escore de 240). Canto superior direito - controle externo em mesma lâmina - adenocarcinoma de pulmão ROS1 positivo na IHQ e com fusão *SDC4::ROS1* em teste molecular (Vide documentação de validação do teste no Anexo 8).

Vale ressaltar que as duas amostras com expressão de H-escore de 15, provenientes de CLIs clássicos bilaterais da mesma paciente, representavam os mesmos tumores de biópsias por agulha ao diagnóstico, testadas conjuntamente em nosso estudo, porém sem mostrar a expressão do ROS1. Esse achado poderia ser explicado por questão de amostragem, visto que nas duas amostras positivas foi evidenciada expressão em pequena proporção de células ou, além disso, poderia indicar um estado de expressão por homeostase tumoral, não necessariamente ligado diretamente a carcinogênese ou a possibilidade de acionabilidade terapêutica.

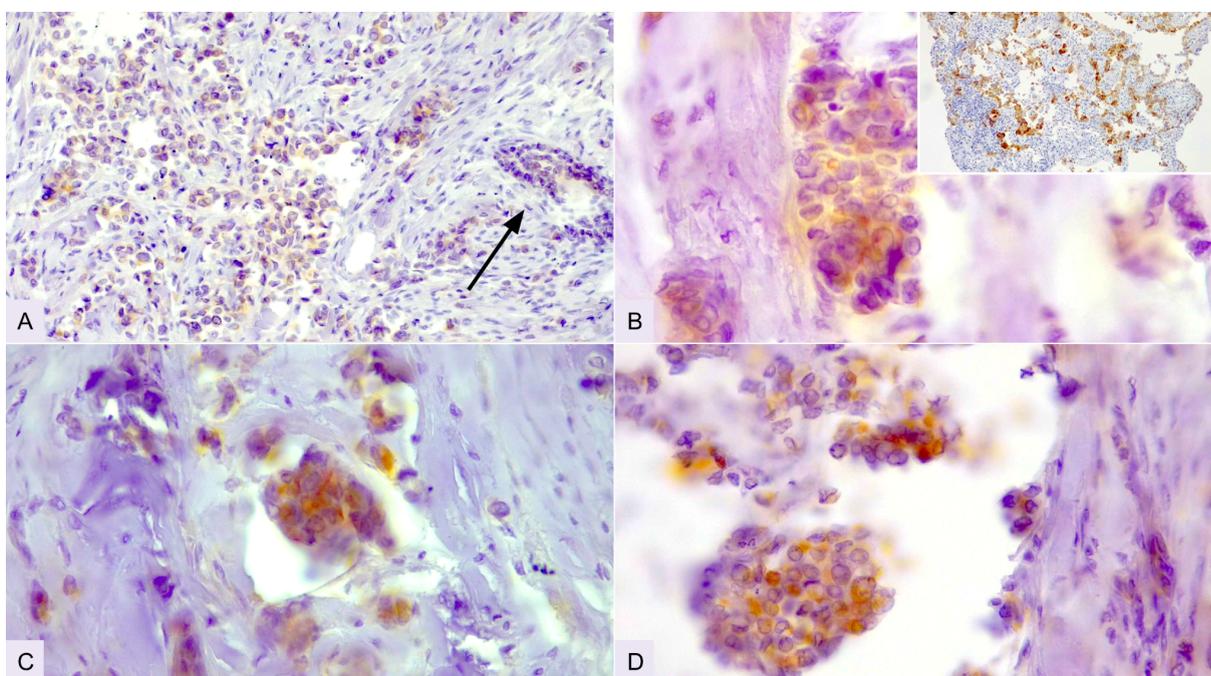


Figura 20 - Fotomicrografia de marcação por IHQ do ROS1 (D4D6) na amostra EC22000006 com H-escore de 240 em células neoplásicas do CLI, em diferentes áreas do tumor (A, 200x), (B, C e D, 400x), mostrando ausência de marcação inespecífica em colágeno ou células estromais. Em A, é possível notar ducto normal sem evidências de expressão significativa (seta) ao lado de células tumorais expressando o marcador. Canto superior direito - controle externo em mesma lâmina - adenocarcinoma de pulmão ROS1 positivo na IHQ e com fusão *SDC4::ROS1* em teste molecular (Vide documentação de validação do teste no Anexo 8).

Isto posto e considerando que estimamos apenas 4,6% de expressão de ROS1 em CLIs diagnosticados no Brasil para cada um dos anos de 2023-2025,

poderíamos discutir, ou até mesmo contestar, a aplicação de inibidores de ROS1 em ensaios clínicos, contemplando CLIs, com seus inerentes custos socioeconômicos (169,170,171), fundamentados pela premissa pré-clínica de letalidade sintética resultante da inibição de ROS1 em culturas de células e tumores em roedores E-caderina deficientes (163), sobretudo sem a estratégia de detecção de um biomarcador que pudesse selecionar as possíveis pacientes sensíveis ao tratamento.

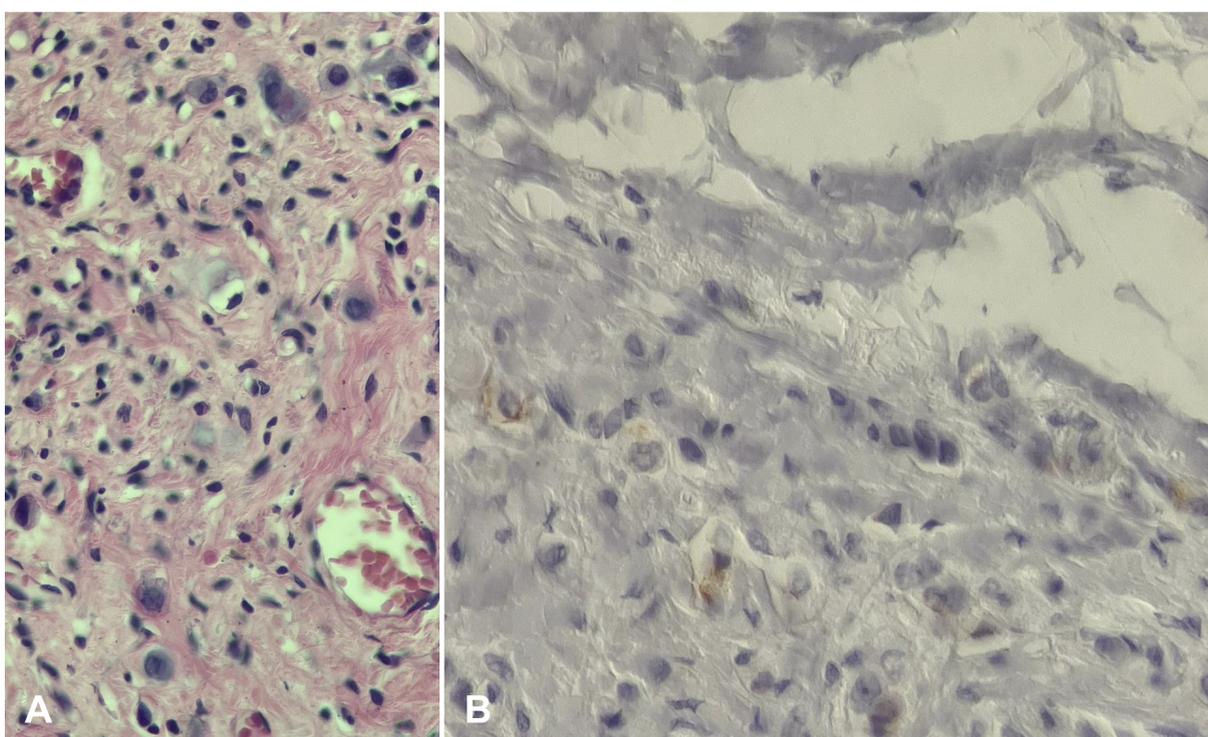


Figura 21 - (A) - Fotomicrografia de H&E (400x) de CLI - amostra EC22000020, pequeno número de células infiltrando o estroma. (B) Fotomicrografia de reação imuno-histoquímica para ROS1 (D4D6) exibindo H-score 15.

Ao enfatizarmos, na análise por pacientes, a correlação entre a expressão do ROS1 e o tipo histológico, das 2 pacientes com expressão, 1 delas apresentava dois CLIs clássicos bilaterais, representando 2,0% das 48 pacientes com CLI clássico avaliadas, e a outra um CLP (Figuras 18 e 19), representando 20% das 5 pacientes com CLP do estudo, do total de 53 pacientes avaliadas para o marcador. Tal diferença repercutiu em significância estatística ($P=0,045$), permitindo afirmar que

para as pacientes que vierem desenvolver CLI, aquelas com subtipo CLP apresentam maior probabilidade de expressar o ROS1.

Tabela 8 - Correlação entre a expressão do ROS1 por IHQ e o tipo histológico registrado nos arquivos pesquisados*.

Tipo histológico	ROS1 (n/%)		P
	Positivo	Negativo	
CLI clássico	1 / 50,0	47 / 71,2	0,045
CLP	1 / 50,0	4 / 28,7	

*n=53 amostras, todas testadas por IHQ

Apesar de para outros subtipos de CLI, sólido ou alveolar, não terem sido registradas descrições nos arquivos pesquisados, o achado com CLP traz possível implicação prognóstica desfavorável (111,119,121).

Ainda segue no mesmo sentido de Raut et al. (2015) que refere que expressão de ROS1 poderia se correlacionar com outras características associadas a piores resultados clínicos, como alto índice de proliferação (150), contudo vai de encontro ao apresentado por Eom M et al. (148) que descreve em CDIs, mas não em CLIs, a expressão de ROS1 relacionada a fatores de bom prognóstico como baixo grau histológico, especialmente a baixa contagem mitótica e baixos índices de Ki-67.

Visto que nosso grupo amostral representa qualitativamente e matematicamente o subtipo CLI de carcinomas mamários, que o recorte amostral em população do DF representa proporcionalmente a população brasileira, que encontramos raros relatos conflitantes da expressão de ROS1 em CMIs e que não identificamos publicações a esse respeito em CLIs, os dados aqui apresentados refletem a primeira descrição em humanos de expressão do ROS1 especificamente em população de CLIs, em pacientes brasileiras (11,12,13,14,15,16,17,18,19,148, 149).

Ao fazer o teste de correlação entre a expressão do ROS1 nas 65 amostras, com a perda de expressão de E-caderina, também não foi evidenciada significância estatística, uma vez que, 90,3% dos casos com perda da E-caderina foram ROS1 negativos (P=0,57) (Tabela 9). Esse achado vai de encontro ao relato pré-clínico de Bajrami I. et al. (2018) que, em cultura de células e roedores encontrou hiperexpressão compensatória de ROS1 em células tumorais E-caderina deficientes,

em contexto molecular heterogêneo, através de diversos ensaios moleculares (Figura 11 - acima) (163).

Testamos ainda a correlação entre a expressão do ROS1 e as proteínas de ancoragem citoplasmáticas, atingindo ausência de significado estatístico. Tanto para p120-catenina (P=0,39), quanto para beta-catenina (P=0,83), não encontramos associação com a expressão do ROS1, assim como esperado, por estarem diretamente vinculadas à atividade e expressão de E-caderina (Tabela 9) (137,138).

Tabela 9 - Correlação entre a expressão do ROS1 e da E-caderina, da p120-catenina e da beta-catenina*

	ROS1 (n/%)		P
	Positivo	Negativo	
E-caderina			
Positivo	0 / 0,0	6 / 9,6	0,57
Negativo	3 / 100,0	56 / 90,3	
p120-catenina			
Negativa (<H15)	0 / 0,0	19 / 30,6	0,39
Citoplasma (H>15)	3 / 100,0	38 / 61,3	
Membrana (H>15)	0 / 0,0	5 / 8,0	
beta-catenina			
Negativa (<H15)	2 / 66,6	46 / 74,2	0,83
Citoplasma (H>15)	1 / 33,3	13 / 20,9	
Membrana (H>15)	0 / 0,0	3 / 4,8	

*n=65 amostras, todas testadas por IHQ

Quanto à correlação entre a expressão de ROS1 e expressão de RE, 2 dos 3 casos expressores de ROS1 mostravam registro dos valores numéricos nos arquivos pesquisados. Apesar de ambos serem positivos, indicando fator preditivo a hormonioterapia, os dois registravam positividade em apenas 20% das células e RP positivo em 60%, sendo que o resultado do teste χ^2 dividindo todas as 50 pacientes do estudo com esses dados disponíveis em dois grupos, a expressão de receptor de estrógeno em 20% ou menos das células neoplásicas mostrou-se estatisticamente significativa (P=0,000015) (Tabela 10), sugerindo correlação entre expressão do ROS1 e menor expressão do RE. Conseqüentemente, um outro potencial elemento de pior prognóstico para CLIs expressores de ROS1 a ser, também, explorado por nossa análise *in silico*, visto que não encontramos publicações abordando esse tema em nossa revisão (3,46).

Tabela 10 - Correlação entre a expressão do ROS1 e de receptor de estrógeno*

	ROS1 (n/%)		P
	ROS1+	ROS1-	
Receptor de estrógeno			
RE>20	0 (0,0)	45 (93,7)	0,000015
RE≤20	2 (100,0)	3 (6,2)	

*referente às 50 amostras com dados quantitativos disponíveis.

Quanto às correlações clínico-patológicas, apesar dos nossos 3 casos expressores de ROS1 terem apresentado metástases linfonodais (P=0,20) e dois deles cursarem com invasões angiolímfáticas (P=0,61), essas condições não se mostraram estatisticamente significativas ao serem correlacionadas a expressão do ROS1 na totalidade da amostras (Tabela 10).

Tabela 11 - Correlação entre expressão do ROS1 e achados patológicos*.

	ROS1		P
	Positivo	Negativo	
Grau histológico (n/%)			
G1	2 / 8,0	23 / 92,0	0,56
G2	1 / 2,6	37 / 97,36	
G3	0 / 0,0	3 / 100,0	
Tipo Histológico (n/%)			
CLI	2 / 3,2	59 / 96,7	0,084
Pleomórfico	1 / 20,0	4 / 80,0	
Invasão linfática (n/%)			
Presente	2 / 4,6	41 / 95,3	0,61
Ausente	1 / 8,3	11 / 91,6	
Margem (n/%)			
Positiva	0 / 0,0	10 / 100,0	0,36
Negativa	3 / 7,7	36 / 92,3	
Linfonodos regionais (n/%)			
Positivos	3 / 20,0	12 / 80,0	0,20
Negativos	0 / 0,0	7 / 100,0	
Receptor de progesterona			
PR>20	2	37	0,44
PR≤20	0	11	
HER2			
Negativo (0/1+)	3	62	0,95
Duvidoso (2+)	0	1	
Positivo (3+)	0	1	
Estadio patológico (n/%)			
IA	0/0,0	21/100,0	0,22
IB	0/0,0	0/0,0	
IIA	0/0,0	10/100,0	
IIB	1/12,5	7/87,5	
IIIA	2/22,2	7/77,7	
IIIB	0/0,0	5/100,0	
IIIC	0/0,0	1/100,0	
IV	0/0,0	3/100,0	

*n=disponibilidade de dados para cada um dos achados

O mesmo aconteceu quando foi testada a correlação quanto ao grau histológico ($P=0,56$), *status* da margem ($P=0,36$), invasão angiolinfática ($P=0,61$), expressão de receptor de progesterona (RP) ($P=0,44$), hiperexpressão ou baixa expressão de HER2 ($P=0,95$) ou entre o padrão de expressão do ROS1 e o estadió TNM ($P=0,22$) (Tabela 11).

Não foi evidenciada, também, significância estatística entre o padrão de expressão do ROS1 com tipo histológico por amostra ($P=0,084$), (Tabela 11), confrontando nossa próprio resultado de correlação entre expressão do ROS1 e o subtipo histológico CLP ($P=0,045$), quando realizamos o cálculo por paciente. Isso mostra a potencial fragilidade da análise e possível ausência de efeito real ao que se refere à amostra, uma vez que a variável tipo histológico pode estar mais relacionada ao tumor que a paciente.

Ainda em relação a fatores prognósticos, todos os três casos expressores de ROS1 foram catalogados com Ki67 maior ou igual a 20%, sendo dois deles com Ki67 de exatos 20,0% e um deles com Ki67 de até 30,0% (Figura 16 - acima).

Utilizando valor de corte do Ki67 em 20,0%, como indicado pelo desenho de alguns ensaios clínicos para uso de inibidores de CDK4 em uso clínico (181,182), dividindo os tumores em dois grupos, aqueles com índice de proliferação celular menor que 20% e o outro grupo com casos exibindo Ki67 maior ou igual a 20%, foi possível observar significância estatística ($P=0,026$) (Tabela 12), uma vez que as 3 lesões que expressaram o ROS1 (100,0%) tiveram Ki67 maior ou igual a 20,0% e apenas 35,7% dos casos ROS1 negativos apresentaram esse índice. Esse achado se assemelha ao encontrado em revisão de Raut, A. et al. (2015) que descreve que a expressão do ROS1 em carcinomas mamários estaria relacionada a fatores de pior prognóstico, como altos índices proliferativos (150).

Tabela 12 - Correlação entre a expressão do ROS1 e do Ki67, por amostras*

	ROS1 (n/%)		P
	Positivo	Negativo	
Ki67 (5/30%)			
< 5,0%	0/0,0	6/100,0	0,78
5,0 – 30,0%	3/5,88	48/94,11	
> 30,0%	0/0,0	2/100,0	
Ki67 (20%)			
>= 20%	3/13,04	20/86,95	0,026
< 20%	0/0,0	36/100,0	

*n=59, excluindo tumores com mais de uma amostra

Em contrapartida, a proporção de 4,6% de expressão do ROS1 em CLIs encontrada em nossa análise destoa dos 55% de expressão em CDIs encontrados por Eom M. et al (2013). Poderia-se aventar que o índice de expressão desse trabalho de 2013 seja uma particularidade dos CDIs e que talvez os lobulares realmente não seriam expressores da proteína. Contudo, algumas reflexões podem ser feitas a respeito do fato. Uma delas seria a ausência de detecção de ROS1 em carcinomas mamários em 631 pacientes do estudo de Raut et al (2015), em que foi utilizado o clone ROS1 (D4D6) em microarranjos teciduais de carcinomas mamários (148,150), mesmo com repetição do teste em cortes teciduais completos para casos que exibiram qualquer potencial de marcação no microarranjo tecidual (150).

Outras ponderações seriam que nenhum dos dois estudos trabalhou especificamente com CLIs, que Eom M. et al. (2013) utilizou o clone do anticorpo ROS1 [ROS1 *antibody* - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA], enquanto que Raut et al. (2015) fez uso de outro clone ROS1 (D4D6), que o trabalho de 2015 não detalhou sua subpopulação de lobulares, até por ser apenas um resumo publicado em suplemento referente a encontro científico anual de 2014 da *Australasian Division* da Academia Internacional de Patologia (148,150) e que não encontramos outros registros sobre a expressão do ROS1 em CMIs.

Há, ainda, publicação recente de Krishnamurthy, K et al. (2022) que encontrou 4 amostras com mutações no gene *ROS1* em uma amostragem de 9 CMIs metastáticos RP negativos, provenientes de uma coorte de 22 casos, onde apenas 2 casos eram lobulares e um deles era misto ductal e lobular. Porém, é importante salientar que não foi descrita a expressão proteica de ROS1 nos casos, se algum dos lobulares foi RP negativo e / ou mutado para *ROS1* e quais foram as mutações do ROS1, ou até mesmo se alguma era fusão ou se eram patogênicas (183).

Um outro trabalho de Stein M.K et al. 2020, relatou 12 amostras de câncer de mama com mutações de significado incerto no gene *ROS1*, com potencial patogenicidade pelo programa computacional PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), contudo a maioria delas localizadas no domínio extracelular e apenas uma no domínio tirosina-quinase. Não foi testada a expressão proteica do ROS1 nesses casos e foi sugerido novas análises em larga escala para confirmação dos dados e sua potencial acionabilidade clínica (184). Logo, nosso trabalho traz a primeira descrição de expressão de ROS1 por IHQ e suas correlações clínico-patológicas em população de CLIs.

