

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Pedro Bandeira Aleixo

**Avaliação de dois novos anticorpos
monoclonais para detecção da
superexpressão da proteína HER2
em carcinomas de mama**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2014**

Pedro Bandeira Aleixo

**Avaliação de dois novos anticorpos
monoclonais para detecção da
superexpressão da proteína HER2
em carcinomas de mama**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau
de Doutor

Orientador: Prof. Antônio Atalábio Hartmann

**Porto Alegre
2014**

DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Antonio e Maria Auxiliadora, minhas irmãs Marina e Sabina, minha esposa Bárbara e a toda minha família, Pulido, Umar, Alice, João Pedro, Luca e Elan, que, com muita amizade, carinho e apoio, não mediram esforços para me ajudar nesta etapa da minha vida e por isso à eles dedico todo meu esforço. Aos meus avôs e avós, Salvador e Maria Aleixo (*in memoriam*) e Osvaldo e Vicência Bandeira (*in memoriam*), pelo amor.

Ao professor Antônio Hartmann pela paciência na orientação, confiança e incentivo que tornaram possível a conclusão desta tese.

Aos coordenadores do curso de Pós-graduação em Patologia e equipe do Laboratório de Pesquisa em Patologia, pelo convívio, apoio, compreensão e amizade.

A todos os professores do curso, que foram muito importantes para o aprimoramento do meu conhecimento técnico-científico.

Aos colegas de pós-graduação, pelo incentivo e apoio constantes.

À Flavia Aleixo, pela contribuição e apoio.

Aos Professores da UFPEL, José Antonio Aleixo, Fabrício Rochedo e Odir Dellagostin, pela contribuição.

Às Professoras Marilda Fernandes e Adriana Roehe, pela contribuição e pelo apoio.

Ao Dr. Roque Furian, pela confiança e apoio.

Às Dra. Silvia Chaves e Dra. Bianca Furian, pelo apoio.

À Dr. Márcia Graudenz, pelo apoio e incentivo.

À Rosalva Meurer, pela contribuição, apoio e estímulo.

À Ceres Oliveira, pela contribuição na análise estatística.

Aos funcionários do Laboratório Histolab e em especial às técnicas em histopatologia.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação da UFCSPA, em especial a Maristela Pasin, pela atenção e ajuda.

Aos meus amigos, em especial Frederico, Pâmela, Luiz Henrique e Mezzari, pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

Dedicatórias e Agradecimentos	II
Sumário	III
Lista de Abreviaturas	VI
Resumo	VIII
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	13
2.1 Câncer de Mama	13
2.1.1 Epidemiologia	13
2.1.2 Características Clínicas	14
2.1.3 Histopatologia	18
2.1.3.1 Carcinoma <i>in situ</i>	18
2.1.3.2 Carcinoma invasor	21
2.1.4 Fatores Prognósticos	25
2.1.4.1 Tradicionais	26
2.1.4.2 Moleculares	30
2.2 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2	31
2.2.1 Biologia	31
2.2.2 Superexpressão de HER2 no câncer de mama	33
2.3 Métodos de Estudo e Detecção de HER2	35
2.3.1 Imuno-histoquímica	36
2.3.2 Hibridização <i>in situ</i>	41
2.3.2.1 FISH	43
2.3.2.2 CISH	45
2.3.2.3 SISH	47

2.3.3 Q-RT-PCR	48
2.3.4 CGH	51
2.4 Questões Adicionais na Interpretação do Teste de HER2	51
2.4.1 Influência da polissomia 17	52
2.4.2 Influência da heterogeneidade intratumoral	54
2.4.3 Discordância entre resultados de IHQ e HIS	56
2.4.4 Influência das novas diretrizes da ASCO/CAP	57
2.5 Anticorpos e Antígenos	58
2.5.1 Estrutura dos anticorpos	59
2.5.2 Interação antígeno e anticorpo	60
2.5.3 Antígenos	61
2.5.4 Imunógenos	62
2.5.5 Tipos de anticorpos	63
2.6 Imuno-histoquímica	65
2.6.1 Fixação	66
2.6.2 Processamento tecidual e reagentes de incubação	69
2.6.3 Recuperação antigênica	70
2.6.3.1 Enzimática	70
2.6.3.2 Baseada em calor	71
2.6.4 Métodos de Detecção	72
2.6.4.1 Diretos	73
2.6.4.2 Indiretos	73
2.6.4.2.1 Avidina-biotina	73
2.6.4.2.2 Peroxidase-antiperoxidase	75
2.6.4.2.3 Baseado em polímeros	75

2.6.4.2.4 Amplificação por tiramina	76
2.7 Validação de Anticorpos	77
2.7.1 Especificidade dos anticorpos	78
2.7.2 Reprodutibilidade de anticorpos	79
2.7.3 Anticorpos comerciais	80
2.8 Referências Bibliográficas	82
2.9 Lista de Tabelas	119
2.9.1 Tabela 1	119
2.9.2 Tabela 2	120
2.9.3 Tabela 3	121
2.9.4 Tabela 4	122
2.9.5 Tabela 5	123
2.9.6 Tabela 6	124
2.9.7 Tabela 7	125
2.9.8 Tabela 8	126
2.9.9 Tabela 9	127
3. Objetivos	128
4. Artigo em Inglês	129
5. Considerações Finais	163
6. Anexos	165
Anexo I	165
Anexo II	170
Anexo III	171
Anexo IV	172
Anexo V	173

LISTA DE ABREVIATURAS

3+ – três cruzes

2+ – duas cruzes

1+ – uma cruz

Ac(s) – anticorpo, anticorpos

Ag(s) – antígeno, antígenos

AEP – atipia epitelial plana

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica

CAP – Colégio Americano de Patologistas

CEN17 – centrômero 17

CEP17 – sonda de numeração cromossômica 17

CIS – carcinoma *in situ*

CDIS – carcinoma ductal *in situ*

CGH – hibridização genômica comparativa

CISH – hibridização *in situ* cromogênica

CITNE – carcinoma invasor tipo não especial

CLI – carcinoma lobular infiltrante

CLIS – carcinoma lobular *in situ*

CK – citoqueratina

CM – carcinoma de mama

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DC – coloração dupla

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – fator de crescimento epidérmico

EGFR – proteína receptor de fator de crescimento epidérmico

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERBB2 – gene *human epidermal growth factor receptor 2*, ou gene *HER2*

EUA – Estados Unidos da América

FDA – agência reguladora americana *Food and Drug Administration*

FISH – hibridização *in situ* por fluorescência

HER2 – receptor de fator de crescimento epidérmico 2

HER2 – gene *human epidermal growth factor receptor 2*

HIER – recuperação antigênica pelo calor
HIS – hibridização *in situ*
HLA - hiperplasia lobular atípica
HRP – peroxidase de rábano
IF – imunofluorescência
IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHQ – imuno-histoquímica
IP – imunoprecipitação
LFNS – linfonodo sentinela
mAc(s) – anticorpo monoclonal, anticorpos monoclonais
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
OMS – Organização Mundial da Saúde
pAc(s) – anticorpo policlonal, anticorpos policlonais
PaP – peroxidase anti-peroxidase
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
pI – ponto isoelétrico
PI3K – fosfoinositídeo 3-quinase
PIER – recuperação de epitopo induzida pela protease
Q-RT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA – recuperação antigênica
RE – receptor de estrógeno
RNA – ácido ribonucleico
RP – receptor de progesterona
SC – coloração simples
SDS – dodecil sulfato de sódio
SGN – sistema de graduação de Nottingham
SISH – hibridização *in situ* por prata
ULDT - unidade lobular do ducto terminal mamário
WB – *Western blot*

RESUMO

Introdução: Anticorpos são usados rotineiramente em ensaios laboratoriais para a detecção de antígenos. A análise imuno-histoquímica (IHQ) tem como princípio a demonstração *in situ* da reação antígeno-anticorpo no tecido biológico. A amplificação do gene *ERBB2* (ou *HER2*), e a resultante superexpressão de sua proteína HER2 em células neoplásicas, tornou-se fator prognóstico e preditivo utilizado no tratamento de pacientes com câncer de mama. Além disso, apresenta um papel determinante na classificação molecular intrínseca do carcinoma de mama. **Objetivo:** Avaliar o desempenho de dois novos anticorpos monoclonais (mAcs) anti-HER2 (33F e 410G) na detecção da superexpressão de HER2, através de IHQ, pela comparação com os resultados de outros dois anticorpos (SP3 e A0485) e da amplificação do gene *HER2* por meio de hibridização *in situ* cromogênica (CISH). **Métodos:** Foi realizado IHQ com os anticorpos 33F, 410G, SP3 e A0485, e duas técnicas de CISH em uma série de 123 casos de carcinoma infiltrativo de mama. Determinou-se a sensibilidade, especificidade e índices de concordância (K) dos resultados da IHQ entre si e com a amplificação de *HER2*. **Resultados:** Foi identificado uma boa concordância entre os resultados de 33F (K=0,81 e K=0,75) e 410G (K=0,81 e K=0,75) com SP3 e A0485, respectivamente. As especificidades encontradas de 33F foram 98,6% e 98,6%, e de 410G 100% e 100%, e as sensibilidades encontradas de 33F foram 80% e 74,1%, e de 410G 78% e 72,2%, quando comparadas com SP3 e A0485, respectivamente. Encontrou-se uma concordância significativa entre os casos 33F (K=1) e 410G (K=0,96) HER2+, e amplificação positiva por CISH. A reprodutibilidade dos resultados de IHQ se manteve em diferentes lotes de produção dos mAcs quando comparados com a amplificação gênica (K=0,96 e K=0,96). **Conclusão:** Em vista do que foi observado, os dois mAcs testados mostraram-se adequados para detectar a superexpressão de HER2 por IHQ em carcinomas de mama e podem ser usados em pesquisa na investigação indireta da amplificação de *HER2* em tecido neoplásico humano incluído em parafina.

Palavras-chave: HER2, *ERBB2*, anticorpo, validação, imuno-histoquímica, hibridização *in situ*.

1. Introdução

Anticorpos (Acs) são usados rotineiramente em ensaios laboratoriais para a detecção de antígenos (Ags), sendo utilizados em reações de *Western blot* (WB), imunoprecipitação (IP), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), imunofluorescência (IF) quantitativa e imuno-histoquímica (IHQ) e, também, em terapia. Eles são uma ferramenta fundamental para caracterizar a função e expressão dos componentes do proteoma humano e validar potenciais biomarcadores proteicos descobertos através de estudos clínicos (Strachan e Read, 2011). Além disso, têm alta importância clínica, sendo usados em laboratórios de análises clínicas (citometria de fluxo e ELISA) e em laboratórios de anatomia-patológica com aplicação em doenças infecciosas e neoplásicas. No estudo histopatológico, o uso de anticorpo (Ac) em testes de IHQ serve para definir diferenciação em células e tecidos, contribuindo para o diagnóstico, prognóstico e na predição de resposta a tratamento em diversas doenças, principalmente as neoplasias (Taylor e cols., 2011).

A análise através de IHQ tem como conceito fundamental a demonstração *in situ* de um alvo – antígeno (Ag) – em proteínas presentes em cortes de tecidos através de Acs específicos (Kampf e cols., 2004). O tecido é usualmente preparado com fixação em formalina e inclusão em parafina (Taylor e cols., 2011). Após a ligação Ag-Ac ocorrer, ela pode ser demonstrada através de uma reação histoquímica colorida visível ao microscópio de luz ou, no caso de fluorocromos, com luz ultravioleta (Taylor e cols., 2011). Atualmente, o uso de microarranjos de tecido permite a avaliação de centenas de amostras em paralelo em uma única lâmina

(Kallioniemi e cols., 2001). A IHQ tem como base as disciplinas de imunologia, histologia e química, e, apesar de ser conceitualmente simples, sua metodologia se tornou mais complexa à medida que metas mais rigorosas de sensibilidade e especificidade foram estabelecidas (Mighell e cols., 1998).

