

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

KAREN MARGARITA RICO ESCAMILLA

**Avaliação da relação da
classificação molecular por
imunofenotipagem nos carcinomas
infiltrantes de mama com escore 2 e
3 do CerbB2 e a concordância com a
amplificação do gene Her-2 pelo
método do SISH**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2017

Karen Margarita Rico Escamilla

**Avaliação da relação da
classificação molecular por
imunofenotipagem nos carcinomas
infiltrantes de mama com escore 2 e
3 do CerbB2 e a concordância com a
amplificação do gene Her-2 pelo
método do SISH**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Cláudio Galleano Zettler
Co-orientador: Dra Cláudia Giuliano
Bica

**Porto Alegre
2017**

Agradecimentos

A Deus, sem ele não existiria, agradeço dia a dia pelo amor, pela proteção e as bênçãos.

A meus pais pela criação, pelo amor e apoio incondicional, por sempre estar aqui para mim e incentivo ao estudo e a ser cada dia melhor.

A meus irmãos pela amizade, pelas conversas e por estar sempre disponíveis para mim.

À memória de meu vovô que apesar de não se encontrar entre nós é a força de motivação para recorrer este caminho longe de casa.

A minha vovó pelo amor, por ser uma segunda mãe, pelos cuidados e pelas palavras de alento.

A meus sobrinhos, Luciana e Luis Fernando, por me ensinarem sobre a inocência e a dar amor sem esperar nada em retorno e me incentivar a ser uma melhor pessoa.

A minha família por sempre me fazer sentir amada na distância.

A meu professor e orientador Cláudio Zettler, pela oportunidade concedida não só na realização deste mestrado, mas também na formação como patologista, pelo apoio e incentivo incondicional na vida acadêmica.

À professora Claudia Giuliano Bicca pela oportunidade de aprendizado, pela orientação no trabalho e por sua força positiva na realização deste.

A Renata e ao Fernando, que leram cuidadosamente meu trabalho e me ajudaram na correção do português.

À aquelas pessoas que de alguma forma ajudaram à realização deste trabalho, pela colaboração, pelo apoio, pelo carinho, pela amizade, pelo amor e pelos belos e inesquecíveis momentos.

A meu Bobby, meu cachorro, por ser meu companheiro nos momentos de solidão, meu parceiro e por me receber cheio de amor e me fazer sorrir depois de dias complicados.

Sumário

1. Introdução	9
1.1 Classificação histológica e clínica dos carcinomas infiltrantes da mama	14
1.1.1 Classificação Histológica	15
1.1.2 Classificação Clínica	17
1.2 Marcadores Moleculares	18
1.3 Perfis Moleculares	24
1.4 Métodos de estudo da avaliação do HER2	27
1.4.1 Tipos de hibridização <i>in situ</i>	29
1.5 Estudos sobre o HER2 positivo no câncer de mama e sua significância biológica	31
1.6 Referências Bibliográficas	35
2. Objetivos	42
2. Objetivo Geral	42
3. Artigo científico redigido em inglês	43
4. Considerações finais	55
5. Anexos	56
5.1. Pathology & Oncology Research - Instructions for authors	56
5.2. Parecer do Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA)	70

Lista de Abreviaturas Utilizadas

CAP: Colégio americano de patologistas (College of american pathologists)

CGA: Campos de grande aumento

CISH : Hibridização *in situ* cromogênica.

CKs: citoqueratinas

FISH: hibridização *in situ* por fluorescência

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

HE: Hematoxilina e eosina

IHQ - IHC: imunistoquímica

ISH: hibridização *in situ*- In situ hybridization

INCA: Instituto Nacional do Câncer

NBCC: National Breast Cancer foundation

NCCN: National comprehensive cancer network

NOS: No otherwise specified

NPV: Negative predictive value

NST: No special type-tipo não especial

PPV: positive predictive value

RE: receptor de estrogênio

RP: Receptor de progesterona

SISH: hibridização *in situ* pela prata

SBP: Sociedade Brasileira de Patologia

TN: Triplo negativo

TTN: tumores triplo negativos

VPP: Valor preditivo positivo

VPN: Valor preditivo negativo

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Resumo da dissertação

Introdução:

O HER2 é um marcador tumoral importante no câncer de mama para a elegibilidade da terapêutica com o trastuzumab, por isso é essencial determinar corretamente o estado da sua amplificação. Entre as técnicas utilizadas para sua determinação, estão a imunoistoquímica (IHQ), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e a hibridização *in situ* pela prata (SISH). O método do SISH é confiável e tem a mesma precisão do FISH, porém é mais acessível e econômico, por usar a microscopia óptica de luz.

Objetivos:

Este estudo pretende avaliar a relação da classificação molecular por imunofenotipagem dos carcinomas de mama infiltrantes com escore 2+ e 3+ do *CerbB-2* com a amplificação do gene HER2 determinada pelo SISH.

Material e métodos:

Foram revisados os resultados anátomo-patológicos de 182 casos de mastectomia ou setorectomia com diagnóstico do carcinoma infiltrante da mama diagnosticados pelo laboratório de patologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre com seus respectivos exames imunoistoquímicos com escore 2+ e 3+ do *cerbB-2* e com a determinação da amplificação do HER2 pelo método do SISH entre janeiro de 2013 e agosto de 2016.

Resultados:

Dos 182 pacientes, 150 casos foram classificados como escore 3+ por IHQ (82,4%) e 32 casos como escore 2+ (17,6%). Se encontrou amplificação pelo SISH em 135/150 casos escore 3+ (90,0%) e em 2/32 casos escore 2+ (6,3%) e 15/135 casos escore 3+ (10,0%) e 30/32 casos escore 2+ (93,7%) não apresentaram amplificação pelo SISH, intervalo de confiança 95%, VPP: 95,3% e PVN: 90,1%.

Conclusão:

A imunoistoquímica apresenta baixa taxa de falsos negativos (6,3%) e falsos positivos (10,0%) e deve permanecer como método de primeira linha para a avaliação da determinação do status do HER2 no carcinoma mamário. O método do SISH permite determinar com segurança o status do HER2 e é mais adequado para o uso na rotina dos laboratórios de patologia e com menores custos.

Palavras chaves: Carcinoma mamário, HER2, hibridização *in situ* pela prata (SISH), imunistoquímica.

1. Introdução

O câncer de mama é uma doença grave, se diagnosticado precocemente e tratado de forma adequada, possui bom prognóstico, com sobrevida média em cinco anos de 89,4%, podendo chegar a 98% nos casos de doença localizada (Buitrago e cols., 2011; WHO, 2012; INCA, 2016). Esta neoplasia é caracterizada pelo crescimento rápido, desordenado, agressivo e incontrolável de células que adquirem a capacidade de se multiplicar na glândula mamária. Cerca de 90% dos tumores malignos de mama são iniciados no epitélio da unidade ducto-lobular terminal, enquanto os outros 5 a 10% são originários da linhagem não epitelial. Dentre os diferentes tipos histológicos de câncer de mama identificados, o carcinoma ductal invasor é o tipo predominante e representa mais de 75% dos casos (Rakha e cols., 2008). É cada vez mais entendido que o câncer de mama é uma doença heterogênea com diferenças moleculares, histopatológicas e clínicas. O câncer afeta todas as faixas etárias, desde relatos de casos em crianças, até senilidade. O risco aumenta após os 50 anos, no entanto, mulheres jovens, menores de 40 anos, também podem ser acometidas por câncer de mama, mas com uma incidência muito menor. Apenas 6,5% dos cânceres de mama ocorrem abaixo dos 40 anos e 0,6% em mulheres com menos de 30 anos (Clagnan e cols., 2008; INCA 2016). O sintoma mais comum do câncer de mama é o aparecimento de um nódulo, outros achados incluem mudança no tamanho e forma da mama, secreções pelo mamilo, inchaço, irritação da pele ou aparecimento de irregularidades que fazem a pele se assemelhar a casca de laranja (NCCN, Clinical cancer guidelines for breast cancer screening and diagnose, 2014).

Não existe uma causa única para o câncer de mama, que é mais comum em mulheres (apenas 1% dos casos são diagnosticados em homens) e tem na idade um dos mais importantes fatores de risco para a doença. Diversos fatores estão relacionados ao câncer de mama, tais como fatores ambientais e comportamentais; fatores da história reprodutiva, hormonal, fatores genéticos e hereditários. O câncer

de mama de caráter genético/hereditário corresponde a apenas 5% a 10% do total de casos da doença. (Kamangar e cols., 2006; Voguel, 2008; WHO 2012).

Os fatores relacionados a comportamentos ou ao ambiente, incluem ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso e obesidade após a menopausa e exposição à radiação ionizante (tipo de radiação presente na radioterapia e em exames de imagem como raio X, mamografia e tomografia computadorizada). O tabagismo é um fator que vem sendo estudado ao longo dos anos, com resultados contraditórios quanto ao aumento do risco de câncer de mama. Atualmente há alguma evidência de que ele aumenta também o risco desse tipo de câncer. O risco devido à radiação ionizante é proporcional à dose e à frequência. Doses altas ou moderadas de radiação ionizante (como as que ocorrem nas mulheres expostas a tratamento de radioterapia no tórax em idade jovem) ou mesmo doses baixas e frequentes (como as que ocorrem em mulheres expostas a dezenas de exames de mamografia) aumentam o risco de desenvolvimento do câncer de mama (INCA, 2017; NBCF, 2017).

Os fatores endócrinos ou relativos à história reprodutiva, referem-se ao estímulo do hormônio estrogênio produzido pelo próprio organismo ou consumido por meio do uso continuado de substâncias com esse hormônio. Esses fatores incluem: história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos); menopausa tardia (após os 55 anos); primeira gravidez após os 30 anos; nuliparidade; e uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, especialmente se por tempo prolongado. O uso de contraceptivos orais também é considerado um fator de risco pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), embora muitos estudos sobre o tema tenham resultados controversos (INCA, 2017; NBCF, 2017).

Os fatores genéticos/hereditários, estão relacionados à presença de mutações em determinados genes transmitidos na família, especialmente BRCA1 e BRCA2, em 5 a 10% dos casos. Mulheres com histórico de casos de câncer de mama em familiares consanguíneos, sobretudo em idade jovem; de câncer de ovário ou de

câncer de mama em homem, podem ter predisposição genética e são consideradas de risco elevado para a doença. Existe também o câncer de mama esporádico, sem história familiar, em 70 a 80% dos casos, e o familiar, mas não atribuídos à genética, em 15 a 20% dos casos (Kamangar e cols., 2006; Voguel, 2008; WHO 2012; INCA, 2017; NBCF, 2017).