Contudo, em divergência aos nossos achados e de Raut et al. (2015), Eom et al. (2013) encontrou maior índice de proliferação pelo Ki67 relacionado a menor expressão de ROS1, ao invés da hiperexpressão. Entretanto, é relevante reforçar que apesar do estudo detectar positividade em 55,0% das 203 pacientes, focou em carcinomas ductais, não especificou achados em lobulares, utilizou outro clone do anticorpo ROS1 [ROS1 *antibody* - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA] e fez análise de IHQ do ROS1 semiquantitativa em que tumores com marcação em menos de 5,0 a 10,0% das células poderiam ser incluídos como positivos. Somado a isso, contrapõe os seus 55% de positividade a não detecção de expressão no trabalho de Raut et al. (2015) (148,150).

Destaca-se que nossos achados se interpõem entre os dessa escassa literatura levantada, uma vez que encontramos, em população brasileira, 3 amostras com expressão de ROS1 em 65 avaliadas (4,6%).

Entretanto, se em uma análise exploratória considerarmos o fato de que a expressão do ROS1 nos três casos de nosso estudo pode não significar hiperexpressão, visto que o ROS1 pode estar expresso em uma pequena proporção de tecidos normais (144,145,146), que o valor de corte 15 para o H-escore, presente em 2 das 3 amostras positivas do estudo, foi relativamente baixo, mesmo baseado nas seguintes justificativas:

- sensibilizar a detecção em amostras parafinadas antigas, uma vez que em um estudo piloto de 6 amostras de CLI não havíamos evidenciado expressão em nenhum dos casos, e;
- Bajrami I. et al. (2018) havia encontrado hiperexpressão de ROS1 em culturas de células e tumores de roedores E-caderina deficientes (163);
- tínhamos acesso às descrições conflitantes de Eom et al. (2013) (148) e Raut et al. (2015) (150);

e que em pulmão há guideline da Associação Internacional para Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC) (2016) que, por reconhecer a heterogeneidade de marcação do ROS1 na IHQ entre os estudos, entre tecidos normais e entre os tipos de fusão do gene em pulmão, favorece maior performance do rastreamento de fusões do ROS1 com marcação forte e difusa do ROS1 na IHQ e / ou H-escore de 100 a 150 (D4D6 - Cell Signaling Technology) (185) poderíamos considerar ROS1 hiperexpresso na nossa população apenas uma amostra, ou seja, a 1,49% dos nossos casos, se aproximando mais dos achados de Raut et al. (2015) (150).

Embora o ROS1 hiperexpresso possa representar um novo subgrupo de oportunidade terapêutica no câncer, salienta-se o ponto limitante de análises em subgrupos relativamente pequenos, especialmente ao considerarmos o número de casos ROS1 positivos. A significância estatística encontrada na IHQ em relação a expressão do ROS1 e do Ki67 não afasta a possibilidade deste ser um achado ao acaso ou uma mera tendência ao analisar-se grupos mais numerosos de tumores ROS1 expressos. Seria preciso uma análise de transcriptoma das três amostras expressoras de ROS1 para traçar uma possível assinatura molecular. Algo que também enfraquece a correlação encontrada entre ROS1 e Ki67 foi o fato de, ao utilizarmos os valores de corte de Ki67 sugeridos pelo (IKWG) (180), dividindo os tumores em três grupos, aqueles com Ki67 menor que 5,0%, os com índice de proliferação entre 5,0 e 30,0% e os maiores que 30,0%, não observamos significância estatística (P=0,78).

Um outro elemento que traz nebulosidade para o tema é a escassa literatura a respeito da expressão do ROS1 em carcinomas mamários, sobretudo em CLIs ao compararmos com o Ki67. Em analogia, a hiperexpressão do ROS1 em outros tumores, como pulmão, está correlacionada a rearranjos do *ROS1*, resultando em fusão a outros genes, como o *CD74* e o *SDC4*, não permitindo inferir que a hiperexpressão nessa pequena parcela dos nossos casos seria compensatória a perda de expressão da E-caderina, como encontrado por Ilirjana Bajrami et al. (2018) em culturas de células e roedores, ou se seria decorrente de algum outro evento genético específico como fusões, descritas em cerca de 0,2% dos carcinoma mamários (150), ou alterações epigenéticas, pós-transcricionais e / ou pós-translacionais como ocorre com a E-caderina (74,85,86,142).

Logo, diante da relativa discrepância entre os nossos achados e o das publicações prévias, além da potencial expressão de ROS1 decorrente de outros eventos não relacionados à homeostase em relação a perda de expressão da E-caderina, realizamos em análise exploratória a pesquisa de expressão de ALK, por IHQ, nos 3 casos positivos para ROS1, além de extração e quantificação de cortes de parafina das três amostras positivas para ROS1 no estudo de IHQ. A intenção seria avaliar de forma exploratória a expressão de possível alvo de biofármaco co-inibidor de *ROS1* e *ALK* e seguir com sequenciamento de próxima geração (NGS) de DNA e RNA, para busca de mutações de ponto, pequenas

inserções e deleções, além de fusões que pudessem explicar a expressão do ROS1 em nossas amostras.

Para análise de expressão de ALK, clone 5a4, todas as três amostras foram negativas. Contudo, após a extração, apesar da quantificação razoável de ácidos nucleicos e aceitável integridade do DNA, não obtivemos resultados de integridade satisfatórios para o RNA de duas das três amostras (Figura 22) para seguirmos com o sequenciamento de RNA e pesquisa das fusões, invalidando estatisticamente essa abordagem. Fato explicável, visto que tratam-se de blocos de parafina com inerente degradação do material genético e os mesmos ainda datam de 2015 e 2016, podendo ter sofrido processo de decaimento dos ácidos nucleicos pelo tempo, sobretudo de RNA (177).

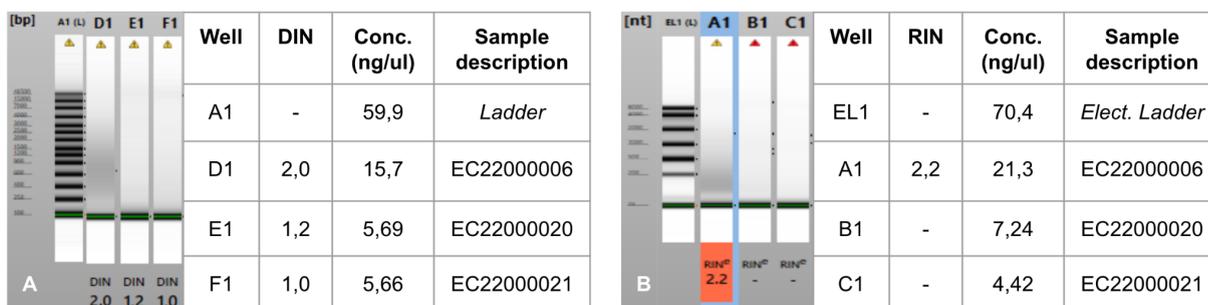


Figura 22 - Eletroforese automatizada revelando, em A, concentração de DNA acima de 5,0 ng/μl para todas as três amostras, contudo com número de integridade do DNA (DIN) abaixo da referência se aproximando do valor mínimo de detecção na escala de 1 a 10, reflexo da dispersão dos fragmentos pelas colunas de eletroforese. Em B, concentração de RNA maior que 5,0 ng/μl em apenas 2 das 3 amostras, sendo que o número de integridade do RNA (RIN) só foi gerado para uma das amostras, próximo ao limite inferior de detecção. Eletroforese automatizada pelo sistema TapeStation 4150.

Em contrapartida, apesar da baixa quantificação e integridade do DNA das três amostras, ambos foram detectáveis e optou-se por seguir com reação de hibridização por fluorescência (FISH) utilizando sonda *ROS1* de rearranjo (*break-apart*) em cortes de 5 um dos blocos de parafina dos 3 tumores com expressão do ROS1 pela IHQ. Realizou-se a pesquisa da separação dos sinais verde e vermelho das sequências 3' e 5', respectivamente, denotando eventual rearranjo e fusão de forma indireta, em 50 a 100 células, para cada amostra.

Ao realizarmos a análise do FISH não foi evidenciado rearranjo para nenhuma das três amostras, visto que os núcleos neoplásicos (Figura 23A),

apresentavam sinais verde (Figura 23B) e vermelho (Figura 23C) e os mesmos estavam co-localizados, gerando sinal único alaranjado a amarelado para cada alelo (Figuras 23D, 23E e 23F).

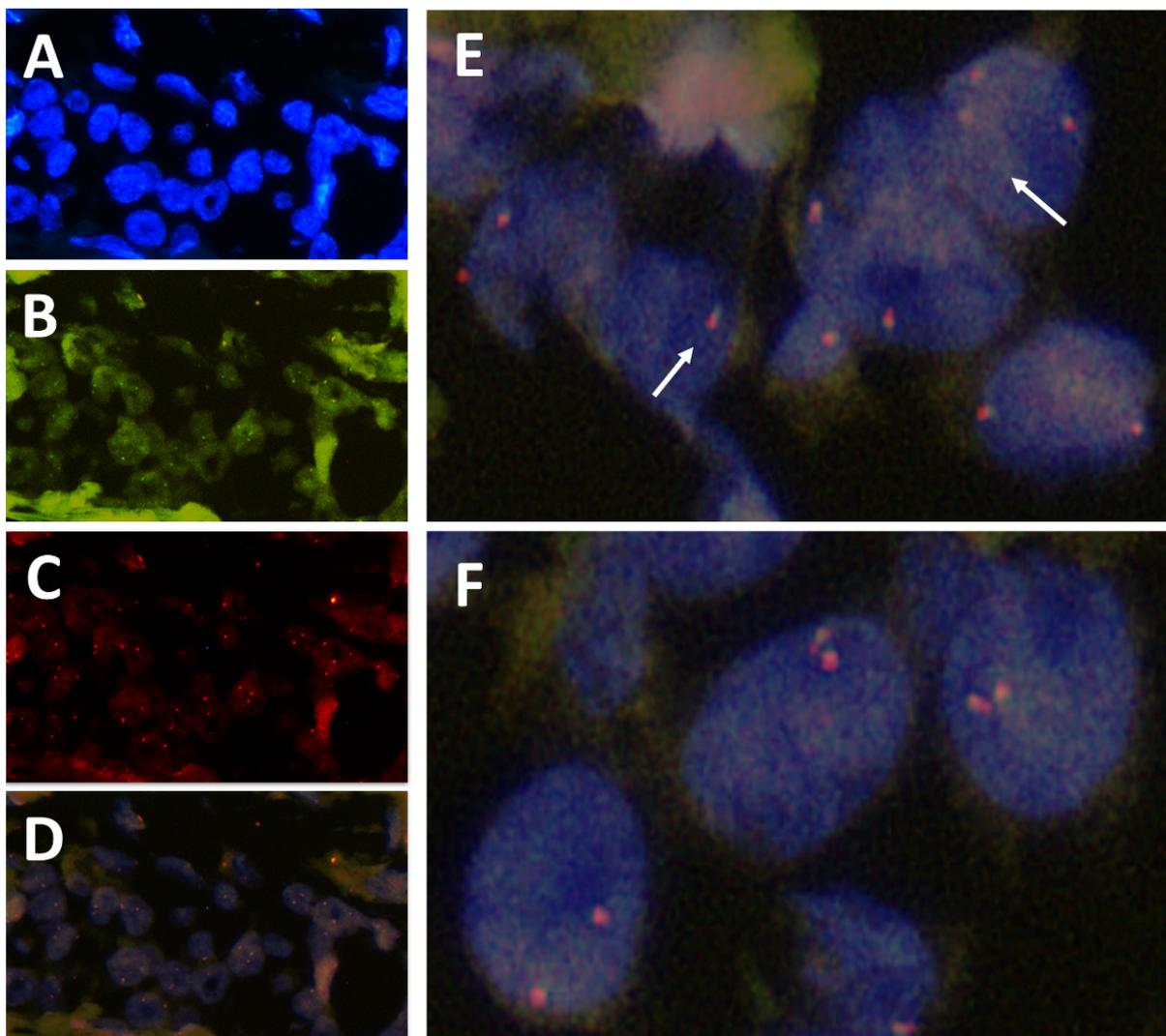


Figura 23 - Fotomicrografia de hibridização *in situ* por fluorescência com sonda *ROS1 break-apart* no caso EC22000006 (*ROS1* IHQ = H240). Área de neoplasia mostrando, em A, DAPI com núcleos em azul, em B sonda *ROS1 3'* com sinais em verde, em C sonda *ROS1 5'* com sinais em vermelho, em D imagem panorâmica, mostrando o somatório das imagens A, B e C, revelando hibridização adequada nas células e possibilitando visualizar a co-localização dos sinais verde e vermelho nas células neoplásicas, produzindo sinal alaranjado/amarelado, ou seja, ausência de rearranjo. Em E, detalhe em núcleos com apenas um sinal ou três sinais co-localizados, sugerindo alteração de número de cópias, resultado de citogenética complexa, própria das neoplasias epiteliais, apesar desse ensaio não ser desenhado para esse fim. Em F, detalhe em núcleos neoplásicos revelando a co-localização dos sinais 3' e 5' (alaranjados), denotando ausência de translocação. Sonda *break-apart* para pesquisa de rearranjos do gene *ROS1*: 3'-vermelho, 5'-verde e DAPI azul (núcleos).

Algumas células isoladas exibiam perda de um dos alelos do gene ou ganhos de um alelo, denotando as alterações citogenéticas que podem ocorrer em células epiteliais, mas que não eram o objetivo do estudo ou do desenho das sondas (Figura 23E). Logo, a probabilidade da expressão do *ROS1* nos casos do nosso estudo ser devido a rearranjo dos genes se torna uma hipótese mais remota, assim como em expressão compensatória a perda de expressão da E-caderina, como havia sido descrito em amostras não humanas por Ilirjana Bajrami et al. (2018) (163).

Outra estratégia foi comparar nossos achados com os dados de expressão de mRNA encontrados na etapa de análise *in silico* desse mesmo estudo descrito abaixo.

Considerando a já relatada escassez de dados e discrepância de estudos em relação a expressão do *ROS1* em CLIs em humanos e seus potenciais desdobramentos prognósticos e preditivos, além do fato de estarem em andamento dois ensaios clínicos baseados no conceito de letalidade sintética (169,170,171), fundamentados na homeostase entre perda de expressão de E-caderina e expressão compensatória de *ROS1* em culturas de células e em roedores, a etapa *in silico* desse projeto se mostrou ainda mais relevante. Sendo que a análise de bancos de dados de amostras de humanos previamente validadas em estudos internacionais de referência como o The Cancer Genome Atlas (TCGA) presentes no CBioportal (<http://www.cbioportal.org/>) permitiria explorar e referendar as hipóteses e dúvidas geradas pela etapa analítica deste trabalho (173,174).

4.4 ANÁLISE *IN SILICO* E EXPLORATÓRIA

Para a análise *in silico* o banco de dados CBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) foi escolhido como base para o trabalho, uma vez que é um banco de dados on-line abrangente para visualização e análise dados genômicos multidimensionais do câncer. Possui ferramentas para explorar, visualizar e analisar esses dados, concentrando aqueles de perfil molecular de tecidos neoplásicos e de expressão gênica, prontamente compreensíveis (173,174,175).

Além disso o CBioPortal contém subgrupo de estudos de câncer de mama, com subdivisão das amostras por tipo histológico, incluindo os CLIs, os quais

apresentam dados de z-escore de expressão de RNA, normalizados por todos os tumores, por amostras normais e / ou por amostras diploides, obtidos ou por sequenciamento de RNA (RNAseq) ou microarray, possibilitando as análises de expressão dos genes *CDH1*, *ROS1*, *ESR1*, *MET*, *KDR*, *ALK*, *IGF1R*, *PTK2* e *MKI67*.

Todos os 25 estudos referentes a câncer de mama disponíveis na plataforma foram selecionados para avaliarmos os critérios de exclusão (Quadro 4).

Quadro 4 - Critérios de exclusão aplicados para a relação dos 25 estudos de câncer de mama inicialmente selecionados no CBioPortal*.

Estudo	Critério de exclusão	Carcinoma mamário não classificado por subtipo histológico (lobular ou ductal)	< 100 amostras do subtipo lobular	Sem dados de expressão de mRNA	Fora do escopo
Breast Cancer (MSK, Cancer Cell 2018)				X	
Breast Cancer (MSK, Nature Cancer 2020)			X	X	
Metastatic Breast Cancer (MSK, Cancer Discovery 2022)				X	
Breast Fibroepithelial Tumors (Duke-NUS, Nat Genet 2015)		X		X	X
Breast Cancer (HTAN, 2022)		X	X	X	
Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)					
Breast Cancer (MSK, Clinical Cancer Res 2020)		X		X	
Breast Cancer (MSK, NPJ Breast Cancer 2019)		X		X	
Breast Cancer (SMC 2018)			X		
Breast Cancer Xenografts (British Columbia, Nature 2015)		X		X	X
Breast Invasive Carcinoma (British Columbia, Nature 2012)		X		X	
Breast Invasive Carcinoma (Broad, Nature 2012)			X	X	
Breast Invasive Carcinoma (Sanger, Nature 2012)			X	X	
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Cell 2015)					
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Firehose Legacy)					
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Nature 2012)		X			
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas 2018)					
Juvenile Papillomatosis and Breast Cancer (MSK, J Pathol. 2015)		X	X		X
MAPK on resist to anti-HER2 therapy for BC (MSK, Nat Com. 2022)				X	X
Metastatic Breast Cancer (INSERM, PLoS Med 2016)		X		X	
Proteogenomic landscape of breast cancer (CPTAC, Cell 2020)		X			
The Metastatic Breast Cancer Project (Archived, 2020)			X		
The Metastatic Breast Cancer Project (Provisional, December 2021)			X		
Adenoid Cystic Carcinoma of the Breast (MSK, J Pathol. 2015)			X		
Metaplastic Breast Cancer (MSK, NPJ Breast Cancer 2021)			X		

*Os estudos destacados em negrito não apresentaram critérios de exclusão e, portanto, seguiram para análise de expressão de RNA por z-escore.

Os quatro estudos selecionados para a análise de expressão de mRNA em CLIs de mama foram o METABRIC, TCGA Cell 2015, Firehose Legacy e PanCancer Atlas 2018. Assim como consta no Quadro 4, todos os quatro cumpriram os critérios de inclusão e não foram excluídos da análise.

O estudo METABRIC constitui-se de 2509 amostras, dessas 192 (7,7%) registradas como CLI da mama. Contudo, apresenta apenas dados de expressão de RNA por *microarray* relativos a todas as amostras de câncer de 146 amostras. Vale ressaltar que a menor proporção de CLIs nesse estudo vem em paralelo ao registro de 269 amostras (10,7%) de casos com histologia mista ductal e lobular (78) (Quadro 5).

O estudo TCGA Cell 2015 constitui-se de 808 amostras, dessas 127 (15,5%) registradas como CLI da mama, sendo que todas possuíam registros de z-escore da expressão de RNA por sequenciamento (RNAseq) com normalização por todas as amostras de câncer e por amostras diploides. Registros de z-escore da expressão de RNA por *microarray* com normalização por todas as amostras e por amostras diploides estavam registrados para 37 amostras (Quadro 5).

O Firehose Legacy constitui-se de 1108 amostras, dessas 207 (18,7%) registradas como CLI da mama, sendo que 206 possuíam registros de z-escore da expressão de RNA por sequenciamento (RNAseq) com normalização por todas as amostras de câncer e 44 possuíam registros de z-escore da expressão de RNA por *microarray* com normalização por todas as amostras de câncer e também por amostras diploides (Quadro 5).

Quadro 5 - Principais características dos estudos do CBioPortal que seguiram para análise de expressão de RNA por z-escore.*

Estudo	Nº total de amostras	Nº de lobulares (n/%)	Z-escore RNAseq (n/%)	Z-escore RNA <i>Microarray</i> (n/%)
Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	2509	192 / 7,7	-	146 / 76,0
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Cell 2015)	818	127 / 15,5	127 / 100,0	37 / 29,1
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Firehose Legacy)	1108	207 / 18,7	206 / 99,5	44 / 21,2
Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas 2018)	1084	201 / 18,5	201 / 100,0	-

*dados referentes aos z-escores normalizados pela expressão de todas as amostras de câncer.