O adenocarcinoma mamário – carcinoma de mama (CM) – é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo (Ferlay e cols., 2010). Atualmente, o principal desafio para o médico que trata o CM é como acessar previamente o desfecho e o curso clínico do paciente doente, para que o tratamento mais apropriado seja oferecido. Os fatores prognósticos tradicionais utilizados para determinação de tratamento incluem o estadiamento tumoral (tamanho da neoplasia invasora, presença de metástase em linfonodo e presença de metástase à distância), o status das margens cirúrgicas, o tipo e grau histológico, a presença de invasão linfovascular, a presença de expressão de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e a presença da superexpressão da proteína receptor do fator de crescimento humano 2 (HER2) (Fitzgibbons e cols., 2000; Ly e cols., 2012).

O desenvolvimento de neoplasias está associado ao aparecimento de alterações genéticas e epigenéticas que causam mudanças nas expressões gênicas levando ao descontrole do ciclo celular e modificações na sobrevivência celular (Vogelstein e Kinzler, 2004; Kotran e cols., 2005). Em muitas neoplasias, essa alteração de controle no ciclo celular começa com a amplificação de um gene, que por sua vez leva ao aumento de expressão inapropriado de sua proteína correspondente, causando desestruturação da

fisiologia celular (Strachan e Read, 2011). Essas proteínas em excesso, produtos de genes alterados, têm um papel direto na evolução biológica e comportamento clínico de células neoplásicas e são um alvo potencial para criação e desenvolvimento de nova terapêutica molecular específica (Albertson, 2006).

Aberrações no DNA genômico relacionados ao número de cópias de genes são muito comuns em tumores sólidos (Albertson, 2006) e contribuem para evolução tumoral, pois permitem a superexpressão de oncogenes. Amplificação gênica é definida como o aumento do número de cópias de uma região restrita do braço de um cromossomo (Albertson, 2006). O DNA amplificado pode estar organizado dentro do núcleo em elementos extra-cromossômicos chamados *double minutes*, em unidades repetidas em um mesmo locus (chamados *homogeneously staining regions*) ou pode estar distribuído por todo o genoma (Storlazzi e cols., 2010). Clinicamente, a amplificação de segmentos cromossômicos pode ter utilidade prognóstica e diagnóstica, sendo também um mecanismo adquirido de resistência a medicamentos por neoplasias (Albertson, 2006).

King e cols. (1985) verificaram a amplificação do proto-oncogene *ERBB2* (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2* ou *HER2*), codificador da proteína HER2 (HER-2, HER2/neu, NEU, ErbB2, c-ErbB2), em uma linhagem celular de carcinoma mamário humano. Essa proteína faz parte de uma família de quatro Tirosina-quinases de membrana. Não demorou muito para se demonstrar a importância desse achado na patogênese e progressão do câncer de mama (Slamon e cols., 1987). A amplificação do gene *HER2* e a resultante superexpressão do receptor HER2

está diretamente ligada com alterações importantes em vias de proliferação e sobrevivência celular nesses tumores. Esse achado se tornou alvo para o desenvolvimento de novas drogas e a detecção do status de HER2 em carcinomas de mama se tornou um fator prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento utilizado rotineiramente na prática clínica (Yarden, 2001).

Células epiteliais normais do tecido mamário apresentam uma cópia do gene HER2 localizado em cada cromossomo 17, mas podem apresentar até quatro cópias do gene em cada célula dependendo da fase do ciclo celular. Uma célula normal apresenta cerca de 20.000 receptores HER2 na sua superfície e células com amplificação de *HER2* apresentam um aumento de cem vezes ou mais desse número (Yarden e Slivkowski, 2001). A proteína HER2 está superexpressa em cerca de 15 a 22% dos carcinomas de mama (Yaziji e cols., 2004; Owens e cols., 2004; Chortiz e cols., 2011). Esse aumento de expressão pode ser demonstrado através da identificação da amplificação do gene *HER2* e isso está altamente correlacionado com o aumento dos níveis da proteína na membrana das células neoplásicas, assim como de seus transcritos no nível de mRNA (Slamon e cols., 1989).

As vias que envolvem os receptores hormonais e o HER2 são os principais reguladores da proliferação celular e crescimento na maioria dos carcinomas de mama. O tratamento quimioterápico dessas vias proporciona uma terapia mais efetiva em pacientes selecionados. A terapia endócrina visando o RE e o uso do anticorpo monoclonal (mAc) anti-HER2 humanizado trastuzumabe, que tem como alvo o HER2, propiciam um aumento importante na sobrevida global e livre de doença no tratamento adjuvante com doença metastática presente, reduzindo em cerca de 50% o risco de recorrência

(Romond e cols., 2005; Ma e cols., 2009). Um paciente com câncer de mama com expressão aumentada de HER2 (chamado HER2 positivo ou HER2+) tem prognóstico adverso quando comparado com HER2 negativo. Porém, por outro lado, o HER2+ prediz resposta ao tratamento com terapia anti-HER2 específica (p.ex. trastuzumabe). Além disso, outras informações importantes para o tratamento desses pacientes estão sendo identificadas. Por exemplo, esses tumores são frequentemente RE negativos e demonstram resistência à terapia antiestrogênica (Prat e Baselga, 2008; Ma e cols., 2009) e uma maior sensibilidade ao tratamento contendo antraciclinas e taxano (Engel e Kaklamani, 2007; Conlin e Seidman, 2008; Dhesy-Thind e cols., 2008). O uso de trastuzumabe no tratamento adjuvante de CM em estágio inicial (Dahabreh e cols., 2008), metastático (Cobleigh e cols., 1999) e, também, como terapia neoadjuvante (Chang, 2010) já têm evidência estabelecida. Com isso, existe uma recomendação universal que todo CM novo ou metastático diagnosticado sejam testados para investigar superexpressão de HER2 (Harris e cols., 2007).

A determinação do status de HER2 em pacientes com CM é de suma importância pois identifica pacientes que têm grande benefício com terapia anti-HER2. Por isso, a fim de fazer uma avaliação precisa e com acurácia da superexpressão de HER2, a validação e uniformização das técnicas usadas para o teste é essencial. Um resultado falso-negativo pode privar esse grupo de pacientes de um tratamento com grande potencial de aumento de sobrevida, ao passo que um diagnóstico falso-positivo pode levar a um risco de efeitos colaterais desnecessários em pacientes com uma chance improvável de responder a essa terapia (Bilous e cols., 2003). O tipo de teste

usado para avaliar HER2 e sua interpretação levaram à observação de diferenças nos resultados em alguns estudos (Press e cols., 1994; Pauletti e cols., 1996; Hanna e cols., 1999). Atualmente, as técnicas usadas para identificar a superexpressão da proteína HER2 são IHQ, análise de soro ou citosol tumoral por ELISA e, também, WB. Os métodos usados para avaliar amplificação gênica de *HER2* incluem o *Southern blot*, *slot blot*, reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), hibridização *in situ* cromogênica (CISH) e hibridização *in situ* por prata (SISH) (Pfeifer, 2006; Ross e cols., 2009).

As técnicas que fazem uso de extração de moléculas de tecido para eletroforese em matriz sólida como *Southern blot* e WB têm uma limitação, pois a amostra contém artefatos de diluição após o rompimento das células durante a homogeneização (Strachan e Read, 2011). O tecido amostrado de uma neoplasia de mama, além das células cancerígenas, contém células ductais e acinares normais, células estromais, células dos vasos sanguíneos e células inflamatórias, que podem contaminar a reação levando a um resultado falso-negativo (Hanna e cols., 1999). O PCR é uma técnica de alta sensibilidade, mas é demorada e trabalhosa, e também sofre com problemas de contaminantes de diluição (Pegram e cols., 1998; Pfeifer, 2006). Adicionalmente, a impossibilidade da avaliação simultânea da morfologia é desvantajosa e a possibilidade de inclusão de carcinoma intraductal na amostra pode levar a um resultado falso-positivo, pois estes apresentam altos índices de expressão de HER2 (Park e cols., 2006; Meijnen e cols., 2008; Tamimi e cols., 2008).

As análises por IHQ e técnicas de hibridização *in situ* (HIS) são os

métodos mais empregados para a investigação do status de HER2 (Bhargava e cols., 2011). Atualmente, essas técnicas estão aprovadas por agências reguladoras para uso clínico (Bilous e cols., 2003; Wolff e cols., 2007a e 2007b; Bhargava e cols., 2011), desde que controles e medidas de qualidade rigorosos sejam mantidos (Paik e cols., 2002). A análise por IHQ e HIS permite a interpretação do resultado do teste junto com a histopatologia, elimina a contaminação com artefatos de diluição e, além disso, pode ser parcialmente automatizada (Shah e Chen, 2010). O algoritmo da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP) para a avaliação de HER2, recomendam a IHQ como teste primário, porém em casos com resultado equívoco, dito também indeterminado, um segundo teste baseado em HIS deve ser realizado (Wolff e cols., 2007a e 2007b).

As diretrizes da ASCO/CAP para a interpretação e testagem de HER2 surgiram com objetivo de uniformizar e aumentar a acurácia e reprodutibilidade de seus resultados (Wolff e cols., 2007b). Além do algoritmo para a interpretação da expressão da proteína por IHQ, o grupo de especialistas definiu a avaliação da amplificação do gene *HER2*. A IHQ para HER2 foi definida usando um escore de critérios qualitativos para a interpretação da coloração da membrana plasmática considerando a intensidade e percentagem de marcação de células positivas. Os resultados possíveis usando esse esquema, avaliados sempre em células neoplásicas do componente invasor, são (a) positivo ou escore 3+ (+++/+++), quando uma coloração na membrana de intensidade forte, completa e uniforme for encontrada em pelo menos 30% das células tumorais; (b) indeterminado ou

escore 2+ (++)/+++), quando uma coloração na membrana completa, não uniforme e fraca à moderada em mais de 10% das células ou coloração na membrana forte e completa, não uniforme, for encontrada em menos de 30% de células e (c) negativo ou escores 1+ (+/+++) ou 0, quando nenhuma marcação (escore 0), ou marcação fraca completa em menos de 10% das células ou marcação fraca incompleta em qualquer proporção de células for encontrada (escore 1+) (Wolff e cols., 2007b).

As técnicas de HIS, como FISH e CISH, têm como princípio a geração de sondas de DNA – sequência de oligonucleotídeo – complementares a sequências genômicas de interesse, sua marcação (p.ex. biotinilação) e posterior hibridização e detecção com seu alvo no tecido (Pfeifer, 2006; Strachan e Read, 2011). Essa reação permite a observação de sequências do DNA nuclear direto no tecido. Além de tecido fixado e embebido em parafina, a HIS, pode ser realizada em esfregaços de sangue ou medula óssea, células fixadas de punções (preparados citológicos) e em cromossomos em metáfase estendidos em lâminas (Pfeifer, 2006). FISH utiliza sondas marcadas com fluorocromos que são interpretados por microscopia de fluorescência que fazem uso de filtros específicos para identificação dos sinais (Pfeifer, 2006). A reação de CISH é um método de HIS, semelhante ao FISH, que usa sondas de DNA marcadas com cromógeno para serem observados no microscópio de luz (Lambros e cols., 2007; Penault-Llorca e cols., 2009). A realização de HIS de forma manual ou automatizada apresenta resultados comparáveis e semelhantes, sendo ambos os métodos confiáveis (Fritzsche e cols., 2010; García-Caballero e cols., 2010; Bartlett e cols., 2011a; Brüggmann e cols., 2011; Yan e cols.,

2011; Ohlschlegel e cols., 2013).

As técnicas de HIS, no estudo do CM, podem usar uma sonda de coloração única/simples (SC) para marcar o gene *HER2* localizado no braço longo do cromossomo 17, ou podem associar uma segunda sonda controle (DC) de referência para marcar também a região centromérica do cromossomo 17 (CEP17, *chromosome enumeration probe 17*), (Pfeifer, 2006; Bhargava e cols., 2011). O número de cópias do *HER2* e do CEP17 são, então, observados no microscópio e quantificados nas células. Recomenda-se contar 50 células de diferentes áreas do tumor e calcular a média do número de cópias de *HER2* ou a razão entre a média de *HER2* e CEP17 (Hwang e cols, 2011). A diretriz da ASCO/CAP definiu como tumor (a) negativo para amplificação de *HER2*, quando a razão *HER2/CEP17* for menor que 1,8 ou quando o número médio de cópias de *HER2* for menor que 4; (b) equívoco ou indeterminado, quando a razão estiver entre 1,8 e 2,2 ou o número de cópias de *HER2* estiver entre 4,0 e 6,0; e (c) positivo, quando a razão for maior que 2,2 ou quando o número de cópias de *HER2* for maior que 6,0 (Wolff e cols., 2007b).