O câncer de mama é a neoplasia mais diagnosticada e a principal causa de morte por câncer no mundo, representando 23% de todas as neoplasias e 14% das mortes por câncer no ano (Ferlay e cols., 2008). É o segundo câncer mais comum no mundo, e o mais frequente em mulheres com um número estimado de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados no ano de 2012 (25% de todos os cânceres) (Globocan, 2012). No Brasil foram estimados para o ano de 2016, 57.960 novos casos, sendo esperadas 14.388 mortes, sendo 181 homens e 14.206 mulheres. No estado do Rio Grande do Sul são estimados nas mulheres, 5.210 casos por 100 mil habitantes, sendo estimado 1.040 novos casos em Porto Alegre (INCA, 2016). Isso orienta a usar mais recursos, fazer mais estudos, para o diagnóstico precoce, para melhorar e individualizar o tratamento (Buitrago e cols., 2011), permitindo assim alcançar uma maior efetividade e indiretamente melhorar a expectativa de vida das pacientes (Dowsett e cols., 2003). A cidade de Porto Alegre apresenta a maior incidência de câncer de mama no país e uma das maiores do mundo (INCA 2016).

Os programas de diagnóstico precoce junto com os avanços no rastreamento e tratamento tem contribuído para o aumento da sobrevida média na população mundial em cinco anos (98% em casos de doença restrita a mama e 89,4% nos casos de câncer de com extensão aos linfonodos regionais) (Buitrago e cols., 2011; WHO, 2012; INCA, 2016). No Brasil, as taxas de sobrevida são menores, atribuindo-se este fato à demora no diagnóstico (tempo superior a três meses entre o surgimento dos sintomas e o início do tratamento, o qual reduz a sobrevivência total em 12%) e o alto número de casos de estágio clínico avançado no início do tratamento (Piñeros e cols, 2011; Ayala, 2012; INCA 2016; Traldi e cols., 2016).

A mama pode apresentar neoplasias de morfologia semelhantes com perfis moleculares diferentes, não detectáveis pelo exame histopatológico convencional. Presume-se que cada tumor seja único e que seus conteúdos de DNA sejam distintos, podendo ser agrupados por métodos moleculares devido a suas semelhanças genéticas (Barros e Leite, 2015; Perou e cols., 2000). A classificação molecular é feita de acordo com sua expressão genética e muitas vezes ajuda a prever a evolução dos tumores. Na prática diária, realizar esta classificação por microarranjos de DNA é uma tarefa complexa, fazendo com que o uso da imunohistoquímica (IHQ) seja mais factível para realizar uma classificação análoga aproximada, através de painéis de anticorpos selecionados (Elston e Ellis, 1991; Perou e cols., 2000).

A IHQ, técnica tecidual *in situ*, utilizada na determinação do perfil de expressão proteica, mantém a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor, podendo ser aplicada a pequenas amostras como biópsias extraídas por agulha fina em laboratórios clínicos ou de pesquisa, com menores custos e com rápido tempo de execução. Para a atual classificação molecular por imunohistoquímica recomenda-se a adoção do painel de fatores preditivos, receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 para todos os casos, adicionando-se outros marcadores, como a CKs 5/6 e o Ki-67 (Gralow e cols., 2008; Goldhirsch e cols., 2011).

Os subtipos moleculares do câncer de mama são, o subtipo luminal A, luminal B, HER2, luminal-HER2, basal e tumores triplo-negativos não basal (TTN). O luminal A apresenta o melhor prognóstico sendo na sua maioria, tumores histologicamente de baixo grau e que apresentam resposta inferior à quimioterapia, enquanto, tumores luminais B apresentam maior proliferação e são, muitas vezes, de alto grau histológico. O subtipo HER2, sem a terapia adjuvante sistêmica, tem menor sobrevida livre de doença e elevada taxa de recorrência, porém se beneficia de terapias alvo-específicas. Os subtipos basal e TTN demonstram prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre de doença e à menor sobrevida

global. A anatomia patológica e o teste de imunistoquímica, através da classificação tumoral, são de fundamental relevância na abordagem terapêutica do carcinoma mamário. Pesquisa sobre as características moleculares são preditivas de resposta terapêutica tem permitido que estratégias de tratamento sejam definidas de maneira mais eficaz (Gralow e cols., 2008; Cirqueira, 2011).

Durante o 12th “St. Gallen international Breast Cancer conference Expert Panel” em 2011, a classificação dos subtipos de câncer de mama realizada através de IHQ e de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi eleita para as deliberações sobre estratégias terapêuticas. Foi sustentado o uso do receptor de estrógeno (RE), do receptor de progesterona (RP), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do Ki-67, o qual avalia a atividade proliferativa, para a estratificação dos subtipos. Os diferentes tipos de câncer de mama são avaliados universalmente para o tratamento clínico das pacientes segundo dois importantes fatores denominados prognósticos e preditivos (Goldhirsch e cols., 2011).

Os fatores prognósticos são características mensuráveis, independentes, que se correlacionam com a história natural da doença; são observados no momento do diagnóstico e visam estimar a evolução clínica, a sobrevida global e tempo livre de doença (Abreu e Koifman, 2002). Enquanto os fatores preditivos são características associadas à resposta esperada a uma determinada terapia. Neste contexto, fatores prognósticos devem ser distinguidos de fatores preditivos. Alguns fatores podem ser ao mesmo tempo prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais e a amplificação e/ou superexpressão do HER2 (Cianfrocca e Goldstein, 2004).

Segundo a conferência de Consenso Saint Gallen de 2005, os parâmetros prognósticos considerados na estratificação das pacientes em grupos de baixo, intermediário e alto risco são idade, tamanho do tumor, grau histológico, invasão perineural, metástases em linfonodos e superexpressão de HER2. O status

linfonodal é considerado o mais importante parâmetro prognóstico (Senn e Thurlimann, 2005).

A superexpressão do HER2, 90% das quais é devido à amplificação, está presente em aproximadamente 15-20% dos casos de carcinomas infiltrantes de mama. Antes do desenvolvimento de terapias moleculares, o HER2 positivo nestes pacientes estava associado com aumento nas taxas de recorrência, metástase e maior mortalidade. Vários estudos mostram que a amplificação do gene HER2 correlaciona-se ainda com níveis reduzidos de receptores de estrogênio e progesterona e atividade proliferativa significativamente aumentada (Dowsett e cols., 2003; Carlsson e cols., 2004).

Determinar o *status* de HER2 é de grande importância para o uso de terapias personalizadas focadas na sua ação molecular em prever a resposta à quimioterapia, ao uso do tratamento com o anticorpo monoclonal humanizado, trastuzumab (Herceptin®) e à terapêutica dirigida ao alvo, que inibe a atividade da tirosinase. Este tratamento leva a um aumento importante de 37% na sobrevida e 40% em redução de risco de reincidência do câncer, em comparação com as pacientes tratadas apenas com a quimioterapia dos pacientes com carcinoma de mama HER2 positivo, assim como o tratamento adjuvante ou neoadjuvante e a ausência de metástases (Dowsett e cols., 2003; Bofin e cols., 2004; Perez e cols, 2007; Haddad, 2010).

1.1 Classificação histológica e clínica dos carcinomas infiltrantes da mama

Na patologia mamaria geral e no câncer de mama há dois tipos de classificações, a classificação patológica e a classificação clínica TNM. A classificação dos tumores em geral tem evoluído consideravelmente nos últimos tempos.

1.1.1 Classificação Histológica

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012) os carcinomas infiltrantes da mama são classificados em tipo não especial (NST) e tipo especial. O tipo não especial compreende o anteriormente chamado carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (NOS), que não apresenta características citológicas ou arquiteturais que permitam classificá-lo em algum tipo especial. Este tipo é considerado o mais comum, representando 40 a 75% das neoplasias mamárias e seu prognóstico é variável, dependendo principalmente das características do tumor, como tamanho e grau histológico. (WHO 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

Os carcinomas mamários do tipo especial incluem aqueles com características citológicas e arquiteturais singulares que permitem classificá-los de forma separada. Estes são divididos em especiais puros e mistos. Os especiais puros tem um padrão presente em mais de 90% da neoplasia, e os mistos apresentam um componente não especial em 10 a 49% da neoplasia. Dentre os carcinomas do tipo especial, estão o lobular, tubular, cribiforme, metaplásico, apócrino, mucinoso, papilar e micropapilar, assim como também carcinomas com características medulares, neuroendócrinas, tipo glândula salivar/anexo cutâneo (WHO 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

O carcinoma lobular é o segundo tipo mais comum de neoplasia mamária, correspondendo a 5 a 15% dos casos. Estudos tem demonstrado que eles apresentam melhor prognóstico que o carcinoma ductal infiltrante de modo geral. Eles se classificam em variantes sólida, alveolar, pleomórfica, tubulopapilar ou mistas. Essas variantes apresentam diferenças no prognóstico do paciente quando são comparados com carcinomas lobulares do tipo clássico (WHO 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

Os demais carcinomas do tipo especial (tubular, cribiforme, mucinoso puro, padrão medular ou neuroendócrino) apresentam bom prognóstico, já que geralmente são de baixo grau histológico, enquanto que os metaplásicos podem ser de baixo ou alto grau, e geralmente possuem pior prognóstico, assim como o mucinoso misto (WHO 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

A classificação de Nottingham é utilizada para realizar a graduação histológica dos carcinomas infiltrantes da mama. Esta classificação leva em consideração três aspectos do tumor: formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. Para avaliar estes aspectos utiliza-se um escore de 1 a 3 pontos. Na formação de túbulos, se a neoplasia apresenta mais de 75% destes, recebe 1 ponto; se apresenta 10 a 75% recebe 2 pontos; e se apresenta menos de 10% recebe 3 pontos. No pleomorfismo nuclear avalia-se o tamanho do núcleo, cromatina e nucléolo. Se o núcleo mede de 1,0 a 1,5 vezes o diâmetro da hemácia, tem cromatina difusa e ausência de nucléolo, recebe 1 ponto (baixo grau). Se o núcleo mede de 1,5 a 2,0 vezes o diâmetro da hemácia, tem cromatina grosseira e poucos nucléolos, recebe 2 pontos (grau intermediário). Se o núcleo mede de 2,0 a 2,5 vezes o diâmetro da hemácia, tem cromatina vesicular e um ou mais nucléolos, recebe 3 pontos (alto grau). O número de mitoses é contado em 10 campos de grande aumento (CGA). Dessa forma, até 4 mitoses, recebe 1 ponto; de 5 a 9 mitoses, recebe 2 pontos; mais de 10, recebe 3 pontos. Avaliando-se esses aspectos, soma-se os pontos para dar o grau final, classificando a neoplasia em grau I - 3 a 5 pontos (bem diferenciado); grau II – 6 a 7 pontos (moderadamente diferenciado); grau III – 8 a 9 pontos (pouco diferenciado) (Elston e cols., 1991; WHO 2012).