O estudo PanCancer Atlas 2018 constitui-se de 1084 amostras, dessas 201 (18,5%) registradas como CLI da mama, todos eles com registros de z-escore da expressão de RNA por sequenciamento (RNAseq) com normalização por todas as amostras de câncer, pelas amostras diploides e também o único dos quatro estudos a apresentar normalização por tecido normal (Quadro 5).

Os dados de expressão dos genes *ROS1*, *IGF1R*, *PTK2*, *MKI67*, *MET*, *KDR*, *ALK*, *CDH1* e *ESR1* por z-escore disponíveis foram obtidos, tabulados por amostra e devido a repetição de amostras entre os trabalhos Firehose, PanCancer Atlas e Cell 2015, as análises foram realizadas separadamente por estudo.

Para avaliação de frequência de z-escore hiperexpresso foram utilizados valores de corte em z-escore 1,8 e 2,0 para o *ROS1* e outros três genes potenciais alvos de terapia anti-*ROS1* (*MET*, *KDR*, *ALK*) (163). Ressalta-se que a normalização da expressão nesses dados se deu pela totalidade de amostras com câncer. Ou seja, a subpopulação amostral de CLIs estaria com hiperexpressão ou hipossupressão de um determinado gene em relação à totalidade de tumores de mama do estudo.

O *ROS1* apresentou hiperexpressão com valor de corte do z-escore em 2,0 em apenas 0,97 (Firehose RNAseq) a 2,05% (METABRIC microarray) das amostras. Mesmo reduzindo o valor de corte do z-escore para 1,8 a hiperexpressão foi reportada em somente 1,46 (Firehose RNAseq) a 2,05% (METABRIC microarray) (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência de z-escore elevado (%) em CLIs nos quatro estudos avaliados para os genes *ROS1*, *MET*, *KDR*, *ALK*.

Gene	Firehose RNAseq (n=206)		METABRIC microarray (n=146)		PanCancer Atlas 2018 RNAseq (n=201)		Cell 2015 RNAse (n=127)	
	Valor de corte		Valor de corte		Valor de corte		Valor de corte	
	1,8	2,0	1,8	2,0	1,8	2,0	1,8	2,0
<i>ROS1</i>	1,46	0,97	2,05	2,05	1,49	1,00	1,57	1,57
<i>MET</i>	0,49	0,00	3,42	2,05	0,50	0,00	0,00	0,00
<i>KDR</i>	1,46	0,00	3,42	3,42	2,99	0,50	3,94	1,57
<i>ALK</i>	5,83	4,85	2,05	1,37	4,98	4,48	4,72	3,94

Esses valores são mais de 20 vezes menores que os 55% de expressão descritos por Eom M. et al. em 2013 em CDIs (148), se aproximam da ausência de expressão de *ROS1* em microarranjo tecidual de 631 tumores de mama reportada

por Raut et al (2015) (150), e são muito semelhantes a nossa descrição de expressão do ROS1 em 4,6% das amostras e hiperexpressão (H-escore de 240) em apenas 1 caso (1,49%), validando os nossos resultados.

Por outro lado, a hiperexpressão compensatória do ROS1 em contexto de carcinomas com perda da expressão da E-caderina, descrita por Bajrami I et al. 2018 em culturas de células e roedores (163) parece não se aplicar a CLIs em humanos, como evidenciado em nossos dados e na análise *in silico* de quatro estudos da plataforma CBioPortal.

Essa premissa por sua vez deixaria de suportar o racional que embasa os ensaios clínicos com inibidores de ROS1 em andamento (169,170,171), a não ser que outros alvos dos fármacos, como *MET*, *KDR* e *ALK*, fossem responsáveis pela resposta terapêutica (Tabela 13) (163).

Contudo, em relação aos outros três potenciais alvos terapêuticos, que poderiam explicar algum padrão de resposta nos ensaios clínicos em andamento com os inibidores de *ROS1* (169,170,171), o *MET* mostrou hiperexpressão em raros casos e o *KDR* em apenas 5 casos de 146 (3,42%) no estudo METABRIC, mesmo utilizando ponto de corte em 1,8 para o z-escore. Já o *ALK*, apesar dos baixos índices no estudo METABRIC, teve registro de até 12 hiperexpressores (5,83%) em uma população de 206 amostras (Firehose Legacy RNASeq), utilizando o valor de corte de 1,8. Esses dados contribuem à escassa descrição de frequências de expressão de *ALK* em CMIs, sobretudo em CLIs, uma vez que a literatura revisada é também conflitante em relação a expressão de *ALK* em carcinomas mamários, variando de 36,0% de expressão por IHQ no trabalho de Siraj et al. (2015) (186) a ausência de expressão em 13 carcinomas inflamatórios da mama no estudo de Hanna MG et al. (2015) (187).

Logo, acreditamos que a probabilidade de ensaios clínicos com a administração de inibidores de ROS1, *ALK*, *MET* e *KDR* teriam a possibilidade de apresentar algum efeito referente a essa via em apenas cerca de 5,0% das pacientes, levantando a hipótese da real validade de arrolar a totalidade de pacientes com CLIs sem a pesquisa de biomarcadores, nos ensaios em andamento (169,170,171).

É relevante salientar que o estudo METABRIC apresentava dados apenas de *microarray* e que estudos vêm mostrando que os resultados entre análise de expressão por *microarray* e RNAseq podem não ser consistentes entre si, portanto,

esse foi mais um motivo para optarmos pela análise em separado dos dados. Contudo, algumas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a comparabilidade entre os resultados de ambos os métodos. Uma delas é baseada em escores de enriquecimento a partir de dados brutos de grupos de genes específicos previamente selecionados (188) que traz a possibilidade de aplicação em futuros estudos *in silico*, assim que a técnica estiver melhor validada e mais difundida.

Outro ponto a se destacar seria que a análise utilizando ponto de corte da expressão por z-escore em relação a todas as amostras não implica em hiperexpressão absoluta de mRNA ou proteica, mas sim que há uma maior quantidade de mRNA nessas amostras em relação à média de expressão das amostras com câncer de mama nos estudos. Assim, descrevemos neste trabalho as diferenças de expressão dos CLIs em relação aos carcinomas mamários de uma forma geral. Logo, a hiperexpressão relativa de mRNA não implica em hiperexpressão protéica nestes tumores, visto que mecanismos pós-transcripcionais e pós-translacionais podem interferir na expressão de proteínas (142), levantando a hipótese de que a expressão das proteínas pode ser ainda menor.

Além disso, pontos de corte pelo z-escore criam um cenário dicotômico, hiperexpressos ou não-hiperexpressos, limitando a análise de correlação entre os genes e as diferentes amostras, dado que a relação entre as moléculas geralmente apresentam uma distribuição em continuum. Deste modo, apresentar a análise qualitativa, permitindo inferências visuais através de mapas de calor poderia permitir a detecção de associações e agrupamentos que vão além da hiperexpressão (Figura 24).

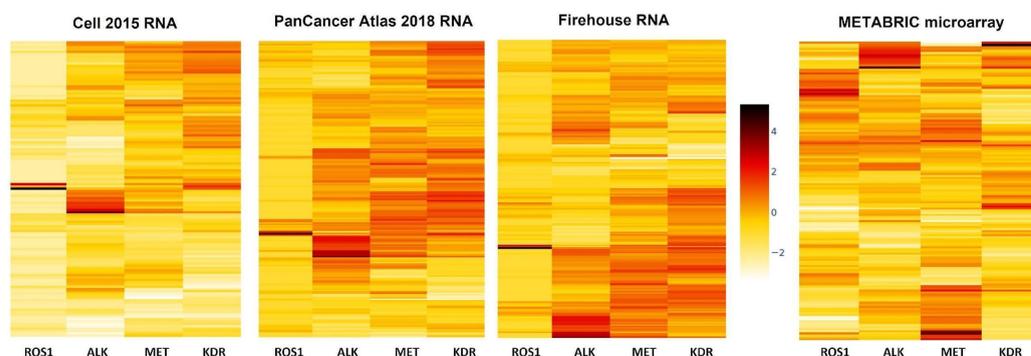


Figura 24 – Análise qualitativa (visual) de mapa de calor da relação entre os genes *ROS1*, *ALK*, *MET* e *KDR*. Intensidade da coloração indica valores de z-score de acordo com a escala da legenda.

Por exemplo, na figura 24, é possível observar uma relação inversa entre a hiperexpressão de *ROS1* e *ALK* em todos os quatro estudos, ao passo que existe uma eventual relação direta entre a expressão dos genes *ALK*, *MET* e *KDR* nos três estudos TCGA, não observada com clareza na análise por *microarray* do estudo METABRIC. Contudo, essa é uma análise exploratória e necessita ser melhor abordada em estudos experimentais.

Em uma outra análise *in silico*, não confirmamos nosso achado de IHQ referentes a menor expressão de RE ($\leq 20\%$) nos casos com expressão de *ROS1* identificada. Não foi evidenciada no estudo PanCancer Atlas 2018, em 201 pacientes avaliadas por RNASeq, correlação entre a expressão desses genes, assim como podemos observar na Figura 25, mesmo confrontando os extremos de expressão do *ROS1*, ou seja, z-escore maior que 1,8 com o quartil de menores z-escores, com *ESR1* apresentando níveis semelhantes de expressão nos dois grupos. Mais uma vez a tendência observada na IHQ pode decorrer do acaso, fruto da pequena representatividade das 3 amostras *ROS1* positivas no universo de CLIs.

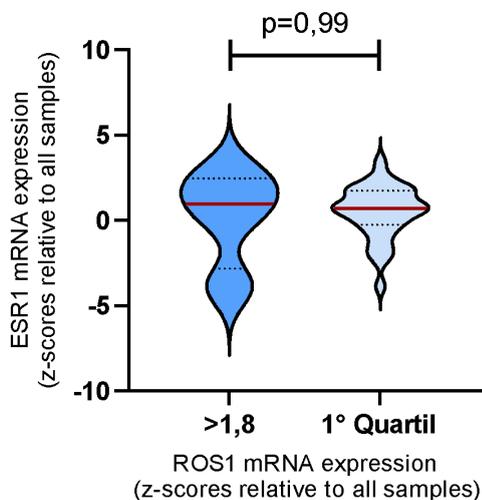


Figura 25 - Gráfico de comparação entre as expressões de *ESR1* nos casos *ROS1* hiperexpressos (z-escore > 1,8) e nos pertencentes ao 1º quartil (inferior) de expressão do *ROS1*. Ausência de significância estatística. Estudo PanCancer 2018 RNA. (teste de Mann Whitney)

Ainda, ao compararmos a hiperexpressão do *ROS1* com a expressão do gene *MKI67* pudemos observar que, também, confrontando os extremos de expressão do *ROS1*, ou seja, z-escore maior que 1,8 com o quartil de menores z-escores, não obtivemos resultado com significância estatística em todos os quatro estudos. Logo, essa análise não confirma a associação descrita pela nossa análise de IHQ de maiores índices de Ki67 ($\geq 20\%$) nas 3 amostras que expressavam *ROS1*,

muito provavelmente, por nosso achado ser fruto do acaso e pela pequena representatividade das 3 amostras no universo de CLIs (Figura 26).

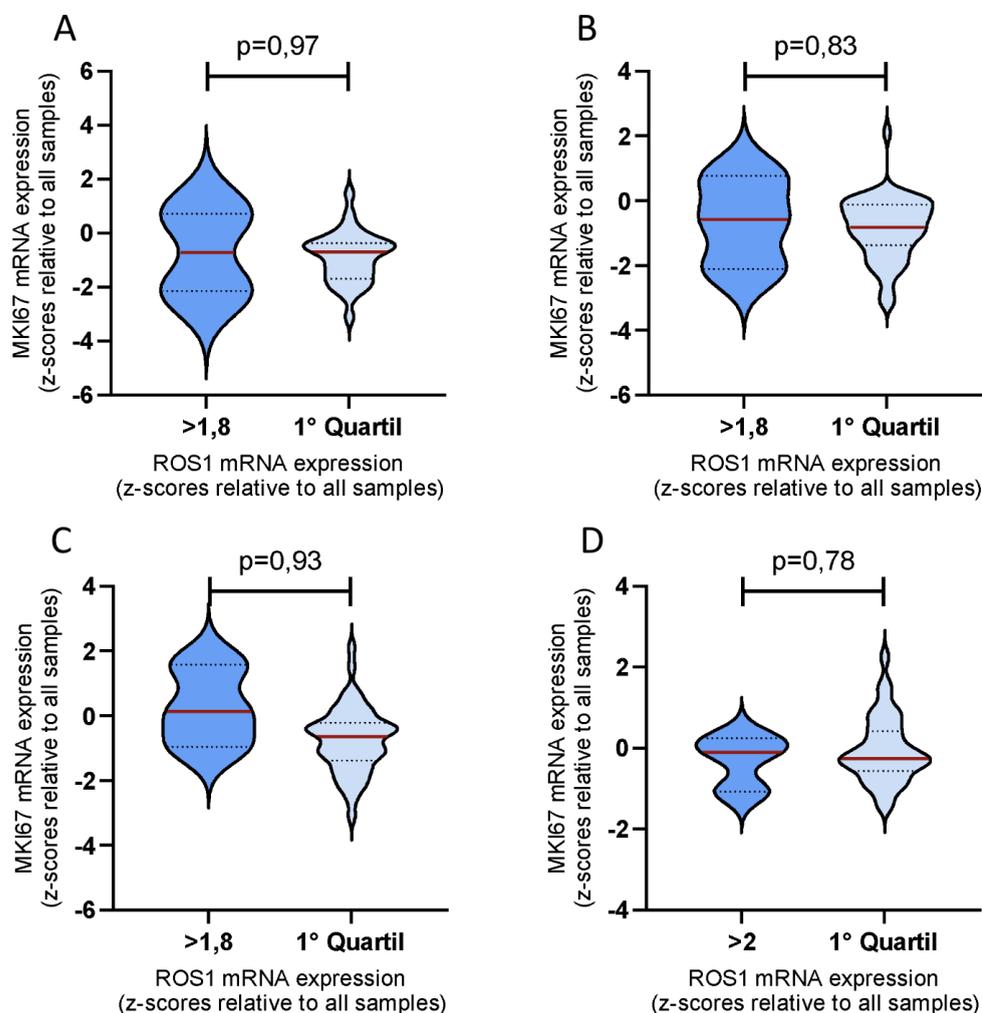


Figura 26 - Gráfico de comparação entre as expressões de *MKI67* nos casos *ROS1* hiperexpressos (z-escore > 1,8) e nos pertencentes ao 1° quartil (inferior) de expressão do *ROS1*. Ausência de significância estatística para todas as análises em todos os estudos. A - Cell 2015 RNA, B - Firehouse RNA, C - PanCancer Atlas 2018 RNA D- METABRIC *microarray*. (teste de Mann Whitney)

Uma vez que não encontramos a associação entre expressão do *ROS1* e E-caderina deficiente descrita por descrita por Ilirjana Bajrami et al. (2018), tanto no estudo de IHQ, quanto na análise *in silico*, fizemos a comparação de expressão do gene *CDH1*, com outros potenciais genes a serem expressos de forma compensatória a perda da proteína de adesão, por análise combinatória de associação.

Na revisão para escolha dos genes a fazerem para dessa análise encontramos, além de publicação evidenciando regulação positiva de receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF1R*) em linhagens celulares *CDH1-knock-out*, mostrando que a homeostase celular de tumores com perda da proteína de adesão pode assumir outras vias divergentes a do ROS1 (161,162), descrição de regulação positiva de quinase de adesão focal (gene *PTK2*) acompanhando o surgimento de resistência à terapia com inibidores de ROS1 em cânceres de estômago e mama deficientes em *CDH1* (154). Há ainda publicação de Chen Y. et al (2022) identificando a expressão de RNA de *PTK2* como fator de prognóstico adverso em análise integrada de bioinformática e experimental (155).

Contudo, foram testadas as associações entre *CDH1* e *PTK2* e entre *CDH1* e *IGF1R* nos quatro estudos do cBioPortal, mas apenas nos estudos Firehouse RNA e PanCancer Atlas 2018 RNA houve correlação significativa, apenas para *IGF1R* (Figura 27). Entretanto, diferente do descrito por Nagle AM et al (2018) e Elangovan A et al (2022) na análise de linhagens de células, visto que a correlação de nossa análise foi positiva, ou seja, a expressão de *IGF1R* estaria diretamente ligada a expressão de *CDH1*, e não de forma compensatória a perda de expressão do gene da molécula de adesão E-caderina (*CDH1*), mostrando mais uma vez que estudos pré-clínicos podem não refletir os achados de mundo real.

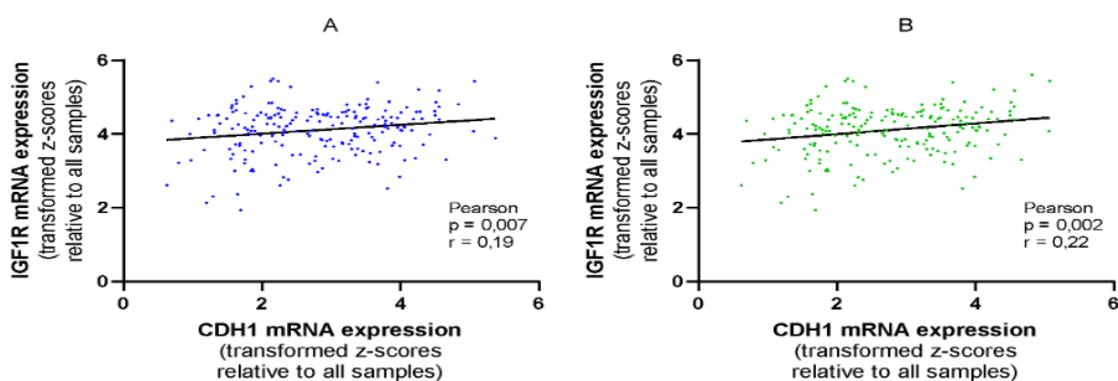


Figura 27 - Associação de correlação (teste de Pearson) combinatória positiva entre *CDH1* e *IGF1R*. A - Firehouse RNA, B - PanCancer Atlas 2018 RNA.

Em virtude de nossas análises terem afastado uma série de associações previamente descritas entre *ROS1* e *CDH1*, *MKI67*, *ESR1*, *PTK2* e *IGF1R*, optamos por realizar uma análise exploratória em busca aleatória de associações (Figura 28).