Embora o método padrão-ouro para avaliar *HER2* que melhor traduz resposta ao tratamento com terapia alvo esteja ainda em debate, a técnica de FISH é aquela que, aparentemente, apresenta melhor resultado (Cuadros e Villegas, 2009; Mansfield e cols., 2013). Vários estudos demonstraram boa concordância entre o escore 3+ por IHQ, e FISH e CISH positivo, enquanto que casos com marcação 2+ por IHQ mostraram maior discrepância (Jacobs e cols., 1999a; Jimenez e cols., 2000; Kakar e cols., 2000; Ridolfi e cols., 2000; Wang e cols., 2000; Lebeau e cols., 2001; McCormick e cols., 2002;

Ogura e cols., 2003; Owens e cols., 2004; Dybdal e cols., 2005; Nunes e cols., 2008; Mayr e cols. 2009). Lal e cols. (2004) estudaram mais de dois mil casos e demonstraram concordância entre IHQ e FISH-DC em 87% dos casos e FISH-SC em 86% dos casos. A concordância nos casos 0, 1+ ou 3+ por IHQ e FISH-DC atingiu 97% e FISH-SC 96%, ao passo que a maioria das discrepâncias ocorreu nos casos 2+ (Lal e cols., 2004). Uma alta concordância entre FISH e CISH foi demonstrada em vários estudos (Tanner e cols., 2000; Dandachi e cols., 2002; Arnould e cols., 2003; Isola e cols., 2004; Bhargava e cols., 2005; Gong e cols., 2005 e 2009; Bilous e cols., 2006; Hanna e Kwok, 2006; Sáez e cols., 2006; Cayre e cols., 2007; Van de Vijver e cols., 2007; Bartlett e cols. 2011a). Gong e cols. (2009) identificaram uma concordância entre CISH e FISH de 99% e 99,1% para casos positivos e negativos, respectivamente, usando os últimos critérios da ASCO/CAP. Uma análise de 94 carcinomas de mama comparando o desempenho de CISH-DC e FISH-DC, usando os critérios da ASCO/CAP, encontrou um índice de concordância de 100% quando casos indeterminados pelo FISH foram excluídos e de 95,7% quando incluídos (Nitta e cols., 2008). A concordância pode diminuir em casos raros com anormalidades mais complexas do gene *HER2* e do centrômero 17 (CEN17) (Mansfield e cols., 2013). As principais vantagens da técnica de CISH incluem: possibilidade de interpretação com microscópio de luz, preservação da morfologia, sinais permanentes para arquivamento, técnica de menor complexidade, menor tempo de reação e baixo custo dos reagentes (Zhao e cols., 2002; Bhargava e cols., 2005; Loring e cols., 2005; Cayre e cols., 2007; Lambros e cols., 2007; Penault-Llorca e cols., 2009).

Atualmente, Acs anti-HER2 estão disponíveis comercialmente na forma de kits contendo o Ac primário e o sistema completo para a detecção. O Ac pode, ainda, ser vendido separadamente e o laboratório escolhe, então, seu sistema de detecção. Os Acs podem reconhecer epitopos diferentes na porção intracelular ou extracelular da proteína HER2. Os principais clones de Acs disponíveis são: um anticorpo policlonal (pAc) anti-HER2 de coelho; o clone A0485 (HercepTest™, Dako, Dinamarca) e quatro anticorpos monoclonais anti-HER2, sendo dois de camundongo, o clone CB11 (Novocastra, Inglaterra) e o clone TAB250 (Invitrogen, Estados Unidos da América [EUA]), e dois de coelho, o clone 4B5 (PATHWAY HER2/neu®, Ventana, EUA e Genentech, EUA) e o clone SP3 (NeoMarkers, EUA e Cell Marque, EUA).

Os Acs direcionados à porção intracelular da proteína são o A0485, CB11 e 4B5. Os direcionados à porção extracelular são o TAB250 e o SP3. Cada anticorpo tem uma característica de coloração e desempenho distintos (Nunes e cols., 2008; Dekker e cols., 2012). O Herceptest tem alta sensibilidade, porém sua baixa especificidade foi demonstrada em alguns estudos (Jacobs e cols., 1999a; Roche e Ingle, 1999; Ricardo e cols., 2007; Nunes e cols., 2008). Powell e cols. (2008) identificaram no clone 4B5 uma marcação de membrana mais nítida, com menos coloração citoplasmática e estromal de fundo, quando comparado com o clone CB11. Em outro estudo, os Acs SP3 e 4B5 demonstraram uma maior concordância com HIS quando foram comparados com o A0485 e o CB11 (Rhodes e cols., 2002). Thomson e cols. (2001) observaram em um estudo sensibilidade maior do TAB250 quando comparado com os Acs A0485 e CB11.

Um dos objetivos de ação política do governo brasileiro para consolidar a área da saúde é incentivar a realização de projetos de pesquisa e o desenvolvimento tecnológico que resultem em melhor desempenho dos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico na área de saúde (Brasil, 2010). Nesse contexto nosso grupo de pesquisa desenvolveu um projeto para gerar, caracterizar e validar anticorpos monoclonais anti-HER2 para identificação da superexpressão da proteína HER2 em neoplasias com possível amplificação do gene *HER2*.

Primeiramente, numa etapa prévia do projeto desenvolvemos cinco clones de hibridomas murinos secretores de mAbs contra a proteína HER2. Dois mAbs secretados, designados clones 410G e 33F, foram caracterizados quanto ao isotipo como IgG₁, com constantes de afinidade 1×10^9 e 6×10^8 L.mol⁻¹ e com rendimento proteico após purificação do fluido ascítico e concentração de 1,12 e 0,39 mg.mL⁻¹, respectivamente (Vasconcellos, 2011). Ambos os clones reagiram com a proteína nativa em (a) células da linhagem MCF-7 por IF indireta e (b) em secções de CM HER2+ por IHQ (Vasconcellos e cols., 2013) (Anexo I e II). Uma reação de WB demonstrou boa especificidade dos mAbs gerados (Vasconcellos e cols., 2013). Na presente etapa avaliamos e uniformizamos o uso desses dois mAbs para identificação da superexpressão da proteína HER2 em tecido de CM humano fixado em formalina e incluído em parafina. Abordamos a validação para utilização em pesquisa e seguimos orientações focadas para o uso final dos mAbs em IHQ (Bordeaux e cols., 2010).

2. Revisão da literatura

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama, referindo-se ao carcinoma mamário e não ao sarcoma mamário, é uma neoplasia que apresenta histopatologia, etiologia e genética heterogênea (Lakhani e cols., 2012). Fatores genéticos importantes foram indicados por ocorrência familiar e envolvimento bilateral. O CM aparece caracteristicamente em várias síndromes de câncer, incluindo a síndrome de Li-Fraumeni (devido a mutações germinativas no gene *TP53*), síndrome de Cowden (devido a mutações no gene *PTEN*) e síndrome de Peutz-Jeghers (devido a mutações no gene *STK11*). Há também um risco aumentado de câncer de mama e do ovário na ataxia-telangiectásica, e existe evidência de que alguns heterozigotos para algumas mutações no gene mutado *ATM* têm um risco aumentado de câncer de mama (Lakhani e cols., 2012; OMIM #114480). Mutações herdadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão associados com um risco significativamente maior de câncer de mama, especialmente antes da idade de 50 anos, bem como um risco aumentado de câncer de ovário (Frank, 1999).

2.1.1 Epidemiologia

O tumor epitelial maligno sólido mais comum em mulheres é o carcinoma mamário (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). O pico de incidência ocorre entre 45 e 60 anos de idade, porém pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais raro em pacientes abaixo de 25 anos e acima de

80 anos de idade (Ellis e cols., 2013). Os grandes estudos na maioria dos países desenvolvidos observaram alta incidência e mortalidade na sua população. Eles identificaram aumento na frequência em população com e sem risco, principalmente em grupos com idade mais jovem. O CM é duzentas vezes mais comum em mulheres do que em homens. O risco de uma mulher desenvolver CM, em toda vida, pode chegar a 1:10 (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). Uma diminuição importante na incidência de CM em mulheres entre 50 e 69 anos de idade, encontrada nos EUA, pode refletir uma redução no uso de terapia de reposição hormonal na população (Jemal e cols., 2007).

2.1.2 Características clínicas

O CM é dividido em duas grandes categorias patológicas, uma denominada carcinoma *in situ* (CIS) e outra carcinoma invasor. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS), ou carcinoma intraductal, e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) são definidos como uma proliferação de células epiteliais malignas nas estruturas parenquimatosas limitadas à membrana basal dos ductos e lóbulos mamários. A neoplasia *in situ* se distingue do carcinoma invasor, que apresenta invasão estromal através da membrana basal (Ellis e cols., 2013).

O aparecimento de carcinoma invasor acontece em aproximadamente 20 a 30% dos casos de CDIS em um período de 15 a 20 anos, e pode chegar a 40% dos casos com acompanhamento de 30 anos (Page e cols., 1982; Page e cols., 1995; Sanders e cols., 2005). Mais de 95% dos pacientes com CDIS tratados com mastectomia são considerados curados. Os fatores prognósticos em pacientes tratados apenas com excisão ampla local (com ou

sem radioterapia) estão relacionados com a distância das margens de ressecção, grau histológico e biologia tumoral. O aumento no risco de recorrência em pacientes tratados com cirurgia conservadora está associado com idade jovem, presença de sintomas, margens positivas, alto grau histológico, presença de necrose e padrão sólido de crescimento (Pinder e cols., 2010; Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013).

A recorrência do CIS usualmente aparece junto ao local de ressecção prévia e apresenta um perfil genético molecular semelhante ao anterior, indicando uma doença residual (Waldman e cols., 2000; Hwang e cols., 2004). Muitos estudos demonstraram uma diminuição de recorrência local com radioterapia (Fisher e cols., 1998; Ottesen e cols., 2000). O carcinoma invasor também aparece junto a locais de biópsia prévia com CIS. Esse achado, junto com estudos de imagem tridimensional, demonstram que o CDIS é um processo mais unifocal, quando comparado com o padrão mais multifocal do CLIS (Faverly e cols., 1994; Norton e cols., 2012).

O CDIS pode se apresentar como uma massa palpável, ou com secreção mamilar, comumente sanguinolenta, ou com microcalcificações identificadas por mamografia (Ellis e cols., 2013). Os programas atuais de rastreamento com mamografia aumentaram a taxa de frequência de CDIS entre os casos de câncer de mama de 5% para 25% (Ellis e cols., 2013). O envolvimento de linfonodo axilar com metástase ocorre numa frequência entre 1 e 2% dos casos de CDIS. Isso geralmente ocorre em casos de grande extensão, onde há a possibilidade de algum foco de microinvasão não ser amostrado. Um foco não suspeito de carcinoma invasor existe em cerca de 50% dos casos de CIS, quando um CDIS de alto grau puro for

diagnosticado em biópsia incisional ou quando identificado por imagem associado com calcificação extensa (Dillon e cols., 2006). Com isso, pode ser apropriado nesses casos realizar biópsia do linfonodo sentinela (LFNS) (Ellis e cols., 2013).

A neoplasia lobular, classificada por alguns como uma entidade única, é um processo epitelial que ocorre na unidade lobular do ducto terminal mamário (ULDT). Ela apresenta um espectro que vai desde uma hiperplasia lobular atípica (HLA) leve até um CLIS florido (Haagensen e cols., 1978; Dabbs e cols., 2013; Ellis e cols., 2013). Em essência, esse espectro apresenta morfologia celular idêntica (que lembra a célula do revestimento epitelial usual) e não apresenta diferenças genéticas e imunofenotípicas nas duas formas (HLA e CLIS). A distinção entre as duas formas é feita com base na extensão e grau de envolvimento da ULDT (Ellis e cols., 2013).