1.1.2 Classificação Clínica

Para a classificação clínica é utilizado o sistema TNM baseando-se no tamanho do tumor (T), disseminação à linfonodos (N) e metástases do tumor (M).

Os tumores de maior tamanho, disseminação linfonodal e metastáticos tem um maior escore de estadiamento e um pior prognóstico. (Sociedade Brasileira de patologia, 2014)

T-Tumor primário	
Tx	Tumor no pode ser avaliado.
Tis	In Situ: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular <i>in situ</i> ou doença de Paget da papila sem tumor
T1	≤2 cm
T1a	≤0,5 cm
T1b	>0,5 cm a 1,0 cm
T1c	>1,0 cm a 2,0 cm
T2	>2,0 cm a 5,0 cm
T3	>5,0 cm
T4	Extensão direta parede torácica/pele.
T4a	Parede torácica
T4b	Edema pele/ulceração/nódulos satélites
T4c	T4a+T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
N-Linfonodos Regionais	
Nx	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases
N1	Metástases em 1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais
N2	Metástases em 4 a 9 linfonodos ou em linfonodo da cadeia mamária interna N2a Metástases em 4 a 9 linfonodos axilares (uma > 2,0 mm)

	N2b Metástases em linfonodos da cadeia mamária interna detectada clinicamente, na ausência de comprometimento axilar.
N3	Metástases em 10 ou mais linfonodos axilares. N3a Metástases em 10 ou mais linfonodos axilares (menos uma >2,0 mm) N3b Metástases nódulos linfáticos infraclaviculares ipsilaterales + axilares. N3c Metástases em linfonodos supraclavicular ipsilateral.
M- Metástases a distância	
Mx	Não avaliável
M0	Ausência de metástases
M1	Metástases a distancia

1. 2 Marcadores Moleculares

A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante em câncer de mama devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Alguns marcadores tumorais e suas relações com o prognóstico são discutidos, dando-se ênfase àqueles que utilizam, para sua detecção, o método imunohistoquímico e onde possa ser empregado material fixado em formol e embebido em parafina (material de arquivo). Os receptores hormonais (RH) são os menos polêmicos e os tumores positivos para

estes marcadores, geralmente, apresentam menor tamanho, menor grau histológico e nuclear, uma melhor resposta à terapia hormonal e um melhor prognóstico. Outros marcadores tumorais como o *herbB-2* e o *p53*, associam-se com tumores de alto grau histológico e com um pior prognóstico. Com a utilização das técnicas moleculares, os eventos envolvidos no processo de carcinogênese têm sido gradativamente esclarecidos, resultando na geração de uma série de novas informações que vêm sendo absorvidas pelos oncologistas clínicos, caracterizando os pacientes, influenciando suas condutas, melhorando a determinação do prognóstico e abordagem terapêutica. A identificação de marcadores moleculares de valor prognóstico significativo revelam mudanças inesperadas na progressão da doença (Philips e cols., 1999; Reed e cols., 2000; Silva e Cols., 2002).

Receptores Hormonais: Os receptores hormonais, estrógeno e progesterona, são marcadores prognósticos e preditivos para os tumores mamários, sendo expressos nas secções da glândula mamária normal. Quando são expressos nos tumores significam um melhor prognóstico, sendo inversamente relacionado ao grau tumoral, subtipo histológico e ao nível de proliferação celular, já que as células tumorais que apresentam a expressão desses receptores são mais parecidas biologicamente com as células mamárias normais. Para serem considerados positivos, conforme recomendações do colégio americano de patologistas (CAP) em conjunto com a sociedade americana de oncologia clínica (ASCO), as amostras devem ser expressas em pelo menos 1% das células tumorais com imunomarcção nuclear, terem a presença de reatividade nos controles internos (epitélio normal) e nos controles externos (Eifel e cols., 2001; Osborne e cols., 2005; Hammond e cols., 2010).

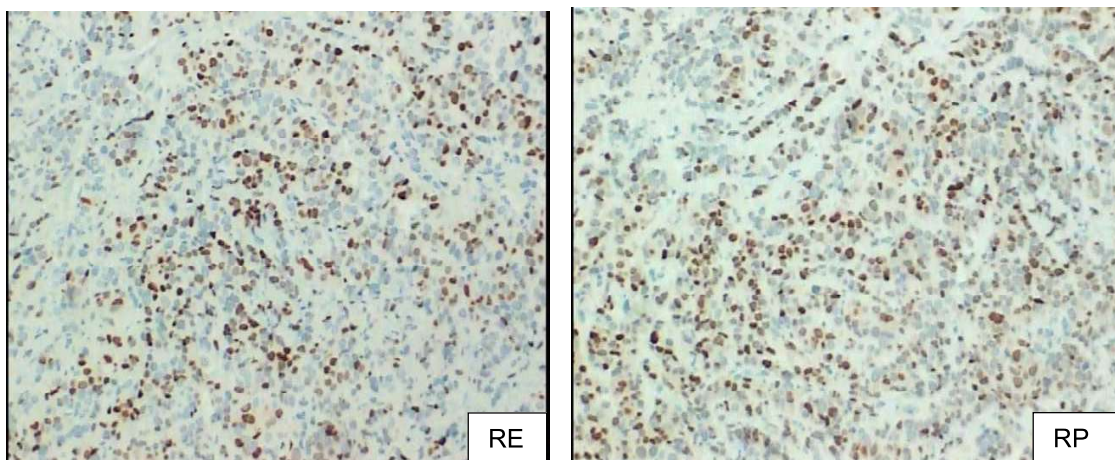


Figura 1. IHQ para receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP), positivos, expressão em 80% das células neoplásicas. 10X (Fotos retiradas do arquivo de lâminas do laboratório de patologia do ISCMPA).

Receptor de fator epidérmico tipo 2 (HER2): O proto-oncogene *cerbB2/HER2/neu* está localizado no cromossomo 17(17q21) e codifica uma glicoproteína de transmembrana de 18kda com atividade de tirosinase que tem funções de receptor de fator de crescimento, estando envolvido na diferenciação, adesão e mobilidade celular. É uma proteína de membrana celular comum em células epiteliais e é também conhecida como c-erbB2, HER2, HER2/neu, NEU; NGL; TKR1 e codificada pelo gene c-erbB2, mesmo nome dado ao seu marcador imunistoquímico. Sua amplificação é encontrada em aproximadamente 20% dos tumores invasores de mama, alguns carcinomas de ovário e gástricos, e está associado a pior prognóstico (Collaborative group,1998; Romond e cols., 2005; Piccart-Gebhart e cols, 2005).

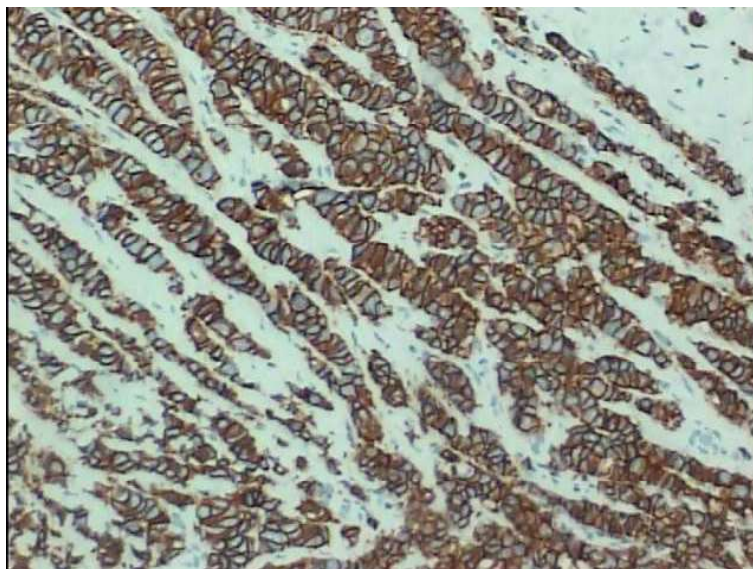


Figura2. IHQ para detecção da amplificação do HER2 com resultado positivo (escore 3+). 10X (Foto retirada do arquivo de lâminas do laboratório de patologia do ISCMPA).

Antígeno Ki-67: O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear que está associada à proliferação nuclear, correlaciona-se com diversos outros fatores prognósticos e é aceito como importante marcador imunistoquímico de proliferação celular tumoral. As células tumorais da mama podem expressar altos níveis de Ki-67 o que não acontece no tecido mamário normal, onde este é expresso em níveis baixos. A alta positividade para o Ki-67 evidencia assim a perda do padrão normal dessas células e é inversamente proporcional a positividade para RE, observando-se casos com baixa positividade do Ki-67 e RE altamente positivos e vice-versa. Os tumores podem ser classificados como de alto ou baixo índice proliferativo, de acordo com a porcentagem de células imunomarcadas, sendo de alto índice aqueles tumores que possuem marcação positiva maior ou igual a 14% de células neoplásicas, e os de baixo índice aqueles com índice inferior a 14% (Cheang e cols., 2008; Barros e Leite, 2015).