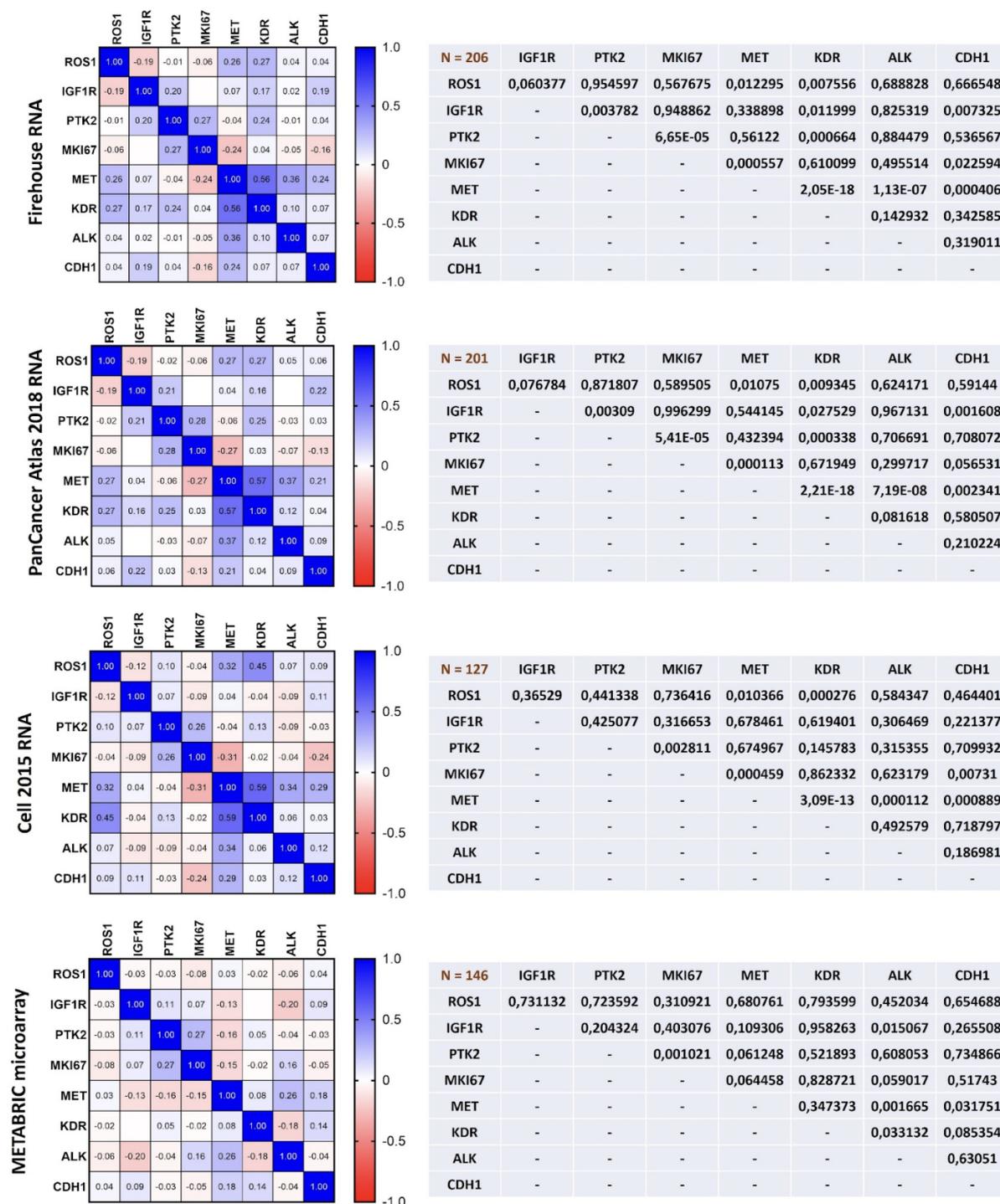


Figura 28 - Resultados da análise combinatória de correlação de dados de expressão de RNA por z-escore, normalizados por todas amostras de câncer dos genes de nosso banco, dos quatro estudos do CBioPortal. À esquerda matriz de correlação para os dados, onde o vermelho representa correlação negativa (valores de r para correlação de Pearson próximos de -1), o azul representa correlação positiva (valores de r para correlação de Pearson próximos de +1) e o branco variáveis independentes (valores próximos e 0). À direita valores de P para as correlações. Foram incluídos na análise os genes *ROS1*, *IGF1R*, *PTK2*, *MKI67*, *MET*, *KDR*, *ALK* e *CDH1*.

Como tínhamos tabulados os dados de z-escore de expressão do RNA, normalizado por todas as amostras de câncer, dos genes *ROS1*, *IGF1R*, *PTK2*, *MKI67*, *MET*, *KDR*, *ALK* e *CDH1*, dos quatro estudos do CBioPortal, investigamos a correlação por combinação entre todos esses genes e consideramos como relevantes apenas aquelas com mesmo padrão de correlação (positiva ou negativa) e com significância estatística em todos os quatro estudos, fortalecendo os achados do ponto de vista de probabilidade estatística (Figura 28).

Foi detectada correlação positiva em todos os quatro estudos entre o gene *PTK2* e o gene *MKI67* (Figura 29A), indicando uma potencial relação com maiores índices proliferativos pelo Ki67 e possível impacto prognóstico negativo.

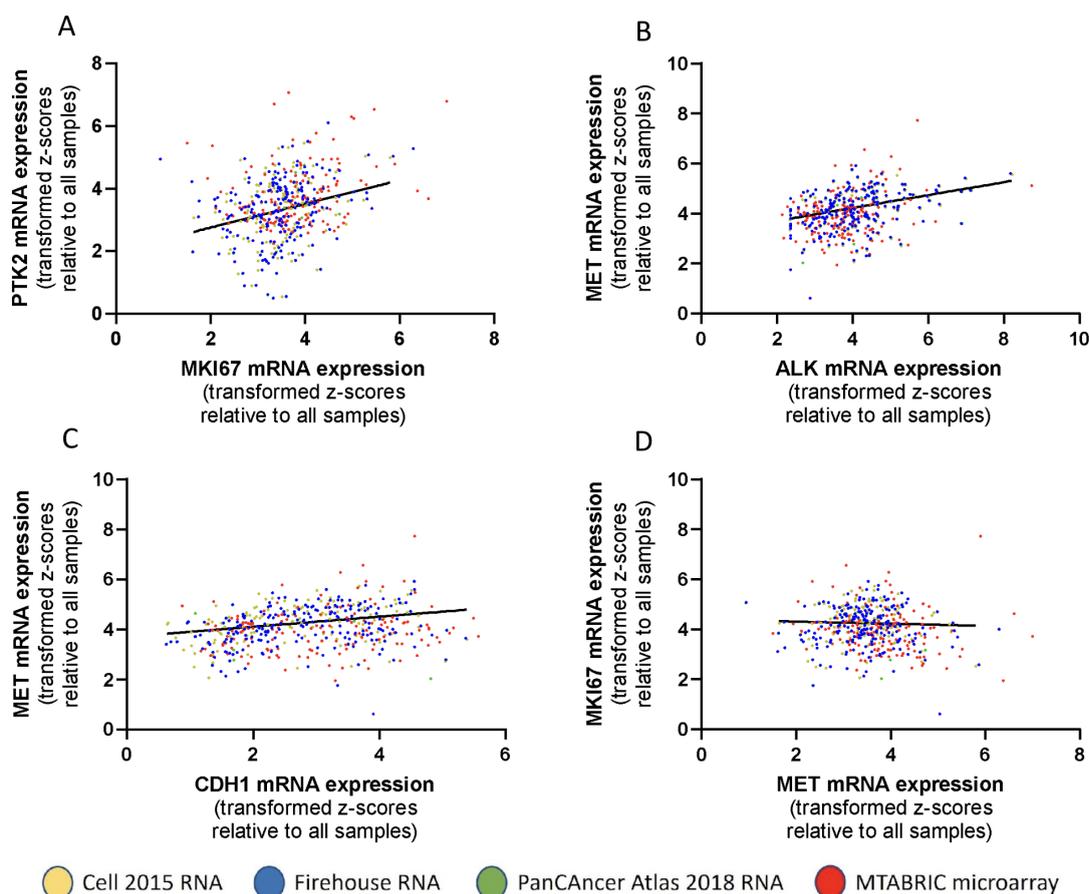


Figura 29 - Ilustração em gráfico de dispersão das principais correlações encontradas na análise combinatória de correlação de dados de expressão por z-escore dos genes de nosso banco de dados, dos quatro estudos do CBioPortal.

Outra correlação positiva nos quatro estudos foi entre *MET* e os genes *ALK* (Figura 29B) e *CDH1* (Figura 29C) em todos os quatro estudos, trazendo novas inferências a respeito dessas interações em CLIs da mama. Visto que a expressão de *MET* poderia estar associada a expressão de *ALK* potencialmente nos casos expressores de *CDH1*, sugerindo um fenótipo de maior proliferação e agressividade a esse subgrupo de CLIs. Por outro lado a correlação detectada entre *MET* e *MKI67* foi negativa (Figura 29D), contrapondo o achado anterior, mas de certa forma justificada pelos baixos índices de *Ki67* em CLIs, algo que pode ter interferido nos números de z-escore para o gene *MKI67*, necessariamente privilegiando essa correlação pela análise combinatorial

Diante desses achados, a expressão das proteínas ROS1, *MET*, *ALK*, *IGF1R* e *FAK* em CLIs de forma simultânea em padrão compensatório a perda da E-caderina nos CLIs, pode vir a ser uma hipótese testada em modelos experimentais para o melhor entendimento desses potenciais biomarcadores prognósticos e / ou preditivos. Fato curioso foi a detecção de correlação negativa entre *MET* e *MKI67*, visto que, apesar da justificativa dos baixos níveis de *Ki67* em CLIs, esperaríamos que o receptor de fator de crescimento *MET* estivesse ligado a uma maior expressão de *Ki67*. Porém, esta é, justamente, uma análise exploratória e seus resultados devem ser avaliados com cautela e gerar novas inferências preliminares a serem confirmadas em estudos mais robustos fundamentados em conceitos médicos e biológicos.

Por fim, em virtude do estudo PanCancer Atlas 2018 RNA possuir dados de expressão de RNA normalizado por amostras de tecido normal, comparamos os perfis de expressão normalizados por todas as amostras de câncer com aqueles referentes à normalização por amostras normais (Figura 30).

A distribuição do z-escore para amostras de CLI em relação aos carcinomas mamários em geral mostra níveis de expressão sem grande variação, com medianas próximas da linha do zero, à exceção do *CDH1*, que evidencia hipoexpressão, como já era esperado em CLIs (Figura 30A).

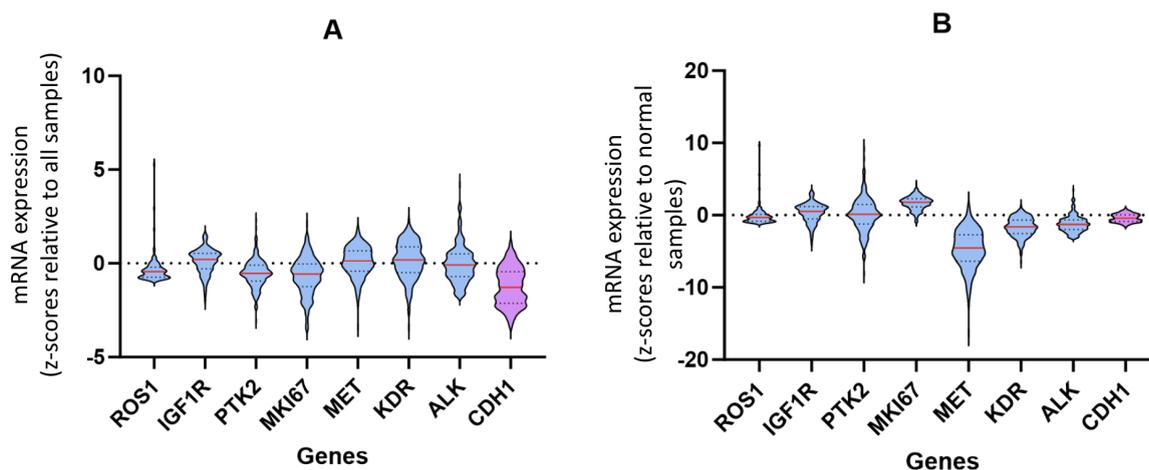


Figura 30 - Gráfico de distribuição de expressão relativa dos genes *ROS1*, *IGF1R*, *PTK2*, *MKI67*, *MET*, *KDR*, *ALK* e *CDH1*, mostrando em A, normalizado por todas as amostras de câncer e, em B, normalizado por tecido normal - estudo PanCancer Atlas 2018.

Em contrapartida, quando o z-escore é calculado em relação às amostras normais, nota-se a expressão elevada de *MKI67*, já esperado em células tumorais, e expressão reduzida de *ALK*, *KDR* e, principalmente, *MET*, o que, juntamente com os resultados anteriores, entre *MET* e *MKI67*, fazem deste um interessante alvo para novos estudos sobre a biologia dos CLI. Visto que essas proteínas em CLIs, conjuntamente com *IGF1R* e *FAK*, poderiam manter a homeostase celular por ação sinérgica e não como genes isoladamente responsáveis pela proliferação e manutenção da vitalidade celular.

5. CONCLUSÃO

O grupo estudado demonstrou características demográficas compatíveis com o esperado segundo os dados da literatura e através dele foi possível estimar a positividade dos principais marcadores relacionados a CLI, como RE (98,3%), RP (92,1%), HER2 (1,5%) e Ki67 (média de 16,2%). Dado esse que, também, foi condizente com o descrito na população mundial, o que tem grande relevância clínica por trazer de forma inédita essa descrição específica de CLI em população brasileira. Foi também originalmente estimada para a população brasileira, por IHQ, em CLIs, a frequência da expressão de ROS1 (4,6%), da perda de expressão de E-caderina (90,9%), além dos padrões de expressão anômalos de p120-catenina e beta-catenina. Logo, demonstrou-se menor expressão de ROS1 do que a esperada conforme as premissas não clínicas em CLIs e clínicas em CMIs-TNE disponíveis na literatura. Apenas duas possíveis correlações foram encontradas entre expressão de ROS1 e dados clínico-patológicos, sendo elas com maiores índices de Ki-67 e com expressões mais baixas de RE. Entretanto, essas correlações não foram confirmadas pela validação *in silico*, demonstrando a fragilidade dessa análise e a possível ausência de um efeito real. Todavia, a análise *in silico* a partir de estudos do CBioPortal permitiu confirmar as baixas expressões de *ROS1* em CLIs por RNA (0,97 a 2,05%), não demonstrou relevante expressão de RNA de possíveis alvos de inibidores de ROS1, como *ALK*, *KDR* ou *MET*, além de proporcionar análise exploratória dos dados, possibilitando gerar novas hipóteses complementares a esse estudo, como a potencial expressão conjunta e compensatória das proteínas ROS1, MET, ALK, IGF1R e FAK em CLIs com perda de E-caderina, que podem vir a ser testadas em estudos posteriores para o melhor entendimento desses potenciais biomarcadores prognósticos e / ou preditivos. Portanto, esse trabalho traz descrição inédita sobre o perfil de CLIs em pacientes brasileiras e sobre a expressão do ROS1 em CLIs e permite contrapor e discutir a execução de ensaios clínicos embasados por premissas pré-clínicas, como os dois que encontram-se em andamento com inibidores de ROS1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estimativa, I. N. C. A.. Incidência de Câncer no Brasil. 2023; [sl: sn].
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021 Jan;71(1):7-33.
3. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019 [cited 2023 March 30]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/32>.
4. Bright CJ, Rea DW, Francis A, Feltbower RG. Comparison of quadrant-specific breast cancer incidence trends in the United States and England between 1975 and 2013. *Cancer Epidemiology*. 2016, 1;44:186-94.
5. Walker GV, Smith GL, Perkins GH, Oh JL, Woodward W, Yu TK, Hunt KK, Hoffman K, Strom EA, Buchholz TA. Population-based analysis of occult primary breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer*. 2010 Sep 1;116(17):4000-6.
6. Moy L, Slanetz PJ, Moore R, Satija S, Yeh ED, McCarthy KA, Hall D, Staffa M, Rafferty EA, Halpern E, Kopans DB. Specificity of mammography and US in the evaluation of a palpable abnormality: retrospective review. *Radiology*. 2002 Oct;225(1):176-81.
7. Soo MS, Rosen EL, Baker JA, Vo TT, Boyd BA. Negative predictive value of sonography with mammography in patients with palpable breast lesions. *American Journal of Roentgenology*. 2001 Nov;177(5):1167-70.
8. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2021 71(3), 209-249.

9. Work ME, Andrulis IL, John EM, Hopper JL, Liao Y, Zhang FF, Knight JA, West DW, Milne RL, Giles GG, Longacre TA. Risk factors for uncommon histologic subtypes of breast cancer using centralized pathology review in the Breast Cancer Family Registry. *Breast cancer research and treatment*. 2012 Aug;134:1209-20.
10. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*. 2005 Oct;93(9):1046-52.
11. Caleffi, M., Crivelatti, I., Burchardt, N. A., Ribeiro, R. A., Acevedo, Y., Job, L. G., ... & Rosa, D. D. Breast cancer survival in Brazil: How much health care access impact on cancer outcomes?. *The Breast*, 2020 54, 155-159.
12. Marques, A. D., Moura, A. R., Hora, E. C., Brito, É. D. A. C., Oliviera, L. S., Feitosa, I. R., ... & Lima, C. A. Analysis of breast cancer survival in a northeastern Brazilian state based on prognostic factors: A retrospective cohort study. *Plos one*, 2022, 17(2), e0263222.
13. Andrade, D. A. P., Veneziani, A. C., Paiva, C. E., Reis, R. D., Sanches, A. O. N., Barroso, A. W. A., ... & Souza, C. D. P. Discrepancies in breast cancer's oncological outcomes between public and private institutions in the southeast region of Brazil: a retrospective cohort study. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13, 1169982.
14. Makdissi, F. B., Leite, F. P. M., Peres, S. V., Mendonça, D. R., de Oliveira, M. M., Lopez, R. V. M., ... & Curado, M. P. Breast cancer survival in a Brazilian cancer center: a cohort study of 5,095 patients. *Mastology*, 2019, 29(1), 37-46.
15. dos-Santos-Silva, I., De Stavola, B. L., Renna, N. L., Nogueira, M. C., Aquino, E. M., Bustamante-Teixeira, M. T., & e Silva, G. A. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001–14: a case only analysis. *The Lancet Global Health*, 2019, 7(6), e784-e797.
16. de Medeiros, J. M., Linhares, J. C., Hatschbach, S. B. B., Hubie, D. P., Ribeiro, R., Rahman, S. A., & Orlandi, D. Perfil epidemiológico e estudo de sobrevida dos

pacientes com câncer de mama atendidos no Hospital Erasto Gaertner em Curitiba, PR. *Revista brasileira de mastologia*, 2016, 26(3), 107-112.

17. Franzoi, M. A., Rosa, D. D., Zaffaroni, F., Werutsky, G., Simon, S., Bines, J., ... & Liedke, P. E. Advanced stage at diagnosis and worse clinicopathologic features in young women with breast cancer in Brazil: a subanalysis of the AMAZONA III study (GBECAM 0115). *Journal of Global Oncology*, 2019, 5, 1-10.

18. Simon, S. D., Bines, J., Werutsky, G., Nunes, J. S., Pacheco, F. C., Segalla, J. G., ... & Barrios, C. H. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. *The Breast*, 2019, 44, 113-119

19. Rosa, D. D., Bines, J., Werutsky, G., Barrios, C. H., Cronemberger, E., Queiroz, G. S., ... & Simon, S. D. 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 Research and Treatment*, 2020, 183, 749-757.

20. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research*. 2004, ;6(6):1-1.

21. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International variation in female breast cancer incidence and mortality ratesinternational variation in female breast cancer rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2015, 1;24(10):1495-506.

22. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002 Jul 17;288(3):321-33.

23. Parise CA, Bauer KR, Caggiano V. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010 Oct 1;76(1):44-52.

24. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL. Race. Breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
25. Bombonati, A., & Sgroi, D. C.. The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of pathology*, 2011, 223(2), 308-318.
26. Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., & Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*, 2010, 57(2), 171-192.
27. Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., Prat, A., Perou, C. M., & Sherman, M. E. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?. *Journal of the National Cancer Institute*, 2010, 106(8), dju165.
28. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2012, 490(7418), 61-70
29. Natrajan, R., Lambros, M. B., Geyer, F. C., Marchio, C., Tan, D. S., Vatcheva, R., ... & Reis-Filho, J. S. Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: Evidence for progression in tumors with a luminal phenotype?. *Genes Chromosomes and Cancer*, 2009, 48(4), 351-365.
30. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 2000, 406(6797), 747-752.
31. Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., ... & Bernard, P. S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology*, 2009, 27(8), 1160.
32. Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., ... & Wood, W. C. Personalizing the treatment of women with early

breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of oncology*, 2013, 24(9), 2206-2223.

33. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Lee, A. H., Robertson, J. F., & Ellis, I. O. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 2007, 109(1), 25-32.

34. Metzger-Filho, O., Tutt, A., De Azambuja, E., Saini, K. S., Viale, G., Loi, S., ... & Piccart-Gebhart, M. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 2012, 30(15), 1879-1887.

35. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietsenpol, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 2011, 121(7), 2750-2767.

36. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., ... & Brown, P. H. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(7), 1688-1698.

37. Zardavas, D., Te Marvelde, L., Milne, R. L., Fumagalli, D., Fountzilas, G., Kotoula, V., ... & Loi, S. Tumor PIK3CA Genotype and Prognosis in Early-Stage Breast Cancer: A Pooled Analysis of Individual Patient Data. *Journal of Clinical Oncology*, 2018, 1;36(10):981-990

38. André, F., Ciruelos, E., Rubovszky, G., Campone, M., Loibl, S., Rugo, H. S., ... & Juric, D. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 2019, 380(20), 1929-1940.

39. Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., & Sotiriou, C. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of oncology*, 2018, 29(4), 895-902.

40. Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., ... & Conte, P. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(6), 523-533.
41. Robson, M. E., Tung, N., Conte, P., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., ... & Domchek, S. M. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 2019, 30(4), 558-566.
42. Budczies, J., Bockmayr, M., Denkert, C., Klauschen, F., Lennerz, J. K., Györfy, B., ... & Stenzinger, A. Classical pathology and mutational load of breast cancer—integration of two worlds. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2015, 1(4), 225-238.
43. Allison KH. Ancillary prognostic and predictive testing in breast cancer: focus on discordant, unusual, and borderline results. *Surgical Pathology Clinics*. 2018, Mar 1;11(1):147-76.
44. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991, 19(5):403-10.
45. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichiyama S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research*. 2010 Aug;12(4):1-2.
46. Kurozumi, S., Matsumoto, H., Hayashi, Y., Tozuka, K., Inoue, K., Horiguchi, J., ... & Kurosumi, M. Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index. *BMC cancer*, 2017, 17(1), 1-9.

47. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., ... & Wolff, A. C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2010, 134(7), e48-e72.
48. Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., ... & Wolff, A. C. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144 (5): 545–563.
49. O'Sullivan, C. C., & Swain, S. M. Pertuzumab: evolving therapeutic strategies in the management of HER2-overexpressing breast cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 2013, 13(5), 779-790.
50. Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J. H., Sledge, G., Geyer Jr, C. E., ... & Wolmark, N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Journal of clinical oncology*, 2014 32(33), 3744.
51. Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M., ... & Dowsett, M. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2018, 142(11), 1364-1382.
52. Grimm, E. E., Schmidt, R. A., Swanson, P. E., Dintzis, S. M., & Allison, K. H. Achieving 95% cross-methodological concordance in HER2 testing: causes and implications of discordant cases. *American journal of clinical pathology*, 2010, 134(2), 284-292.

53. Allison, K. H. Ancillary prognostic and predictive testing in breast cancer: focus on discordant, unusual, and borderline results. *Surgical Pathology Clinics*, 2018, 11(1), 147-176.
54. Sheffield, B. S., Kos, Z., Asleh-Aburaya, K., Wang, X. Q., Leung, S., Gao, D., ... & Chia, S. K. Molecular subtype profiling of invasive breast cancers weakly positive for estrogen receptor. *Breast cancer research and treatment*, 2016, 155, 483-490.
55. Lakhani, S. R., Jacquemier, J., Sloane, J. P., Gusterson, B. A., Anderson, T. J., van de Vijver, M. J., ... & Easton, D. F. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, 90(15), 1138-1145.
56. Krammer, J., Pinker-Domenig, K., Robson, M. E., Gönen, M., Bernard-Davila, B., Morris, E. A., ... & Jochelson, M. S. Breast cancer detection and tumor characteristics in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Breast cancer research and treatment*, 2017, 163, 565-571.
57. Cakir, A., Gonul, I. I., & Uluoglu, O. A comprehensive morphological study for basal-like breast carcinomas with comparison to nonbasal-like carcinomas. *Diagnostic pathology*, 2012, 7(1), 1-11.
58. Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology*, 2006, 19(2), 264-271.
59. Rakha, E. A., Putti, T. C., Abd El-Rehim, D. M., Paish, C., Green, A. R., Powe, D. G., ... & Ellis, I. O. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2006, 208(4), 495-506.

60. Lim ST, Yu JH, Park HK, Moon BI, Ko BK, & Suh YJ. A comparison of the clinical outcomes of patients with invasive lobular carcinoma and invasive ductal carcinoma of the breast according to molecular subtype in a Korean population. *World journal of surgical oncology*, 2014; 12(1), 1-10.
61. Li, C. I., Anderson, B. O., Daling, J. R., & Moe, R. E. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *Jama*, 2003, 289(11), 1421-1424.
62. Li, C. I., Anderson, B. O., Porter, P., Holt, S. K., Daling, J. R., & Moe, R. E. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2000, 88(11), 2561-2569.
63. Reeves, G. K., Beral, V., Green, J., Gathani, T., & Bull, D.. Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 2006, 7(11), 910-918.
64. Li, C. I., Chlebowski, R. T., Freiberg, M., Johnson, K. C., Kuller, L., Lane, D., ... & Prentice, R. Alcohol consumption and risk of postmenopausal breast cancer by subtype: the women's health initiative observational study. *Journal of the National Cancer Institute*, 2010, 102(18), 1422-1431.
65. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Powe, D. G., Green, A. R., Habashy, H., Grainge, M. J., ... & Ellis, I. O. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *European journal of cancer*, 2008, 44(1), 73-83.
66. Arpino, G., Bardou, V. J., Clark, G. M., & Elledge, R. M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast cancer research*, 2004 6(3), 1-8.
67. Pestalozzi, B. C., Zahrieh, D., Mallon, E., Gusterson, B. A., Price, K. N., Gelber, R. D., ... & Goldhirsch, A. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *Journal of clinical oncology*, 2008, 26(18), 3006-3014.

68. Hilleren, D. J., Andersson, I. T., Lindholm, K., & Linnell, F. S. Invasive lobular carcinoma: mammographic findings in a 10-year experience. *Radiology*, 1991, 178(1), 149-154.
69. Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. In *Seminars in oncology*, 2019, Vol. 46, No. 2, pp. 121-132.
70. Selinko, V. L., Middleton, L. P., & Dempsey, P. J. Role of sonography in diagnosing and staging invasive lobular carcinoma. *Journal of Clinical Ultrasound*, 2004, 32(7), 323-332.
71. Dietzel, M., Baltzer, P. A., Vag, T., Gröschel, T., Gajda, M., Camara, O., & Kaiser, W. A. Magnetic resonance mammography of invasive lobular versus ductal carcinoma: systematic comparison of 811 patients reveals high diagnostic accuracy irrespective of typing. *Journal of computer assisted tomography*, 2010, 34(4), 587-595.
72. Mann, R. M., Kuhl, C. K., Kinkel, K., & Boetes, C. Breast MRI: guidelines from the European society of breast imaging. *European radiology*, 2008, 18, 1307-1318.
73. Mann, R. M., Cho, N., & Moy, L. Breast MRI: state of the art. *Radiology*, 2019, 292(3), 520-536
74. Ciriello, G., Gatzka, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., ... & Zmuda, E. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*, 2015 163(2), 506-519.
75. Desmedt, C., Zoppoli, G., Gundem, G., Pruneri, G., Larsimont, D., Fornili, M., ... & Sotiriou, C. Genomic characterization of primary invasive lobular breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 2016, 34(16), 1872-1881.

76. Weigelt, B., Geyer, F. C., Natrajan, R., Lopez-Garcia, M. A., Ahmad, A. S., Savage, K., ... & Reis-Filho, J. S.. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade-and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2010, 220(1), 45-57.
77. Nielsen, T. O., Parker, J. S., Leung, S., Voduc, D., Ebbert, M., Vickery, T., ... & Ellis, M. J. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor–positive breast cancer. *Clinical cancer research*, 2010, 16(21), 5222-5232.
78. Pereira, B., Chin, S. F., Rueda, O. M., Vollan, H. K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., ... & Caldas, C. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature communications*, 2016, 7(1), 11479.
79. Iorfida M, Maiorano E, Orvieto E, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Rotmensz N, ... & Viale. Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. *Breast cancer research and treatment*, 2012; 133(2), 713-723.
80. Park, S., Koo, J. S., Kim, M. S., Park, H. S., Lee, J. S., Lee, J. S., ... & Park, B. W. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *The Breast*, 2012, 21(1), 50-57.
81. Vargas, A. C., Lakhani, S. R., & Simpson, P. T. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: molecular pathology and clinical impact. *Future Oncology*, 2009, 5:2, 233-243.
82. Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Lambros, M. B. K., Jones, C., Steele, D., Mackay, A., ... & Lakhani, S. R. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular

carcinomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2008, 215(3), 231-244.

83. Boelens, M. C., Nethe, M., Klarenbeek, S., de Ruiter, J. R., Schut, E., Bonzanni, N., ... & Jonkers, J. PTEN loss in E-cadherin-deficient mouse mammary epithelial cells rescues apoptosis and results in development of classical invasive lobular carcinoma. *Cell reports*, 2016, 16(8), 2087-2101.

84. de Groot, J. S., Ratze, M. A., van Amersfoort, M., Eisemann, T., Vlug, E. J., Niklaas, M. T., ... & Derksen, P. W. α E-catenin is a candidate tumor suppressor for the development of E-cadherin-expressing lobular-type breast cancer. *The Journal of pathology*, 2018, 245(4), 456-467.

85. Sarrió, D., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sánchez-Estévez, C., Guo, M., Herman, J. G., ... & Palacios, J. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *International journal of cancer*, 2003, 106(2), 208-215.

86. Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2018, 121, 11-22.

87. Conlon, N., Ross, D. S., Howard, J., Catalano, J. P., Dickler, M. N., & Tan, L. K. Is there a role for onco Dx testing in invasive lobular carcinoma? *The breast journal*, 2015, 21(5), 514-519.

88. Tsai, M. L., Lillemoe, T. J., Finkelstein, M. J., Money, J. E., Susnik, B., Grimm, E., ... & Swenson, K. K. Utility of Oncotype Dx risk assessment in patients with invasive lobular carcinoma. *Clinical breast cancer*, 2016, 16(1), 45-50.

89. Beumer, I. J., Persoon, M., Witteveen, A., Dreezen, C., Chin, S. F., Sammut, S. J., ... & Glas, A. M. Prognostic value of MammaPrint® in invasive lobular breast cancer. *Biomarker insights*, 2016, 11, BMI-S38435.

90. Felts, J. L., Zhu, J., Han, B., Smith, S. J., & Truica, C. I. An analysis of Oncotype DX recurrence scores and clinicopathologic characteristics in invasive lobular breast cancer. *The Breast Journal*, 2017, 23(6), 677-686.
91. Michaut, M., Chin, S. F., Majewski, I., Severson, T. M., Bismeyer, T., De Koning, L., ... & Bernardis, R. Integration of genomic, transcriptomic and proteomic data identifies two biologically distinct subtypes of invasive lobular breast cancer. *Scientific reports*, 2016, 6(1), 1-13.
92. Desmedt, C., Salgado, R., Fornili, M., Pruneri, G., Van den Eynden, G., Zoppi, G., ... & Sotiriou, C. Immune infiltration in invasive lobular breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2018, 110(7), 768-776.
93. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., ... & Stratton, M. R. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 2016, 534(7605), 47-54.
94. Ross, J. S., Gay, L. M., Wang, K., Ali, S. M., Chumsri, S., Elvin, J. A., ... & Stephens, P. J. Nonamplification *ERBB2* genomic alterations in 5605 cases of recurrent and metastatic breast cancer: an emerging opportunity for anti-HER2 targeted therapies. *Cancer*, 2016, 122(17), 2654-2662.
95. Dieci, M. V., Smutná, V., Scott, V., Yin, G., Xu, R., Vielh, P., ... & Lefebvre, C. Whole exome sequencing of rare aggressive breast cancer histologies. *Breast cancer research and treatment*, 2016, 156, 21-32.
96. Ma, C. X., Bose, R., Gao, F., Freedman, R. A., Telli, M. L., Kimmick, G., ... & Ellis, M. J. (2017). Neratinib efficacy and circulating tumor DNA detection of HER2 mutations in HER2 nonamplified metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(19), 5687-5695.
97. Martinez, V., & Azzopardi, J. G. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology*, 1979, 3(6), 467-488.

98. Arpino, G., Bardou, V. J., Clark, G. M., & Elledge, R. M. (2004). Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast cancer research*, 2004, 6(3), 1-8.
99. Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. In *Seminars in oncology*, 2019, Vol. 46, No. 2, pp. 121-132.
100. Quincey, C., Raitt, N., Bell, J., & Ellis, I. O. Intracytoplasmic lumina – a useful diagnostic feature of adenocarcinomas. *Histopathology*, 1991, 19(1), 83-88.
101. Abdel-Fatah, T. M., Powe, D. G., Hodi, Z., Lee, A. H., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 2007, 31(3), 417-426.
102. Chen, Z., Yang, J., Li, S., Lv, M., Shen, Y., Wang, B., ... & Yang, J. (2017). Invasive lobular carcinoma of the breast: a special histological type compared with invasive ductal carcinoma. *PloS one*, 2017, 12(9), e0182397.
103. Nakagawa, S., Miki, Y., Miyashita, M., Hata, S., Takahashi, Y., Rai, Y., ... & Sasano, H. Tumor microenvironment in invasive lobular carcinoma: possible therapeutic targets. *Breast cancer research and treatment*, 2016, 155, 65-75.
104. Fechner, R. E. (1975). Histologic variants of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Human pathology*, 1975, 6(3), 373-378.
105. McCart Reed, A. E., Kalinowski, L., Simpson, P. T., & Lakhani, S. R. Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. *Breast Cancer Research*, 2021, 23(1), 1-16.

106. Shousha, S., Backhous, C. M., Alagband-Zadeh, J., & Burn, I. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast: a tumor rich in estrogen receptors. *American journal of clinical pathology*, 1985, 85(1), 1-5.
107. Rakha, E. A., & Ellis, I. O. Lobular breast carcinoma and its variants. In *Seminars in diagnostic pathology*, 2010, Vol. 27, No. 1, pp. 49-61.
108. Sneige, N., Wang, J., Baker, B. A., Krishnamurthy, S., & Middleton, L. P. Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. *Modern Pathology*, 2002, 15(10), 1044-1050.
109. Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Lambros, M. B. K., Jones, C., Steele, D., Mackay, A., ... & Lakhani, S. R. Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2008, 215(3), 231-244.
110. Rakha, E. A., Van Deurzen, C. H., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., & Lee, A. H. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: is it a prognostically significant pathological subtype independent of histological grade?. *Modern Pathology*, 2013, 26(4), 496-501.
111. Eusebi, V., Magalhaes, F., & Azzopardi, J. G. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Human pathology*, 1992, 23(6), 655-662.
112. Tan, P. H., Harada, O., Thike, A. A., & Tse, G. M. K. Histiocytoid breast carcinoma: an enigmatic lobular entity. *Journal of clinical pathology*, 2011, 64(8), 654-659.
113. Esposito, N. N., Chivukula, M., & Dabbs, D. J. The ductal phenotypic expression of the E-cadherin/catenin complex in tubulolobular carcinoma of the breast: an

immunohistochemical and clinicopathologic study. *Modern pathology*, 2007, 20(1), 130-138.

114. Radhi. Immunohistochemical analysis of pleomorphic lobular carcinoma: higher expression of p53 and chromogranin and lower expression of ER and PgR. *Histopathology*, 2000, 36(2), 156-160.

115. Christgen, M., Cserni, G., Floris, G., Marchio, C., Djerroudi, L., Kreipe, H., ... & Vincent-Salomon, A. Lobular breast cancer: histomorphology and different concepts of a special spectrum of tumors. *Cancers*, 2021, 13(15), 3695.

116. Middleton, L. P., Palacios, D. M., Bryant, B. R., Krebs, P., Otis, C. N., & Merino, M. J. Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *The American journal of surgical pathology*, 2000, 24(12), 1650-1656.

117. Rakha, E. A., Patel, A., Powe, D. G., Benhasouna, A., Green, A. R., Lambros, M. B., ... & Ellis, I. O. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *The American journal of surgical pathology*, 2010, 34(10), 1472-1479.

118. Dabbs, D. J., Bhargava, R., & Chivukula, M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of p120 catenin. *The American journal of surgical pathology*, 2007, 31(3), 427-437.

119. Orvieto, E., Maiorano, E., Bottiglieri, L., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Galimberti, V., ... & Viale, G. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2008, 113(7), 1511-1520.

120. Christgen, M., Steinemann, D., Kühnle, E., Länger, F., Gluz, O., Harbeck, N., & Kreipe, H. Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. *Pathology-Research and Practice*, 2016, 212(7), 583-597.

121. Korhonen, T., Kuukasjärvi, T., Huhtala, H., Alarmo, E. L., Holli, K., Kallioniemi, A., & Pylkkänen, L. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. *The Breast*, 2013, 22(6), 1119-1124.
122. Viale, G., Rotmensz, N., Maisonneuve, P., Orvieto, E., Maiorano, E., Galimberti, V., ... & Coates, A. S. Lack of prognostic significance of “classic” lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009, 117, 211-214.
123. Kwast, A. B., Groothuis-Oudshoorn, K. C., Grandjean, I., Ho, V. K., Voogd, A. C., Menke-Pluymers, M. B., ... & Siesling, S. Histological type is not an independent prognostic factor for the risk pattern of breast cancer recurrences. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, 135, 271-280.
124. Loibl, S., Volz, C., Mau, C., Blohmer, J. U., Costa, S. D., Eidtmann, H., ... & Untch, M. Response and prognosis after neoadjuvant chemotherapy in 1,051 patients with infiltrating lobular breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2014, 144, 153-162.
125. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Menon, S., Green, A. R., Lee, A. H., & Ellis, I. O. (2008). Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111, 121-127.
126. Engstrøm, M. J., Opdahl, S., Vatten, L. J., Haugen, O. A., & Bofin, A. M. Invasive lobular breast cancer: the prognostic impact of histopathological grade, E-cadherin and molecular subtypes. *Histopathology*, 2015, 66(3), 409-419.
127. Carbognin, L., Sperduti, I., Fabi, A., Dieci, M. V., Kadrija, D., Griguolo, G., ... & Bria, E. Prognostic impact of proliferation for resected early stage ‘pure’ invasive lobular breast cancer: cut-off analysis of Ki67 according to histology and clinical validation. *The Breast*, 2017, 35, 21-26.

128. Petrelli, F., & Barni, S. Response to neoadjuvant chemotherapy in ductal compared to lobular carcinoma of the breast: a meta-analysis of published trials including 1,764 lobular breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2014, 142, 227-235.
129. Lips, E. H., Mukhtar, R. A., Yau, C., De Ronde, J. J., Livasy, C., Carey, L. A., ... & I-SPY TRIAL Investigators. Lobular histology and response to neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2012, 136, 35-43.
130. Patel, A., D'Alfonso, T., Cheng, E., & Hoda, S. A. Sentinel Lymph Nodes in Classic Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2017, 41(11), 1499-1505.
131. Hou, Y., Zynger, D. L., Li, X., & Li, Z. Comparison of Oncotype DX with modified Magee equation recurrence scores in low-grade invasive carcinoma of breast. *American Journal of Clinical Pathology*, 2017, 148(2), 167-172.
132. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: *CDH1* mutations and beyond. *JAMA oncol.* 2015;1(1):23-32.
133. Blair V.R., McLeod M, Carneiro F, Coit D.G., D'Addario J.L., van Dieren J.M. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: Updated clinical practice guidelines. *The Lanc Oncol.* 2020;21(8):e386-e397.
134. Benesch MG, Bursey SR, O'Connell AC, Ryan MG, Howard CL, Stockley CC et al. *CDH1* Gene Mutation Hereditary Diffuse Gastric Cancer Outcomes: Analysis of a Large Cohort, Systematic Review of Endoscopic Surveillance, and Secondary Cancer Risk Postulation. *Cancers.* 2021;13(11):2622.
135. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 1998; 392:402-05.

136. Majewski IJ, Kluijdt I, Cats A, Scerri TS, de Jong, D, Kluin RJ, et al. An alpha-E-catenin (*CTNNA1*) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol.* 2013; 229:621–9.
137. Reed AEM, Kutasovic JR, Lakhani SR, & Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and omics. *Breast cancer research,* 2015; 17(1), 1-11.
138. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):78-85.
139. Dossus L & Benusiglio PR. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research,* 2015; 17(1), 1-8.
140. Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, ... & Ro J. The invasive lobular carcinoma as a prototype luminal A breast cancer: a retrospective cohort study. *BMC cancer,* 2010; 10(1), 1-8.
141. Ross JS, Wang K, Sheehan CE, Boguniewicz AB, Otto G, Downing SR, ... & Stephens PJ. Relapsed classic E-Cadherin (*CDH1*)–mutated invasive lobular breast cancer shows a high frequency of HER2 (*ERBB2*) gene mutations. *Clinical cancer research,* 2013; 19(10), 2668-2676.
142. Corso, G., Figueiredo, J., De Angelis, S. P., Corso, F., Girardi, A., Pereira, J., ... & Gandini, S. E-cadherin deregulation in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 2020, 24(11), 5930-5936.
143. Alexander, J., Mariani, O., Meaudre, C., Fuhrmann, L., Xiao, H., Naidoo, K., ... & Natrajan, R. Assessment of the molecular heterogeneity of E-cadherin expression in invasive lobular breast cancer. *Cancers,* 2022, 14(2), 295.
144. Acquaviva J, Wong R, & Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* 2009; 1795(1), 37-52.