O CLIS não é um precursor obrigatório de carcinoma invasor e, atualmente, é considerado um fator de risco, sendo desnecessária a ressecção completa local com margens amplas (Ben-David e cols., 2006). Neoplasia lobular de qualquer grau (HLA ou CLIS) ocorre em apenas 1% das biópsias (El-Sayed e cols., 2008; Rakha e cols., 2011). Raramente a neoplasia lobular provoca sintoma (tumoração), geralmente não é visível macroscopicamente e sua identificação ocorre usualmente por acidente. A incidência da neoplasia lobular aumentou após o início do rastreamento com mamografia. Poucos casos de CLIS apresentam-se com calcificações (Ellis e cols., 2013). O risco de desenvolvimento subsequente de carcinoma é de quatro vezes para HLA e de dez vezes para CLIS (Page e cols., 1991; Crisi e cols., 2003). A maioria dessas lesões são identificadas no período

perimenopausa, e o risco de carcinoma subsequente parece ser maior no período pré-menopausa (Collins e cols., 2007a e 2007b). Aparentemente, a neoplasia lobular parece ser um fenômeno multifocal. O risco de carcinoma subsequente ocorre nas duas mamas, sendo três vezes maior na mesma mama. Por isso, para alguns autores, a neoplasia lobular parece ser um precursor e não apenas um fator de risco para carcinoma invasor (Page e cols., 2003; Simpson e cols., 2003; Li e cols., 2006a e 2006b).

O carcinoma invasor da mama é identificado, na maioria das vezes, por presença de uma massa palpável ou por uma anormalidade impalpável detectada na mamografia (Ellis e cols., 2013). A lesão pode ser pequena ou pode atingir vários centímetros e geralmente é firme com bordas bem ou mal definidas. A lesão pode retrair ou ulcerar a pele. A descarga de secreção mamilar e a dor na mama raramente estão associados com malignidade. A neoplasia invasora pode ocorrer em qualquer local da mama, mas o quadrante superior externo é o local mais comum (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013).

Atualmente, os achados histológicos e moleculares do carcinoma invasor da mama demonstram que o câncer de mama é uma doença heterogênea, constituída por subtipos com morfologia e genética distintas. Cada subtipo apresenta diferente comportamento clínico e resposta à terapia. O carcinoma invasor mamário é classificado clinicamente de acordo com o tamanho do tumor primário, presença de metástase em linfonodos, grau de extensão local e presença de metástase à distância. Morfologicamente, o CM é classificado de acordo com tipos e graus histológicos (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). Do ponto de vista da biologia molecular, o câncer

de mama é classificado de acordo com a expressão de receptores hormonais de estrógeno e progesterona, e o status de HER2 (Ly e cols., 2012). Outras variáveis de classificação com potencial valor biológico e prognóstico incluem invasão angiolinfática, índice proliferativo (identificado pelo Ac anti-Ki-67), presença de P53 mutado e expressão de E-caderina (marcador de adesão celular) (Fitzgibbons e cols., 2000; Ly e cols., 2012).

A classificação molecular do carcinoma de mama avançou muito com o uso de tecnologias de alta resolução como hibridização genômica comparativa (CGH). Os perfis de expressão gênica identificados por esses métodos evidenciaram grupos de câncer de mama biologicamente e clinicamente distintos (Perou e cols., 2000; Van de Vijver e cols., 2002; Van't Veer e cols., 2002; Sorlie e cols., 2003; Wang e cols., 2005; Jönsson e cols., 2010). Os principais subtipos moleculares identificados foram definidos como: luminal A, luminal B, HER2 positivo e basal. Esses principais subtipos apresentam características próprias em níveis molecular, clínico, prognóstico e preditivo de resposta a tratamento (Tabela 1, pág. 119), independente de seu tipo histológico (Perou e cols., 2000; Van de Vijver e cols., 2002).

2.1.3 Histopatologia

2.1.3.1 Carcinoma *in situ*

Atualmente, os sistemas de categorização do CDIS baseiam-se na avaliação do grau nuclear apenas (Holland e cols., 1994; NHS Breast Screening Programme, 2005; Lester e cols; 2009) ou numa combinação entre grau nuclear e presença de necrose (Silverstein e cols., 1995; Pinder e cols.,

2010). Existe forte evidência que o CDIS com citologia de alto grau tem mais chance de recidivar ou de progredir para carcinoma invasor que o CDIS de baixo grau (Bijker e cols., 2001; Pinder e cols., 2010). Porém, alguns resultados sugerem que os dois são similares quanto à predição do risco de recorrência local (Douglas-Jones e cols., 1996; Badve e cols., 1998; Pinder e cols., 2010).

O CDIS é dividido em três graus nucleares e apresenta ainda algumas variantes citológicas e arquiteturais mais raras. O CDIS de alto grau nuclear é constituído por células pleomórficas com alta razão entre núcleo e citoplasma, medindo o núcleo aproximadamente 2 a 3 hemácias de diâmetro (Lester e cols., 2009). Usualmente, apresenta cromatina grosseira, nucléolo evidente, mitoses e necrose. Os padrões arquiteturais comuns são: cribriforme, comedo, sólido e micropapilar. A presença de necrose tipo comedo (necrose central, geralmente no padrão sólido) pode aparecer no padrão cribriforme e em CDIS não de alto grau, com ou sem calcificação associada (Ellis e cols., 2013).

O CDIS de baixo grau nuclear é constituído por células com núcleo pequeno e regular (menor que o diâmetro de 2 a 3 hemácias), sem nucléolo evidente (Lester e cols., 2009). Os padrões arquiteturais mais comuns são o cribriforme e o micropapilar, e mais raramente o sólido. Mitoses são pouco frequentes, a presença de necrose é rara e pode apresentar calcificações em secreção luminal. A presença de CDIS de baixo grau tem forte associação com a presença de atipia epitelial plana (ou lesão de célula colunar com atipias) (Collins e cols., 2007b). O CDIS com grau nuclear intermediário apresenta núcleo com menos pleomorfismo que o de alto grau e não tem a

uniformidade do núcleo de baixo grau. Pode apresentar nucléolo pequeno e pouca necrose. Geralmente tem padrão sólido, cribriforme ou micropapilar (Ellis e cols., 2013).

As variantes raras do CDIS podem ser puras ou podem se apresentar junto com os outros tipos de carcinoma intraductal. Essas variantes incluem os subtipos apócrino, neuroendócrino, células em anel de sinete, hipersecretório cístico, papilar, papilar intracístico ou encapsulada e a doença de Paget do mamilo (Guerry e cols., 1988; Tavassoli e Norris, 1994; Kawasaki e cols., 2008; Dalberg e cols., 2008; O'Malley e Bane, 2008; Esposito e cols., 2009; Wynveen e cols., 2011). O CDIS de alto grau apresenta alto índice proliferativo e é geralmente positivo para HER2 e P53, tendendo a ser negativo para RE, RP, e BCL-2. O CDIS de baixo grau geralmente é negativo para HER2 e P53, tem baixo índice proliferativo e é positivo para RE, RP e BCL-2 (Bobrow e cols., 1994; Leong e cols., 2001). Diferenças genéticas existem entre o CDIS de alto grau e o CDIS baixo grau (Ellsworth e cols., 2007).

A célula do CLIS é similar à célula epitelial acinar usual, apresenta tamanho pequeno a moderado, com núcleo regular e redondo, e com pouco citoplasma. Geralmente não tem nucléolo aparente. As células têm aspecto discoeso, com membrana plasmática indistinta e podem apresentar luz intracitoplasmática. Essa proliferação preenche, distende e distorce a ULDT, podendo se estender aos ductos adjacentes (de forma pagetoide ou extensa) (Ellis e cols., 2013). Uma variante dita pleomórfica do CLIS apresenta o mesmo padrão, porém contém pleomorfismo celular ou células em anel de sinete (Sneige e cols., 2002). O índice proliferativo e a expressão de HER2

são maiores nesse grupo quando comparada à forma clássica do CLIS (Chivukula e cols., 2008; Chen e cols., 2009). Entretanto, os achados típicos da neoplasia lobular clássica (p.ex. deleção de 16q) são encontrados nesse grupo (Chen e cols., 2009).

2.1.3.2 Carcinoma invasor

O carcinoma invasor da mama é dividido conceitualmente em dois grupos principais, o carcinoma invasor tipo não especial (CITNE) e os carcinomas invasores de tipo especial (Lakhani e cols., 2012). O CITNE mamário não é considerado um tipo específico de carcinoma de mama (Ellis e cols., 2013), sendo constituído por um grupo heterogêneo de tumores, sem nenhuma característica que os classifique em um dos tipos histológicos especiais (p.ex. lobular, mucinoso ou tubular). O CITNE mamário também é chamado de carcinoma ductal invasor tipo não especial ou carcinoma sem outra especificação. O termo ductal era usado para denotar origem do epitélio ductal mamário nesse grupo, enquanto que o carcinoma lobular seria derivado do lóbulo mamário, porém a evidência atual demonstra que, na realidade, os dois tipos de carcinoma originam-se da ULDT (Ellis e cols., 2013). O CITNE corresponde a cerca de 45 a 80% dos casos de carcinoma invasor da mama na maioria das séries descritas (Rosen, 1979; Anderson e cols., 1991; Ellis e cols., 1992; Li e cols., 2005 e 2006a; Anderson e cols., 2006; Lakhani e cols., 2012).

A histopatologia do CITNE é bastante variável e pode se apresentar com lençóis sinciciais ou cordões de células com abundante citoplasma. Pode apresentar áreas “targetoides” (como no carcinoma lobular) e estruturas

glandulares (focal a extensa). O núcleo pode ser pleomórfico ou regular. O componente estromal é variável podendo ser escasso, desmoplásico ou hialinizado. Necrose está presente em aproximadamente 60% dos casos e um infiltrado linfoplasmocitário pode ser identificado (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). O CITNE pode apresentar algumas características dos tipos especiais de carcinoma focalmente. A classificação como CITNE requer que o tumor seja constituído pelo padrão não especial em mais de 50% da lesão. No caso do padrão de CITNE aparecer entre 10 a 49%, e o restante da lesão for um tipo especial, o carcinoma é classificado como misto (NHS Breast Screening Programme, 2005; Lakhani e cols., 2012). Ocasionalmente, o CITNE pode apresentar: (a) metaplasia escamosa, (b) metaplasia em células claras (Ellis e cols., 2013), (c) deposição abundante de lipofucsina citoplasmática (Shin e cols., 2000), (d) melanina nas células neoplásicas simulando melanoma, (e) nível de gonadotropina coriônica humana beta elevado no soro ou evidência de diferenciação coriocarcinomatosa (Mohammadi e Rosa, 2011), (f) células pleomórficas e células gigantes tumorais em abundância [sendo chamado de carcinoma pleomórfico quando presentes em mais de 50% das células no tumor] (Silver e Tavassoli, 2000), ou (g) componente de CDIS extenso associado (Ellis e cols., 2013).

O carcinoma lobular infiltrante (CLI) da mama é o tipo especial mais comum de carcinoma mamário e o segundo tipo mais comum de carcinoma de mama (~15% dos casos) (Ellis e cols., 1992; Li e cols., 2003). O CLI demonstra características clínicas, histologia, fatores de risco, transcriptomas e perfil genômico distinto do CITNE (Cleton-Jansen, 2002; Korkola e cols., 2003; Arpino e cols., 2004; Yoder e cols., 2007; Lopez-Garcia e cols., 2010).

A forma clássica do CLI apresenta um padrão de infiltração por células neoplásicas isoladas em “fila indiana”, com celularidade semelhante ao CLIS (Dixon e cols., 1982). Algumas variantes do CLI são bem reconhecidas e incluem a lobular sólida, lobular alveolar, túbulo-lobular e lobular pleomórfico (Rakha e Ellis, 2010). Porém, todos apresentam evidências de alterações genéticas características de neoplasia lobular como perda da função da E-caderina e deleções no braço longo do cromossomo 16 (Rakha e cols., 2006a; Simpson e cols., 2008).

O CLI está frequentemente associado com idade avançada (média de 57 anos), maior tamanho tumoral, grau histológico baixo e positividade para receptores hormonais (Arpino e cols., 2004; Li e cols., 2005, Rakha e Ellis, 2010). Não é frequente a presença de invasão linfovascular ou perineural (Ellis e cols., 2013). Alguns estudos observaram uma taxa maior de multicentricidade, multifocalidade, bilateralidade, desenvolvimento subsequente de carcinoma contralateral e múltiplas metástases (Sastre-Garau e cols., 1996; Winston e cols., 2000; Ferlicot e cols., 2004). Existe uma tendência de recorrência locorregional tardia (Cocquyt e Van Belle, 2005).