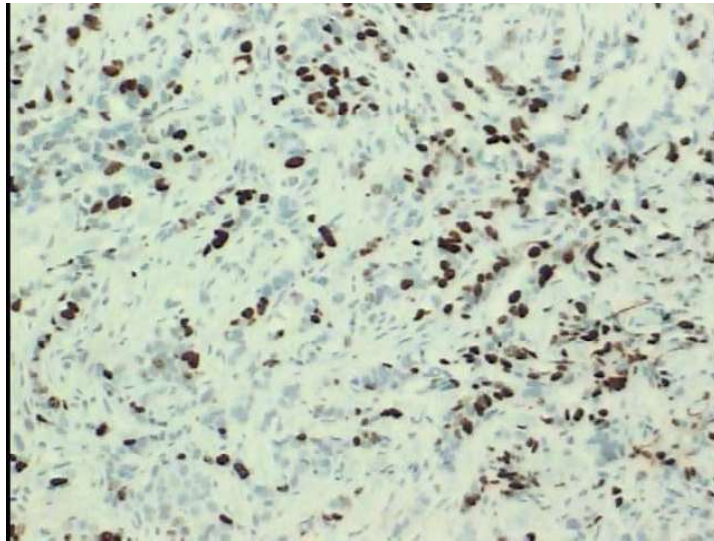


Figura 3. IHQ índice proliferativo da neoplasia (Ki67) alto, cerca de 30% das células neoplásicas. 100X (Foto retirada do arquivo de lâminas do laboratório de patologia do ISCMPA).

Citoqueratinas 5/6: As células mamárias normais possuem moléculas que conferem estabilidade mecânica aos tecidos, assim como as demais células epiteliais. Essas moléculas são conhecidas como citoqueratinas (CKs) ou citoceratinas. As células do lúmen expressam CKs de baixo peso molecular dos tipos 7, 8, 18 e 19, enquanto as células justapostas à membrana basal expressam CKs de alto peso molecular dos tipos 5, 6, 14 e 17. As CKs 5 e 5/6 estão no grupo das neutras ou básicas, e se caracterizam, na IHQ, por terem um fenótipo basal (Perou e cols., 2000; Rakha e cols., 2010).

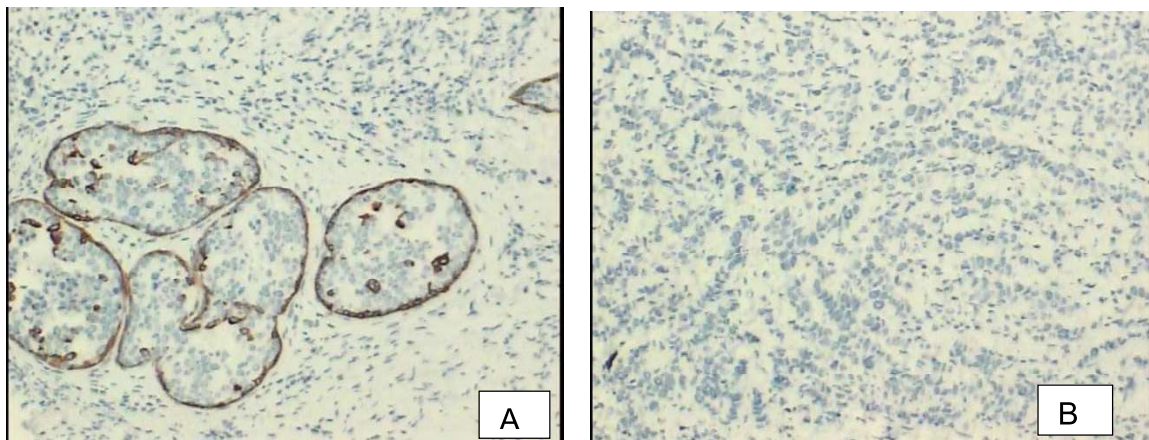


Figura 4. IHQ para CKs 5/6, A: positivo no carcinoma in situ. B: Negativo no carcinoma infiltrante. 10X. (Fotos retiradas do arquivo de lâminas do laboratório de patologia do ISCMPA).

P53: O gene p53 localiza-se no cromossomo 17p13, possui aproximadamente 20 Kb e origina um transcrito primário (mRNA) de 2.8 Kb.¹⁸ Este gene foi descoberto em 1979, sendo proposto inicialmente como um oncogene. Posteriormente, verificou-se que a atividade oncogênica deste gene dependia de mutações no código de leitura, e que o gene não mutado produzia uma proteína de 53 KDa, apresentando uma função de “guardião do genoma” ao reconhecer danos no DNA e controlar crescimento e morte celular. Deste modo, esta proteína controla a proliferação celular, exercendo um papel fundamental na supressão do desenvolvimento tumoral. As funções biológicas do supressor de tumor p53 tornam-no um potencial marcador preditivo. Foi observado que o p53 funciona como um fator de transcrição que regula o crescimento normal das células através do controle de genes que promovem a progressão através do ciclo, e controlando aqueles que causam a paragem em G1 quando o genoma está danificado. O p53 ativado pode promover ainda mais a apoptose em células bloqueadas pelo crescimento e tem sido relacionado com a execução eficiente da morte celular programada em resposta a danos no ADN na presença de desencadeantes oncogênicos. A perda

da função p53 tem sido relacionada com o aumento à resistência celular a um número de agentes quimioterapêuticos (Harris, 1996; Kandioler e cols., 1998; Kandioler e Cols, 2000).

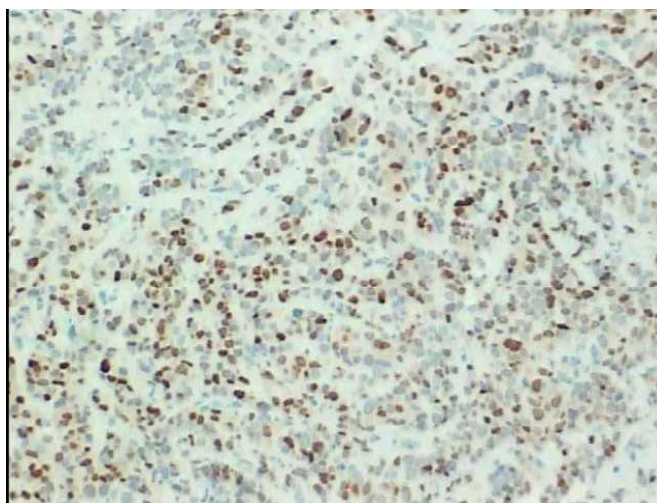


Figura 5. IHQ para P53 positivo, expressão em cerca de 60% das células neoplásicas. 10x (Foto retirada do arquivo de lâminas do laboratório de patologia do ISCMPA).

1.3 Perfis moleculares

Os tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas. Essas diferenças podem ser, em parte, justificadas pela existência de diversos subtipos moleculares do carcinoma de mama, a exigir terapêutica específica. Essa complexidade torna difícil a definição de condutas clínicas, podendo por vezes propiciar tratamentos inadequados. O advento da tecnologia de microarranjos de DNA complementar, com a análise paralela de milhares de genes, têm permitido

correlacionar perfis de expressão gênica dos cânceres de mama com a evolução clínica das pacientes e com as respostas às terapias utilizadas. Painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão. Essas descobertas têm proporcionado importantes informações prognósticas e preditivas e uma melhor percepção sobre os complexos mecanismos biológicos da tumorigênese (Perou e cols., 2000; Rouzier, 2005; Cianfrocca e Gadishar, 2009; Geyer e cols., 2009; Weigelt e cols., 2009).

Luminal A: Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais. Classificam-se como luminais A os tumores positivos para RE e/ou RP, e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2, com Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas. Este representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, e possuem, em relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau histológico. Os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase, são as terapias alvo-específicas utilizadas para o seu tratamento sistêmico (Cirqueira e cols., 2011).

Luminal B: Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis. São caracterizados por expressarem um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67) maior que 14%. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminal A. Este subtipo foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico, e, ainda, associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar menos do

que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (Kennecke e cols., 2010; Cirqueira e cols., 2011).

Luminal-HER2 (triplo positivo): uma nova estratificação para o subtipo luminal B, este subtipo é caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, HER2 positivo e geralmente apresenta um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (Cirqueira e cols., 2011).

HER2: como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais. Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. Assim sendo, justifica-se a incorporação do status de HER2, juntamente com o status de outros fatores prognósticos, a uma decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica; entretanto, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumab), melhora acentuadamente o prognóstico dessas pacientes. A positividade de HER2 parece estar associada relativamente, mas não em absoluto, a resistência às terapias endócrinas. Esse efeito pode ser específico para as terapias moduladoras seletivas do RE, como o tamoxifeno, e talvez não para terapias de depleção de estrogênio, como os inibidores de aromatase, utilizados em mulheres após a menopausa (Cianfroca e cols., 2004; Wolff e cols., 2007; Voduc e cols., 2010; Rakha e cols., 2010).

Basal: Este subtipo apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2, e é caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais. Este demonstra padrão prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global. Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, elevado índice mitótico, presença de áreas de necrose central e

destacado infiltrado linfocitário. Espera-se assim, que pacientes com esse perfil, não se beneficiem do uso do trastuzumab, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno. Devido à ausência de imunomarcção de RE, RP e HER2, tumores basaloides são ainda chamados por alguns autores de “tumores triplo-negativos” (TTN), no entanto, sabe-se que parte dos tumores triplo-negativos não se equivalem aos basais, podendo ser mais bem descritos como “tumores triplo-negativos não basaloides”. A partir da adição de marcadores imunoistoquímicos aos perfis “triplo-negativos” como a citoqueratina 5 ou 5/6 e o EGFR, segundo alguns autores, pode-se fenotipicamente se estimar um perfil gênico do subtipo basal (Cirqueira e cols., 2011).

1.4 Métodos de estudo da avaliação do HER2

Na prática clínica corrente, são usadas duas metodologias para avaliar o status de HER2: a IHQ e as técnicas de hibridização *in situ* (IHS). A IHQ teve grande desenvolvimento a partir da década de 1970, quando foi possível demonstrar antígenos teciduais pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Atualmente, a IHQ está incorporada à patologia cirúrgica como método diagnóstico complementar. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais propiciaram enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos teciduais e celulares, e o advento da recuperação antigênica foi um fato marcante na evolução da IHQ. A IHQ para detectar superexpressão da proteína p185 e as técnicas de hibridização *in situ* para avaliar a amplificação do gene HER2. A IHQ é influenciada por vários fatores, desde a fase pré-analítica (fixação e processamento dos tecidos), passando pela fase analítica (escolha de anticorpos primários e sistema de visualização), até a fase pós-analítica (interpretação dos resultados). A experiência do patologista com o método é fator relevante, pois ele interfere na escolha dos reagentes e anticorpos a serem usados em cada caso, analisa a qualidade das reações e interpreta os

resultados da coloração. Além disso, o patologista integra os achados morfológicos com os resultados do estudo imunoistoquímico, formulando o diagnóstico anatomopatológico final. A IHQ é utilizada como um primeiro teste para detectar casos de status de HER2. A verificação da positividade para HER2 é dada pela coloração IHQ de 3+ (uniforme, de intensa coloração da membrana e em mais de 30% das células do tumor invasivo), sendo consideradas negativas colorações de IHQ de 0 ou 1+ (coloração fraca em parte de membrana em mais de 10% das células). Colorações de IHQ de 2+ (coloração fraca/moderada completa em mais de 10% das células) são consideradas duvidosas, exigindo uma intervenção adicional para o diagnóstico final (Allred e cols., 1998; Alves e cols., 2004; Betina e cols., 2005; Wolff e cols., 2007; Gobbi e cols., 2008; Hammond e cols., 2010).

