

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Bárbara Jaime dos Santos

**EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS
INVASORES**

Belo Horizonte

2019

Bárbara Jaime Dos Santos

**EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS
INVASORES**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiana Buzelin Nunes

Co-orientador: Prof^o. Msc. Marcelo Araújo Buzelin

Belo Horizonte

2019

Santos, Bárbara Jaime dos.
SA237e Efeitos da terapia neoadjuvante em carcinomas mamários
invasores [manuscrito]. / Bárbara Jaime dos Santos. - - Belo Horizonte:
2019.

110f.: il.

Orientador (a): Cristiana Buzelin Nunes.

Coorientador (a): Marcelo Araújo Buzelin.

Área de concentração: Patologia Investigativa.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Imuno-Histoquímica. 3. Receptores
Estrogênicos. 4. Receptores de Progesterona. 5. Terapia Neoadjuvante. 6.
Dissertações Acadêmicas. I. Nunes, Cristiana Buzelin. II. Buzelin, Marcelo
Araújo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
IV. Título.

NLM: QZ 270

Ata da defesa de dissertação



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

BARBARA JAIME DOS SANTOS

Realizou-se, no dia 18 de fevereiro de 2019, às 15:00 horas, Faculdade de Medicina, 5º andar, sala 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES DIAGNOSTICADOS E TRATADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG ENTRE 2009 E 2017*, apresentada por BARBARA JAIME DOS SANTOS, número de registro 2017668120, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes - Orientador (UFMG), Prof(a). Helenice Gobbi (UFTM), Prof(a). Marcelo Araujo Buzelin (IEP - Santa Casa de BH), Prof(a). Luciene Simões de Assis Tafuri (FUMEC).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2019.

Cristiana Buzelin Nunes
Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Doutora)

Helenice Gobbi
Prof(a). Helenice Gobbi (Doutora)

Marcelo Araujo Buzelin
Prof. Marcelo Araujo Buzelin (Mestre)

Luciene Simões de Assis Tafuri
Prof(a). Luciene Simões de Assis Tafuri (Doutora)

Faculdade de Medicina - UFMG
Campus Saúde
Centro de Pós-Graduação
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5º andar
Centro - Cep: 301300100
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-9640 - 3403-9641
cpg.ppg.patol@gmail.com

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Campus Pampulha
Departamento de Patologia Geral
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
Pampulha - Cep: 31270-901
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-2878
dpat@icb.ufmg.br

Folha de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES DIAGNOSTICADOS E TRATADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG ENTRE 2009 E 2017

BARBARA JAIME DOS SANTOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes- UFMG

Prof(a). Helenice Gobbi- UFMT

Prof. Marcelo Araujo Buzelin- IEP - Santa Casa de BH

Prof(a). Luciene Simões de Assis Tafuri- FUMEC

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2019.

Faculdade de Medicina - UFMG
Campus Saúde
Centro de Pós-Graduação
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5 andar
Centro - Cep: 301300100
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-9640 - 3403-9641
cpg.ppg.patol@gmail.com

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Campus Pampulha
Departamento de Patologia Geral
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
Pampulha - Cep: 31270-901
Belo Horizonte - MG
Tel: 3409-2878
dpat@icb.ufmg.br

A minha família.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cristiana Buzelin Nunes, que desde o primeiro e-mail acreditou em mim, por me orientar, pelos ensinamentos e confiança.

Ao meu co-orientador Prof^o. Msc. Marcelo Araújo Buzelin, pelos conselhos, idéias e apoio técnico nas reações de imunohistoquímica.

A Dra. Débora Balabram, pelas idéias na construção do trabalho e colaboração nas estatísticas.

A Prof^a. Dr^a. Luciene Simões de Assis Tafuri, por me transmitir o amor pela docência e pela pesquisa.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Patologia por todo o conhecimento transmitido que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG e do Laboratório de Anatomia Patológica, especialmente a Margarida, pelo apoio e atenção na separação dos casos.

Ao meu irmão pelo exemplo de vida, força e determinação, mesmo em momentos difíceis, que me ensinou a nunca desistir.

A minha mãe pelo exemplo de mulher guerreira, que sempre correu atrás dos seus objetivos para que eu tivesse condições de realizar os meus.

Ao Agnaldo, que sempre esteve presente, pelo apoio e incentivo.

Ao meu marido João, pelo apoio, companheirismo e compreensão.

A toda minha família, pelo incentivo.

À Coordenação Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa concedida.

A Deus.

“ Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impendem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

APOIO FINANCEIRO: Coordenação Nacional de Pesquisa (CNPq).

RESUMO

OBJETIVOS: Identificar fatores histológicos e imuno-histoquímicos (IHQ) do carcinoma mamário invasor (CMI) relacionados com resposta patológica à terapia neoadjuvante (Tneo) e avaliar os efeitos da terapia na histologia e na expressão imunohistoquímica de biomarcadores dos tumores.

MATERIAL E MÉTODOS: 70 casos de CMI (biópsia inicial pré-terapia e a peça cirúrgica pós-terapia) do arquivo do Laboratório de Patologia Mamária, diagnosticados e tratados com Tneo no Hospital das Clínicas da UFMG, entre 2009 e 2017. Realizadas avaliações histológica (tipo, grau e densidade de infiltrado inflamatório) e IHQ para Receptores hormonais (RH), HER2 e Ki67. Para avaliação dos fatores preditivos de resposta à Tneo, os casos foram separados em dois grupos (resposta patológica completa - RPC e resposta patológica parcial - RPP). Os achados histológicos e IHQ foram comparados nos grupos RPP e RPC, e entre os tumores iniciais e pós-terapia no grupo RPP.

RESULTADOS: Características clínicas, histológicas e IHQ dos 70 casos: predominou o tipo Carcinoma Ductal SOE (77,1%), o grau histológico III (48,6%), e o nível de infiltrado inflamatório entre 1 e 20% (64,3%). 31 (44,3%) dos tumores eram RH+ e HER2-, 10 (14,3%) eram RH- e HER2+, 25 (35,7%) eram triplo negativos e 4 (5,7%) eram RH+ e HER2+. 14 (20%) dos tumores apresentaram RPC e 56 (80%), RPP. Na avaliação dos fatores preditivos de RPC apenas os níveis do infiltrado inflamatório mostraram resultados significativos ($p=0,003$): todos os tumores com RPC apresentaram densidade acima de 21%, enquanto que os tumores com RPP apresentaram densidade de até 20%. Tipo e grau histológicos, RH, HER2 e Ki67 não mostraram resultados significativos. Na avaliação dos efeitos da terapia (grupo RPP), o único fator com significância estatística foi o tipo histológico ($p=0,024$): 19/55 (34,5%) apresentaram mudança do tipo histológico. Apesar de não ter significância estatística, houve mudança no grau histológico em 26/55 dos casos, como aumento do grau em 27,3% e diminuição em 10,9% dos casos com RPP. Houve aumento dos níveis de infiltrado inflamatório em 7% e diminuição, em 35% dos casos. 22/55 apresentaram mudança do *status* de RE ou do escore de Alred e 20/55 apresentaram mudança no RP. 96,4% dos casos mantiveram a expressão de HER2. 34,5% tiveram alterações do índice de Ki67. A distribuição do Ki67 tornou-se diferente dos tumores pós-terapia, desviando do esperado ($p=0,014$).

CONCLUSÕES: O único fator que demonstrou associação com RPC foi o nível do infiltrado inflamatório. O tipo e grau histológico e os biomarcadores RE, RP, HER2 e Ki67 não demonstraram significância estatística em relação ao tipo de resposta. Os tumores apresentaram alterações no tipo e grau histológico e nos biomarcadores RE, RP, HER2 e Ki67 após a terapia neoadjuvante, mas somente o tipo histológico e o Ki67 foram estatisticamente significantes.

Palavras-chave: neoplasias da mama; imuno-histoquímica; receptores estrogênicos; receptores de progesterona; HER2; terapia neoadjuvante.

ABSTRACT

AIMS: To identify histological and immunohistochemical factors (IHC) of invasive mammary carcinoma (IMC) related to better pathological response to neoadjuvant therapy (Tneo) and evaluate the effect of therapy on the classification, graduation and expression of prognostic and predictive factors in tumors.

MATERIALS AND METHODS: 70 cases of IMC (initial pre-therapy biopsy and postoperative surgical specimen) from the Archives of the Mammary Pathology Laboratory, diagnosed and treated with Tneo at Hospital das Clínicas of UFMG between 2009 and 2017. Histological evaluation (histologic type, histologic grade and density of inflammatory infiltrate) and IHC for Hormone Receptors (HR), HER2 and Ki67. To evaluate the predictive factors of Tneo response, the cases were separated into two groups (complete pathological response - CPR and partial pathological response - PPR). Histological findings and IHC were compared in the PPR and CPR groups, and between the initial tumors and post-therapy in the PPR group.