O carcinoma mamário do tipo especial tubular (~1-4% dos carcinomas de mama) tem como características a presença de túbulos angulados com luzes abertas em mais de 90% do tumor e estroma desmoplásico (Ellis e cols., 2013). O carcinoma tubular está frequentemente associado com AEP, neoplasia lobular e CDIS de baixo grau e apresenta um ótimo prognóstico (Rakha e cols., 2010; Ellis e cols., 2013). Alguns autores usam o termo carcinoma misto tubular infiltrativo (e não CITNE) para aqueles tumores que apresentam entre 50% a 90% de morfologia tubular, pois aparentemente

apresentam um bom prognóstico (Cabral e cols., 2003; Ellis e cols., 2013). Outro tipo especial de carcinoma raro (~1% dos casos de carcinoma invasor), que tem relação com o carcinoma tubular, é o carcinoma cribriforme invasivo (Venable e cols., 1990). Esse tumor é constituído por glândulas infiltrativas tubulares com padrão cribriforme e tem, também, um bom prognóstico (Ellis e cols., 2013).

O carcinoma mucinoso da mama na sua forma pura, também chamado de colóide, apresenta grupamentos de células carcinomatosas uniformes e núcleo regular dentro de lagos de mucina em cerca de 90% do tumor (Lakhani e cols., 2012). Esse tipo especial é incomum (~1-4% dos casos de carcinoma invasor) e sua forma pura tem um bom prognóstico (Diab e cols., 1999; Di Saverio e cols., 2008). Outro tipo especial de carcinoma mamário, com frequência entre 1 a 7% do total de casos, é o carcinoma medular (Ellis e cols., 2013). A morfologia do carcinoma medular demonstra um tumor circunscrito, com padrão de crescimento sincicial, alto grau histológico e intenso infiltrado linfoplasmocitário (Lakhani e cols., 2012). Apesar de apresentar um alto grau histológico, alguns estudos observaram um prognóstico melhor quando comparado com CITNE (Jensen e cols., 1997; Rakha e cols., 2009a).

A OMS descreve 19 tipos especiais de carcinoma de mama (Lakhani e cols., 2012), os principais foram descritos acima. Outros exemplos de tipos especiais de carcinoma da mama incluem: o carcinoma papilar invasivo, o carcinoma micropapilar invasivo, o carcinoma secretor, o carcinoma apócrino, o carcinoma rico em glicogênio e rico em lipídio, o carcinoma neuroendócrino, o carcinoma metaplásico, o carcinoma epidermóide e o carcinoma

adenocarcinoma de baixo grau (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). Recentemente, um subtipo denominado carcinoma do tipo basal, que apresenta imunofenótipo triplo negativo (RE, RP e HER2 negativos) e expressão de marcadores de células basais, surgiu como um grupo distinto (Ellis e cols., 2013).

2.1.4 Fatores prognósticos

Um fator prognóstico é definido como uma característica do paciente ou da neoplasia identificada no diagnóstico que pode ser usada para proporcionar informação do desfecho clínico (recorrência ou sobrevida) na ausência de terapia. Um fator preditivo é definido como uma característica que permite informar a probabilidade de resposta à terapia. Uma característica pode ser ao mesmo tempo um fator prognóstico e preditivo (Fitzgibbons e cols., 2000; Ly e cols., 2012). Fatores prognósticos não predizem resposta à terapia, mas orientam a seleção de tratamento de pacientes com neoplasias malignas. Por exemplo, pacientes com ótimo prognóstico após a ressecção de um tumor podem ser dispensados de quimioterapia adjuvante que tem alta morbidade. Ao contrário, pacientes com prognóstico muito ruim podem se beneficiar de uma terapia adjuvante agressiva (Fitzgibbons e cols., 2000; Ly e cols., 2012).

Os fatores prognósticos em carcinomas de mama são divididos em tradicionais ou moleculares (Ly e cols., 2012). Os fatores tradicionais são investigados pelo exame macroscópico e histológico do tumor. Os fatores moleculares podem ser acessados por técnicas especiais como IHQ, PCR ou HIS.

2.1.4.1 Tradicionais

A. Tamanho do tumor

O tamanho do tumor deve ser medido por patologista, pois a mensuração clínica não tem acurácia suficiente (Ellis e cols., 2013). O maior diâmetro do tumor deve ser medido, e tumores com menos de um centímetro tem que ser medidos com o microscópio no corte histológico (Sinn e cols., 2010). O tamanho do tumor é um fator tempo dependente, vários estudos demonstraram sua correlação com prognóstico (Carter e cols., 1989; Neville e cols., 1992; Lakhani e cols., 2012), apresentando os tumores pequenos uma melhor sobrevida. Neoplasias com medida igual ou menor do que 1 cm de diâmetro usualmente se apresentam em um estágio menor, sem metástase em linfonodo, quando comparados com tumores com 1,5 cm ou mais (Carter e cols., 1989; Foulkes e cols., 2010). O tamanho tumoral é usado como marcador prognóstico para manejo de pacientes no (a) Índice Prognóstico de Nottingham (junto com grau histológico e grau de comprometimento de linfonodos) e (b) no estadiamento TNM de tumores malignos, onde constitui uma variável categórica dividida em T1 (≤ 2 cm), T2 (> 2 cm e ≤ 5 cm) e T3 (> 5 cm) (Ellis e cols., 2013).

B. Estágio de comprometimento de linfonodos

Pacientes com comprometimento linfonodal locorregional comprovado na histologia têm um prognóstico muito pior do que aqueles pacientes que não apresentam envolvimento de linfonodos (Ferguson e cols., 1982; Truong e cols., 2005). Quanto maior o número de linfonodos comprometidos pior o prognóstico (Lakhani e cols., 2012; Ellis e cols., 2013). O envolvimento de linfonodos no nível mais distal da axila e linfonodos da cadeia mamária

interna tem o pior prognóstico (Ellis e cols., 2013). O estágio de comprometimento linfonodal é dividido em quatro pelo TNM: N0 (sem metástase), N1 (1-3 linfonodos metastáticos), N2 (4-9 linfonodos comprometidos) e N3 (acima de 10 linfonodos comprometidos, ou metástase no nível III, ou supraclavicular, ou na cadeia mamária interna). A categoria N1 pode ser envolvida por uma micrometástase, definida com uma medida entre 0,2 e 2 mm, sendo descrita como N1mi (Singletary e cols., 2002). Atualmente, a frequência de positividade de linfonodos diminuiu e a introdução da técnica de biópsia do LFNS diminuiu o número de esvaziamentos axilares (Ellis e cols., 2013). Um grande estudo realizado não identificou diferença na sobrevida global, na sobrevida livre de doença e no controle local do carcinoma de mama entre cirurgia com amostragem do linfonodo sentinela ou cirurgia com esvaziamento axilar convencional (Krag e cols., 2010). O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo da cadeia que drena o tumor da mama e é o primeiro sítio de metástase linfática do câncer de mama (Giuliano e cols., 1995).

C. Tipo histológico

Alguns subtipos de carcinoma de mama têm um prognóstico favorável bem definido. Os carcinomas tubular e túbulo-lobular (Rakha e cols., 2010), o carcinoma mucinoso puro (Clayton, 1986) e o carcinoma cribriforme invasivo (Venable e cols., 1990) têm um prognóstico melhor que o CITNE. Considerando casos com mesmo grau histológico, o carcinoma medular e o CLI apresentam prognóstico melhor que o CITNE em algumas séries (Jensen e cols., 1997; Rakha e cols., 2009a; Rakha e Ellis, 2010). Rakha e cols. (2006b) descreveram um novo tipo de carcinoma de mama, denominado

carcinoma mamário tipo basal, com pior prognóstico quando comparado com outros tipos de câncer de mama.

D. Grau histológico

O grau histológico é um indicador prognóstico forte e proporciona informações sobre as características intrínsecas biológicas do tumor. O sistema de graduação recomendado pela OMS e por outras entidades internacionais é o sistema de graduação de Nottingham (SGN) (Lakhani e cols., 2012). Esse sistema de graduação leva em conta, de forma semiquantitativa, características morfológicas do tumor incluindo: (a) o grau de diferenciação glandular do tumor (formação de luz tubular), (b) o grau de pleomorfismo nuclear e (c) o número de figuras mitóticas (que indica uma medida de proliferação) (Lakhani e cols., 2012). Cada característica recebe uma pontuação (Tabela 2, pág. 120) que são somadas para atingir um escore final e posterior definição da graduação final em: 1 ou baixo grau (escores 3, 4 ou 5), 2 ou grau moderado (escores 6 e 7) ou 3 ou alto grau (escores 8 ou 9).

E. Invasão linfovascular

A detecção de invasão linfovascular no tumor primário é um marcador de potencial metastático e de significado prognóstico, principalmente no grupo de pacientes com linfonodos negativos (Mohammed e cols., 2009a). Alguns estudos não identificaram correlação com desfecho clínico (Sears e cols., 1982; Dawson e cols., 1986); porém, outros demonstraram que a presença de invasão linfovascular prediz recorrência e está associada com diminuição de sobrevida (Dawson e cols., 1986; Locker e cols., 1989; Mohammed e cols., 2009b).

F. Necrose

A presença de necrose tumoral em carcinomas invasores da mama está associada com pior prognóstico e geralmente aparece nos CITNE, nos tumores de alto grau histológico e nos carcinomas com fenótipo basal (Tsuda e cols., 2000; Yu e cols., 2010; Ellis e cols., 2013).

G. Características do estroma

Com base em estudos subjetivos esse fator prognóstico tem uma associação variável de fibrose no estroma tumoral com bom prognóstico, porém não foi encontrada diferença na sobrevida em curto ou longo prazo (Black e cols., 1983; Dawson e cols., 1986). Parham e cols. (1988) em um estudo morfométrico encontraram um prognóstico melhor no grupo de tumores com maior celularidade e menor fibrose no estroma. Outra característica do estroma identificada em alguns estudos é a presença de elastose (Ellis e cols., 2013). Um estudo sugere que a presença de elastose no centro do tumor está associada com bom prognóstico (Davies e Barnard, 1982), porém outros estudos não confirmaram essa hipótese (Carlomagno e cols., 1995, Ellis e col., 2013).

H. Outros fatores convencionais

A presença de um componente de carcinoma *in situ* extenso no tumor está associada com melhor prognóstico e uma frequência menor de metástase em linfonodo (Matsukuma e cols., 1991). Idade jovem, história familiar positiva, apresentação primária com sintomas (e não por rastreamento) e comprometimento de pele ou mamilo (doença de Paget cutânea) estão associados com pior prognóstico; enquanto que um infiltrado linfoplasmocitário acentuado e focos de fibrose estão associados com bom

prognóstico (Fitzgibbons e cols., 2000; Hasebe e cols., 2002; Rakha e cols., 2009a; Blamey e cols., 2010; Marginean e cols., 2010). Ainda, outros fatores prognósticos investigados incluem: infiltrado inflamatório rico células T CD8+, angiogênese (densidade microvascular aumentada), índice apoptótico e invasão perineural (Ellis e cols., 2013).

2.1.4.2 Moleculares

No câncer de mama, a determinação da expressão de receptores hormonais, superexpressão de HER2 e investigação do índice proliferativo da neoplasia são procedimentos padrão para o manejo do paciente (Wolff e cols., 2007; Hammond e cols., 2010). O RE e o RP informam que a neoplasia responde à terapia endócrina e tem um bom prognóstico, já o HER2 informa que a neoplasia responde à terapia seletiva anti-HER2 e tem um pior prognóstico (Ellis e cols., 2013). A ASCO/CAP recomendam que todo tumor primário e recorrente de mama seja investigado para RE, RP e HER2 (Wolff e cols., 2007; Hammond e cols., 2010; Hammond, 2011). Somado aos seus valores preditivos e prognósticos, o papel desses marcadores na atual classificação molecular intrínseca do carcinoma de mama é determinante (Perou e cols., 2000; Sorlie e cols., 2003).