O princípio da HIS é a geração de pequenas sequências de oligonucleotídeos, chamadas sondas, de DNA marcadas com um substrato. Essas sondas são complementares às sequências genômicas de interesse, e posteriormente são hibridizadas (ligação complementar entre as sequências) diretamente no corte histológico de tecido na lâmina de vidro. Com a HIS, existe o benefício da avaliação simultânea da morfologia celular da neoplasia e a alteração no genoma de interesse na mesma amostra. Estas técnicas são mais complexas e trabalhosas que a IHQ, necessitando de mais tempo para sua realização. Assim como na IHQ, porém em menor escala, variáveis pré-analíticas, como a deficiente preparação da amostra (fixação inadequada), podem levar a perda de sinais, artefatos de coloração e alteração de morfologia, dificultando sua interpretação. A HIS pode ser aplicada a vários tipos de amostras: células em cultura, tecido incluído em parafina, tecido congelado, fluidos, aspirados citológicos e microarranjos de tecido. A realização de HIS de forma manual ou automatizada apresenta resultados comparáveis e semelhantes, sendo ambos os métodos confiáveis. De forma resumida, a técnica envolve o pré-tratamento da amostra, posterior digestão proteica, desnaturação, adição de sonda de oligonucleotídeos marcada, e subsequente hibridização. A imunodeteção da sonda segue após lavagem e envolve a aplicação de anticorpos

marcados. Por fim, o resultado é visualizado em microscópio de luz ou de fluorescência (Wolff e cols., 2007; Shah e cols., 2009; Cuadros e Villegas, 2009).

1.4.1 Tipos de Hibridização *in situ*

FISH: Esta técnica está bem estabelecida para investigação de mutações genômicas e apresenta evidência clínica de relação diagnóstica, prognóstica e preditiva comprovada em várias neoplasias. 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 foram demonstradas desde o seu desenvolvimento. Por exemplo, o FISH é considerado o método padrão-ouro para avaliação da amplificação do gene HER2 e foi utilizado nos primeiros ensaios clínicos que avaliaram o desfecho de pacientes com carcinomas HER2 positivos. Os sinais fluorescentes diminuem com o tempo e não podem ser arquivados, podendo as imagens serem arquivadas digitalmente. Nessa técnica, a observação detalhada da morfologia tumoral é apenas parcial, o que torna necessária a correlação com corte histológico corado com HE para garantir avaliação adequada do componente investigado do componente normal da amostra, e possibilitar a identificação de heterogeneidade intratumoral (Wolff e cols., 2007; Cuadros e Villegas, 2009).

CISH: A técnica de CISH (hibridização *in situ* cromogênica) é um método de hibridização *in situ* semelhante ao FISH, que usa sondas de DNA marcadas com cromógeno para serem observadas em microscópio de luz. As principais vantagens da técnica de CISH são a possibilidade de interpretação com o microscópio de luz, preservação detalhada da morfologia, sinais permanentes com possibilidade para arquivamento, menor complexidade técnica e menor tempo de reação. Uma alta concordância (superior a 95%) entre FISH e CISH foi demonstrada na maioria dos estudos que comparam as duas técnicas. Um trabalho por Hanna e Kwok (2006) revelou que a concordância entre estas duas técnicas de ISH era de 97% e 98%,

respectivamente (Wolff e cols., 2007; Cuadros e Villegas, 2009; Sauter e cols., 2009).

SISH: A técnica de SISH baseia-se na deposição de prata no alvo hibridizado após uma reação enzimática metalográfica. Os sinais são permanentes e podem ser observados com microscópio de luz. Essa técnica pode ser totalmente automatizada e tem um tempo de reação abaixo de 6 horas. Cortes de tecido são fixados em formalina e incluídos em parafina, sendo posteriormente submetidos à desparafinização, digestão e pré-tratamento, e, após, incubados separadamente com as sondas INFORM HER2 Dual e ISH DNA Probe Cocktail (Ventana Medical Systems, Inc., USA). Este ensaio determina o estado do gene HER-2 por enumeração da razão entre o gene HER2 e o cromossomo 17. As sondas do gene HER2 e do centrômero do cromossomo 17 são detectadas utilizando hibridização *in situ* com dois cromógenos distintos (dupla coloração), sendo o gene HER2 marcado com sonda de DINITROPHENYL (DNP) e o centrômero do cromossomo 17 marcado com DIGOXIGENIN (DIG). À microscopia óptica a dupla marcação é visualizada no núcleo celular como sinais pretos para o gene HER2 (SISH) e sinais vermelhos para o centrômero do cromossomo 17 (Red ISH). (Chenard, 2015).

A interpretação dos resultados segue os seguintes critérios (Guidelines ASCO/CAP 2008) após a contagem de no mínimo 40 núcleos de células neoplásicas, em pelo menos 2 áreas distintas da neoplasia invasiva:

Razão HER2/Cr 17 < 1,8: NEGATIVO para amplificação gênica de HER2

Razão HER2/Cr 17 > 2,2: POSITIVO para amplificação gênica de HER2

Razão HER2/Cr 17 entre 1,8 e 2,2; INCERTO para amplificação gênica de HER2 (contagem de 20 núcleos adicionais) (Wolff e cols., 2007; Cuadros e Villegas, 2009; Sauter e cols., 2009).

A técnica de FISH é atualmente aceita como referência para a avaliação do *status* do HER2, mas é uma técnica laboriosa, difícil, dispendiosa, que requer profissionais e equipamento especializados e não está disponível na grande maioria

dos laboratórios. A técnica de hibridização *in situ* por prata (SISH) é um método disponível recentemente, baseado na metalografia enzimática e deposição de prata, que permite a quantificação dos sinais específicos de HER2 recorrendo a um microscópio convencional de fundo claro, ao qual todos os patologistas estão familiarizados, ao invés de um microscópio de fluorescência como é utilizado com a técnica FISH. Além disso, é um método que pode ser automatizado, o que garante a consistência de resultados e permite a avaliação da amplificação do HER2. Vários trabalhos revelaram que a concordância entre estas duas técnicas de IHS era de 97% e 98%, nos grupos com escore 0/1+ e 3+, respectivamente. A técnica CISH não é bem aceita na rotina de trabalho por ser uma técnica demorada e por ser necessário o processamento (Bilous e cols., 2003; Wolff e cols., 2007; Cuadros e Villegas, 2009; Sauter e cols., 2009).

1.5 Estudos sobre o HER-2 positivo no câncer de mama e sua significância biológica.

Há mais de duas décadas desde a primeira publicação descrevendo o papel potencial do HER2 no câncer de mama. Segundo McGuire e Clark (1991) uma variedade de técnicas foram empregadas nos estudos para avaliar HER2 em níveis de DNA, RNA e proteína. Esses estudos, principalmente retrospectivos, demonstraram que o HER2 é um marcador de mau prognóstico e sugeriram que pode ser um marcador preditivo de resposta a certos tipos de quimioterapia. Como centenas de outros biomarcadores de significância potencial no câncer de mama, o interesse do uso clínico de HER2 permaneceu discreto. O desenvolvimento do tratamento direcionado ao HER2 (Herceptin® [trastuzumab], Genentech, Inc, South San Francisco, Califórnia) mudou o curso da história para o HER2. Assim que começaram os ensaios clínicos para o Herceptin®, inicialmente em pacientes com câncer da mama, e mais tarde como uma configuração adjuvante em outros tipos,

o HER2 tornou-se um biomarcador clinicamente útil (McGuire e cols., 1991; Allred e cols., 1998; Bilous e cols., 2003;)

Outros estudos demonstraram que o RE e as vias de sinalização HER2 (c-erbB2, HER2 /neu) são os principais condutores da proliferação celular e sobrevivência na maioria (85%) dos cânceres de mama. Segmentação destas vias fornece a terapia mais eficaz em pacientes adequadamente selecionados. A terapia endócrina para o tratamento do RE e o trastuzumab para o tratamento do HER2 fornecem benefícios notáveis de sobrevivência global e no tratamento adjuvante quando há doença micrometastática presente (redução de 50% no risco de recorrência). As remissões, por vezes duradouras embora temporárias, são observadas em pacientes com doença metastática tratados com terapêutica orientada para RE e HER2, o que geralmente é combinado com quimioterapia (Slamon e cols., 1989; Collaborative Group, 1998; Slamon e cols., 2001; Piccart-Gebhart e cols., 2005; Romond e cols., 2005; Joensuu e cols., 2009).

Segundo Slamon (1987), os tecidos normais tem um baixo complemento de proteína de membrana HER2. A superexpressão de HER2 é observada em 20% das neoplasias de mama e em alguns cânceres ovarianos e gástricos, e confere pior comportamento biológico, com maior agressividade clínica no câncer de mama. Os carcinomas da mama podem ter de 25 à 50 cópias do gene HER2, e podem aumentar até 40 à 100 vezes a proteína HER2 resultando em 2 milhões de receptores expressos na superfície das células tumorais. O diferencial na expressão de HER2 entre tecidos normais e tumores ajuda a definir o HER2 como alvo de tratamento ideal. O trastuzumab, o primeiro tratamento dirigido a HER2, é bem tolerado em doentes com pouca toxicidade, uma vez que os seus efeitos são relativamente específicos para células cancerosas que superexpressam HER2.

A amplificação de HER2 é um evento relativamente precoce na tumorigênese da mama humana, ocorrendo em quase 50% dos carcinomas *in situ*. O status de HER2 é mantido durante a progressão para doença invasiva e para metástase nodal

e a distância. O fato de apenas 20% dos carcinomas invasivos da mama apresentarem amplificação do HER2 sugere que muitos carcinomas in situ com amplificação do HER2 nunca evoluem para a fase invasiva. A amplificação de HER2 define um subtipo de câncer de mama com uma assinatura única de genes e isso é mantido durante a progressão. Alguns tumores perdem a expressão do HER2 após tratamento com trastuzumab, presumivelmente por seleção de um clone HER2 negativo não eliminado pelo tratamento. Por outro lado, o HER2 pode tornar-se positivo em alguns tumores inicialmente negativos ao longo do tempo, especialmente após a terapia endócrina visando RE. O RE tem sido demonstrado como desregulador do HER2, assim como o HER2 desregula a expressão do RE. Portanto, bloquear o RE poderia aumentar a expressão do HER2, assim como bloquear o HER2 aumenta a expressão do RE (Newman e cols., 2000; Guo e Sonenshein, 2004).