RESULTS: Clinical, histological and IHC characteristics of the 70 cases: Ductal SOE carcinoma (77,1%), histological grade III (48,6%), and inflammatory infiltrate density between 1 and 20% (64,3%) predominated. 31 (44,3%) of the tumors were HR + and HER2 +, 10 (14,3%) were HR- and HER2 +, 25 (35,7%) were triple negative and 4 (5,7%) were HR + and HER2 +. 14 (20% (80%), PPR. In the evaluation of the predictive factors of PRC only the density of the inflammatory infiltrate showed significant results ($p = 0.003$): all the tumors with CPR had a density above 21%, whereas the tumors with PPR had a density of up to 20%. Histological type and grade, HR, HER2 and Ki67 did not show significant results. In the evaluation of the effects of the therapy (PPR group), the only factor with statistical significance was histological type ($p = 0.024$): 19/55 (34.5%) presented a histological type change. Although not statistically significant, there was a change in histological grade in 26/55 cases, such as an increase in grade in 27.3% and a decrease in 10.9% of cases with PPR. There was an increase in the density of inflammatory infiltrate in 7% and a decrease in 35% of the cases. 22/55 presented a change in the status of ER or Alred score and 20/55 presented a change in PR. 96.4% of cases maintained HER2 expression. 34.5% had changes in the Ki67 index. Ki67 distribution became different from post-therapy (non-normal) tumors, diverting from expected ($p = 0.014$).

CONCLUSIONS: The only factor that demonstrated association with CPR was the density of the inflammatory infiltrate. The type and histological grade and the biomarkers ER, PR, HER2 and Ki67 did not demonstrate statistical significance regarding the type of response. Tumors presented alterations in histological type and grade and in the biomarkers ER, PR, HER2 and Ki67 after neoadjuvant therapy, but only the histological type and Ki67 were statistically significant.

Keywords: breast neoplasms; immunohistochemistry; estrogen receptor; progesterone receptor; HER2; Ki67; neoadjuvant therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Influência do tipo de células inflamatórias nos tumores.....21

FIGURA 2: Diferentes tipos de resposta à terapia neoadjuvante - Caso 31 pré (A) e pós-terapia (B) apresentando 90% de celularidade residual; Caso 18 pré (C) e pós-terapia (D) apresentando 5 a 10% de celularidade residual; e caso 19 pré (C) e pós-terapia (D) apresentando resposta patológica completa.....39

FIGURA 3: Caso 1 Pré-terapia - Ductal SOE grau III (A) e Pós-terapia - Ductal SOE grau II (B).....47

Caso 18 pré (A) e pós-terapia (B) apresentando RPP e caso 19 pré (C) e pós-terapia (D) apresentando RPC

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Tipo histológico dos carcinomas iniciais distribuídos de acordo com o tipo de resposta à terapia	40
GRÁFICO 2: Distribuição do Grau Histológico do carcinoma inicial de acordo com o tipo de resposta à terapia.....	44
GRÁFICO 3: Grau histológico final dos tumores residuais pós-terapia neoadjuvante.....	46
GRÁFICO 4: Alterações no grau histológico apresentadas pelos tumores residuais comparados com os iniciais.....	46
GRÁFICO 5: Porcentagem de infiltrado inflamatório presente nos carcinomas pré-terapia nos grupos RPC e RPP	47
GRÁFICO 6: Porcentagem de infiltrado inflamatório nos tumores pós-terapia neoadjuvante.....	48
GRÁFICO 7: Alterações na densidade do infiltrado inflamatório identificadas após a terapia neoadjuvante.....	49
GRÁFICO 8: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pré-terapia.....	54
GRÁFICO 9: Distribuição das amostra pela marcação do Ki67 pós-terapia	54
GRÁFICO 10: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pré-terapia.....	55
GRÁFICO 11: Distribuição das amostra pela marcação do Ki67 pós-terapia.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Anticorpos, clones, fabricantes, sistemas de detecção e diluições dos anticorpos anti HER2, RE, RP e Ki67.....	35
TABELA 2: Escore para interpretação de imunocoloração para RE E RP, segundo Allred (2010).....	35
TABELA 3: Sistema de escore recomendado para avaliação do HER2 pelo guia ASCO/CAP (2013/2018).....	36
TABELA 4: Tipos histológicos das amostras pós-terapia neoadjuvante com resposta parcial.....	41
TABELA 5: Alterações nos tipos histológicos das amostras pós-terapia comparadas com as pré-terapia neoadjuvante.....	42
TABELA 6: Formação tubular, Pleomorfismo nuclear e índice mitótico de tumores pré-terapia nos grupos com RPC e com RPP.....	44
TABELA 7: Formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico dos tumores pós-terapia.....	45
TABELA 8: <i>Status</i> da expressão imuno-histoquímica de HER2, receptores hormonais e Ki67 em carcinomas pré-terapia com RPC e RPP.....	50
TABELA 9: <i>Status</i> da expressão imuno-histoquímica de HER2, receptores hormonais e Ki67 nos tumores residuais pós-terapia neoadjuvante.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<u>American Joint Committee on Cancer</u>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CBN	Cristiana Buzelin Nunes
CMI	Carcinomas mamários invasores
COEP	Comitê de ética em pesquisa da UFMG
H.E.	Hematoxilina e eosina
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HER2	Receptor Epidérmico Humano 2
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
RPC	Resposta Patológica Completa
RPP	Resposta Patológica Parcial
TILs	Linfócitos intratumorais
Qtno	Quimioterapia neoadjuvante
TNM	<i>American Joint Committee on Cancer tumor, node and metastasis</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	18
1.1	Tratamento.....	21
1.2	Receptores hormonais.....	24
1.3	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2.....	26
1.4	Ki67.....	27
1.5	Avaliação dos biomarcadores.....	27
1.6	Expressão de biomarcadores em diferentes amostras do tumor.....	28
2.	Justificativa.....	30
3.	Objetivos.....	31
3.1	Objetivos gerais.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Seleção dos casos.....	32
4.2	Crítérios de inclusão e exclusão.....	32
4.3	Avaliação Histológica.....	32
4.4	Imuno-histoquímica.....	33
4.5	Aspectos éticos.....	36
4.6	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS.....	38
5.1	Caracterização da amostra.....	38
5.2	Avaliação do tipo histológico.....	39
5.2.1	Tumores pré-terapia.....	39
5.2.2	Tumores pós-terapia.....	40
5.2.3	Comparação do tipo histológico entre os tumores pré x Pós-terapia.....	41
5.3	Avaliação do grau histológico.....	43
5.3.1	Tumores pré-terapia.....	43
5.3.2	Tumores pós-terapia.....	45
5.3.3	Comparação do grau histológico entre os tumores pré x pós-terapia.....	46
5.4	Infiltrado inflamatório intratumoral.....	47

5.4.1	Tumores pré-terapia.....	47
5.4.2	Tumores pós-terapia.....	48
5.4.3	Comparação da densidade do infiltrado inflamatório entre os tumores pré x pós-terapia.....	48
5.5	Expressão dos biomarcadores.....	49
5.5.1	Tumores pré-terapia.....	49
5.5.2	Tumores pós-terapia.....	51
5.5.3	Comparação da expressão dos biomarcadores nos tumores pré x pós-terapia.....	52
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	Conclusões.....	66
8.	Referências.....	67
9.	Anexos.....	77
9.1	Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética – Plataforma Brasil.....	77
9.2	Anexo B: Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	78
9.3	Anexo C: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit HERCEPTEST™.....	79
9.4	Anexo D: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit PharmaDx™.....	80
9.5	Anexo E: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit Novolink™.....	81
9.6	Anexo F: Apresentação de parte do trabalho – pôster 1.....	82
9.7	Anexo G: Certificado de apresentação de pôster -1.....	83
9.8	Anexo H: Certificado de apresentação de pôster – Encontro da Pós-graduação.....	84
9.9	Anexo I: Publicação de resumo – 1.....	85
9.10	Anexo J: Apresentação de parte do trabalho – pôster 2.....	88
9.11	Anexo K: Certificado de apresentação de pôster – 2.....	89
9.12	Anexo L: Certificado de apresentação de pôster – Encontro da Pós-graduação.....	90
9.13	Anexo M: Publicação de resumo – 2.....	91
9.14	Anexo N: Banco de dados construído para o trabalho.....	94

9.15 Anexo O: Artigo submetido à revista Pathology Research and Practice.....	95
--	-----------

1. Introdução

O câncer representa um conjunto de várias doenças que possuem o crescimento desordenado das células como fator comum (INCA, 2018). Considerado um problema de saúde pública, segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2030, serão 27 milhões de novos casos de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas por ano com câncer (ONCOGUIA, 2015).

No Brasil e no mundo, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres, apresentando um risco estimado de 56,33 tumores a cada 100 mil mulheres e 59.700 novos tumores para cada ano do biênio 2018/2019 (INCA,2018).

Em países desenvolvidos, após uma publicação que demonstrava o risco de desenvolvimento do câncer de mama atribuído à terapia hormonal houve uma queda na incidência, atribuída à diminuição da sua utilização. Além disso, existem programas de conscientização e rastreamento eficazes, que permitem a detecção de lesões menores, o que diminui o índice de mortalidade por câncer de mama. Já em países subdesenvolvidos, muitas vezes os tumores são diagnosticados quando se tornam palpáveis, em estágios avançados da doença (BRAY *et al.*, 2018; JATOI; MILLER, 2003; VERONESI *et al.*, 2006).