O marcador de índice proliferativo mais estudado é o Ki-67 (MIB1), que aparece exclusivamente em células dentro do ciclo celular (Colozza e cols., 2005) e pode ser usado para prever resposta à terapia neoadjuvante (Vincent-Salomon e cols., 2004; Miglietta e cols., 2009) e adjuvante (Aleskandarany e cols., 2010). Além de sua ação como fator preditivo em quimioterapia, o Ki-67 pode ser usado para dividir carcinomas de mama grau

2 e carcinomas de mama RE positivos em subcategorias com prognósticos distintos (Cheang e cols., 2009; Aleskandarany e cols., 2011).

Os principais marcadores do fenótipo basal utilizados são a citoqueratina (CK) 5/6 e o EGFR, além de outros menos utilizados como CK14 e CK17 (Nielsen e cols., 2004; Rakha e Reis-Filho, 2009). Recentemente, foi demonstrado que usando marcadores basais pode-se identificar um subgrupo de carcinomas de mama triplo negativo (cerca de 60-90% dos casos) com biologia e clínica distinta e com um pior prognóstico (Rakha e cols., 2007; Cheang e cols., 2008; Rakha e cols., 2009b).

2.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2)

2.2.1 Biologia

HER2 faz parte da família de quatro receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF) que incluem: EGFR (HER1, ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4). O gene *ERBB2* está localizado na região 12 do braço longo (q) do cromossomo 17 (17q12) e codifica a proteína de membrana HER2 de 185 kDa que demonstra atividade de tirosina quinase (Akiyama e cols., 1986). Essa proteína receptora é estruturalmente constituída por um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana e um domínio catalítico tirosina quinase intracelular (Strachan e Read, 2011). A via de sinalização onde HER2 funciona é complexa e apresenta um nível de entrada constituído pelos receptores de membrana (HER1-4) e seus ligantes (EGF, TGF α , amphiregulina, heregulina e outros), que iniciam o sinal do lado extracelular. Depois, um sistema central

de processamento do sinal, constituído por um conjunto de interações bioquímicas, promove a expressão gênica no núcleo celular através de diversos fatores de transcrição. Dependendo da combinação de fatores de transcrição atuando nos genes, a resposta ao sinal afetará funções celulares como proliferação, migração, diferenciação, apoptose e angiogênese (Citri e Yarden, 2006).

Após a estimulação/ligação por um ligante no domínio extracelular, os receptores EGF sofrem dimerização e transfosforilação de seu domínio intracelular com consequente ativação de vias sinalizadoras intracelulares mediadoras de proliferação e diferenciação (Moasser, 2007). O mecanismo de ativação celular de HER2 ainda não está completamente elucidado (Normanno e cols., 2005). Por exemplo, não se conhece nenhum ligante ativador do receptor HER2 homodimerizado. Porém, apesar de não ter ligante, a dimerização de HER2 com outros membros da família EGF forma heterodímeros que têm ação mais potente e estável, ou ainda, quando expresso em altos níveis pode formar homodímeros para sua ativação (Graus-Porta e cols., 1997; Moasser, 2007). Essas tirosinas fosforiladas acoplam-se com outras moléculas sinalizadoras intracelulares ativando vias mensageiras secundárias e outras vias sinalizadoras na membrana (Citri e Yarden, 2006; Moasser, 2007).

Os fatores de transcrição, ativados pela via, regulam genes envolvidos na sobrevivência, invasão e metástase. HER2 expõe seus domínios de dimerização e é o parceiro principal de dimerização da família EGF. HER2 apresenta a maior atividade quinase catalítica e heterodímeros contendo HER2 têm atividade sinalização com maior força (Graus-Porta e cols., 1997;

Citri e Yarden, 2006). HER3 tem como ligante a heregulina, mas não apresenta atividade tirosina quinase e, assim como HER2, precisa se ligar com outro membro da família para sua ativação. Apesar disso, apresenta múltiplos sítios de ligação para PI3K (fosfoinositídeo 3-quinase) e quando heterodimerizada com HER2 é o estimulador mais potente da via anti-apoptótica PI3K/AKT (proteína quinase B)/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Citri e Yarden, 2006; Moasser, 2007). A ativação de HER2 também pode ocorrer quando existir formação de complexos com alguns outros receptores de membrana como IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) (Nahta e cols., 2005). O RE, através de uma via não genômica fora do núcleo, também pode ativar a via de sinalização através de HER2 (Shou e cols., 2004). Uma forma truncada constantemente ativada de HER2, sem sua porção amino terminal extracelular (p95-HER2) e que dimeriza com os outros membros da família EGF, foi identificada em alguns carcinomas de mama (Gajria e Chandarlapaty, 2011; Han e cols., 2012).

2.2.2 Superexpressão de HER2 no câncer de mama

A atividade oncogênica de HER2 foi demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*. Pierce e cols. (1991) identificaram que a superexpressão de HER2 estava associada com a transformação e oncogênese de células epiteliais de glândulas mamária humana. Em animais, a superexpressão de HER2 levou ao desenvolvimento de neoplasias mamárias e indução de metástases (Bouchard e cols., 1989; Guy e cols., 1992). Tecidos sadios apresentam baixos níveis de HER2 na membrana. O aumento de expressão de HER2 é

observado em cerca de 10-20% dos casos de CM e em alguns casos de câncer de ovário e estômago (Lal e cols., 2004; Owens e cols., 2004; Yaziji e cols., 2004; Lee e cols., 2005; Gravalos e Jimeno, 2008). O CM pode apresentar até 50 cópias do gene *ERBB2* e ter a proteína HER2 aumentada em até 100 vezes, resultando na expressão de cerca de dois milhões de receptores na superfície da célula neoplásica (Kallioniemi e cols., 1992).

A amplificação de *ERBB2* acontece numa etapa inicial da oncogênese mamária em humanos. Um dos indícios é sua alta prevalência (~50%) em carcinomas intraductais (Park e cols., 2006). Essa amplificação fica mantida durante a progressão da doença para neoplasia invasora, disseminação loco-regional e metástase à distância (Latta e cols., 2002; Carlsson e cols., 2004). Assim, a observação de que apenas aproximadamente 20% dos casos de carcinoma invasor da mama são HER2 positivos sugere que a maioria dos carcinomas intraductais não progride para neoplasia invasora. A amplificação de HER2 define um grupo de câncer mamário com expressão gênica característica e que se mantém durante a progressão tumoral (Perou e cols., 2000; Weigelt e cols., 2005; Cancer Genome Atlas Network, 2012). A expressão de HER2 pode desaparecer em alguns casos de CM tratados com trastuzumabe, possivelmente pela seleção de um clone de célula HER2 negativo não eliminado pelo tratamento (Mittendorf e cols., 2009). Ao contrário, alguns tumores inicialmente negativos para HER2 podem se tornar positivos, sendo uma das principais causas de não resposta à terapia hormonal anti-RE (Gutierrez e cols., 2005). Como o RE pode agir como regulador negativo de HER2, e HER2 pode regular negativamente o RE, o bloqueio do RE pode aumentar a expressão de HER2, e o bloqueio de HER2

pode aumentar a expressão de RE (Munzone e cols., 2006; Lopez-Tarruella e Schiff, 2007).

Os carcinomas com amplificação de *ERBB2* apresentam como característica um alto grau histológico e nuclear na morfologia (Lakhani e cols., 2012). Também apresentam uma sensibilidade aumentada para agentes citotóxicos como doxorubicina e resistência relativa à terapia hormonal, além de um índice elevado de metástase para o cérebro e vísceras (Gabos e cols., 2006; Ross e cols., 2009). Embora os tumores HER2 positivos geralmente apresentam baixos níveis de expressão de receptores hormonais, cerca da metade pode expressar RE (Konecny e cols., 2003). Muitos deles apresentam mutação e expressão de P53 (Tsutsui e cols., 2003). Eles mostram, ainda, altos índices proliferativos e aneuploidia, e estão associados com pior prognóstico (Allred e cols., 1992; Lakhani e cols., 2012).

2.3 Métodos de estudo e detecção de HER2

A detecção do estado de HER2 é muito importante, pois seleciona pacientes para um tratamento potencialmente curativo. Atualmente, para se proporcionar o tratamento personalizado com terapia alvo anti-HER2 para um paciente com câncer de mama, deve-se primeiramente confirmar o aumento da expressão de HER2 e/ou amplificação de seu gene correspondente com um método de testagem. Em 2007, um grupo de especialistas da ASCO/CAP fez uma extensa revisão crítica da literatura e desenvolveu recomendações para o teste de HER2 com o objetivo de uniformizar e aumentar o seu desempenho (Wolff e cols., 2007). Foram propostas diretrizes rigorosas

sobre aspectos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos dos testes usados para investigação do status de HER2. Assim, puderam garantir um resultado consistente e com acurácia em no mínimo 50% dos casos com resultado positivo ou negativo (Hammond, 2011). Os métodos principais de estudo de HER2 são: IHQ, FISH, CISH, SISH, Q-RT-PCR (*quantitative real time PCR*) e CGH. A maioria dos testes é realizada em tecido neoplásico fixado em formalina e incluído em parafina, mas tecido congelado e esfregaços ou blocos de células também podem ser utilizados. As principais vantagens e desvantagens dos principais métodos de detecção de HER2 estão listadas na Tabela 3 (pág. 121).

2.3.1 Imuno-histoquímica

A reação de IHQ depende de uma reação imune entre um Ac específico e o receptor HER2 localizado na membrana plasmática de uma célula. A IHQ é uma técnica bem estabelecida, bastante difundida e com preço acessível. As principais variáveis que influenciam no resultado da reação foram identificadas e incluem: o tipo de fixação tecidual, os reagentes utilizados na reação, o protocolo utilizado na reação, o tipo de Ac utilizado e a interpretação do escore de marcação (Penault-Llorca e cols., 1994; Press e cols., 1994; O'Leary, 2001; Khoury e cols., 2009; Lourenço e cols., 2009; Taylor e cols., 2011). IHQ é um teste qualitativo que no caso da investigação do gene *HER2* é usado como um teste semiquantitativo para detecção do aumento da expressão da proteína, baseado em uma validação técnica e clínica.

Os primeiros estudos clínicos que testaram o trastuzumabe no

tratamento dos pacientes com câncer de mama exigiam o desenvolvimento de um teste para identificar a expressão de HER2 no tumor (Cobleigh e cols., 1999; Slamon e cols., 2001). O resultado foi a geração, para a pesquisa clínica, de um teste de IHQ usando dois mAbs (4D5 e CB11) específicos para regiões diferentes da proteína HER2 (Slamon e cols., 2001). O status de HER2 nos tumores foi avaliado de maneira semiquantitativa numa escala com escore que variava de 0 a 3+, e que correspondia ao aumento do nível de expressão de HER2 que aparece histologicamente como uma maior intensidade de coloração/marcação dos receptores na membrana das células (Dybdal e cols., 2005).

Atualmente, as lâminas coradas seguem diretrizes de interpretação da ASCO/CAP que são reconhecidas internacionalmente (Wolff e cols., 2007). O escore do resultado da coloração acessa qualitativamente a intensidade e porcentagem de marcação dos receptores na membrana nas células neoplásicas (Tabela 4, pág. 122). Os resultados possíveis são (a) positivo ou 3+, quando uma coloração periférica nos limites da membrana citoplasmática celular de intensidade forte, completa e uniforme for encontrada em mais de 30% das células tumorais; (b) indeterminado ou 2+, quando for encontrada uma coloração periférica celular completa, não uniforme e de intensidade fraca a moderada em pelo menos 10% das células, ou quando for observado uma coloração forte e completa igual ou menor do que 30% das células e (c) negativo, quando nenhuma marcação (escore 0) ou marcação fraca completa em menos de 10% das células ou quando uma marcação fraca incompleta em qualquer proporção de células for encontrada (escore 1) (Wolff e cols., 2007). Cada um desses resultados leva a um tipo diferente de manejo no

tratamento do paciente com câncer de mama (Wolff e cols., 2007).

A correlação entre a intensidade de marcação dos receptores na membrana plasmática com Acs anti-HER2 e o aumento da expressão da proteína foi demonstrado (Press e cols., 1994). Uma marcação citoplasmática pode ser identificada em alguns casos, porém não foram identificados correlação com amplificação gênica de *ERBB2* (Press e cols., 1994) ou com níveis de HER2 mRNA (Taylor e cols., 1998 e 1999). Também, nenhuma associação entre marcação de membrana e piora de prognóstico foi encontrada em mulheres com CM com linfonodo positivo (Têtu e Brisson, 1994). Porém, um estudo identificou associação entre a marcação citoplasmática moderada a forte de HER2 com pior prognóstico usando o Ac CB11 (Keshgegian e Cnaan, 1997).