145. Klempner SJ, & Ou, SH. *ROS1* (ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2015.
146. Pal P, & Khan Z. *ROS1*. Journal of clinical pathology, 2017; 70(12), 1001-1009.
147. Davies KD, & Doebele RC. Molecular pathways: *ROS1* fusion proteins in cancer. Clinical cancer research, 2013; 19(15), 4040-4045.
148. Eom M, Lkhagvadorj S, Oh SS, Han A, & Park KH. *ROS1* expression in invasive ductal carcinoma of the breast related to proliferation activity. Yonsei medical journal, 2013; 54(3), 650-657.
149. Tiash, S., Chua, M. J., & Chowdhury, E. H. (2016). Knockdown of *ROS1* gene sensitizes breast tumor growth to doxorubicin in a syngeneic mouse model. International Journal of Oncology, 48(6), 2359-2366.
150. Raut, A., Yeap, I., Mylchreest, L., Mills, J., Watson, N., & Gill, A. J. 20. *ROS1* immunohistochemistry is not a worthwhile screening test in breast carcinoma. Pathology, 2015, 47, S106.
151. Hu, H., Ding, N., Zhou, H., Wang, S., Tang, L., & Xiao, Z. (2021). A novel *CD74-ROS1* gene fusion in a patient with inflammatory breast cancer: a case report. Journal of Medical Case Reports, 15, 1-6.
152. Drilon, A., Jenkins, C., Iyer, S., Schoenfeld, A., Keddy, C., & Davare, M. A. (2021). *ROS1*-dependent cancers—biology, diagnostics and therapeutics. Nature reviews Clinical oncology, 18(1), 35-55.
153. Li, K., Liao, N., Chen, B., Zhang, G., Wang, Y., Guo, L., ... & Liao, N. (2020). Genetic mutation profile of Chinese HER2-positive breast cancers and genetic predictors of responses to Neoadjuvant anti-HER2 therapy. Breast Cancer Research and Treatment, 183, 321-332.

154. Gao, J., Yao, Y., Liu, C., Xie, X., Li, D., Liu, P., ... & Ren, R. (2023). Synergism of FAK and ROS1 inhibitors in the treatment of *CDH1*-deficient cancers mediated by FAK-YAP signaling. *International journal of biological sciences*, 19(9), 2711.
155. Chen, Y., Wang, W., Fang, L., Zhang, Z., & Deng, S. Identification of PTK2 as an adverse prognostic biomarker in breast cancer by integrated bioinformatics and experimental analyses. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9, 984564.
156. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, ... & Doebele RC. Identifying and targeting *ROS1* gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2012; 18(17), 4570-4579.
157. Gainor JF, & Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: *ROS1* and *RET* fusions. *The oncologist*, 2013; 18(7), 865.
158. Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, ... & Iafrate AJ. Crizotinib in *ROS1*-rearranged non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 2014; 371(21), 1963-1971.
159. Warth A, Muley T, Dienemann H, Goepfert B, Stenzinger A, Schnabel PA, ... & Weichert W. ROS 1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology*, 2014; 65(2), 187-194.
160. Lee KH, Lee KB, Kim TY, Han SW, Oh DY, Im SA, ... & Bang YJ. Clinical and pathological significance of ROS1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC cancer*, 2015; 15(1), 1-9.
161. Nagle, A. M., Levine, K. M., Tasdemir, N., Scott, J. A., Burlbaugh, K., Kehm, J., ... & Lee, A. V. (2018). Loss of E-cadherin Enhances IGF1-IGF1R pathway activation and sensitizes breast cancers to anti-IGF1R/InsR inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 24(20), 5165-5177.
162. Elangovan, A., Hooda, J., Savariau, L., Puthanmadhomnarayanan, S., Yates, M. E., Chen, J., ... & Lee, A. V.. Loss of E-cadherin Induces IGF1R Activation and

Reveals a Targetable Pathway in Invasive Lobular Breast Carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 2022; 20(9), 1405-1419.

163. Bajrami I, Marlow R, van de Ven M, Brough R, Pemberton HN, Frankum J, ... & Lord CJ. E-cadherin/ROS1 inhibitor synthetic lethality in breast cancer. *Cancer discovery*, 2018; 8(4), 498-515.

164. Lucchesi, J. C. Synthetic lethality and semi-lethality among functionally related mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1968, 59, 37–44 (1968).

165. Bender, A. & Pringle, J. R. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 1295–1305.

166. Setton, J., Zinda, M., Riaz, N., Durocher, D., Zimmermann, M., Koehler, M., ... & Powell, S. N. Synthetic lethality in cancer therapeutics: the next generation. *Cancer Discov.* 2021; 11: 1626–1635.

167. Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W. & Friend, S. H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*, 1997, 278, 1064–1068.

168. Noack S, Raab M, Matthes Y, Sanhaji M, Kramer A, Gyorffy B, et al. Synthetic lethality in *CCNE1*-amplified high grade serous ovarian cancer through combined inhibition of Polo-like kinase 1 and microtubule dynamics. *Oncotarget* 2018;9:25842–59.

169. Agostinetto, E., Nader-Marta, G., Paesmans, M., Ameye, L., Veys, I., Buisseret, L., ... & Aftimos, P. ROSALINE: a phase II, neoadjuvant study targeting ROS1 in combination with endocrine therapy in invasive lobular carcinoma of the breast. *Future Oncology*, 2022; 18(22), 2383-2392.

170. Van Baelen, K., Geukens, T., Maetens, M., Tjan-Heijnen, V., Lord, C. J., Linn, S., ... & Desmedt, C. Current and future diagnostic and treatment strategies for

patients with invasive lobular breast cancer. *Annals of Oncology*, 2022, 33(8), 769-785.

171. Mouabbi, J. A., Hassan, A., Lim, B., Hortobagyi, G. N., Tripathy, D., & Layman, R. M. Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2022, 193(2), 253-264.

172. Distrito Federal, Companhia de desenvolvimento do Distrito Federal (Codeplan), Atlas do Distrito Federal 2020, Capítulo 5, Meio Socioeconômico, Brasília, 2020.

173. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., ... & Schultz, N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2012, 2(5), 401-404

174. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., ... & Schultz, N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal, 2013, *Science signaling*, 6(269), p11-p11.

175. Hozhabri, H., Moghaddam, M. M., Moghaddam, M. M., & Mohammadian, A. A comprehensive bioinformatics analysis to identify potential prognostic biomarkers among CC and CXC chemokines in breast cancer. *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 10374.

176. McCarty Jr KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty Sr KS. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1985 Aug 1;109(8):716-21.

177. Fujii, S., Yoshino, T., Yamazaki, K., Muro, K., Yamaguchi, K., Nishina, T., ... & Tsuchihara, K. Histopathological factors affecting the extraction of high quality genomic DNA from tissue sections for next-generation sequencing. *Biomedical reports*, 2019, 11(4), 171-180.

178. Angerilli, V., Galuppini, F., Pagni, F., Fusco, N., Malapelle, U., & Fassan, M. The role of the pathologist in the next-generation era of tumor molecular characterization. *Diagnostics*, 2021, 11(2), 339.
179. Penault-Llorca, F., Kerr, K. M., Garrido, P., Thunnissen, E., Dequeker, E., Normanno, N., ... & Moch, H. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing—Part 1: Tissue collection and management. *Virchows Archiv*, 2022, 481(3), 335-350.
180. Nielsen, T. O., Leung, S. C. Y., Rimm, D. L., Dodson, A., Acs, B., Badve, S., ... & Hayes, D. F. Assessment of Ki67 in breast cancer: updated recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2021, 113(7), 808-819
181. Harbeck, N., Rastogi, P., Martin, M., Tolaney, S. M., Shao, Z. M., Fasching, P. A., ... & Graff, S. L. Adjuvant abemaciclib combined with endocrine therapy for high-risk early breast cancer: updated efficacy and Ki-67 analysis from the monarchE study. *Annals of Oncology*, 2021, 32(12), 1571-1581.
182. Johnston, S. R., Harbeck, N., Hegg, R., Toi, M., Martin, M., Shao, Z. M., ... & Rastogi, P. Abemaciclib combined with endocrine therapy for the adjuvant treatment of HR+, HER2-, node-positive, high-risk, early breast cancer (monarchE). *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(34), 3987.,
183. Krishnamurthy, K., Deb, A., Alghamdi, S., Schwartz, M., Cusnir, M., Sriganeshan, V., & Poppiti, R. ROS1 altered breast cancers—a distinctive molecular subtype of PR-metastatic breast cancers: Expanding the scope of targeted therapeutics. *Breast Disease*, 2022, 41(1), 295-301.
184. Stein, M. K., Morris, L. K., & Martin, M. G. Next-generation sequencing identifies novel RTK VUSs in breast cancer with an emphasis on ROS1, ERBB4, ALK and NTRK3. *Pathology & Oncology Research*, 2020, 26, 593-595.

185. Tsao, M. S., Hirsch, F. R., & Yatabe, Y. 2nd ed. Aurora IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. International Association for the Study of Lung Cancer. 2016.
186. Siraj, A. K., Beg, S., Jehan, Z., Prabhakaran, S., Ahmed, M., R Hussain, A., ... & Al-Kuraya, K. S. ALK alteration is a frequent event in aggressive breast cancers. *Breast Cancer Research*, 2015, 17(1), 1-12
187. Hanna, M. G., Najfeld, V., Irie, H. Y., Tripodi, J., & Nayak, A. Analysis of ALK gene in 133 patients with breast cancer revealed polysomy of chromosome 2 and no ALK amplification. *Springerplus*, 2015, 4, 1-6.
188. van der Kloet, F. M., Buurmans, J., Jonker, M. J., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. Increased comparability between RNA-Seq and microarray data by utilization of gene sets. *PLoS computational biology*, 2020, 16(9), e1008295

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial do ROS1 como marcador prognóstico e preditivo em carcinomas lobulares invasores de mama.

Pesquisador: Thiago David Alves Pinto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 26419920.3.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.326.978

Apresentação do Projeto:

Conforme projeto da Plataforma Brasil:

"Resumo:

O carcinoma lobular invasivo (CLI) é um tipo especial de câncer de mama e representa cerca de 10% dos casos. Até o momento não há tratamento específico para os CLIs. Porém, trabalho recente de Ilirjana Bajrami et al. (2018) relata letalidade sintética entre E-caderina deficiente e inibição da tirosina-kinase ROS1, em fase pré-clínica, com importante atividade antitumoral "in vitro" e "in vivo" de inibidores da tirosina-kinase ROS1. As comprovações da hiperexpressão homeostática de ROS1 por imuno-histoquímica (IHQ) em casos de carcinomas mamários com deficiência da expressão de E-caderina pode corroborar os achados pré-clínicos de Ilirjana Bajrami e colaboradores (2018), dando suporte a futuros estudos clínicos para determinação de eficácia de inibidores de tirosina-kinase. Além disso, pode-se estabelecer correlações clínico-patológicas, de cunho prognóstico, específicas com a expressão do ROS1. O objetivo desse estudo é analisar o potencial da expressão de ROS1, por IHQ, como marcador por meio de estudo retrospectivo experimental, no qual os dados de IHQ serão extraídos de blocos de parafina provenientes de casos de CLI entre os anos de 2015 e 2019."

Metodologia proposta:

"Dados clínico-patológicos:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

- Os casos serão pesquisados em prontuários físicos e digitais, além de laudos histopatológicos arquivados nos setores de patologia das instituições, quanto ao diagnóstico/ termos "carcinoma lobular invasor". Os casos positivos serão catalogados e dados clínico-patológicos como idade, sexo, estadiamento clínico, tipo de cirurgia, tipo histológico, grau histológico (formação tubular, grau nuclear e mitoses), invasão angiolinfática, invasão perineural, perfil imuno-histoquímico, subtipo molecular, tratamento hormonal/quimioterápico, sobrevida livre de doença e sobrevida global serão tabulados e analisados em comparação aos resultados da expressão do ROS1.*

Testes de IHQ:

- Reações de IHQ: As reações de IHQ para detecção da expressão da E-caderina e do ROS1 serão realizadas pelo método automatizado DAKO Autostainer Link48 (Dako, Glostrup, Denmark), utilizando DAKO Flex Kit, recuperação antigênica através de exposição a calor controlado em solução de PH alto, utilizando PTLINK DAKO, bloqueio endógeno com peroxidase (150 microlitros - 5 minutos), incubação com anticorpos primários (E-caderina - Clone NCH-38 - Anti-Human - Monoclonal Mouse - DAKO, diluição 1:100, 150 microlitros - 15 minutos) e (ROS1 - clone D4D6 - Monoclonal Rabbit - Cellsignal- diluição 1:250, 150 microlitros - 15 minutos), amplificação com LINKER (EnVision FLEX - DAKO)(150 microlitros - 15 minutos), reação com polímero (EnVision Flex/HRP) (150 microlitros - 20 minutos), revelação com cromógeno (300 microlitros - 5 minutos) e contracoloração com Hematoxilina (EnVision FLEX - 300 microlitros - 5 minutos). Os controles constarão na mesa lâmina/reação, sendo os "positivos" previamente determinados por imunohistoquímica e método molecular (FISH/PCR) e os "negativos" de tecido normal previamente determinado como não imunoreagente para o anticorpo.

- Análise das lâminas de IHQ: As lâminas de IHQ serão analisadas pelo doutorando, médico Patologista, e por Patologista experiente da equipe do laboratório laboratório privado de anatomia patológica (Alesso Cervantes Sartorelli). Ambos participam e possuem certificação de instituições de controle de qualidade nacionais (PICQ) no âmbito de patologia. Os casos serão analisados quanto ao padrão de expressão dos receptores: membrana, citoplasma ou ambos; além da intensidade da expressão (fraca, moderada ou forte), no intuito de estabelecer escore de classificação. Serão avaliadas uma lâmina por marcador, por caso. Serão fotografados 3 campos em cada amostra.*

*Análise estatística:

- Os dados serão tabulados em conjunto com informes gerais como idade, sexo, tipo e grau histológico e estadiamento. E analisados estatisticamente por métodos apropriados quanto a amostra,

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsurb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

variável e resultados almejados. Os resultados dos testes serão analisados pelo método qui-quadrado.”

***Aspectos Éticos:**

Os princípios enunciados na Declaração de Helsinque 31 serão respeitados, mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados serão identificados apenas pelo número de registro no projeto. Os mesmos não serão submetidos a procedimentos invasivos para obtenção de amostras uma vez que as mesmas são blocos de parafina arquivados no laboratório privado de anatomia patológica e do hospital público terciário e são provenientes de procedimentos cirúrgicos prévios com indicação específica. Portanto não haverá custos para os pacientes e caso venham a surgir estarão garantidos pelo pesquisador responsável. As amostras serão utilizadas com parcimônia, resguardando os critérios de exclusão que visam proteger a reserva de material para estudos futuros de interesse do paciente. Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.”

“Critério de Inclusão: Serão selecionados blocos de parafina de peças cirúrgicas (mama) contendo CLI, da casuística de laboratório privado de anatomia patológica e de hospital público terciário, entre os anos de 2015 e 2019. Estes serviços possuem média anual de 45 casos de CLI, em conjunto.”

“Critério de Exclusão: - Casos duplicados, atendidos em mais de um serviço.

- Casos com material (blocos de parafina) já retirado dos serviços pelo paciente e que não foram devolvidos.
- Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de IHQ. Peças cirúrgicas geralmente possuem de três a quatro blocos de lesão arquivados. Sendo assim os blocos excedentes ficarão resguardados para estudos futuros de necessidade dos pacientes. Além disso há grande probabilidade de que o bloco estudado permaneça, ao final do estudo, com grande quantidade de material disponível para novas pesquisas.
- Espécimes inadequados para estudo molecular e por IHQ. A adequabilidade de fixação é avaliada através de sinais de autólise e capacidade tintorial em análise das lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E).

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

- Casos que em o paciente não estiver de acordo com os termos da pesquisa e /ou não assinar o TCLE, autorizando acesso ao prontuário e ao material biológico para realização da pesquisa. Salvo os casos em que não for possível aplicar o TCLE, para os quais será solicitada dispensa de aplicação do termo. Serão considerados casos sem possibilidade de aplicação do TCLE, aqueles em que o paciente não tiver registros de número de telefone ou e-mail, ou que havendo, não seja obtida resposta após três contatos (telefônicos ou e-mail) em um intervalo de 15 dias, devidamente registrados nos arquivos da pesquisa."

Objetivo da Pesquisa:

Conforme projeto da Plataforma Brasil:

"Objetivo Primário: Analisar o potencial da expressão de ROS1, por imuno-histoquímica (IHQ), como marcador prognóstico em carcinomas lobulares invasores (CLIs) da mama.

Objetivo Secundário:

- a) Pesquisar a expressão membrano-citoplasmática da E-caderina e do ROS1 por IHQ nos casos selecionados de CLI, utilizando o anticorpo monoclonal anti-ROS1 D4D6;
- b) Estabelecer Escore de classificação referente ao padrão membrano-citoplasmático de marcação do ROS na IHQ.
- c) Testar se há correlação entre a expressão dos dois marcadores (ROS1 e E-caderina).
- d) Correlacionar os dados clínico-patológicos com os resultados da E-caderina e do ROS1, especialmente com dados de relevância prognóstica (por exemplo grau histológico, perfil imuno-histoquímico, sobrevida, entre outros)."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos: o principal risco do estudo é o consumo do material biológico do tumor arquivado em bloco de parafina. Para minimizar esse risco foi adotado o seguinte critério de exclusão: "Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de IHQ. Peças cirúrgicas geralmente possuem de três a quatro blocos de lesão arquivados. Sendo assim os blocos excedentes ficarão resguardados para estudos futuros de necessidade dos pacientes. Além disso há grande probabilidade de que o bloco estudado permaneça, ao final do estudo, com grande quantidade de material disponível para novas pesquisas." A confidencialidade dos pacientes será mantida com identificação própria para o estudo."

"Benefícios: As comprovações da hiperexpressão homeostática de ROS1 por imuno-histoquímica

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

(IHQ) em casos de carcinomas mamários com deficiência da expressão de E-caderina, pode corroborar os achados pré-clínicos de Ilirjana Bajrami e colaboradores (2018), dando suporte a futuros estudos clínicos para determinação de eficácia de inibidores de tirosina-kinase, até mesmo medicamentos já licenciados como o crizotinib. Além disso, pode-se estabelecer correlações clínico-patológicas, de cunho prognóstico, específicas com a expressão do ROS1."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de Projeto de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, de Thiago David Alves Pinto, sob orientação do Prof. Diego Madureira de Oliveira. Consta ainda na equipe de pesquisa João Nunes de Matos Neto.

Conforme o pesquisador, a pesquisa tem como objetivo "Analisar o potencial da expressão de ROS1, por imuno-histoquímica (IHQ), como marcador prognóstico em carcinomas lobulares invasores (CLIs) da mama".

Serão levantados dados clínico-patológicos em prontuários e testes de IHQ, realizados com "blocos de parafina de peças cirúrgicas (mama) contendo CLI, da casuística de laboratório privado de anatomia patológica e de hospital público terciário, entre os anos de 2015 e 2019".

Embora tamanho da amostra previsto seja de 97 participantes, foi informado que o número de indivíduos em grupo será 0, pois não haverá intervenção.

São centros coparticipantes da pesquisa o Instituto Hospital de Base do Distrito Federal e o Diagnóstico Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia S.S. LTDA, locais onde o pesquisador responsável trabalha, de acordo com o currículo lattes.

Segundo o cronograma apresentado, ocorrerá entre novembro e dezembro/2020 o "Levantamento e seleção dos casos de CLI dos registros dos laboratório e hospital terciário", estando a coleta de amostras e dados prevista para ocorrer entre dezembro/2020 e janeiro/2021.

O orçamento informado foi no valor de R\$ 6.300,00, consistindo em material de escritório, papelaria e informática e anticorpos específicos, de custeio próprio.