A mama é formada por um sistema de ductos maiores (ductos principais) que se ramificam a partir do mamilo e terminam nas unidades ductais lobulares terminais. O epitélio escamoso queratinizado da pele se estende por dentro do mamilo e se transforma em uma camada dupla de epitélio que reveste os ductos. A camada basal é formada por células mioepiteliais, que têm função na ejeção do leite na lactação, além de função estrutural, o outro tipo celular são as células epiteliais

luminais ductais ou lobulares. Estas últimas são as responsáveis pelos principais tumores de mama, os carcinomas (BRASILEIRO FILHO, 2014).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer podem ser hormonais ou genéticos, sendo divididos em esporádicos ou hereditários. Os carcinomas hereditários se devem a mutações genéticas herdadas que são responsáveis por cerca de 12% de todos os tumores, sendo as mutações mais conhecidas as dos genes BRCA1 e BRCA2 cujas portadoras desenvolvem o tumor em 30 a 90% dos casos dependendo da mutação existente. Os carcinomas esporádicos estão ligados à exposição endócrina, como idade da primeira menarca, menopausa precoce, primeira gravidez acima de 30 anos, nuliparidade, uso de anticoncepcionais por mais de 10 anos e terapia de reposição hormonal. Alguns fatores de risco ambientais podem aumentar a chance de desenvolvimento do câncer, como consumo de álcool, sobrepeso, tabagismo e a radioterapia para tratamento de tumores prévios (BRAY *et al.*, 2018; MENEN; TESHOME, 2019).

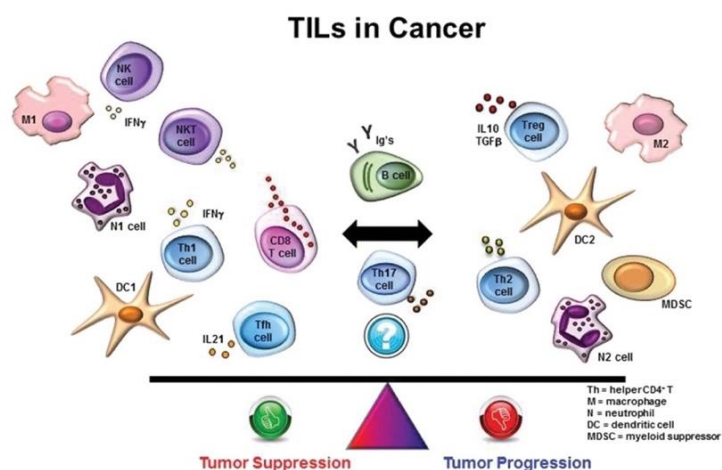
Tanto os fatores genéticos, quanto os epigenéticos, levam a alterações no ciclo e na divisão celular, não ativando o processo de apoptose, reparo do DNA e supressão tumoral, levando ao surgimento de células que adquirem capacidade de proliferação autônoma, invasão de tecidos adjacentes e que podem desenvolver a capacidade de se destacar do tumor inicial, migrar para outros locais (metástase) e alterar outras células e órgãos (BRASILEIRO FILHO, 2014). A migração destas células pode ocorrer através da corrente sanguínea, chegando a órgãos mais distantes, ou do sistema linfático, aonde podem desenvolver metástases nos linfonodos mais próximos ao sítio primário (BRASILEIRO FILHO, 2014).

Além da capacidade de metastatização, as células tumorais adquirem outras propriedades; uma delas é a evasão do sistema imune, que é ocasionada

pela interação das células tumorais com outras células do microambiente tumoral, local onde há troca de sinais celulares entre as células tumorais e do estroma, resultando em inibição ou ativação, de cujo balanço depende o desenvolvimento, progressão e a regressão dos carcinomas mamários invasores (CMI) (WÜRFEL *et al.*, 2018).

O estroma das neoplasias é composto por células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, mastócitos e vários tipos de células imunitárias de defesa inata e adaptativa (células dendríticas, linfócitos, macrófagos, neutrófilos polimorfonucleados e eosinófilos) (BRASILEIRO FILHO, 2014). As células imunitárias vêm sendo bastante estudadas, principalmente os linfócitos intratumorais (TILs), pois sua presença confere melhor prognóstico para as pacientes quando comparado com a ausência destes, além de ser um fator preditivo em potencial para a resposta à terapia (CASTANEDA *et al.*, 2016; DENARDO; COUSSENS, 2007; DENKERT *et al.*, 2010; DIECI, MARIA VITTORIA *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2018). A quimioterapia pode levar à formação de novos epitopos imunogênicos, secreção de citocinas, apresentação cruzada de antígenos, ativação de células dendríticas e indução de células T citotóxicas específicas de tumores, levando à indução da resposta imune anti-tumoral direcionada às células lesadas (PELEKANOU *et al.*, 2017). Alguns estudos com pacientes que receberam agentes citotóxicos, como antraciclinas e taxanos, verificaram o aumento de linfócitos intratumorais, além da indução de resposta imune antitumoral (DEMARIA *et al.*, 2001; DIECI, M. V. *et al.*, 2014; LADOIRE *et al.*, 2008). A quimioterapia também pode ter um efeito negativo no microambiente tumoral, pois também exerce efeito citotóxico nas células do sistema imune (GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2014; GONZALEZ-ANGULO *et al.*, 2012).

A contagem das células inflamatórias é realizada através de coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE) (PELEKANOU *et al.*, 2017); entretanto, podem ser identificadas e separadas em células que conferem bom prognóstico e células que conferem mau prognóstico através de utilização de marcadores fenotípicos de células inflamatórias. Quando os linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ (Th1), macrófagos ativados do tipo M1 e linfócitos citotóxicos T CD8+ são a maioria das células inflamatórias, o prognóstico seria melhor, e tumores com predomínio de linfócitos Th2, macrófagos alternativamente ativados M2 e de células mieloides supressoras, teriam pior prognóstico (Figura 1) (BRASILEIRO FILHO, 2014).



From: The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014
 Ann Oncol. 2014;26(2):259-271. doi:10.1093/annonc/mdl450
 Ann Oncol | © The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology.
 All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Figura 1: Influência do tipo de células inflamatórias nos tumores

1.1 Tratamento

A escolha da terapia a ser utilizada se baseia em características biológicas do tumor e no estadiamento. O estadiamento (TNM) é utilizado para descrever a extensão da doença e segue o sistema de estadiamento da *American*

Joint Committee on Cancer (AJCC) de 2017 (BADVE *et al.*, 2017). Essa classificação leva em consideração o tamanho do tumor (T) e a presença de metástases linfonodais (N) ou à distância (M) (FERNANDES *et al.*, 2010).

O tratamento do câncer de mama é baseado no controle local (cirúrgico) associado ou não à terapia sistêmica (WILLIAMS *et al.*, 2006). A terapia sistêmica pode ser realizada através de quimioterapia, terapia endócrina e de terapia alvo-específica. A quimioterapia utiliza medicamentos que destroem as células tumorais durante seu processo de divisão celular através de toxicidade; a terapia endócrina visa alvos moleculares específicos, impedindo a proliferação tumoral, e a terapia alvo-específica visa destruir proteínas ligadas a proliferação, sobrevivência e apoptose, podendo ser realizada antes da ressecção cirúrgica (neoadjuvante) ou após (adjuvante) (ALLRED, 2010; GOWN, 2008) .

A terapia adjuvante é administrada na corrente sanguínea a fim de atingir as células tumorais que se desprenderam do tumor primário, podendo gerar metástases e eventuais células tumorais residuais (FERNANDES *et al.*, 2010).

A quimioterapia neoadjuvante é um método que visa reduzir o volume do tumor antes da ressecção cirúrgica. Inicialmente, quando começou a ser utilizada na clínica nos anos 70 era utilizada em pacientes com tumores localmente avançados e inoperáveis para que se tornassem operáveis. Atualmente, também é utilizada em pacientes com tumores operáveis grandes, que seriam submetidas à mastectomia, para que elas se tornem candidatas à cirurgia conservadora da mama. A resposta à terapia neoadjuvante é considerada como importante fator prognóstico, podendo ser de dois tipos, resposta patológica completa (RPC) e resposta patológica parcial (RPP). Podem ser classificados como RPC, casos em que ocorreu o desaparecimento total do tumor na mama e em metástases linfonodais, mesmo em

presença de carcinoma *in situ*; e como RPP, casos que responderam parcialmente. Esse tipo de terapia é mais utilizado em carcinomas mamários localmente avançados, principalmente em tumores considerados triplo-negativos, HER2 positivos ou com um alto índice proliferativo. A maior diferença entre a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante, é a possibilidade de se observar os efeitos da quimioterapia diretamente no tumor, verificando se este responde ou não àquele tipo de terapia, possibilitando a revisão da terapêutica em tumores com baixa resposta (AMOROSO et al., 2015; FERNANDES et al., 2010; KRUG *et al.*, 2018).

A quimioterapia apresenta toxicidade significativa e vários efeitos colaterais que interferem na qualidade de vida da paciente, além dos custos elevados. A variedade de tratamentos existentes tem impacto na clínica de rotina, e se baseia, cada vez mais, na avaliação de fatores prognósticos e preditivos, clínicos e patológicos bem validados para dar suporte às decisões terapêuticas (MCSHANE et al., 2005).

Para garantir maior chance de obter benefício com menor efeito colateral negativo à paciente, existe uma necessidade crescente na identificação e validação de biomarcadores como fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama (RAKKA & ELLIS, 2011).

Vários fatores são considerados como preditivos e prognósticos. A presença de metástases linfonodais, por exemplo, é considerada um dos principais fatores prognósticos para pacientes com câncer de mama (FERNANDES et al., 2010; WALKER et al., 2012), juntamente com a avaliação imuno-histoquímica de biomarcadores presentes nas células tumorais, a diferenciação da lesão (tipo histológico e grau do tumor) e o índice proliferativo. Além do seu valor prognóstico, definindo o curso da doença e auxiliando na decisão terapêutica, esses marcadores

também possuem valor preditivo (MCSHANE et al., 2005), avaliando a resposta individualizada que uma paciente pode obter em tratamentos específicos, onde o alvo é uma molécula envolvida no crescimento e na proliferação celular expressa pelo tumor, obtendo a melhor resposta ao tratamento quando as células tumorais apresentam alta expressão de moléculas alvo ou podendo prever resposta negativa a certos tratamentos (HAMBURG; COLLINS, 2010; LEONG et al., 2010).