Os principais clones de Acs anti-HER2 disponíveis são: um pAc de coelho, clone A0485 (HercepTest™, Dako, Dinamarca) e quatro mAcs, sendo dois de camundongo, clones CB11 (Novocastra, Inglaterra) e TAB250 (Invitrogen, EUA), e dois de coelho, clones 4B5 (PATHWAY HER2/neu®, Ventana, EUA e Genentech, EUA) e SP3 (NeoMarkers, EUA e Cell Marque, EUA). Os Acs direcionados à porção intracelular da proteína são o A0485, o CB11 e o 4B5. Os direcionados à porção extracelular são o TAB250 e o SP3. Cada Ac tem uma característica distinta de coloração e desempenho (Nunes e cols., 2008; Dekker e cols., 2012). O Herceptest tem alta sensibilidade, porém sua baixa especificidade foi demonstrada em alguns estudos (Jacobs e cols., 1999a; Roche e Ingle, 1999; Ricardo e cols., 2007; Nunes e cols., 2008). Powell e cols. (2008) identificaram no clone 4B5 uma marcação de membrana mais nítida, com menos coloração citoplasmática e estromal de

fundo, quando comparado com o clone CB11. Em outro estudo, os Acs SP3 e 4B5 demonstraram uma maior concordância com HIS, quando foram comparados com o A0485 e o CB11 (Rhodes e cols., 2002). Thomson e cols. (2001) observaram em um estudo sensibilidade maior do TAB250 quando comparado com o A0485 e o CB11.

A reação de IHQ para HER2 deve incluir controles positivos e negativos, que podem ser lóbulos mamários sadios presentes no corte da própria amostra, em cada ensaio realizado (Bhargava e cols., 2011). Na descrição do resultado da IHQ deve-se incluir a intensidade e a porcentagem de células coradas; recomenda-se, também, informar o tipo de fixador e tempo de fixação do tecido e o tipo de protocolo utilizado na reação (Wolff e cols., 2007). A IHQ é altamente dependente da preservação e fixação do tecido analisado. O único fixador recomendado é o formol 10% tamponado (formalina neutra, pH=7,0) com um tempo mínimo de fixação de seis horas, porém não mais que 48 horas, e o ideal é de 24 horas (Wolff e cols., 2007; Bhargava e cols., 2011).

Vários estudos demonstraram discordância entre resultados de IHQ e HIS entre laboratórios centrais com controle de qualidade e laboratórios periféricos pequenos (Paik e cols., 2002; Rhodes e cols., 2002; Dowsett e cols., 2007; Middleton e cols., 2009; Shah e cols., 2010; Bilous e cols., 2012). Isso acontece porque na IHQ existem variáveis desde antes da fixação até a interpretação pelo patologista que influenciam no resultado. Essas variações são tradicionalmente divididas em pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas (de interpretação) (Wolff e cols., 2007). Variáveis pré-analíticas começam na sala cirúrgica e são mais difíceis de controlar, pois ocorrem fora do

laboratório de patologia. O tempo de isquemia fria (peça cirúrgica fora do fixador), o tipo de fixador e o tempo inadequado de fixação, principalmente em peças grandes, podem afetar muito os resultados de uma IHQ (Taylor e cols., 2011). As diretrizes da ASCO/CAP recomendam que o tempo de início de fixação deva ser o menor possível, o fixador utilizado deve ser formalina tamponada em tempo não inferior a 6 horas e não superior a 48 horas, este tempo deve sempre ser indicado em cada amostra (Wolff e cols., 2007). Algumas variações que ocorrem na fase analítica podem ser diminuídas com uso de sistemas automatizados (Roche cols., 2002; Perez e cols., 2006). Uma das limitações dos sistemas de escore da marcação de HER2 é a variação interobservador, principalmente em casos com coloração moderada (2+) de membrana (Hoang e cols., 2000; Thomson e cols., 2001).

A interpretação da superexpressão de HER2 por IHQ em biópsias incisionais (*core* biópsia ou *tru-cut*) pode levar a um falso-positivo por artefatos (p.ex. coloração de borda) e, também, pode não revelar a heterogeneidade existente nos tumores devido à amostragem limitada. Com isso, existe uma recomendação de testagem de HER2 no material de biópsia excisional (Wolff e cols., 2007). Apesar disso, os índices de concordância entre biópsia incisional e excisional descritos na literatura variam entre 88% e 99% (Rhodes e cols., 2002; Arnedos e cols., 2009; Ahmed e cols., 2011).

Por fim, as diretrizes da ASCO/CAP afirmam que a marcação de membrana no epitélio sadio de glândula mamária é um dos critérios de exclusão para rejeitar um resultado de teste de HER2 através de IHQ (Wolff e cols., 2007). A calibração adequada da metodologia de IHQ com casos ou linhagens celulares sabidamente positiva, negativa ou indeterminada, produz

um teste sem nenhuma coloração do epitélio da glândula mamária sadia devido à baixa expressão fisiológica de HER2 (Robertson e cols., 1996; Nagy e cols., 1999). A categoria HER2 3+ é prática e requer uma imunorreatividade positiva com coloração periférica celular dos receptores na membrana plasmática forte e completa em mais de 30% das células tumorais. Na maioria dos casos positivos cerca de 90% das células são positivas (Hammond, 2011). A opção por um limite de corte de 30% nas diretrizes da ASCO/CAP objetiva permitir uma margem de perda de proteína que pode acontecer após a fixação tecidual (Leong e cols., 2006).

2.3.2 Hibridização *in situ*

O princípio da HIS é a geração de sondas (pequenas sequências) de DNA marcadas, complementares às sequências genômicas de interesse, e posterior hibridização no tecido (Pfeifer, 2006). Com a HIS, existe o benefício da avaliação simultânea da histomorfologia da neoplasia e a amplificação do gene *HER2* na mesma amostra. Estas técnicas são mais complexas e trabalhosas que a IHQ (Taylor e cols., 2011), necessitando de dois dias para sua realização (Tabela 5, pag. 123). Assim como na IHQ, porém em menor escala, variáveis pré-analíticas, como a deficiente preparação da amostra (p.ex. fixação inadequada), podem levar a perda de sinais, artefatos de coloração e alteração de morfologia (Pfeifer, 2006). A HIS pode ser aplicado a vários tipos de amostras: linhagens de células, tecido incluído em parafina, tecido congelado e micro-arranjos de tecido. A realização de HIS de forma manual ou automatizada apresenta resultados comparáveis e semelhantes, sendo ambos os métodos confiáveis (Fritzsche e cols., 2010; García-

Caballero e cols., 2010; Bartlett e cols., 2011a e 2011b; Brüggmann e cols., 2011; Yan e cols., 2011; Ohlschlegel e cols., 2013).

As técnicas de HIS podem usar uma sonda de coloração única marcando o gene *HER2*, ou podem associar uma segunda sonda controle marcando a região centromérica do cromossomo 17 (CEP17 ou CEN17), na qual o gene *HER2* está situado (Pfeifer, 2006; Bhargava e cols., 2011). O número de sinais do gene e do CEN17 são então visualizados no microscópio e contados nas células. Recomenda-se contar 50 células de diferentes áreas do tumor e calcular uma média de número de sinais de *HER2* ou a razão da média de sinais de *HER2* para média de sinais de CEP17 (Hwang e cols, 2011). A diretriz da ASCO/CAP definiu como tumor (a) negativo para amplificação de *HER2*, quando a razão *HER2/CEP17* for menor que 1,8 no caso de HIS-DC ou quando o número de sinais do gene *HER2* for menor que 4 no caso de sonda única; (b) equívoco ou indeterminado, quando a razão estiver entre 1,8 e 2,2 ou número de sinais de *HER2* estiver entre 4 e 6; e (c) positivo, quando a razão for maior que 2,2 ou quando o número de sinais de *HER2* for maior que 6 (Wolff e cols., 2007) (Tabela 6, pág. 124).

A razão *HER2/CEP17* é utilizada para distinguir uma verdadeira amplificação ($HER2/CEP17 \geq 2,2$) de uma falsa amplificação devido à presença de múltiplas cópias do cromossomo 17 (polissomia) ($HER2/CEP17 < 2,2$). O uso da razão *HER2/CEP17* para definir o status de *HER2* através de HIS pode apresentar dificuldades quando à coamplificação da região centromérica do cromossomo 17 ocorre junto com a amplificação de *HER2* (Mansfield e cols., 2013). A possibilidade de um falso-negativo pode

acontecer e o uso de uma sonda de controle interno no cromossomo 17 pode ser utilizado (Mansfield e cols., 2013). Nos casos onde o escore de *HER2* for indeterminado, recomenda-se a contagem de células adicionais e/ou a realização de IHQ (Wolff e cols., 2007). Bartlett e cols. (2008 e 2011b) não recomendam a realização de HIS sem a presença da sonda para o CEN17 devido à possibilidade de aneussomia do cromossomo 17.

2.3.2.1 FISH

A técnica de FISH para investigação da amplificação de *HER2* está bem estabelecida e apresenta evidência clínica de relação prognóstica e preditiva comprovada em vários estudos (Dybdal e cols., 2005; Mass e cols., 2005; Sauter e cols., 2009). A sonda de FISH é marcada com revelador fluorescente que pode ser visualizado com microscópio de fluorescência. Uma alta especificidade e boa reprodutibilidade da técnica foi demonstrada desde o seu desenvolvimento (Pauletti e cols., 1996; Jacobs e cols., 1999b; Owens e cols., 2004; Press e cols., 2005; Perez e cols., 2006). FISH é considerado por muitos o método padrão-ouro para avaliação da amplificação de *HER2* e foi utilizado nos primeiros ensaios clínicos que avaliaram o desfecho de pacientes com carcinomas *HER2* positivos (Dybdal e cols., 2005; Mass e cols., 2005; Schmidt e cols., 2005).

A concordância entre carcinomas *HER2* 3+ por IHQ e amplificados por FISH é grande, sendo menor nos casos *HER2* 2+ (Jacobs e cols., 1999b; Jimenez e cols., 2000; Kakar e cols., 2000; Ridolfi e cols., 2000; Wang e cols., 2000; Lebeau e cols., 2001; McCormick e cols., 2002; Ogura e cols., 2003; Owens e cols., 2004; Dybdal e cols., 2005). Lal e cols. (2004)

estudaram 2279 casos de CM invasivos e demonstraram concordância entre IHQ e FISH-DC em 87% dos casos, e entre IHQ e FISH-SC em 86% dos casos. A concordância nos casos 0, 1+ ou 3+ por IHQ atingiu 97% com FISH-DC e 96% com FISH-SC, ao passo que a maioria dos casos discrepantes ocorreu nos casos com escore 2+. Em um estudo multicêntrico com 426 mulheres com CM que investigou a correlação entre o Herceptest e FISH foi encontrado que 2/270 (0,7%) dos casos de IHQ 0 ou 1+ foram FISH positivo para HER2, 6/102 (5,9%) dos casos de IHQ 3+ foram FISH negativos e que, entre 54 casos com IHQ 2+, apenas 26 (48%) demonstraram amplificação de *HER2* por FISH (Dowsett e cols., 2003). A maioria dos trabalhos demonstra ausência de amplificação gênica de *HER2* nos casos de escore 2+ por IHQ (Jimenez e cols., 2000; Ridolfi e cols., 2000; Tubbs e cols., 2001; Owens e cols., 2004; Dybdal e cols., 2005; Rossi e cols., 2006).

Alguns estudos sugerem o FISH como o método primário de investigação do status de HER2 (Elkin e cols., 2004; Mass e cols., 2005; Press e cols., 2005; Sauter e cols., 2009). Porém, um grande estudo com 2963 casos obtidos de 135 locais demonstrou para o teste de FISH, em comparação à IHQ, um índice de insucesso significativamente maior (5% contra 0,08%), custo de reagentes maior (14 vezes) e tempos maiores para realização (36 horas contra 4 horas) e interpretação (7 minutos contra 45 segundos) (Yaziji e cols., 2004). Este estudo concluiu que a determinação do status de HER2 é mais efetiva quando a IHQ é usada como método primário e FISH como método secundário em casos com coloração indeterminada (2+) (Yaziji e cols., 2004). Além disso, os sinais fluorescentes diminuem com o tempo rapidamente e não podem ser arquivados, sendo necessário um

arquivo digital com fotos de todos os casos (Pfeifer, 2006). Também, a observação detalhada da histopatologia do tumor não é possível, o que torna necessária a correlação com corte histológico corado com HE para (a) garantir avaliação do componente invasivo, e (b) possibilitar a identificação de uma área de amplificação do gene *HER2* heterogênea no tumor (Pathmanathan e Bilous, 2012).