O pesquisador solicitou dispensa de TCLE, dentre outras justificativas, pois "As amostras da pesquisa são oriundas de pacientes oncológicos que muitas vezes possuem sobrevida restrita e se submetem a tratamento em diversos estados da federação, impedindo sua localização devido ao óbito ou a sua condição de migração. Adjunto a isso muitos casos não têm registro de telefone ou domicílio suficientes para sua localização."

Conforme deliberação do CEP, não é autorizada a dispensa do TCLE, exceto nos casos em que não seja possível, após 3 tentativas, entrar em contato com o participante de pesquisa.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos analisados para emissão do presente parecer:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1426480.pdf", postado em 21/09/2020.
2. Carta de respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 4.276.667: "Carta_resposta_pendencias_CEP_2276667.pdf" e versão editável "CARTA_DE_RESPOSTAS_AS_PENDENCIAS_APONTADAS_PELo_CEP_2276667.docx", postados em 21/09/2020.
3. Projeto detalhado: "PROJETO_DOUTORADO_CEP_setembro2020.docx", postado em 20/09/2020.
4. Modelo de TCLE: "TCLE_v2_setembro2020.docx", postado em 20/09/2020.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas nos Pareceres consubstanciados Nos. 3.934.688, 4.183.334 e 4.276.667:

1. Embora o pesquisador afirme que "As amostras da pesquisa são oriundas de pacientes oncológicos que muitas vezes possuem sobrevida restrita e se submetem a tratamento em diversos estados da federação, impedindo sua localização devido ao óbito ou a sua condição de migração. Adjunto a isso muitos casos não têm registro de telefone ou domicílio suficientes para sua localização.", o prontuário sempre pertence ao paciente e só podem ser divulgados com sua autorização ou a de seu responsável (Res. CFM No. 1.821/2007), e ainda a propriedade do material biológico é SEMPRE do participante de pesquisa.

1.1 O CEP/FS acata a dispensa de TCLE para os casos em que de fato o contato com o paciente ou familiar não seja possível. Contudo, solicita-se que seja apresentada na metodologia quais medidas serão adotadas para se obter o consentimento do paciente e/ou familiares. Por exemplo, o número de ligações telefônicas para estabelecer contato.

RESPOSTA: "Foi acrescentado no item do projeto "Metodologia - Critérios de exclusão", último parágrafo com a seguinte redação: "Casos que em o paciente não estiver de acordo com os termos da pesquisa e /ou não assinar o TCLE, autorizando acesso ao prontuário e ao material biológico para realização da pesquisa. Salvo os casos em que não for possível aplicar o TCLE, para os quais será solicitada dispensa de aplicação do termo. Serão considerados casos sem possibilidade de aplicação do TCLE, aqueles em que o paciente não tiver registros de número de telefone ou

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-000
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

e-mail, ou que havendo, não seja obtida resposta após três contatos (telefônicos ou e-mail) em um intervalo de 15 dias, devidamente registrados nos arquivos da pesquisa.”.

ANÁLISE: Para que seja excluído o participante deve ter sido previamente incluído e a concordância em participar da pesquisa é direito e não condição. Desta forma, solicita-se que seja retirado tal parágrafo dos critérios de inclusão e a informação sobre casos em que não seja possível aplicar o TCLE em outro local do projeto detalhado e da Plataforma Brasil. **PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA**

RESPOSTA2: “o parágrafo sobre a aplicação do TCLE foi retirado de “Critérios de exclusão” e realocado como segundo parágrafo de “Aspectos éticos” com os seguintes dizeres: “Será aplicado TCLE, solicitando autorização para acesso ao prontuário e ao material biológico para realização da pesquisa. Salvo os casos em que não for possível aplicar o TCLE, para os quais será solicitada ao CEP/FS/UnB dispensa de aplicação do termo. Serão considerados casos sem possibilidade de aplicação do TCLE, aqueles em que o paciente não tiver registros de número de telefone ou e-mail, ou que havendo, não seja obtida resposta após três contatos (telefônicos ou e-mail) em um intervalo de 15 dias, devidamente registrados nos arquivos da pesquisa.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.2 Solicita-se que seja apresentado modelo de TCLE a ser apresentado aos participantes de pesquisa que estão ainda sendo atendidos no serviço ou que forem contatados informando o acesso do prontuário e dos materiais biológicos para a realização da pesquisa.

RESPOSTA: “Foi redigido TCLE de acordo com modelo fornecido pelo CEP, adaptando-o para as particularidades da pesquisa, de acordo com os termos solicitados acima. O mesmo conta em anexo aos documentos da pesquisa na plataforma Brasil em formatos PDF e word.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.3 Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros. Solicita-se que tal informação conste do projeto detalhado, projeto da Plataforma Brasil e modelo de TCLE.

RESPOSTA: “Foi acrescentado no item do projeto “Metodologia - Aspectos éticos”, segundo parágrafo com a seguinte redação: “Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.”.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

ANÁLISE: Tal informação foi incluída no projeto detalhado e na Plataforma Brasil, porém não consta no TCLE. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RESPOSTA 2: "Foi acrescentado ao TCLE parágrafo com os seguintes dizeres "Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Todas as pendências foram atendidas.

Não há óbices éticos para a realização do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, inc. V, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

A realização das atividades do projeto na instituição coparticipante está condicionada à aprovação pelo CEP responsável, o CEP-IGESDF.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1426480.pdf	21/09/2020 21:55:54		Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTAS_AS_PENDÊNCIAS_APONTADAS_PELo_CEP_2276667.docx	21/09/2020 21:53:11	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_CEP_2276667.pdf	21/09/2020 21:49:09	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOUTORADO_CEP_setembro2020.docx	20/09/2020 20:19:08	Thiago David Alves Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v2_setembro2020.docx	20/09/2020 20:18:49	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PENDENCIAS_CEP_4183334.pdf	02/08/2020 16:55:15	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTAS_AS_PENDÊNCIAS_APONTADAS_PELo_CEP_418	02/08/2020 16:51:58	Thiago David Alves Pinto	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

**UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.326.978

Outros	.docx	02/08/2020 16:51:58	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTAS_AS_PENDE NCIAS_APONTADAS_PELo_CEP.docx	08/07/2020 16:35:37	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_CEP.pdf	08/07/2020 16:33:42	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONCORDANCIA_DA_IN STITUICAO_PROPONENTE_word.docx	05/07/2020 16:41:49	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Declaração de concordância	Termo_de_concordancia_instituicao_pro ponente.pdf	05/07/2020 16:35:34	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	declaracao_de_aluno_regular.pdf	24/01/2020 21:09:15	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Carta_encaminhamento_DiegoAssinado .pdf	21/01/2020 23:44:23	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	cartaencaminhprojeto_ao_CEPFS_word. docx	21/01/2020 23:41:47	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Termo_responsabilidade_FS.pdf	21/01/2020 23:39:13	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	TERMO_DE_RESPONSABILIDADE_E_ COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_ RESPONSAVEL_word.docx	21/01/2020 23:38:42	Thiago David Alves Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SOLICITACAO_DE_DISPENSA_DE_TC LE_word.docx	21/01/2020 23:36:19	Thiago David Alves Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_req_dispensa_TCLE.pdf	21/01/2020 23:34:35	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Termo_de_Coparticipacao_Diagnose_w ord.docx	21/01/2020 23:34:04	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Termo_De_Coparticipacao_Institucional DIAGNOSE.pdf	21/01/2020 23:32:49	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Orçamento	PLANILHA_DE_ORCAMENTO_word.do cx	21/01/2020 23:31:56	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Termo_de_coparticipacao_IGESDF.pdf	21/01/2020 23:29:26	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Outros	Termo_de_coparticipacao_IGESDF_wor d.docx	21/01/2020 23:28:27	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CEP_FS.pdf	21/01/2020 23:16:41	Thiago David Alves Pinto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	16/01/2020 20:15:31	Diêgo Madureira de Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Joao_Nunes.pdf	16/01/2020 20:15:02	Diêgo Madureira de Oliveira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Diego_Madureira.pdf	16/01/2020 20:14:43	Diêgo Madureira de Oliveira	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

ANEXO 1

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.326.978

Outros	Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_L attes_Thiago_David_Alves_Pinto.pdf	19/12/2019 00:35:07	Thiago David Alves Pinto	Aceito
--------	--	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 07 de Outubro de 2020

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador(a))

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsurib@gmail.com

ANEXO 2



Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **Análise do potencial do ROS1 como marcador prognóstico e preditivo em carcinomas lobulares invasores de mama**, sob a responsabilidade do pesquisador Thiago David Alves Pinto, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB. O projeto consta de análise de dados em prontuário e estudo imuno-histoquímico em blocos de parafina de tecido tumoral. O objetivo desta pesquisa é analisar o potencial da expressão de ROS1, por imuno-histoquímica, como marcador de acontecimentos futuros em carcinomas lobulares invasores da mama.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de autorizar o acesso aos dados de seu prontuário e dos materiais biológicos (blocos de parafina) para a realização da pesquisa.

O risco decorrente de sua participação na pesquisa é o consumo do material biológico do tumor arquivado em bloco de parafina. Para minimizar esse risco foi adotado o seguinte critério de exclusão: "Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de imuno-histoquímica. Se o(a) senhor(a) aceitar participar, estará contribuindo para que, caso hajam comprovações da hiperexpressão homeostática de ROS1 por imuno-histoquímica (IHQ) em casos de carcinomas mamários com deficiência da expressão de E-caderina, essas possam corroborar os achados pré-clínicos, dando suporte a futuros estudos clínicos, para o uso de medicamentos já licenciados como o crizotinib. Além disso, pode-se estabelecer correlações clínico-patológicas, de cunho prognóstico, específicas com a expressão do ROS1.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração. Todas as despesas que o(a) senhor(a) tiver relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o(a) senhor(a) deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Thiago David Alves Pinto no Laboratório Diagnóstico, no respectivo telefone (61) 3244-0822, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou para o email thiagodap@hotmail.com.

Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@umb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Além disso, como a IGESDF é coparticipante desta pesquisa, este projeto também foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IGESDF. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3315-1675 ou e-mail: gipc@igesdf.com.br.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Nome e assinatura do Participante de Pesquisa

Thiago David Alves Pinto - Pesquisador responsável



Diagnose
Brasília - DF



Relatório detalhado da lâmina

Caso JH
EC22000009
Nome

Caso HE
OLS/B275315-1
Patologista
Thiago

N.º da lâmina 96396
Zonas de gotejame AS3330D1403 - 3 : 10
Secagem de lâmi

N.º de lâm. externa DLx5100-000096396
Dispositivo de coloração - suporte : posi
Programado 22/06/2022 08:15:18

Bloco

Tipo

Preparação FFFPE
Concluído 22/06/2022 15:25:59

Desparafiniz.

Recup. Antigenica FLEX TRS High
Usuário Calixto, Gustavo

Protocolo E-Cadherin
Controle

Notas sobre a lâm.

Código	Nome do reagente	Volume (µL)	Incubação	Registro da lâmina
SM801	Buffer	0	0	22/06/2022 10:55:22
	FLEX Peroxidase Block	100	5	22/06/2022 10:55:22
	Buffer	0	0	22/06/2022 12:20:23
IR059	E-Cadherin	100	20	22/06/2022 12:49:11
	Buffer	0	0	22/06/2022 12:49:12
SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	100	15	22/06/2022 12:51:34
	Buffer	0	0	22/06/2022 13:04:58
SM802	FLEX/JHRP	100	20	22/06/2022 13:10:07
	Buffer	0	0	22/06/2022 13:28:39
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	22/06/2022 13:49:26
	Buffer	0	0	22/06/2022 13:58:21
	DI Water	0	0	22/06/2022 14:13:24
				22/06/2022 14:18:17
				22/06/2022 14:38:22
				22/06/2022 14:43:49
				22/06/2022 15:05:37
				22/06/2022 15:15:46
				22/06/2022 15:25:55
				22/06/2022 15:25:55

Impresso por: Calixto, Gustavo
Impresso em: 15/06/2023 15:11:22

Versão: 4.2.5.1
Página 1



Diagnose
Brasília - DF



Relatório detalhado da lâmina

Caso IH
ECZ2000009
Name
Caso HE
OLS/B27/5315-1
Patologista
Thiago

N.º da lâmina 100785 N.º de lâm. externa DLX5100-000100785 Bloco ROS-1 D
Zonas de gotejamento AS3330D1403 - 3 : 4 Dispositivo de coloração - suporte : posiç. Programado Tipo Preparação FFPPE Desparafin. Recup. Antigenica Protocolo
AS3330D1403 - 3 : 4 Secagem de lâmi 18/08/2022 09:48:52 18/08/2022 16:35:08 Concluido 18/08/2022 16:35:08 FLEX TRS High ROS-1 D
 Controle Notas sobre a lam.

Código	Nome do reagente	Volume (µL)	Incubação	Registro da lâmina
SM801	Buffer	0	0	18/08/2022 12:26:22 PT Link Run started. Instrument: "PT3 - MY2145P525" PT3 - MY2145P525, Left tank
	FILEX Peroxidase Block	100	5	18/08/2022 12:26:22 TR Fluid: Fluid: FLEX TRS High - Lot: 11364082 - Made: 8/16/2022 - Expir.: 1/31/2023 - Uses: 2/3
	Buffer	0	0	18/08/2022 13:53:16 PT Link Run finished.
	ROS-1 D	100	30	18/08/2022 14:05:48 Coloração iniciada
	Buffer	0	0	18/08/2022 14:05:48 Run ID:2183
SM805	FILEX+ Rabbit (LINKER)	100	15	18/08/2022 14:07:22 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
	Buffer	0	0	18/08/2022 14:20:37 Soprar e aplicar 100 µL ENVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (41361636 2022-10-31) [1,2]
SM802	FILEX /HRP	100	20	18/08/2022 14:25:46 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
	Buffer	0	0	18/08/2022 14:31:43 Soprar e aplicar 100 µL ROS-1 Diag (00000048 2026-08-31) [1,2]
	Buffer	5	5	18/08/2022 15:01:52 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
SM803	FILEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	18/08/2022 15:14:20 Soprar e aplicar 100 µL ENVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (41386233 2022-12-31) [1,2]
	Buffer	0	0	18/08/2022 15:29:29 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
	DI Water	0	0	18/08/2022 15:31:21 Soprar e aplicar 100 µL ENVision FLEX /HRP (41351096 2022-10-31) [1,2]
				18/08/2022 15:51:25 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
				18/08/2022 15:55:58 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
				18/08/2022 16:11:33 Soprar e aplicar 200 µL Substrate Working Solution (mix) (41361648 2022-11-30) [1,2]
				18/08/2022 16:21:43 Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Criado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
				18/08/2022 16:35:04 Lavado com água
				18/08/2022 16:35:04 Coloração concluída



Diagnose
Brasília - DF



Relatório detalhado da lâmina

Case ID EG22000009	Case HE OLS/B2/5315-1
Name Name	Patologista Thiago

N.º da lâmina 97747 N.º de lâm. externa DLx5100-000097747 Bloco 11/07/2022 08:49:59 Tipo Programado

Zonas de gotejame AS3330D1403 - 1 : 6 Dispositivo de coloração - suporte : posi: Secagem de lâmli

Preparação FFPE Concluído 11/07/2022 15:06:04 Desparafiniz. Recup. Antigenica FLEX TRS Low Usuário Calixto, Gustavo

Protocolo P.120 Cat D Controle Notas sobre a lâm.

Código	Nome do reagente	Volume (µl)	Incubação	Registro da lâmina
SM801	Buffer	0	0	11/07/2022 10:52:13
	FLEX Peroxidase Block	100	5	11/07/2022 10:52:13
	Buffer	0	0	11/07/2022 12:15:42
	P.120 Cat D	100	30	11/07/2022 12:15:42
	Buffer	0	0	11/07/2022 12:35:21
SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	100	15	11/07/2022 12:35:45
	Buffer	0	0	11/07/2022 12:40:10
SM802	FLEX /HRP	100	20	11/07/2022 12:45:16
	Buffer	0	0	11/07/2022 13:00:09
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	11/07/2022 13:30:18
	Buffer	0	0	11/07/2022 13:42:48
	DI Water	0	0	11/07/2022 13:57:57
				11/07/2022 14:02:54
				11/07/2022 14:23:01
				11/07/2022 14:28:28
				11/07/2022 14:37:00
				11/07/2022 14:47:55
				11/07/2022 15:06:00
				11/07/2022 15:06:00



Diagnose
Brasília - DF



Relatório detalhado da lâmina

Caso HE
EC22000009
Name
Caseo HE
OLS/B2/5315-1
Patologista
Thiago

N.º da lâmina 94278
Zonas de gotelame AS330D1403 - 1 : 9
Secagem de lâmi

N.º de lam. externa DLx5100-000094278
Dispositivo de coloração - suporte : posi

Bloco Programado
Tipo 30/05/2022 10:11:24

Preparação FPE
Concluído 30/05/2022 17:36:18

Desparafiniz.
Recup Antigenica FLEX TRS High
Usuário Calixto, Gustavo

Protocolo Beta-Catenin
Controle

Notas sobre a lâm.

Código	Nome do reagente	Volume (µL)	Incubação	Registro da lâmina
	Buffer	0	0	30/05/2022 13:57:27
SM801	FLEX Peroxidase Block	100	5	30/05/2022 13:57:27
	Buffer	0	0	30/05/2022 15:24:01
IR702	Beta-Catenin	100	20	30/05/2022 15:35:31
	Buffer	0	0	30/05/2022 15:35:31
SM802	FLEX /HRP	100	20	30/05/2022 15:36:08
	Buffer	0	0	30/05/2022 15:41:08
	Buffer	5	5	30/05/2022 15:46:16
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	200	10	30/05/2022 16:01:48
	Buffer	0	0	30/05/2022 16:21:56
	DI Water	0	0	30/05/2022 16:23:19
				30/05/2022 16:43:27
				30/05/2022 16:58:32
				30/05/2022 17:07:24
				30/05/2022 17:17:32
				30/05/2022 17:36:14
				30/05/2022 17:36:14

PT Link Run started. Instrument: "PT+ PTL, Right tank
TR Fluid: Fluid: FLEX TRS High - Lot: 11364082 - Made: 30/05/2022 - Expires: 31/01/2023 - Uses: 2/3
PT Link Run finished.
Coloração iniciada
Run ID:2064
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Soprar e aplicar 100 µL ENVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (11364198,2022-10-31) [1,2]
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Soprar e aplicar 100 µL FLEX Beta-Catenin, MxH (Beta-Catenin-1) (41236405,2022-05-31) [1,2]
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Soprar e aplicar 100 µL ENVision FLEX /HRP (11388386,2022-12-31) [1,2]
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Soprar e aplicar 200 µL Substrate Working Solution (rmh) (11388380,2023-02-28) [1,2]
Lavado com tampão (Lote:11314216, Tipo:Wash Buffer, K8007, Chado:2022-03-01, Vencimento:2022-08-31)
Lavado com água
Coloração concluída



Diagnose
Brasília - DF



Relatório detalhado da lâmina

Caso HI EC22000006	Caso HE CRS/B33815-3
Name Thiago	Patologista Thiago

N.º da lâmina 118702 N.º de lam. externa DLX5100-000118702 Bloco AS3300D1403 - 4 : 1 Tipo Programado 30/06/2023 06:23:02 Preparação FFPE Concluído 30/06/2023 13:45:21 Desparafinizar Recup. Antigênica FLEX TRS High Usuário Calixto, Gustavo Protocolo ALK5a4 D Controle Notas sobre a lam.