Em carcinomas mamários, a avaliação de alguns marcadores é considerada primordial para definir a probabilidade de resposta a certos tratamentos, juntamente com o tamanho do tumor, tipo, grau histológico e a presença de metástases ganglionares. Os marcadores utilizados são os receptores hormonais (receptores de estrogênio e progesterona), o índice proliferativo avaliado através do Ki-67 e o Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2) (ELSTON; ELLIS, 2002; GOBBI, 2012; UNTCH *et al.*, 2013).

1.2 Receptores hormonais

Em 1896, Beatson observou em uma jovem mulher com carcinoma inflamatório que a ooforectomia provocava respostas em tumores localmente avançados. Estudos posteriores comprovaram o valor da terapia endócrina para a evolução das pacientes, mudando seu prognóstico (BEATSON, 1896).

Vários tipos de terapia endócrina são utilizados em combinação ou isoladamente: ablação cirúrgica de órgãos produtores de estrogênio ou medicamentos que inibem a hipófise; medicamentos que atuam nos receptores de estrogênio e inibidores da aromatase (ALLRED, 2010; NUNES,CB *et al.*, 2013). A terapia endócrina é a mais utilizada atualmente em tumores sensíveis a hormônios. O tamoxifeno, medicação mais utilizada nas terapias anti-hormonais em tumores RE e RP positivos, se liga aos receptores de estrogênio, impedindo a ligação do

hormônio a seu receptor, tendo como consequência positiva a inibição do crescimento induzido pelo estrógeno. Estudos mostram que o Tamoxifeno aumenta a sobrevida e reduz as chances de recorrência em pacientes com tumores de mama RE positivos (ALLRED, 2010).

Os receptores de estrógeno (RE) são membros da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição induzidos por ligante, são ativados pelo hormônio estrógeno. Regulam o crescimento e a diferenciação de células epiteliais normais na mama. Em tumores, esta via de sinalização celular pode estar ativa em diferentes níveis, sendo prejudicial, pois leva ao crescimento das células tumorais induzido por estrógeno (ALLRED, 2010).

Os receptores de progesterona (RP) são membros dos fatores de transcrição ativados por ligante da família de receptores nucleares esteroides, e são ativados pelo hormônio progesterona. Auxiliam a regulação de funções celulares normais primordiais, como a proliferação celular, portanto sua ativação é prejudicial em tumores por levar a proliferação. O RP positivo indica que a via de sinalização celular do crescimento induzida por estrógeno está funcionando perfeitamente, pois a expressão do RP é regulada pelo RE. Em pacientes tratados com a terapia hormonal, sua expressão está associada com baixa taxa de recorrência (ALLRED, 2010).

A avaliação dos receptores hormonais nos tumores tem como principal função avaliar a resposta à terapia endócrina (OYAMA et al., 2007; ARIAS; MAZZA; FUNKE, 2003; YAZIJI et al., 2008). Devido à importância clínica destes marcadores, a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e o *College of American Pathologists* (CAP) definiram diretrizes para as análises e para os testes de IHQ destes marcadores (HAMMOND et al., 2011).

1.3 Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

Pertencente ao grupo de receptores do fator de crescimento epidérmico, composto pelo EGFR (HER1), HER2, HER3 e HER4, o fator de crescimento epidérmico humano 2 ou HER2 é uma proteína transmembrana de 185 kd codificada pelo gene localizado no cromossomo 17. Expressa em baixos níveis em tecidos normais, regula várias funções celulares normais como a proliferação, sobrevivência e a apoptose. Em 10 a 20% dos tumores, está superexpressa e associada a proliferação, diferenciação, adesão e motilidade celular, progressão tumoral, metastatização, angiogênese e redução de apoptose (ALLRED, 2010; GOWN, 2008; LEONG et al., 2010; ROSS *et al.*, 2009).

A superexpressão de HER2 está associada a pior prognóstico e má resposta ao tamoxifeno e quimioterapia, e a melhor resposta terapêutica à terapia-alvo anti-HER2. Os tumores com superexpressão do HER2 são mais comumente de grau histológico intermediário ou alto, mais frequentemente são negativos para receptores de estrógeno e progesterona, e apresentam metástase linfonodal ao diagnóstico inicial (GOWN, 2008; HAMBURG; COLLINS, 2010; WOLFF et al., 2013).

A avaliação da superexpressão do HER2 inicialmente é realizada por IHQ, e havendo resultados equívocos (2+), é necessária confirmação da amplificação do gene através de hibridização in situ (ISH). A ASCO/CAP desenvolveu algoritmos de análise para HER2, tanto por IHQ, quanto por FISH, além de indicar diretrizes para a fase pré-analítica das reações IHQ (WOLFF *et al.*, 2018).

Um marco na trajetória das pacientes foi a liberação de tratamentos alvo-específicos pela *Food and Drug Administration (FDA)*. A medicação mais utilizada em tumores com superexpressão de HER2 é o Trastuzumab (HerceptinTM), anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2, que se utilizado em tumores HER2

positivos, melhora a taxa de sobrevida e reduz o risco de recorrência e mortalidade, mas além dele existem outros, como lapatinib (TykerbTM), pertuzumab (PerjetaTM), e trastuzumab-emtansine (KadcylaTM), também conhecida como T-DM1 (GOWN, 2008; SATTI, 2011; WOLLF *et al.*, 2013).

1.4 Ki67

A proteína Ki67 foi denominada de Ki em homenagem a cidade e Universidade de Kiel na Alemanha e 67 devido ao número do anticorpo capaz de identificá-lo. A proteína codificada pelo gene MK167, localizado no cromossomo 10q25-ter está envolvida nas etapas iniciais de síntese de RNA ribossomal, e é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (ALLISON, 2018).

O Ki67 é considerado um dos principais marcadores de proliferação celular e sua superexpressão é associada a piores taxas de sobrevida. Sua avaliação é utilizada tanto para distinguir os tipos do câncer de mama, como para auxiliar na decisão terapêutica (MATSUBARA *et al.*, 2013; YAMAZAKI *et al.*, 2015).

Existem muitas diferenças de opiniões em relação à porcentagem de células marcadas que define como alto ou baixo índice de proliferação, conferências como a de Saint Gallen na Suíça recomendam pontos de corte (*cut-off*) para a análise deste marcador que variaram ao longo dos anos (GNANT; HARBECK; THOMSEN, 2017).

1.5 Avaliação dos biomarcadores

Inicialmente, a avaliação dos biomarcadores é feita em amostras de biópsia incisional ou biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) para avaliação do tipo e grau histológicos, além de avaliar a possibilidade de recebimento de terapia neoadjuvante (VON MINCKWITZ *et al.*, 2011).

A avaliação dos receptores hormonais e do Ki67 é realizada exclusivamente através da imuno-histoquímica (IHQ), método que, normalmente, utiliza tecidos previamente fixados em formalina, incluídos em parafina, submetidos à microtomia e à utilização de anticorpos específicos para a identificação de produtos celulares ou marcadores de superfície através de imunomarcação (FERNANDES et al., 2010; HAMMOND et al., 2010; ROCHA et al., 2009).

A avaliação do HER2 pode ser realizada tanto por imuno-histoquímica, quanto por métodos de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou cromogênica (CISH) (ROCHA et al., 2009). Rotineiramente, é feita pela IHQ por ser um método de custo mais baixo e de mais fácil execução (DOWSETT et al., 2007; NUNES, C. B. et al., 2008; WOLFF et al., 2013).

1.6 Expressão de biomarcadores em diferentes amostras do tumor

Alguns pacientes apresentam resistência à terapia-alvo, sendo uma explicação para isto, a possibilidade de discordância entre o perfil molecular do tumor primário em diferentes amostras (AITKEN et al., 2010; BA; LIU; JIN, 2014; RAICA et al., 2014).

Há várias teorias que suportam a ideia de diferenças entre o perfil imuno-histoquímico da amostra obtida inicialmente por biópsia de agulha e a amostra proveniente da ressecção tumoral, como as diferenças na execução da técnica e na análise das reações de IHQ, a evolução biológica, a heterogeneidade do tumor de mama e o recebimento de terapia neoadjuvante (LI et al., 2013; YEUNG et al., 2016). Essas alterações podem levar a mudanças no estado dos receptores, levando à resistência à terapia (BA; LIU; JIN, 2014).

Este fato nos mostra a necessidade da avaliação do perfil biológico de todas as amostras do tumor, pois pacientes podem estar recebendo tratamentos

desnecessários em tumores em que o status do receptor era positivo na amostra anterior, mas negativo em outra amostra, ou estar deixando de receber um tratamento que poderia melhorar o manejo da paciente e aumentar a sobrevida em tumores em que os receptores eram negativos, mas se tornaram positivos em outra amostra (ADAMCZYK et al., 2012; YAO et al., 2014).

Com a avaliação dos perfis das amostras de biópsia de agulha e da ressecção tumoral, os pacientes receberiam a terapia mais apropriada para seu caso, evitando também a toxicidade e efeitos colaterais provocados por alguns tratamentos (JENSEN et al., 2012).