2.3.2.2 CISH

A técnica de CISH é um método de HIS, semelhante ao FISH, que usa sondas de DNA marcadas com cromógeno para serem observadas em microscópio de luz (Lambros e cols., 2007; Penault-Llorca e cols., 2009). Esta técnica foi descrita por Tanner e cols. (2000) para detecção da amplificação de *HER2* em carcinomas de mama. Como no FISH, uma ou duas sondas podem ser usadas (Hoff e cols., 2010; García-Caballero e cols., 2010; Bartlett e cols., 2011a). De forma resumida, a técnica envolve o pré-tratamento de tecido fixado em formalina e incluído em parafina, posterior digestão em pepsina e adição de sonda de DNA marcada com digoxigenina, que fica hibridizando em torno de 14 a 16 horas (Tanner e cols., 2000). A imunodetecção da sonda segue após lavagem e envolve a aplicação de anticorpos anti-digoxigenina marcados com fluoresceína, seguidos de antifuoresceína marcados com peroxidase e revelados com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Tanner e cols., 2000).

As principais vantagens da técnica de CISH incluem: possibilidade de interpretação com o microscópio de luz, preservação detalhada da morfologia, sinais permanentes com possibilidade para arquivamento, técnica

de menor complexidade, menor tempo de reação e baixo custo dos reagentes (Zhao e cols., 2002; Bhargava e cols., 2005; Loring e cols., 2005; Cayre e cols., 2007; Lambros e cols., 2007; Penault-Llorca e cols., 2009).

Uma alta concordância (superior a 95%) entre FISH e CISH foi demonstrada na maioria dos estudos que comparam as duas técnicas (Tanner e cols., 2000; Dandachi e cols., 2002; Arnould e cols., 2003; Isola e cols., 2004; Bhargava e cols., 2005; Gong e cols., 2005 e 2009; Bilous e cols., 2006; Hanna e Kwok, 2006; Sáez e cols., 2006; Cayre e cols., 2007; Van de Vijver e cols., 2007; Bartlett e cols. 2011a). Gong e cols. (2009) identificaram uma concordância entre CISH e FISH de 99% e 99,1% para casos positivos e negativos, respectivamente, usando os últimos critérios da ASCO/CAP. Uma análise de 94 carcinomas de mama comparando o desempenho entre CISH-DC e FISH-DC, usando os critérios da ASCO/CAP, encontrou um índice de concordância de 100% quando casos indeterminados pelo FISH foram excluídos e de 95,7% quando incluídos (Nitta e cols., 2008).

A maioria das discordâncias de resultados entre FISH e CISH ocorre nos casos com baixa amplificação de *HER2* e pode ser resolvida (melhorada) com o uso de CISH-DC (Van de Vijver e cols., 2007). A concordância pode diminuir, também, em casos com anormalidades mais complexas do gene *HER2* e amplificação concomitante do CEN17 (Mansfield e cols., 2013). Porém, estudos mais recentes comparando FISH e CISH-DC têm demonstrado um aumento do índice de concordância (Di Palma e cols., 2007; García-Caballero e cols., 2010; Hoff e cols., 2010; Meijer e cols., 2011).

O sistema de escore de CISH envolve a avaliação de sinais individuais ou agregados de sinais. Porém, algumas vezes, a interpretação e

quantificação do número individual de cópias do gene investigado não é possível devido à fusão de sinais (Zhao e cols., 2002; Penault-Llorca e cols., 2009). Por exemplo, um kit aprovado pela agência reguladora FDA considera o resultado positivo na presença de seis ou mais cópias de *HER2*, na presença de *clusters* (aglomerados) pequenos ou grandes, ou uma combinação destes em mais de 50% das células neoplásicas (Invitrogen, 2008). Na contagem do número de cópias do gene, agregados pequenos correspondem aproximadamente a 3 sinais e agregados grandes a 5 sinais (Invitrogen, 2008). Foi observado que um sistema de escore uniformizado, como as diretrizes da ASCO/CAP (Wolff e cols., 2007), resulta em uma maior concordância com FISH (Gong e cols., 2009).

2.3.2.3 SISH

A técnica de SISH baseia-se na deposição de prata no alvo hibridizado após uma reação enzimática metalográfica (Ventana, 2012). Os sinais são permanentes e podem ser observados com microscópio de luz. O SISH pode usar uma ou duas sondas, como o FISH e CISH, e o sistema de escore é o recomendado pela ASCO/CAP (Wolff e cols., 2007). Essa técnica pode ser totalmente automatizada e tem um tempo de reação abaixo de 6 horas (Ventana, 2012).

Os índices de concordância do SISH com FISH variam entre 87% e 97% (Downs-Kelly e cols., 2005a e 2005b; Dietel e cols., 2007; Capizzi e cols., 2008; Carbone cols., 2008; Nitta e cols., 2008; Shousha e cols., 2009; Papouchado e cols., 2010; Koh e cols., 2011; Varga e cols., 2012). Em um estudo multicêntrico com 298 casos de carcinoma invasor da mama, a

concordância entre SISH e FISH foi de 96,6% quando interpretado pelos critérios aprovados pelo FDA, e de 98,9% quando analisado pelos critérios da ASCO/CAP. Outro estudo demonstrou alta reprodutibilidade interobservador e interlaboratorial da técnica (Carbone e cols., 2008). Fritzsche e cols. (2010) observaram boa correlação entre CISH e FISH em preparados citológicos.

O FDA recentemente aprovou uma técnica automatizada de dupla marcação com sondas para *HER2* e *CEP17* que usa SISH e CISH para interpretação (INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, Ventana, EUA). Os sinais de *HER2* são visualizados como pontos pretos, oriundos de uma SISH com prata, e os sinais do *CEP17* como pontos vermelhos, oriundos da reação de CISH com cromógeno *Fast Red*. Essas duas cores demonstram um alto contraste entre as duas marcações (Nitta e cols., 2008). Essa técnica demonstrou alta concordância com FISH em estudos recentes (Papouchado e cols., 2010; Koh e cols., 2011). O primeiro estudo publicado com esta técnica encontrou 95,7% de concordância com FISH utilizando os critérios da ASCO/CAP, e 100% de concordância após a exclusão de casos indeterminados pelo FISH (Nitta e cols., 2008).

2.3.3 Q-RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Q-RT-PCR) pode medir os níveis de amplificação gênica de *HER2* ou o aumento dos níveis de expressão do *HER2* mRNA (Pfeifer, 2006; Strachan e Read, 2011). A técnica faz uso de um par de primers (iniciadores), uma sequência curta de nucleotídeos, que se ligam ao gene *HER2* ou ao *HER2* mRNA para amplificar um segmento alvo. Essa técnica pode ser realizada em tecido

fresco congelado e em tecido fixado e incluído em parafina (Pathmanathan e Bilous, 2012). O método tem boa sensibilidade, especificidade e analisa o status de HER2 de forma quantitativa, o que possibilita a diminuição de variação interobservador presente em outras técnicas (Merkelbach-Bruse e cols., 2003). Uma limitação significativa da técnica é a presença de muitos contaminantes na amostra investigada, pois durante o processo de extração do DNA ou RNA existe uma mistura de células neoplásicas, não neoplásicas e neoplasia *in situ*. Para aumentar a chance de resultado favorável da reação, pode ser realizada uma microdissecção da área de interesse (Gjerdrum e cols., 2004).

Diversos estudos determinaram os níveis de expressão da proteína HER2 através das técnicas de IHQ e Q-RT-PCR, demonstrando boa concordância entre elas e com os níveis de amplificação gênica identificados por FISH (Merkelbach-Bruse e cols., 2003; Gjerdrum e cols., 2004; Bossard e cols., 2005; Vinatzer e cols., 2005; Barberis e cols., 2008; Press e cols., 2008; Lehmann-Che e cols., 2011; Noske e cols., 2011). Outros dois estudos demonstraram uma concordância entre FISH e Q-RT-PCR de 83% a 98% e, também, demonstraram que FISH e Q-RT-PCR apresentaram (a) 100% de concordância para tumores com marcação negativa (0 ou 1+) por IHQ, (b) 63% a 96% de concordância para tumores com marcação indeterminada (2+) e (c) 100% de concordância para tumores com marcação positiva (3+) (Merkelbach-Bruse e cols., 2003; Gjerdrum e cols., 2004). Lehmann-Che e cols. (2011) utilizaram amostras obtidas por microdissecção tumoral e encontraram discordância entre IHQ e Q-RT-PCR em apenas 0,42% dos casos. A maioria dos casos discrepantes se encontrava no limite do corte de

positividade do método, problema encontrado nas outras técnicas de determinação do status de HER2. Essa discrepância também foi atribuída a heterogeneidade de expressão de HER2 e anormalidades do cromossomo 17 (Lehmann-Che e cols., 2011).

O método de RT-PCR quantitativo é usado em ensaios multigênicos como o *OncotypeDx* (Genomic Health, EUA). Um estudo comparou os resultados da determinação do status de HER2 com *OncotypeDx*, IHQ e FISH e identificou um alto índice de falso-negativos (76%) no primeiro método (Dabbs e cols., 2011). Nesse estudo, 26 de 36 casos (76%) foram negativos ou indeterminados usando o *OncotypeDx*, porém foram positivos através de FISH e IHQ, levando os autores a questionarem a confiabilidade deste método para determinação do status de HER2 (Dabbs e cols., 2011).

Outros métodos que usam PCR para medir os níveis de amplificação do gene HER2 também foram testados. Um estudo achou boa correlação entre Q-RT-PCR e PCR competitivo na determinação do status de HER2 (Millson e cols., 2003). Recentemente, a técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), que é baseada em PCR, mostrou-se eficiente para a testagem de HER2 (Moerland e cols., 2006; Purnomosari e cols., 2006; Moelans e cols., 2010a e 2010b; Farshid e cols., 2011). Esta técnica utiliza pequenos segmentos curtos do DNA alvo para ligação de uma sonda e tem a capacidade de avaliar múltiplas sequências diferentes de DNA alvo na mesma reação (Pfeifer, 2006). É uma técnica ideal para o DNA contido em espécimes de tecido fixados e incluídos em parafina, já que o seu DNA encontra-se fragmentado.

2.3.4 CGH

CGH (hibridização genômica comparativa) é uma técnica de citogenética molecular de alta resolução que detecta alterações no número de cópias de genes em grande escala investigando muitas vezes todo o genoma (Pfeifer, 2006; Strachan e Read, 2011). Recentemente, um estudo usando CGH para investigar casos onde o teste de HER2 foi discordante entre IHQ e FISH encontrou um maior número de cópias do gene HER2 em 18 casos (de 20). Além disso, atribuiu os falso-positivos e negativos por FISH à complexidade das alterações nos dois braços e na região centromérica do cromossomo 17 (Gunn e cols., 2010). Essas alterações levam a um desequilíbrio da real razão entre *HER2* e CEP17 identificada por FISH, o que foi também confirmado em outros estudos (Moelans e cols., 2010a; Varga e cols., 2012).

A polissomia completa do cromossomo 17 é um evento raro em carcinomas de mama e a técnica de cariotipagem por CGH foi fundamental na identificação desse achado (Marchiò e cols., 2009; Yeh e cols., 2009; Gunn e cols., 2010). A investigação de HER2 através de CGH pode detalhar com alta resolução o cromossomo 17 e pode auxiliar na resolução de casos de IHQ ou FISH problemáticos. CGH foi sugerido como um novo método de referência no estudo de casos não categorizados (Varga e cols., 2012).

2.4 Questões adicionais na interpretação do teste de HER2

Vários estudos identificaram um grupo de CM com resultado falso-positivo. Esse grupo varia entre 3% a 22% dos casos positivos e apresentam