As técnicas para a avaliação do HER2 tem sido problemáticas historicamente, com taxas de erro em um laboratório central especializado de até 20% para a IHQ e HIS. Estes são inaceitáveis considerando que o teste é usado para selecionar pacientes para terapia potencialmente curativa e dispendiosa. (Paik e cols., 2002; Cuadros e Villegas, 2009).

Em 2007, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica e o Colégio de Patologistas Americanos (CAP) desenvolveram recomendações para o desempenho do teste do HER2 para reduzir erros de ensaio. Atualmente o teste HER2 é realizado por vários métodos: imunohistoquímica (IHC), hibridização in situ por fluorescência (FISH), hibridização cromogênica in situ (CISH) e hibridização in situ reforçada com prata (SISH) (Allred e cols., 1992; Perou e cols., 2000; Latta e cols., 2002; Carlsson e cols, 2004; Park e cols., 2006; Mittendorf e cols., 2009).

Segundo Shousha e cols. (2009), o SISH é uma técnica altamente sensível que requer menos reagentes do que FISH ou CISH. Tal como o CISH, a coloração SISH é permanente e não se decompõe, permitindo que os espécimes sejam

arquivados. Ao contrário do CISH, o SISH permite a quantificação do número de cópias genéticas. Em um estudo recente comparando as técnicas de HER2 FISH e HER2 SISH em biópsias excisionais, os resultados foram idênticos em 50 de 53 casos (94%). Dois casos foram SISH-, FISH + e um caso SISH +, FISH-. Os resultados de SISH na biópsia central foram idênticos à biópsia excisional correspondente em 89% dos casos. Quatro casos (7%) foram SISH negativos no núcleo, mas positivos no espécime de excisão e dois casos ao contrário.

O oncogene HER2 é um membro importante da família HER das tirosina quinases de membrana. O gene é amplificado em um subconjunto de carcinomas da mama em que o HER é o principal motor de proliferação e sobrevivência de células tumorais. Esta via terapêutica tem notavelmente melhorado o prognóstico dos pacientes com estes carcinomas agressivos da mama, mas o tratamento é somente eficaz nos pacientes cujos tumores expressam níveis elevados da proteína ou são amplificados para o gene. O papel do patologista em avaliar com precisão o status HER2 de um tumor é crítico para o tratamento bem sucedido. A avaliação diagnóstica de HER2 por IHC ou amplificação genética deve seguir diretrizes e procedimentos estabelecidos para evitar classificação errada de pacientes que, de outra forma, não receberiam tratamento que salvaria vidas (Gralow e Cols., 2008; Joensuu e cols., 2009; Gutierrez e Schiff, 2011).

Dessa forma, é importante que novos estudos sejam feitos a fim de que se possa estabelecer um tratamento otimizado das pacientes, efeitos adversos menores e proporcionando melhor qualidade de vida. (Gralow e Cols., 2008; Joensuu e cols., 2009; Gutierrez e Schiff, 2011).

1.6 Referências Bibliográficas

Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002;48:113-31.

Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schinitt SJ, Gilchrist KW, *et al*. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 1992 Sep;23(9):974-79.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 1998, 11(2):155-68.

Alves VA, Leandro L, Vassallo J, Pereira M, Kanamura C, Wakamatsu A, *et al*. Controle de qualidade interlaboratorial em imuno-histoquímica: citoceratinas e receptor de estrógeno como modelos. *J Bras Patol Med Lab*. 2004,40(3):175-83.

Ayala ALM. Sobrevida de mulheres com câncer de mama, de uma cidade no sul do Brasil. *Rev Bras Enferm*. 2012;65(4):566-70.

Bachi C, Melo AC, De Franco M, Neto R. Manual de padronização de laudos histopatológicos 4º Edição. Sociedade Brasileira de Patologia. 2014;328-30.

Barros ACSD, Leite KRM. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea/molecular. *Revista Brasileira de Mastologia*. 2015;25:146-55.

Betina W, Campos A, Nadji M, Torres LF. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab*. 2005, 41(5):353-64.

Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, *et al*. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER 2000 International Study. *The Breast*. 2003; 12:92-85.

Bofin AM, Ytterhus B, Martin C, O'leary JJ, Hagmar BM: Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:110-9.

Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. *Com. Ciências Saúde*. 2011;22:S69-S82.

Carlsson J, Nordgren H, Sjostrom J, Wester K, Villman N, Bengtsson O, *et al*. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer*. 2004;12:2344-48.

Cheang MC, Voduc D, Bajdk, Leung S, Mckinney S, Chia SK, *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negatives phenotype. *Clin Canc Res.* 2008;14:1368-76.

Chenard M-P, Wissler M.P, Weingertner N, Mathelin C, Bellocq J-P. HER2 gene and protein expression status of breast carcinoma can be reliably tested on a single slide. *Virchows Arch.* 2015 May;467(2):169-75.

Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(5):303-13.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist Breast Cancer.* 2004;9:606-16.

Cirqueira MD, Moreira M, Soares LR, Freitas-Junior R. Subtipos moleculares do câncer de mama feminina. 2011;39:499-503.

Clagnan W, Andrade J, Carrara H, Tiezzi D, Reis T, Havana H, *et al.* Idade como fator independente de prognóstico no câncer de mama. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2008;30:67-74.

Collaborative Group , Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet.* 1998 May;351(9114):1451-67.

Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009 Jan;17(1):1-7.

Dowsett, M, Barlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, *et al.* Correlation between immunohistochemistry (HerceptTest) and fluorescence in situ hybridization FISH) for HER2 in 426 breast carcinomas from 37 centers. United States: *J Pathology.* 2003;199:418-23.

Eifel P, Axelson J.A, Costa J, Crowley J, Curran W.J, Deshler A. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1-3 2000. *J of the national Cancer Institute.* 2001 Jul; 93(13):979-89.

Ellis P., Smith I., Ashley S., Walsh G., Ebbs S., Baum M., Sacs N., McKinna J. Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16:107-114,.

Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW, Screening for breast cancer. 2005 Jan; 293(10):1245-56.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology*. 1991;19:403-410.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, and Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *International J of Can*. 2010;12:2893-2917.

Geyer FC, Marchiò C, Reis-Filho JS. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*. 2009;41(1):77-88

Gobbi H, Rocha R, Nunes C. Predictive factors of breast cancer evaluated by imunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab*. 2008, 44(2):127-36.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, *et al*. Strategies for subtypes- dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011;22:1736-47.

Gralow J, Ozols RF, Bajorin DF, Cheson BD, Sandler HM, Winer EP, *et al*. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. Report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):313-25.

Guo S, Sonenshein GE. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(19):8681-90.

Gutierrez C, Schiff R. HER2: Biological, detections and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan;135(1):55-62.

Haddad C. Trastuzumab no câncer de mama. *Femenina*, 2010, Fev,38(2):73-78.

Hammond M.E.H, Hayes D.F, Wolff A.C. American Society of clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for imunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J of Clinical Oncology*. 2010 Jun;28(16):2784-95.

Harris C. Structure and function of the p53 tumor suppresser gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88:1442-1455.

Instituto Nacional do Câncer. Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação geral de ações estratégicas. Coordenação de educação. ABC do Câncer: Abordagem

básicas para o controle do câncer/Instituto Nacional do câncer. Organização Luiz Claudio Thuler. 2ed. Ver e atual. Rio de Janeiro: INCA 2012.

Instituto Nacional do Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2016.

Instituto Nacional do Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (INCA). Fatores de risco no câncer de mama. Rio de Janeiro: INCA 2017.

Joensuu H, Bono P, Kataja V, Alanko T, Kokko R, Asola R, *et al.* Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol.* 2009 Dec; 27(34):5685-92.

Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel D, *et al.* TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients *Clin Can Res.* 2000, 6(1):96-101.

Kamangar, F, Dores, G.M, Anderson, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J of Clinical Oncology.* 2006 May;24(14):2137-50.

Kennecke H, Yerushlami R, Woods R, Cheang M, Voduc D, Speers C, *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J of Clin Oncol.* 2010 May;28:3271-77.

Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2002 Dec;15(12):1318–1325.

McGuire WL, Clark GM. Follow-up study of HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1991 Feb;51(3):944-8.

Mittendorf E, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt K, Buzdar A, *et al.* Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res.* 2009 Dec 1;15(23):7381–7388.

Nabuco C. Câncer de mama: 10 perguntas e respostas sobre diagnóstico e tumores nas mamas. *Femama* 2014 Jul.

NCCN National comprehensive cancer network: Clinical Practice Guidelines in Oncology for breast Cancer 2014.

Nenutil R. A revolution postponed indefinitely. WHO classification of tumors of the breast 2012: the main changes compared to the 3rd edition (2003). *Cesk Patol.* 2015;51(1):23-25.

Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC. Cofactor competition between the ligand-bound estrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to estrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene.* 2000 Jan;19(4):490-97.

Osborne C.K, Schiff R, Arpino G, Lee A, Hilsenbeck V.G. Endocrine responsiveness: Understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *The Breast.* 2005;14(6):458-65.

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, *et al.* Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun;94(11):852-54.

Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology.* 2006 May;48(6):702-7.

Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Bryant J, Davidson NE, Geyer CE, *et al.* Updated results of the combined analysis of NCCTG N9831 and NSABP B-31 adjuvant chemotherapy with/without trastuzumab in patients with HER2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(18S Suppl):512.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug;406(6797):747-52.

Philips K, Andrulis L, Goodwin P. Breast carcinoma arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? *J Clin Oncol* 1999;17:3653-63.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Bell R, Goldhirsch A, Untch M, *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct;353(16):1659-72.

Piñeros M, Sánchez MER, Perry MC, García MCOA, Ocampo MCR. Demoras em el diagnóstico y tratamiento de mujeres com câncer de mama em Bogotá, Colombia. *Salud Publica Mex.* 2011;53(6):47885.