2. Justificativa

A resposta patológica completa ou parcial à quimioterapia neoadjuvante orienta a conduta terapêutica após a ressecção tumoral, pois informa a eficácia da terapia *in vivo*. Conhecer fatores que possam prever esta resposta e seus efeitos no tumor devem ser estudados, pois mudanças na histopatologia refletem mudanças no prognóstico da paciente e até mesmo mudanças no tratamento para evitar que pacientes deixem de receber tratamentos que poderiam aumentar a sua sobrevida e evitar que tratamentos desnecessários, potencialmente tóxicos e de alto custo sejam dados às pacientes que não responderiam (ADAMCZYK et al., 2012; BAULIES et al., 2015; YAO et al., 2014).

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais:

Identificar fatores histológicos e imuno-histoquímicos do carcinoma mamário invasor no tumor primário relacionados com o grau de resposta patológica à terapia neoadjuvante e avaliar os efeitos da quimioterapia neoadjuvante na classificação, graduação e expressão imuno-histoquímica para RE, RP, HER2 e Ki67 nos tumores residuais pós terapia.

3.2 Objetivos específicos:

- Associar as características histológicas e imuno-histoquímicas com o tipo de resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante
- Comparar as características histológicas e imuno-histoquímicas em amostras pré-terapia neoadjuvante com as amostras da doença residual, quando presente;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos casos

Neste trabalho foram utilizados 70 casos de pacientes com carcinomas mamários invasores de pacientes que realizaram terapia neoadjuvante, diagnosticados e operados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e arquivados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, no período de 2009 a 2017.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos os casos que preencheram os seguintes critérios:

- Ter realizado diagnóstico inicial (biópsia), tratamento e cirurgia no HC-UFMG;
- Ter as lâminas coradas em H.E. e blocos de parafina dos tumores disponíveis no arquivo;
- Ter amostra suficiente para realizar as análises.

Foram excluídos os casos que preencheram os seguintes critérios:

- Ter realizado diagnóstico inicial em outro serviço;
- Tumores em que as lâminas ou blocos não foram encontrados no arquivo;
- Amostras insuficientes no bloco de parafina para novos cortes.

4.3 Avaliação Histológica

Foi realizada revisão de todas as lâminas dos casos selecionados, pré e pós terapia neoadjuvante, quanto ao diagnóstico, classificação e graduação

histológica dos tumores, de acordo com os critérios diagnósticos propostos por Elston e Ellis e mantidos pela Organização Mundial da Saúde. O grau histológico final foi baseado na soma de três parâmetros, sendo eles: formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, que foram graduados de I a III (ELSTON; ELLIS, 2002; LAKHANI *et al.*, 2012). A avaliação do infiltrado inflamatório foi realizada de acordo com os critérios propostos pelo *International TILs Working Group*, agrupando-se os níveis de infiltrado em ausente, discreto (1 a 20%), moderado (21 a 50%) e acentuado (acima de 50%) (SALGADO *et al.*, 2015).

4.4 Imuno-histoquímica

Foram realizadas reações IHQ para RE, RP, HER2 e Ki67 nas amostras pré e pós quimioterapia. Para os receptores hormonais utilizou-se o Kit PharmaDX (Dako Cytomation); para o Ki67 foi utilizado anticorpo primário Dako (Dako Cytomation) e o kit Novolink (Leica); e para a avaliação do HER2 foi utilizado o Kit HercepTest, (Dako Cytomation). As reações foram realizadas no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, utilizando protocolos padronizados, seguindo as recomendações dos fabricantes.

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 4µm colocados em lâminas com carga elétrica sendo então, submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

Os cortes foram desparafinizados, desidratados em álcool e corados manualmente para os marcadores com utilização de protocolos validados previamente em nosso laboratório. Informações sobre os clones dos anticorpos, sistemas de detecção, métodos de reativação antigênica e diluições estão na Tabela 1. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas com lamínula e verniz.

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas com controles positivos e negativos conhecidos. As reações para RE, RP e HER2 foram realizadas com controles fornecidos pelos kits.

As lâminas foram analisadas por uma patologista experiente (CBN). Os critérios empregados para a análise imuno-histoquímica dos receptores hormonais foram baseados no guia de recomendação da ASCO/CAP, onde a marcação maior que 1% das células neoplásicas com intensidade moderada ou forte é considerada como resultado positivo (HAMMOND *et al.*, 2010). Os tumores foram também semi-quantitativamente e qualitativamente avaliados para RE e RP segundo Allred, 2010 (Tabela 2).

A análise da expressão da proteína HER2 foi baseada no guia de recomendação da ASCO/CAP para HER2 de 2018 (WOLFF *et al.*, 2013, WOLFF *et al.*, 2018), Tabela 3.

A interpretação da marcação pelo Ki67 foi semi-quantitativa, verificando-se a porcentagem de núcleos marcados, observados nas áreas de maior marcação (*hot spot*) avaliando-se pelo menos 300 células consecutivas, quando disponíveis (CURIGLIANO *et al.*, 2013; UNTCH *et al.*, 2013; YERUSHALMI *et al.*, 2010).

Os resultados das avaliações dos aspectos histológicos e IHQ foram inseridos em uma planilha do Excel, contendo todos os parâmetros avaliados. Posteriormente, foram comparados os resultados dos parâmetros nos tumores com resposta patológica completa (grupo RPC) e com resposta patológica parcial (grupo RPP), na tentativa de identificar fatores associados à RPC. Nos tumores do grupo com resposta patológica parcial, foram comparados os parâmetros dos tumores nas amostras pré e pós-terapia para avaliar os efeitos da terapia nos tumores residuais.

TABELA 1: Anticorpos, clones, fabricantes, sistemas de detecção e diluições dos anticorpos anti HER2, RE, RP e Ki67

Anticorpo	Clone	Fabricante	Sistema de detecção	Diluição
HER2	A0485 (HercepTest™)	Dako Cytomation, United States of America	Reagente de visualização por polímeros, DAKO	Pronto para uso
RE	1D5 (PharmaDX™)	Dako Cytomation, United States of America	Reagente de visualização por polímeros, DAKO	Pronto para uso
RP	PGR1294 (PharmaDX™)	Dako Cytomation, United States of America	Reagente de visualização por polímeros, DAKO	Pronto para uso
Ki67	MIB1	Dako Cytomation, United States of America	Sistema de detecção e amplificação Novolink, Leica Biosystems	Pronto para uso

TABELA 2: Escore para interpretação de imunocoloração para os receptores hormonais, segundo Allred (2010)

Intensidade da Imunorreatividade	Escore	Proporção de reatividade	Escore
Ausência de reatividade	0	Ausência de reatividade	0
Reatividade fraca	1	<1% núcleos reativos	1
Reatividade moderada	2	1–10% núcleos reativos	2
Reatividade forte	3	11–33% núcleos reativos	3
	-	34–66% núcleos reativos	4
	-	67–100% núcleos reativos	5
Soma dos escores de proporção e intensidade			
Escore total	Interpretação		
0 - 2	Negativo		
3 - 8	Positivo		

TABELA 3: Sistema de escore recomendado para avaliação do HER2 pelo guia ASCO/CAP (WOLFF *et al.*, 2018)

Escore de interpretação	Achado microscópico
0 NEGATIVO	Não identificada nenhuma coloração na membrana citoplasmática ou Coloração fraca envolvendo parcialmente a circunferência da membrana citoplasmática em \leq 10% das células neoplásicas.
1+ NEGATIVO	Coloração fraca envolvendo parcialmente a circunferência da membrana citoplasmática em $>$ 10% das células neoplásicas.
2+ EQUÍVOCO	Coloração fraca/moderada envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática $>$ 10% das células neoplásicas.
3+ POSITIVO	Coloração completa, forte, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em $>$ 10% das células neoplásicas.

4.5 Aspectos éticos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Mamária da Universidade Federal de Minas Gerais e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer da Plataforma Brasil de número 2.109.565 (ANEXO A).

4.6 Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS (SPSS, Inc, Chicago, Ill). Para analisar as diferenças entre as variáveis categóricas de cada grupo (como tipo, grau histológico e positividade de marcadores) foi usado o teste qui-quadrado de Pearson. Para comparar as variáveis pré e pós-terapia utilizamos o teste de McNemar para variáveis dicotômicas e McNemar-Bowker para variáveis com mais categorias. Para analisar as variáveis

contínuas pré e pós-terapia foi utilizado o teste de Wilcoxon. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Foram selecionadas todas as pacientes que receberam terapia neoadjuvante entre 2009 e 2017 e se encontravam nos critérios de inclusão. Encontramos 294 pacientes, mas 224 foram excluídas por falta de material suficiente para o estudo ou material arquivado em laboratórios externos. A amostra final foi composta por 70 CMI de 68 pacientes, com idade entre 25 e 72 anos e idade média de 47 anos, sendo que 41 tumores eram na mama direita (60%), 25 na mama esquerda (37%) e duas pacientes apresentavam tumores bilaterais (3%).

A maior parte das avaliações pré-terapia ocorreu em amostras de biópsias por agulha grossa 39 (55,7%) e 31 (44,3%) era composto por biópsias incisionais. As avaliações pós-terapia foram obtidas através de mastectomia em 56 (80%) pacientes e em 14 (20%), através de cirurgia conservadora da mama.

Os tumores foram separados em dois grupos de acordo com o tipo de resposta à terapia: resposta patológica completa (RPC) e resposta patológica parcial (RPP) (Figura 2). Após receberem a terapia neoadjuvante, 14 (20%) pacientes obtiveram a RPC e 56 (80%), obtiveram RPP, destas últimas, uma paciente (1,4%) apresentou resposta patológica completa na mama, mas apresentava metástase linfonodal, por isso foi classificada como RPP, mas não participou da análise da comparação entre os tumores pré e pós-terapia.