Zonas de gotelame Dispositivo de coloração - suporte : posi: Programado 30/06/2023 06:23:02 Secagem de lâmli

Código	Nome do reagente	Volume (µL)	Incubação	Registro da lâmina
	Buffer	0		30/06/2023 09:34:53
	ALK5a4 D	100	30	30/06/2023 09:34:53
	Buffer	0		30/06/2023 11:00:02
SM801	FLEX Peroxidase Block	100	5	30/06/2023 11:00:02
	Buffer	0		30/06/2023 11:14:00
SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	100	15	30/06/2023 11:16:19
	Buffer	0		30/06/2023 11:39:19
SM802	FLEX/HRP	100	20	30/06/2023 12:09:20
	Buffer	0		30/06/2023 12:09:58
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	100	5	30/06/2023 12:15:00
SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	100	5	30/06/2023 12:17:03
	Buffer	0		30/06/2023 12:32:02
	DI Water	0		30/06/2023 12:39:46
				30/06/2023 12:59:48
				30/06/2023 13:06:11
				30/06/2023 13:19:07
				30/06/2023 13:24:13
				30/06/2023 13:29:18
				30/06/2023 13:45:17
				30/06/2023 13:45:17

ANEXO 8

 Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 1/14
ROS1			

1. Informação do anticorpo:

Anticorpo	<i>ROS1</i>
Marca	Cell Signaling
Clone	D4D6
Diluição	1 µl <i>ROS1</i> / 250 µl diluente
ID do lote	9
Bula em anexo	sim
Validade	junho de 2024

2. Embasamento científico:

ROS1, um receptor tirosina quinase órfão da família dos receptores de insulina, foi inicialmente identificado como um homólogo de v-ros do vírus do sarcoma UR2 ⁽¹⁾. O ROS1 consiste em um grande domínio extracelular composto por seis repetições de fibronectina, um domínio transmembranar e um domínio quinase C-terminal. Sendo um receptor órfão, as funções de ROS1 não são bem conhecidas, embora tenha sido demonstrado que desempenha um papel importante na diferenciação do epitélio epididimal ⁽²⁾. A primeira fusão oncogênica de ROS1, foi inicialmente identificada por estudos de pesquisa em glioblastoma ⁽³⁾, e estudos subsequentes encontraram essa fusão em colangiocarcinoma ⁽⁴⁾, câncer de ovário ⁽⁵⁾ e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) ⁽⁶⁾. Os investigadores encontraram proteínas de fusão ROS1 oncogênicas adicionais em NSCLC (com uma frequência de ~ 1,6%), onde o domínio ROS1 quinase é fundido à região amino-terminal de várias proteínas diferentes, incluindo CD74 e SLC34A2 ⁽⁶⁻⁸⁾. As proteínas de fusão ROS1 ativam as vias SHP-2 fosfatase, PI3K/Akt/mTOR, Erk e Stat3 ^(3,4,9). Existem dois locais de autofosforilação (Tyr2274, Tyr2334) a jusante do domínio quinase de ROS1, qualquer um dos quais pode servir como biomarcadores da atividade da quinase ROS1, incluindo a das proteínas de fusão ROS1 ⁽¹⁰⁾.

ANEXO 8

 Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 2/14
ROS1			

3. Metodologia da validação:

Foram selecionadas dez amostras de tumor (carcinoma/ adenocarcinoma), dos arquivos do Laboratório Diagnose, previamente testadas em painel somático tumores sólidos (FoundationOne® CDX), em laboratório de referência (Foundation Medicine). FoundationOne® CDX é um sequenciamento de nova geração (NGS) baseado em ensaio que identifica descoberta genômicas em centenas de genes relacionados ao câncer. Duas amostras (M21000248 e M22000093) apresentaram fusão *CD74::ROS1* e uma delas (M23000040) apresentou a fusão *SDC4::ROS1* e sete amostras não demonstraram mutação para o gene ROS1.

O médico patologista condutor da validação definiu o tecido tumoral parafinado da amostra previamente coletado a ser utilizado na validação. As etapas técnico-metodológicas das reações imunoistoquímicas foram realizadas como orientado em bula do anticorpo e POP de imunoistoquímica do laboratório Diagnose (DIAG ANP POP 10).

Após definido o tecido, seguimos com a análise do anticorpo ROS1, a qual obtivemos 100% de concordância nos casos analisados (Ilustrações em anexo).

4. Identificação das amostras e resultado:

Amostra (Am)	Topografia da amostra	Tipo de amostra	Foundation One CDx /Resultado	Imunoistoquímica/ Resultado
A21019371 M21000248 H21002775	Pulmão	Adenocarcinoma	ROS1 + CD74-ROS1 fusion	ROS1 (clone D4D6) + (forte expressão)
220301756 M22000093 VL23000015	Linfonodo	Adenocarcinoma	ROS1 + CD74-ROS1 fusion	ROS1 (clone D4D6) +
A23002783 M23000040 H23000314	Pulmão	Adenocarcinoma	ROS1 + SDC4-ROS1 fusion	ROS1 (clone D4D6) +
A22015698 M23000002 H22002183	Pulmão	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -

ANEXO 8

 Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 3/14
ROS1			

Amostra (Am)	Topografia da amostra	Tipo de amostra	FoundationO ne CDx /Resultado	Imunoistoquímica/ Resultado
A22022462 M23000003 H22002978	Pulmão	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -
A23000036 M23000008 H23000007	Lesão cerebral	carcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -
B22003453 M23000011 H22002754	Pulmão	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -
A23000521 M23000017 H23000087	Transbrônquica	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -
A23008487 M23000089 H23000996	Linfonodo	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -
A23007966 M23000092 H23000990	Broncoalveolar	Adenocarcinoma	ROS1 -	ROS1 (clone D4D6) -

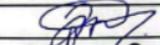
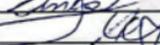
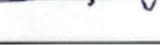
5. Referências bibliográficas:

1. Matsushime, H. et al. (1986) Mol Cell Biol 6, 3000-4.
2. Yeung, CH et al. (1999) Biol Reprod 61, 1062-9.
3. Charest, A. et al. (2003) Genes Chromosomes Cancer 37, 58-71.
4. Gu, TL et ai. (2011) PLoS One 6, e15640.
5. [Birch, AH et ai. \(2011\) PLoS One 6, e28250.](#)
6. Rimkunas, VM et al. (2012) Clin Cancer Res 18, 4449-57.
7. Rikova, K. et ai. (2007) Cell 131, 1190-203.
8. Stumpfova, M. e Jänne, PA (2012) Clin Cancer Res 18, 4222-4.
9. Jun, HJ et al. (2012) Câncer Res 72, 3764-74.
10. Zou, HY et al. (2015) Proc Natl Acad Sci USA 112, 3493-8.

ANEXO 8

 Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 4/14
ROS1			

6. Validação:

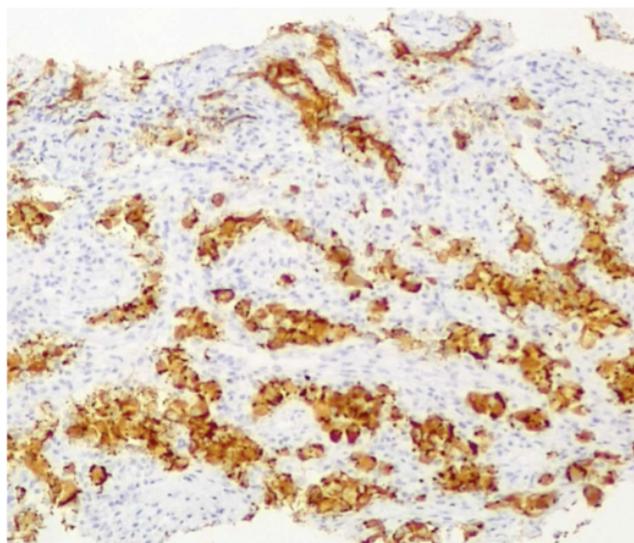
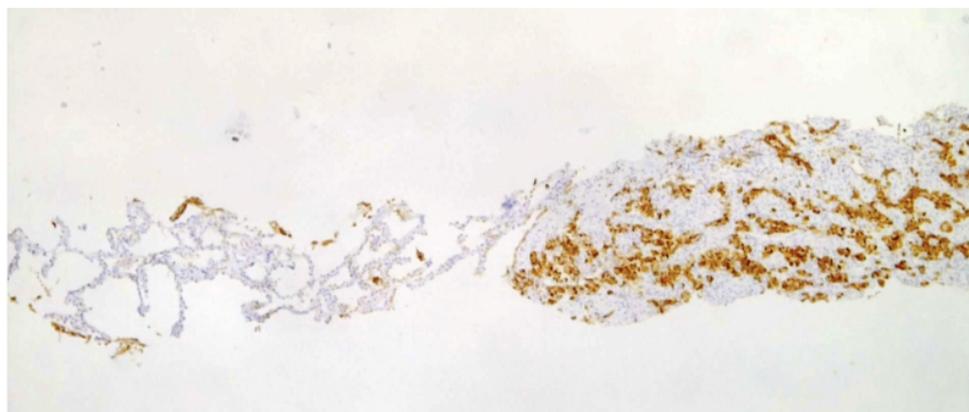
Função	Nome	Assinatura
Elaboração	Jacilene Muniz Passos	
Revisão	Maykon Dérberson M. Carvalho	
Aprovação	Thiago David Alves Pinto	
Aprovação	Alesso Cervantes Sartorelli	
Data: 05/06/2023		

ANEXO 8

DIAGNOSE Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 5/14
ROS1			

ANEXO 1

M21000248 - CD74:: ROS1 / H21002775 - A21019371 - ROS1 (D4D6) POSITIVO

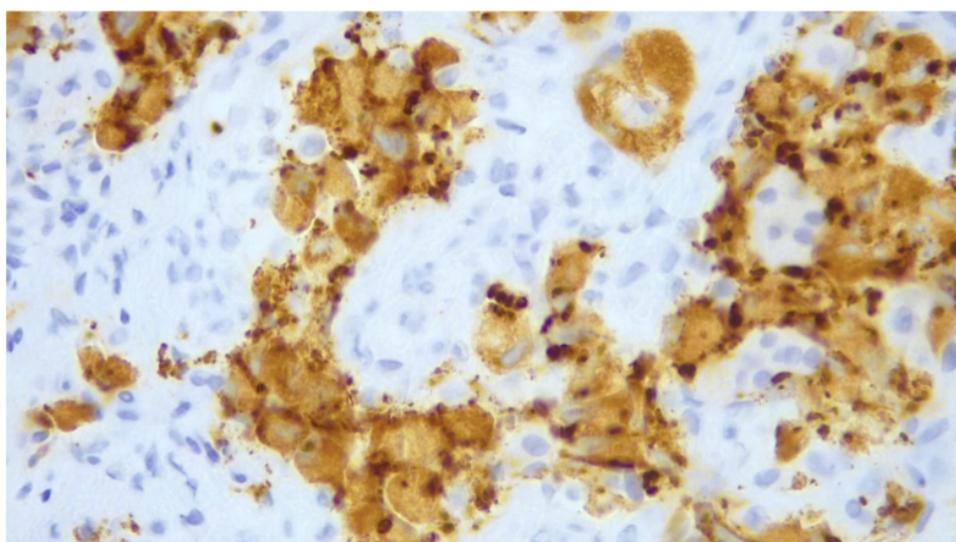
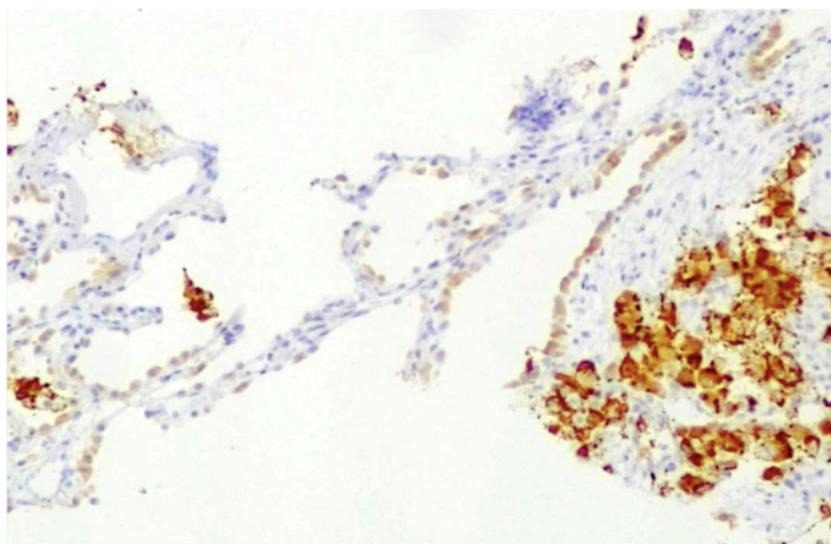


Diagnose Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia Ltda

SGAS 910, conj. B, Ed. Mix Park Sul, Bloco B - Térreo, Brasília-DF Tel: (61) 3443-0961

ANEXO 8

DIAGNOSE Anatomia Patológica e Citologia	Validação de Anticorpo		
	Versão 231.1	Código DIAG ANP VALID 08	Página 6/14
ROS1			



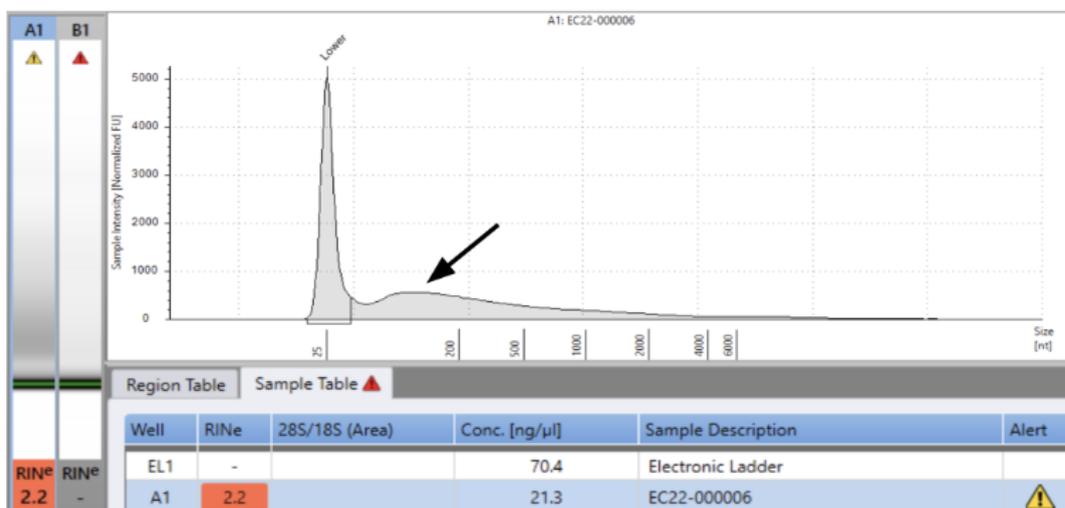
Anexo 1 - Células neoplásicas demonstrando positividade citoplasmática difusa.
Estroma, parênquima pulmonar alveolar, endotélio e células inflamatórias negativos.

ANEXO 9

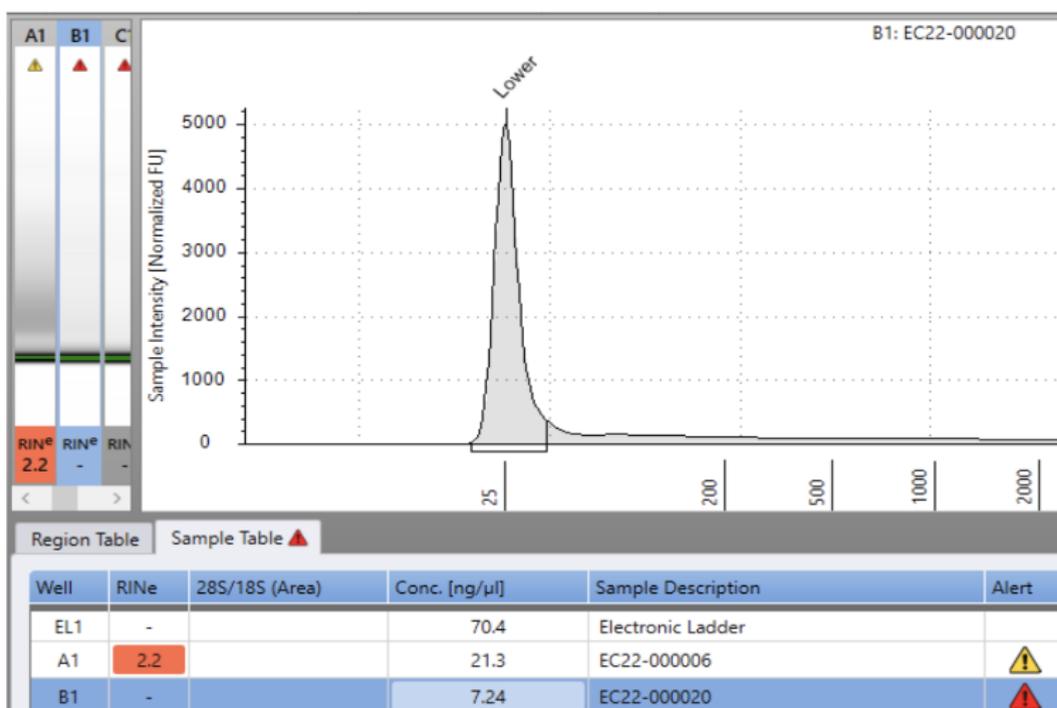


Lâminas de IHQ dos três casos que exibiram positividade para ROS1 (EC22000006, EC22000020 e EC22000021), marcadas com o anticorpo ROS1 (D4D6), com controle externo em mesma lâmina (setas) - adenocarcinoma de pulmão ROS1 positivo na IHQ e com fusão *SDC4::ROS1* em teste molecular.

ANEXO 10

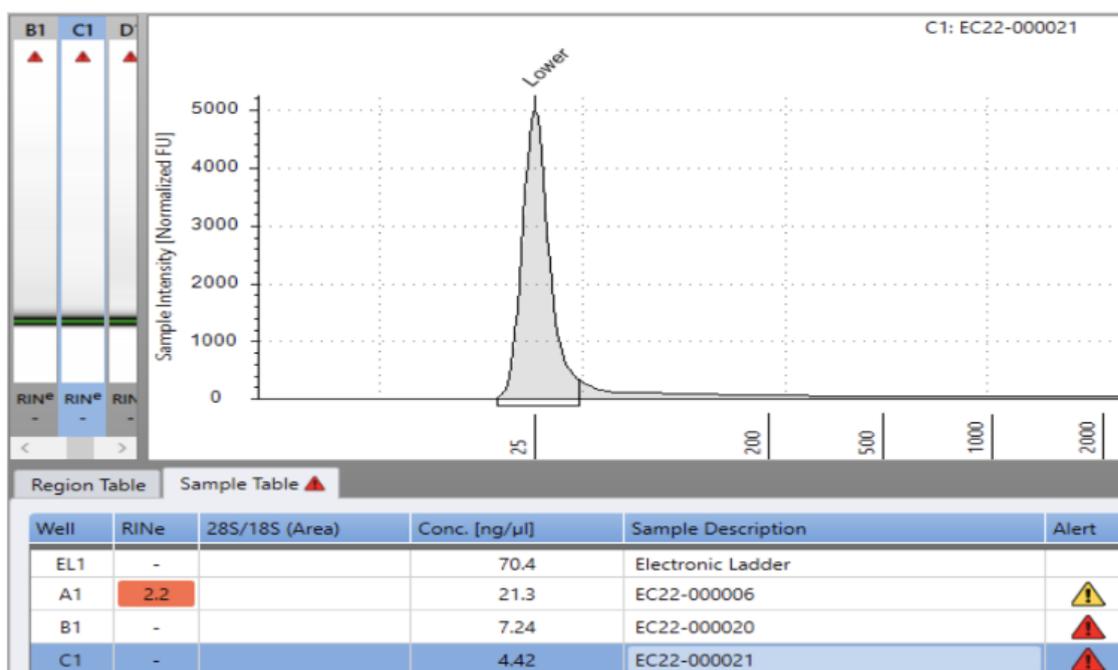


Eletroforese automatizada revelando concentração de RNA de 21,3 ng/ul para a amostra EC22000006, sendo a única a produzir curva de detecção por tamanho do fragmento (seta) com número de integridade do RNA (RIN) 2,2 se aproximando do valor mínimo de detecção na escala de 1 a 10. Eletroforese automatizada pelo sistema TapeStation 4150.



Eletroforese automatizada revelando concentração de RNA de 7,24 ng/ul para a amostra EC22000020, sem produzir curva de detecção por tamanho do fragmento ou número de integridade do RNA (RIN) na escala de 1 a 10, acendendo alerta vermelho para integridade do RNA na amostra. Eletroforese automatizada pelo sistema TapeStation 4150.

ANEXO 10



Eletoforese automatizada revelando concentração de RNA de 4,42 ng/ul para a amostra EC22000021, sem produzir curva de detecção por tamanho do fragmento ou número de integridade do RNA (RIN) na escala de 1 a 10, acendendo alerta vermelho para integridade do RNA na amostra. Eletoforese automatizada pelo sistema TapeStation 4150.