Rakha EA, Reis-Filho, Ellis I.O, Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy, *Pathobiology.* 2008; 75(2)95-103.

Rakha E, Reis-Filho J, Baehner F, Dabbs D, Decker T, Eusebi V, *et al*, Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*. 2010;12(4):207.

Reed W, Hannisdal E, Boehler P, Gundersen S, Host H, Nesland J. The prognostic value of p53 and c-erb b-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2000;88:804-13.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman V, Geyer C, Davidson N, *et al*. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct;353(16):1673-84.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, *et al*. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5678-85.

Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon D, Press M. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27:1323-33.

Schwartzmann G. Breast cancer in South American: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *J Clin Onc*. 2001 Sep;19(18S):118-24.

Senn H-J, Thurlimann H. The International Breast Cancer Treatment Consensus St. Gallen-2005: Departure to new risk selection and new treatment options. *The Breast*. 2005 Dec;14(6):427-28.

Shah SS, Ketterling RP, Goetz MP, Ingle J, Reynolds C, Perez E, *et al*. Impact of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on HER2 interpretation in breast cancer. *Hum Pathol*. 2009 Jan;41(1):103-6.

Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. *Histopathology*. 2009 Jan;54(2):248-53.

Silva D, Saddi V, Monotuk E. Marcadores tumorales asociados ao cancer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002; 48(1): 39-48.

Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 5th Edition, Focusing on issues and updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan;235(4785):177-82.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holf JA, Wong SG, Keith DE, *et al*. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May;244(4905):707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al*. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar;344(11):783-92.

Traldi M, Galvão P, Siani S, Campos M. Demora no diagnóstico de câncer de mama de mulheres atendidas no Sistema Público de Saúde. *Cad. Saúde Colet.*, 2016, Rio de Janeiro, 24 (2):185-191.

Voguel VG. Epidemiology, genetics and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. 2008;15(4):782-9.

Voduc K, Cheang M, Tyldesley S, Nielsen K. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Onc*. 2010 Apr;28(10):1684-9.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(12):718-30.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ *et al*. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Onc*. 2007;25:1-28.

World Health Organization. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan PH van de Vijver MJ, Lyon: WHO Classification of Tumours of the Breast 4th. IARC Press; 2012.

2. Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar a concordância da amplificação do HER2 pelo método do SISH nos carcinomas mamários invasores classificados com escores 2+ e 3+ por imunohistoquímica.

3. Artigo científico redigido em inglês

Evaluation of the concordance of HER2 amplification status by SISH with immunohistochemistry with scores 2+ and 3+ for breast cancer.

Keywords: breast cancer, HER-2, silver in situ hybridization, immunohistochemistry.

Abstract

HER2 is an important tumor marker in breast cancer management, essential for the eligibility of the patients for specific therapy and it's essential to identify correctly HER2 status. Immunohistochemistry (IHC) estimates protein expression and the silver in situ hybridization (SISH) evaluates his amplification. SISH combines the accuracy of fluorescence in situ hybridization (FISH) with the use of light opaque silver, instead of fluorescent spot-like signals, thus allowing the use of ordinary light microscopy, which enables pathologist to evaluate slides within the context of tissue morphology. SISH is an important complement of IHC, tumors with equivocal, or non-interpreted staining, and those with score 2+ and score 3+; 10-12% of cases with scores 3+, don't have amplification. All cases of mastectomy and breast conserving surgery with diagnosis of infiltrating breast carcinomas, with scores 2+ and 3+ by IHC and their determination of HER2 status by SISH, from Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex during the period from January of 2013 until August 1st 2016 were reviewed. The objective of this study was to evaluate the frequency of the amplification of Her2, with SISH in 182 cases whose scores from IHC were score 3+ and 2+. 150 of these 182 cases were score 3+ and 32 score 2+, of those 150, 135/150 (90,0%) score 3+ e 2/32 score 2+ (6,3%) were reported as amplified e 15/135 score 3+ (10,0%) e 30/32 (93,7%) as negative by SISH with a confidence level of 95%, PPV: 95,3% e NPV: 90.1%. IHC has a low rate of false negative cases (6,3%) and it should remain as a first-line test for screening of HER2 status in breast cancer. SISH is an essential complementary technique, that is reliable and it's suited for routine application in laboratories of pathology.

Introduction

Breast cancer is increasingly understood as a heterogeneous disease. Neoplasms of similar morphology may have different molecular profiles, not detectable by the conventional histopathology. If it's diagnosed early and properly treated, has good prognosis, but still is the malignant neoplasm affecting more women in the whole world, except non-melanoma skin cancer. Therefore, the existence of indicators suggesting a more aggressive behavior of the neoplasm is of great importance in addressing patients that not respond to therapy [1-4].

The expression of hormone receptors (estrogens and progesteron) and the HER2 oncogene have helped to define biologically distinct subtypes of this pathology. Her2 has been regarded as an important prognostic factor and predictive biomarker of the disease and is amplified and/or over-expressed in 20-30% of cases, defining a tumor subtype of greater aggressiveness, clinically associated to early and higher mortality, faster progression, increased risk of relapse, low levels of estrogen and progesterone receptors and increase proliferative activity [5,6].

The determination of the HER2 status is of great importance in predicting the response to chemotherapy with anti-her2 monoclonal antibody Trastuzumab, which has significant clinical benefits. The HER2 status should be evaluated in all breast cancers cases at the time of first diagnosis, relapse and metastases. Therefore it's essential that accurate, reliable and easy to reproduce methods can be used for the determination of HER2 status in these patients [7-9].

In clinical practice, two methodologies are used for assess of HER2 status, IHC and ISH techniques. IHC is usually the first technique been performed. From the point of view of therapeutic decision-making, positive and negative results of IHC do not require additional confirmatory studies, while the 2+ results do require a confirmatory study by ISH techniques. From a technical perspective, the IHC is an

inexpensive test that is performed in most pathology laboratories; however, it has the disadvantage in that normal tissues do not express this protein [5, 8-14].

Therefore, a positive control does not exist in the tissue to evaluate whether the technique or tissue conditions have been the most appropriate. On the other hand, the interpretation of results is subjective and depends on the training of the observer. This situation leads to the possibility that a significant number of false negatives or positives exist [15, 16].

The FISH is the most sensitive test, is the gold standard, but is expensive and difficult to perform in routine laboratories. The silver in situ hybridization (SISH) technique is a recently available method, based on enzymatic metallography and silver deposition, which allows the quantification of specific HER2 signals using a conventional light-colored microscope, to which all pathologists are familiar, instead of a fluorescence microscope as used with the FISH technique. In addition, it is an automatic method, which guarantees the consistency of results and allows the evaluation of HER2 amplification after 6 hours [15-19].

Considering these factors, it's expected that a high level of agreement exists between the results obtained with these two methods; it's estimated that this value must be greater than 95%. The objective of this study was to evaluate the concordance of HER2 status with scores 2+ and 3+ by IHC with his amplification by SISH, in samples of mastectomy or breast conserving surgery patients, with pathological diagnosis of invasive breast cancer, from the Laboratory of Pathology from Hospital complex Santa Casa de Misericórdia in Porto Alegre [20-24].

Materials and Methods

This is a retrospective study. 182 cases of mastectomy or breast conserving surgery with pathological diagnosis of invasive breast cancer, HER2 status scores 2+ and 3+ by IHC and with their respective SISH, from the Laboratory of Pathology

of Hospital Santa Rita, in the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex, between January, 2013 and August, 2016 were reviewed. The Committee of Ethics in Research from the “Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre” approved the study with number 525.170, according to Resolution 466/2012 from the CNS/MS.

Medical records and pathological reports were reviewed, as well all slides stained with hematoxylin and eosin and slides from the immunohistochemical and SISH tests of surgical specimens stored in paraffin block. Besides, all pathological and immunohistochemical tests were analyzed by the same group of pathologists (3 pathologists), using staining with hematoxylin and eosin for evaluating the primary tumor. The immunohistochemistry was performed in all cases, selecting the cut with more representativeness of the primary tumor. The determination of HER2 status was made by IHC, using CerbB2 (clone 4B5) and was realized determination of the amplification by SISH technique.

For HER2, protein overexpression must meet a threshold criteria for the intensity and pattern of membrane staining (3+ on a scale of 0 to 3+), and for the percent positive tumour cells (greater than 10%). Staining must localize to the cell membrane and be circumferential (complete). Staining of the cytoplasm may be present, but this staining is not included in the determination of positivity. Score 0: No membrane staining is observed, score 1+: faint, partial staining of the membrane in any proportion of the cancer cells, scores 0 and 1 are considered negative. Score 2+ (indeterminate): weak to moderate complete staining of the membrane, greater than 10% of cancer cells. Score 3+ (positive): strong, complete staining of the membrane greater than 10% of cancer cells, according to the criteria of the ASCO/CAP (2008) [15, 8-14].

For SISH, the interpretation of the results follows the following criteria (Guidelines ASCO / CAP 2007) after the counting of at least 40 nuclei of neoplastic cells in at least two distinct areas of invasive neoplasia:

HER2 / Cr ratio $17 < 1.8$: NEGATIVE for HER2 gene amplification

HER2 / Cr 17 ratio > 2.2: POSITIVE for HER2 gene amplification

HER2 / Cr 17 ratio between 1.8 and 2.2; UNCERTAIN for HER2 gene amplification (count of 20 additional nuclei) a ratio of HER2/Cr17 equal to or greater than 2.2 was considered amplified, a ratio of HER2/Cr17 less than 1,8 was considered negative, and a ratio of HER2/Cr17 between 1.8-2.2 was considered ambiguous [18-19].

The Kappa index was performed according to the scale proposed by Landis e Koch in which, if the agreement is greater than the agreement due to chance, the value of k is greater than 0. With this test, some ranges are defined in which if the coefficient k is in a range between 0.00 to 0.21 the agreement will be slight, low if the range is from 0.21-0.40, moderate if the range is from 0.41-0.60, good if the range is 0.61-0.80, and a k coefficient greater than 0.80 would correspond to almost a perfect agreement. All statistical analyses were performed in SPSS version 18.0 for Windows.

Results.