Quatro pacientes (5,7%) obtiveram RPC, mas apresentavam carcinoma *in situ* residual. Quatro pacientes (5,7%) tiveram boa resposta na mama, restando somente raros ninhos de células ou células tumorais isoladas.

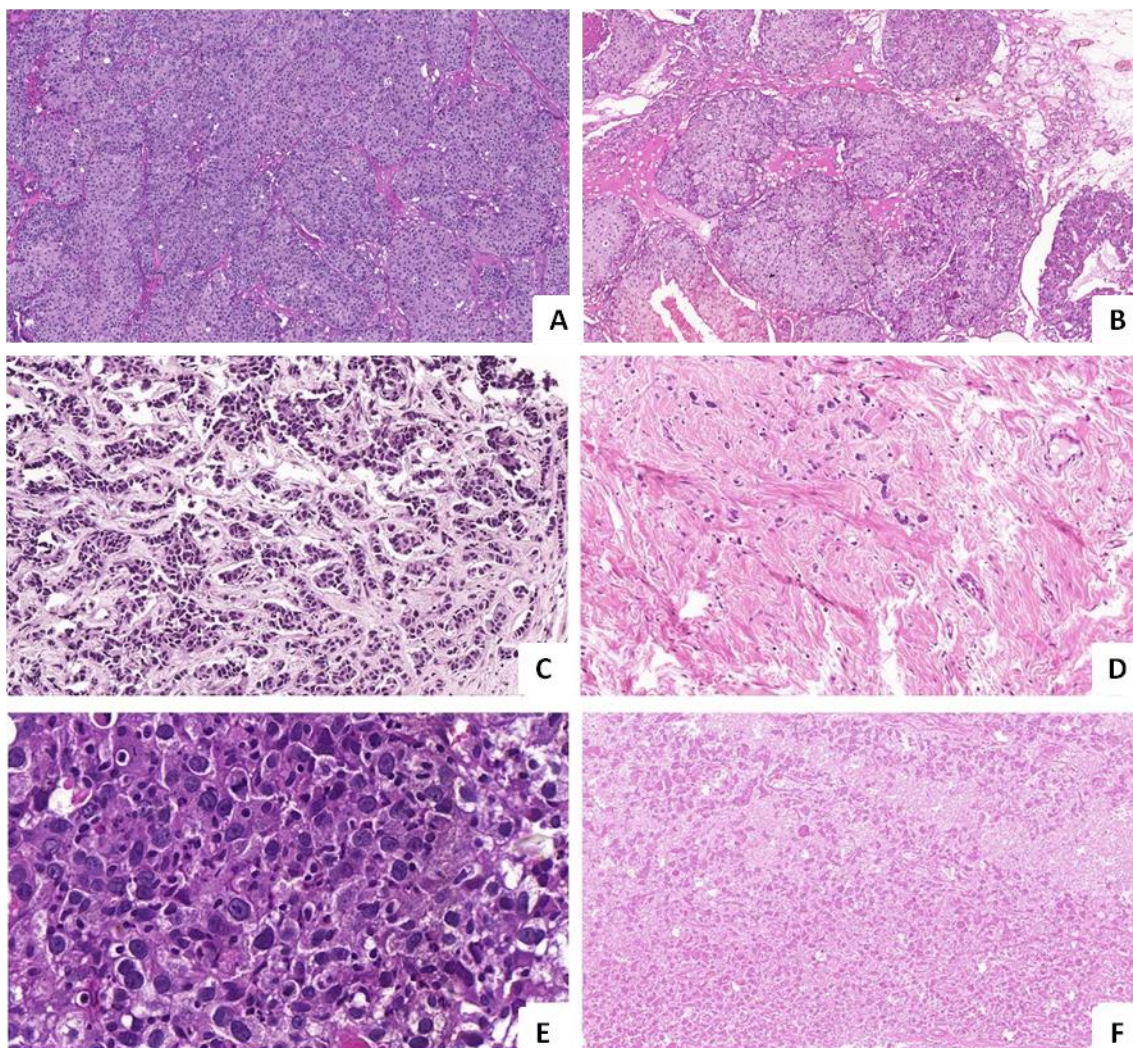


Figura 2: Diferentes tipos de resposta à terapia neoadjuvante - Caso 31 pré (A) e pós-terapia (B) apresentando 90% de celularidade residual; Caso 18 pré (C) e pós-terapia (D) apresentando 5 a 10% de celularidade residual; e caso 19 pré (E) e pós-terapia (F) apresentando resposta patológica completa (40x - H.E.).

5.2 Avaliação do tipo histológico

5.2.1 Tumores pré-quimioterapia

Nas 70 amostras pré-quimioterapia foram encontrados 8 tipos de carcinoma mamário invasor em nossas amostras, sendo eles: carcinoma tipo não especial (Ductal SOE), carcinoma ductal com características medulares, carcinoma mucinoso, carcinoma lobular invasor, carcinoma metaplásico, carcinoma micropapilar invasor e tipo misto (ductal-lobular e tubular-lobular). Para análise estatística, os tipos histológicos foram agrupados em carcinomas tipo não especial e

outros tipos, sendo mais frequente o carcinoma tipo não especial (Ductal SOE) encontrado em 77,1% (54/70) dos casos. A maioria das amostras não apresentava carcinoma *in situ* associado (ductal e/ou lobular) (87,1%).

Em relação aos dois grupos RPC e RPP, a distribuição do tipo histológico dos carcinomas iniciais foi semelhante (Gráfico 1).

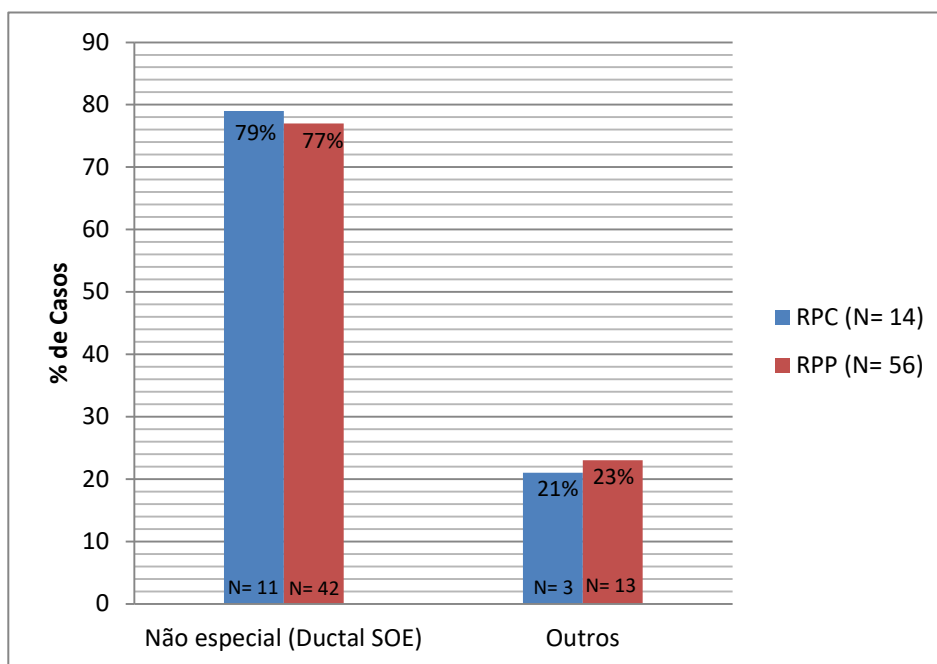


GRÁFICO 1: Tipo histológico dos carcinomas pré-terapia distribuídos de acordo com o tipo de resposta à terapia

5.2.2 Tumores pós-terapia

O tipo histológico mais frequente nas 55 amostras pós-terapia que obtiveram RPP, foi o carcinoma tipo não especial (Ductal SOE). Os tipos histológicos especiais encontrados estão descritos na Tabela 4. A maioria das pacientes não apresentava carcinoma *in situ* associado 38/55 (70%).

TABELA 4: Tipos histológicos das amostras pós-terapia neoadjuvante nos 55 casos com resposta patológica parcial

Subtipo histológico	N	%
Carcinoma tipo não especial (Ductal SOE)	32	58,2%
Carcinoma ductal SOE com áreas de padrão micropapilar e apócrino	1	1,8%
Carcinoma ductal SOE com áreas de diferenciação escamosa	1	1,8%
Carcinoma lobular invasor	3	5,5%
Carcinoma micropapilar invasor	2	3,6%
Carcinoma metaplásico	2	3,6%
Carcinoma invasor variante cribriforme	1	1,8%
Carcinoma misto (Ductal-lobular)	4	7,3%
Carcinoma misto (Ductal-mucinoso)	1	1,8%
Carcinoma misto (Ductal-micropapilar)	3	5,5%
5 a 10% de celularidade residual pós Qt neo	4	7,3%
Carcinoma não classificável pós Qtneo	1	1,8%

5.2.3 Comparação do tipo histológico entre os tumores pré x pós-quimioterapia

Após quimioterapia neoadjuvante, 36 tumores (65,5%) não tiveram alteração do tipo histológico e 19 tumores (34,5%) apresentaram alterações histológicas (**p= 0,024**):

- Mudança do tipo histológico da neoplasia = 4 tumores
- Índice de celularidade residual entre 5 e 10% = 4 tumores
- Alterações celulares causadas pela quimioterapia tornando o tumor inclassificável = 1 tumor

- Tipo misto inicial e tipo específico na peça = tumores
- Tipo específico inicial e tipo misto na peça = 7 tumores

As alterações nos tipos histológicos detalhadas estão listadas na Tabela 5.

TABELA 5: Alterações nos tipos histológicos das amostras pós-quimioterapia comparadas com as pré-quimioterapia neoadjuvante de 55 casos com RPP

Subtipo da amostra inicial	Subtipo da ressecção cirúrgica pós-terapia	Número de tumores	Total
Ductal SOE	Micropapilar invasor	1	
Ductal SOE	Metaplásico	1	4 com alterações do subtipo
Ductal SOE	Carcinoma Invasor variante cribriforme	1	
Micropapilar invasor	Ductal SOE + Mucinoso	1	
Ductal SOE	5 a 10% de celularidade residual	3	4 tumores com boa resposta à Qtneo
Micropapilar invasor	5 a 10% de celularidade residual	1	
Ductal SOE	Carcinoma não classificável após Qtneo	1	1 caso não classificável devido à alterações da Qtneo
Carcinoma túbulo-lobular	Carcinoma Lobular	1	3 tumores com tipo misto alterou para um tipo específico
Carcinoma Ductal SOE + Lobular	Ductal SOE	2	
Ductal SOE	Ductal SOE + Micropapilar invasor	3	7 tumores com somente

Ductal SOE	Ductal SOE + áreas de padrão micropapilar e apócrino	1	um subtipo e na ressecção apresentaram tipo misto
Carcinoma Lobular	Carcinoma Ductal SOE + Lobular	2	
Ductal SOE	Ductal SOE + áreas de diferenciação escamosa	1	
Sem alterações		36	
Total		55	

SOE: Sem outras especificações

5.3 Avaliação do Grau histológico

5.3.1 Tumores pré-quimioterapia

A maioria dos tumores iniciais apresentou baixa formação tubular (nota 3), incluindo todos os tumores com RPC. Em relação ao pleomorfismo nuclear, a maior parte dos tumores apresentou alto pleomorfismo (nota 3) em ambos os grupos. A maior parte dos tumores apresentou baixo índice mitótico (nota 1). Os graus histológicos II e III foram os mais frequentes, com predomínio de grau II nos tumores com RPC (60%) e de grau III nos tumores com RPP (50,9%).

5.3.1.1 Comparação do grau histológico dos tumores nos grupos RPC e RPP

Os achados referentes a formação tubular, ao pleomorfismo nuclear, ao índice mitótico e ao grau histológico final dos tumores, separados de acordo com o tipo de resposta (RPC ou RPP), encontram-se na Tabela 6 e Gráfico 2.

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à formação tubular, ao pleomorfismo nuclear, ao índice mitótico e ao grau histológico final.

TABELA 6: Formação tubular, Pleomorfismo nuclear e índice mitótico de tumores pré-terapia nos grupos com RPC e com RPP

Características		RPC	RPP	Total	Valor de p
		N (%)	N (%)		
Formação Tubular	1	0 (0%)	2 (3,6%)	2 (2,9%)	p = 0,238
	2	0 (0%)	7 (12,5%)	7 (10%)	
	3	14 (100%)	47 (83,9%)	61 (87,1%)	
Pleomorfismo Nuclear	1	0 (0%)	7 (12,5%)	7 (10%)	p = 0,338
	2	4 (28,6%)	13 (23,2%)	17 (24,3%)	
	3	10 (71,4%)	36 (64,3%)	46 (65,7%)	
Índice mitótico	1	8 (57,2%)	22 (39,3%)	30 (42,9%)	P = 0,068
	2	0 (0%)	15 (26,8%)	15 (21,4%)	
	3	6 (42,8%)	19 (33,9%)	25 (35,7%)	

RPC: resposta patológica completa, RPP: resposta patológica parcial. Teste estatístico: χ^2

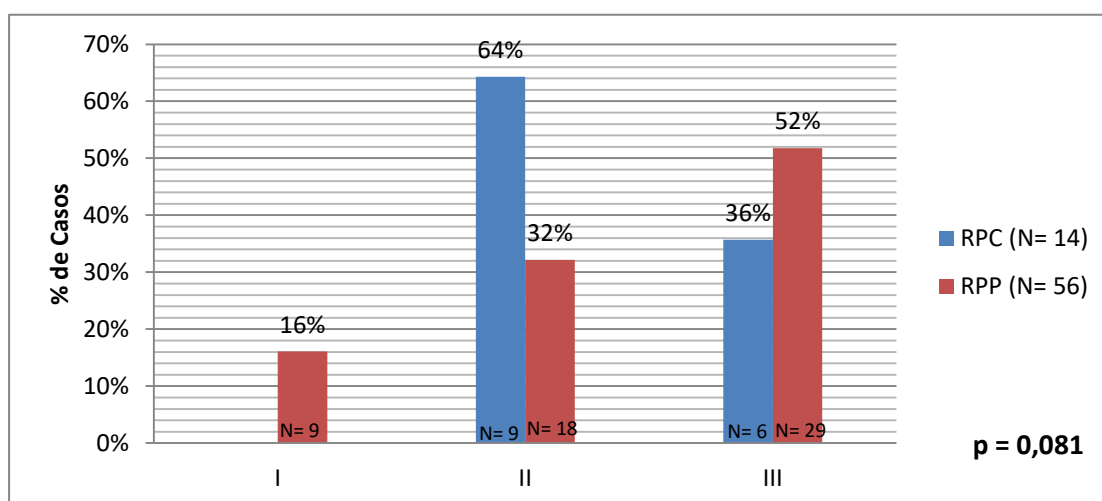


GRÁFICO 2: Distribuição do Grau Histológico do carcinoma inicial de acordo com o tipo de resposta à terapia. Teste estatístico: χ^2

5.3.2 Tumores pós-quimioterapia

A maioria dos tumores residuais pós-quimioterapia apresentou nota 3 de formação tubular e de pleomorfismo nuclear. Em relação ao índice mitótico, a distribuição foi semelhante entre as notas 1 e 3. A maior parte dos tumores apresentou grau histológico final III, seguido pelo grau II. Em cinco tumores o grau não pôde ser avaliado, pois quatro tumores tinham somente células isoladas e um tumor se tornou não classificável. Os achados referentes à formação tubular, ao pleomorfismo nuclear, ao índice mitótico e ao grau histológico final dos tumores pós-terapia encontram-se na Tabela 7 e Gráfico 3.

TABELA 7: Formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico dos tumores pós-quimioterapia com RPP

Características	Grau	N	%
Formação Tubular	1	2	4%
	2	7	14%
	3	41	82%
Pleomorfismo Nuclear	1	0	0,0%
	2	11	22%
	3	39	78%
Índice mitótico	1	19	38%
	2	7	14%
	3	24	48%

N= número de tumores

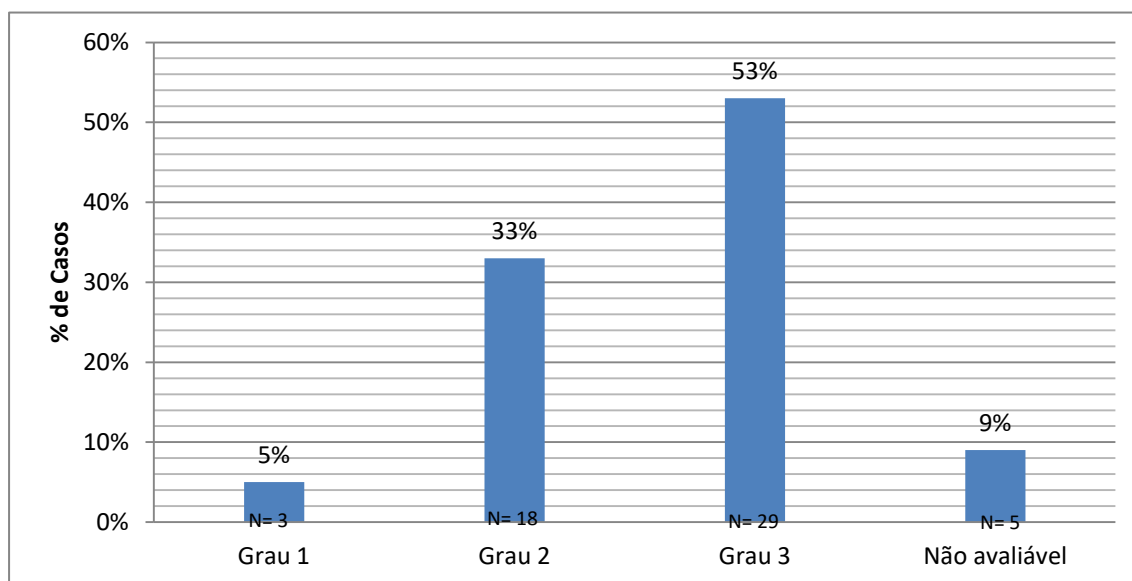


Gráfico 3: Grau histológico final dos tumores residuais pós-quimioterapia neoadjuvante

5.3.3 Comparação do grau histológico entre os tumores pré x pós-terapia

Em relação ao grau histológico final, dos 55 tumores com RPP, 26 tumores apresentaram mudanças, representando 47,3% dos tumores e 29 permaneceram com o grau histológico do tumor inicial, representando 52,7% dos tumores (Gráfico 4, Figura 3).