HER2 oncogene status by immunohistochemistry: 182 cases were analyzed for the oncogene HER2 status by IHC. The results of this marker showed that 82,3% of cases (150/182) were classified as positive (score 3+) and 17,7% (32/182) were undetermined (score 2+). (Table 1)

Correlation between immunohistochemistry studies for HER2 status and the SISH: SISH studies were performed in all samples scores 3+ (150) corresponded to positives and in score 2+ (32) undetermined cases, for which a physician request was received for conducting this test. In 135 cases or 90% of those classified as 3+, HER2 amplification was found. In the remaining cases, HER2 amplification was identified in 2 of 32 cases that were interpreted by IHC (2+) as undetermined. (Table1)

About the remaining cases, results by SISH were not amplified, in 15 cases that were interpreted as positive (3+) and in 30 cases that were interpreted as

undetermined. In all cases the time of the tissue fixation was at least 8 hours. (Table1)

For statistical analysis of concordance, the kappa (k) index was used to assess the HER2 oncogene status by IHC and SISH methodologies, which was globally calculated for all cases. It yielded an overall k value of 0.733. This result is considered “good” on the rating scale. Confidence level of 95%, PPV: 95,3% e NPV: 90.1%.

Table 1. Concordance study to evaluate the amplification status of the oncogene HER2 by the IHC and SISH methods.

IHC	HER2 SISH		Total	Concordance(%)
	Amplified	Not amplified		
3+	135	15	150	90.8
2+	2	30	32	65.4
Total	137	45	182	

Discussion

In breast invasive carcinoma, the level of overexpression or amplification of HER2 is correlated with clinical benefit from Trastuzumab therapy and the knowledge of the status of this oncogene is used for eligibility of patients for this therapy. The determination of HER2 status is crucial not only in the definition of an adverse prognostic factor in patients who present with amplification, but also in the selection of patients who will possibly have a clinical response to the use of inhibitors for this oncogene. The amplification of the oncogene is associated with an increased likelihood of tumor progression, a negative response to chemotherapy, a better

response to the use of anthracyclines, a resistance to hormone therapy with Tamoxifen and a response to Trastuzumab. [25-27].

The determination of HER2 status can be established by IHC, FISH, SISH and CISH. The FISH is considered the most sensitive test, or “gold standard”. Their correct identification is very important in terms of decision-making regarding the best scheme of therapy for the patient with breast cancer. [28-29]

This study had the objective of evaluating the concordance of oncogene HER2 status by IHC with the amplification status by SISH. The analysis of this study shows that the number of cases with false negative and false positive results are low, with a false negative rate of 6.3% and a false positive rate of 10%. The concordance index was 0.733 (good) and the confidence level between cases 3+ and 2+ by IHC and the results from SISH was 95%.

Within the group of cases interpreted as undetermined or 2+ by IHC, studies had close to a 50% probability of being positive, reflecting the difficulty of defining with the IHC test the real state of amplification in some cases. These differences represent an over-interpretation of this category, which has a significant economic impact for health services. [30]

The study demonstrates that IHC technique is suitable as a test in an initial approach, by its low cost, as opposed from the different ISH techniques, and is reliable and good characterization of part of the cases. [25-29]

Conclusion

The IHC should continue as a first-line test, relegating the ISH techniques for cases with score 2+, no test for HER2 status is perfect, so the result depends on the level of uncertainty you are willing to accept. As discussed, if a ratio of 2 to 8% of false negative cases is acceptable, the current guidelines should be maintained. On the contrary, if you want to reduce the number of false negatives to less than 1%, this involves the use of ISH techniques as a test of the first line. A recent study reveals that the most cost-effective strategy is the application of IHC as screening, in cases

diagnosed with breast carcinoma, with application of ISH techniques for scores 2+ or 3+, this is also supported due to the discrepancy IHQ-ISH in these cases. This would decrease false-positive cases, avoiding thus, myocardial toxicity (and other side effects) of anti-HER2 therapy, as well as spending money on a treatment that would not be beneficial for the patients. In addition, some studies indicate that the level of amplification of the HER2 gene may be correlated with complete response rate to therapy with Trastuzumab. With this, it is necessary to consider the SISH technique in cases of 3+ score, to anticipate better response to antiHER2 therapy [25-29].

The results with SISH technique are similar to gold-standard FISH, with the advantage that only use common light microscope. This method facilitates and accelerates the diagnosis contributing to the evolution of this process in this area of pathology.

Conflict of interest

There was no known conflict of interest present in this study.

References

- [1] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 17 (2010) 747-752. PubMed PMID:10963602.
- [2] A.C.S.D. Barros, K.R. Leite, Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea/Molecular classification of breast cancer: a contemporary view, *Rev. Bras. Mastologia* 25 (4) (2015) 146-155.
- [3] Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil, INCA, Rio de Janeiro, 2016.
- [4] T.S. Lialiaris, G. Georgiou, E. Sivridis, D. Kareli, G. Tripsiannis, A. Papageorgiou *et al.*, Prognostic and predictive factors of invasive ductal breast carcinomas, *J Buon.* 15 (11) (2010) 79-88.
- [5] Dowsett M, BARTLETT J, ELLIS O *et al*: Correlation between immunohistochemistry (Hercep Test) and fluorescence in situ hibrodization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418-23 2.
- [6] Makar AP, Desmedt EJ, DePotter CR, *et al.* Neu (c-erbB-2) oncogene in breast cancer and its possible association with the risk of distant metastases. A retrospective study and review of literature. *Acta Oncol.* 1990; 29:931
- [7] De Laurentiis M, Canello G, Zinno L *et al*: Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. *Ann Oncol* 2005;16:7-13
- [8] Bilous M, Ades C, Armes J *et al*: Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopatology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER 2000 International Study. *Breast* 2003;12:92-8 5
- [9] Hammock L, Lewis M, Philips C, Cohen CS: HER – 2/ neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003;34:1043-7
- [10] Bofin AM, Ytterhus B, Martin C, O'learly JJ, Hagmar BM: Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:110-9
- [11]. Winston JA, Ramanaryanan J, Levine E: HER-2/neu evaluation in breast cancer are we there yet? *Am J Clin Pathol* 2004;121:33-49

- [12] C.W. Elston, I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer, The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology* 19(5) (1991) 403-410.
- [13] 2. Ross J, Fletcher J, Linette G et al: The HER2/neu Gene and protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and target of Therapy. *The Oncologist* 2003;4:307-25
- [14] Dendukuri N, Khetani K, Mclsaac M, et al. Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ*. 2007 May; 176(10):1429-34.
- [15] Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol*. 2001;19:2714–2721.
- [16] Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*. 1994;54:2771–2777.
- [17] Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009 Jan; 17(1):1-7.
- [18] Arnould L, Arveux P, Couturier J, et al. Pathologic complete response to Trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin Cancer Res*. 2007; 13; 6404-6409
- [19] Powell RD, Pettay JD, Powell WC, et al. Metallographic in situ hybridization. *Hum Pathol* 2007. 38:1145e59
- [20] Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:855–857
- [21] Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006;24:3032–3038.
- [22] Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, Klein PM. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer*. 2006;7:153–157.

[23] Wludarski SC, Lopes LF, Berto E, Silva TR, Carvalho FM, Weiss LM, Bacchi CE. HER2 testing in breast carcinoma: very low concordance rate between reference and local laboratories in Brazil. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Mar;19(2):112–118.

[24] Ghaffari SR, Sabokbar T, Dastan J, Rafati M, Moossavi S. Her2 amplification status in Iranian breast cancer patients: comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(4):1031–1034.

[25] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human Breast Cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177–182.

[26] Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008;65:1566–1584.

[27] Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369:29–36.

[28] Joseph A. Sparano and Soonmyung Paik. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2008:721–728.

[29] Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ. Clinical application of the 70-gene profile: The MINDACT Trial. *J Clin Oncol*. 2008:729–735.

[30] Wludarski SC, Lopes LF, Berto E, Silva TR, Carvalho FM, Weiss LM, Bacchi CE. HER2 testing in breast carcinoma: very low concordance rate between reference and local laboratories in Brazil. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Mar;19(2):112–118.

4. Considerações finais

No estado do Rio Grande do Sul, o Laboratório de Patologia e Citologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre representa um centro de referência no diagnóstico das patologias oncológicas, e estima-se que cerca de 7000 casos correspondam a neoplasias mamárias. Podemos inferir que nossa amostra é representativa da população do sul do Brasil. Este estudo faz parte de uma pesquisa maior, intitulada Estudo dos marcadores tumorais no câncer de mama, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA (parecer número 525.170) de acordo com a Resolução 466/2012 do CNS/MS. Esta se iniciou em 2013, com o objetivo de investigar os marcadores preditivos no câncer de mama, visando contribuir com informações sobre o perfil das pacientes e as características do tumor, correlacionando ao prognóstico e à sobrevida.

As limitações do nosso estudo incluem o caráter retrospectivo e o tamanho da amostra de acordo com os critérios de inclusão adotados. Contudo, nossos achados reforçam que a IHQ deverá continuar a ser o teste de primeira linha na avaliação do status HER2. Dessa forma, é importante que novos estudos com uma amostra maior sejam feitos a fim de que se possam estabelecer correlações ainda mais precisas para o conhecimento do status do oncogene HER2 no carcinoma de mama, já que é indispensável quando se considera a elegibilidade das pacientes para a terapêutica com o anticorpo monoclonal anti-Her2/trastuzumab.

5. Anexos

5.1. Pathology, Research and Practice: Guide for Authors

Introduction

Pathology, Research and Practice covers the entire field of pathology: Reviews focus on recent progress in pathology, while Comments look at interesting current problems and at hypotheses for future developments in pathology. Original Papers present novel findings on all aspects of general, anatomic and molecular pathology. Rapid Communications inform readers on preliminary findings that may be relevant for further studies and need to be communicated quickly. Teaching Cases look at new aspects or special diagnostic problems of diseases and at case reports relevant for the pathologist's practice.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English

or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request.

For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to

a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/prp>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#).

Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Peer Review: Single blinded

Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate.

Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.**

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.**

Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation

addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.**

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.**

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name.

The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason.

References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system.

Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system.

Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly

established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y .

In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article.

Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original.

Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please indicate your preference for color: in print or online only.

[Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard.

Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration.

Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'.

Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct.

Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation.

When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>.

Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote.

Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/pathology-research-and-practice>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ...'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003
(accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our [Support Center](#).

5.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA)

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCOMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo dos marcadores tumorais no câncer de mama.

Pesquisador: Claudia Giuliano Bica

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 22396713.1.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCOMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 901.915

Data da Relatoria: 26/11/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da Emenda:

A inclusão das co-investigadoras: Renata Fragomeni Almeida, Suzana Elisabete Lamonatto e Karen Margarita Rico Escamilla.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos e adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.tche.br