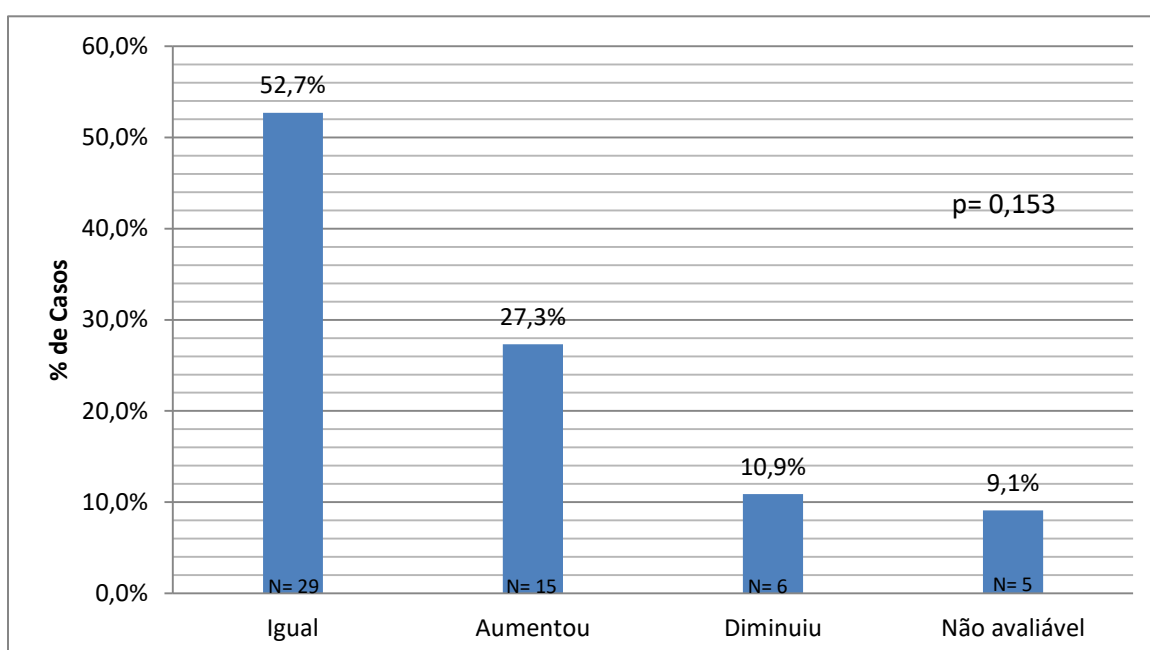


Gráfico 4: Alterações no grau histológico apresentadas pelos tumores residuais comparados com os iniciais dos casos com RPP

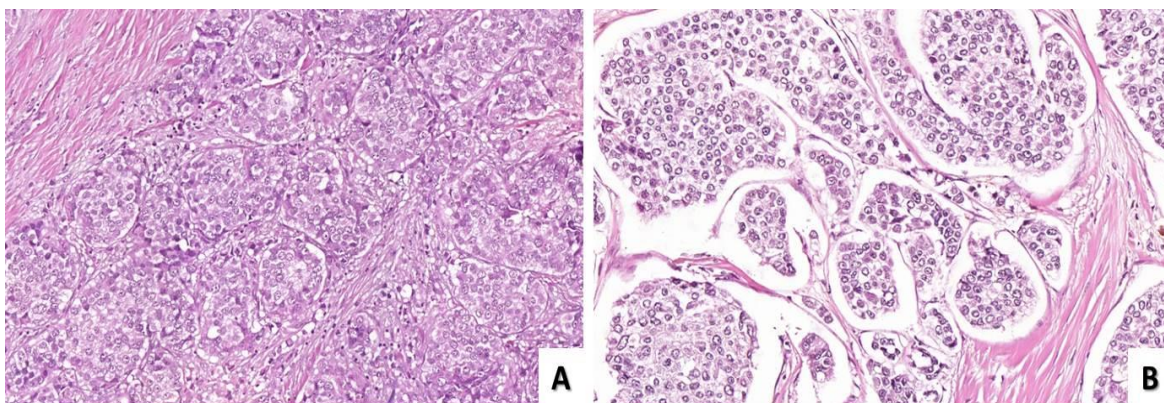


FIGURA 3: Caso 1 Pré-quimioterapia - Ductal SOE grau III (A) e Pós-quimioterapia - Ductal SOE grau II (B) H.E. 40x

5.4 Infiltrado inflamatório intratumoral

Os tumores foram segregados em 4 grupos de acordo com a densidade do infiltrado inflamatório: ausente, discreto (1 a 20%), moderado (21 a 50%) e acentuado (acima de 50%).

5.4.1 Tumores pré-terapia

Todos os 14 tumores iniciais com RPC apresentaram infiltrado inflamatório acima de 21%, sendo em 8 tumores considerado moderado e um tumor, acentuado.

Nos 56 tumores com RPP, a maioria apresentou infiltrado inflamatório abaixo de 20% (discreto), sete tumores mostraram ausência de infiltrado e 40 tumores, níveis discretos. Esta avaliação demonstrou resultados estatisticamente significativos (Gráfico 5).

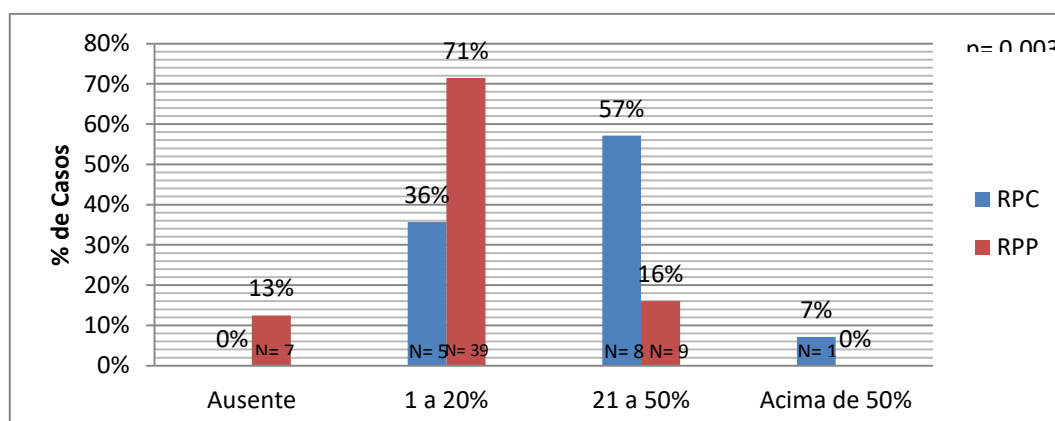


GRÁFICO5: Porcentagem de infiltrado inflamatório presente nos carcinomas pré-quimioterapia nos grupos RPC e RPP

5.4.2 Tumores pós-quimioterapia

A maioria dos tumores (29/55) apresentou níveis discretos (<20%) de infiltrado inflamatório, seguidos por ausência de infiltrado inflamatório em 20/55 tumores. Nenhum tumor apresentou níveis acentuados de infiltrado inflamatório nos tumores pós-terapia neoadjuvante (GRÁFICO 6).

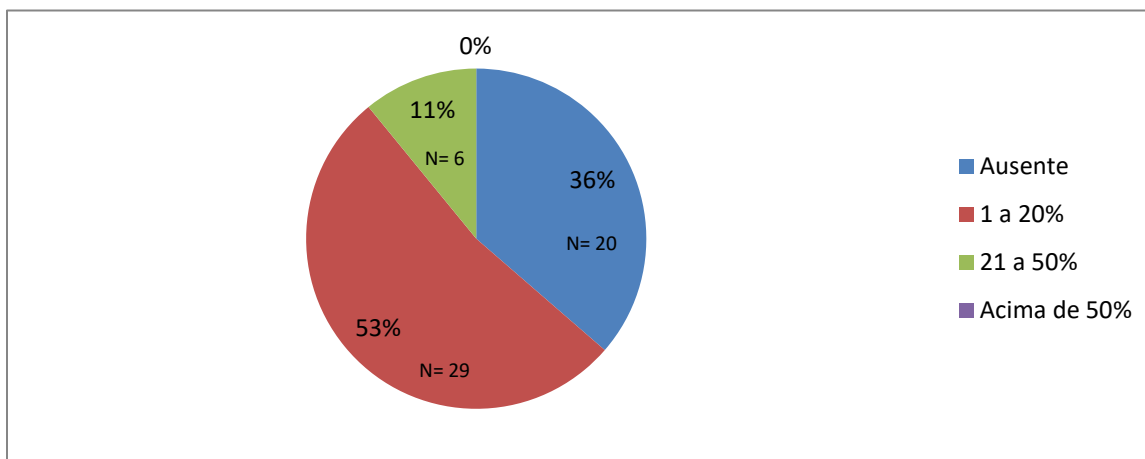


GRÁFICO 61: Porcentagem de infiltrado inflamatório nos tumores pós-quimioterapia neoadjuvante dos casos com RPP

5.4.3 Comparação da densidade de infiltrado inflamatório entre os tumores pré x pós-quimioterapia

A maioria dos tumores manteve níveis semelhantes de infiltrado inflamatório intratumoral nos tumores pré e pós-terapia. Ocorreram alterações na densidade do infiltrado inflamatório em 42% dos tumores: 12 tumores com níveis discretos na biópsia inicial e um tumor com nível moderado não apresentaram infiltrado inflamatório nos tumores pós-terapia; 6 tumores com níveis moderados de infiltrado inflamatório na biópsia inicial apresentaram níveis discretos nos tumores pós-terapia; e quatro tumores com níveis discretos na biópsia inicial passaram a apresentar níveis moderados na amostra pós-terapia neoadjuvante (GRÁFICO 7).

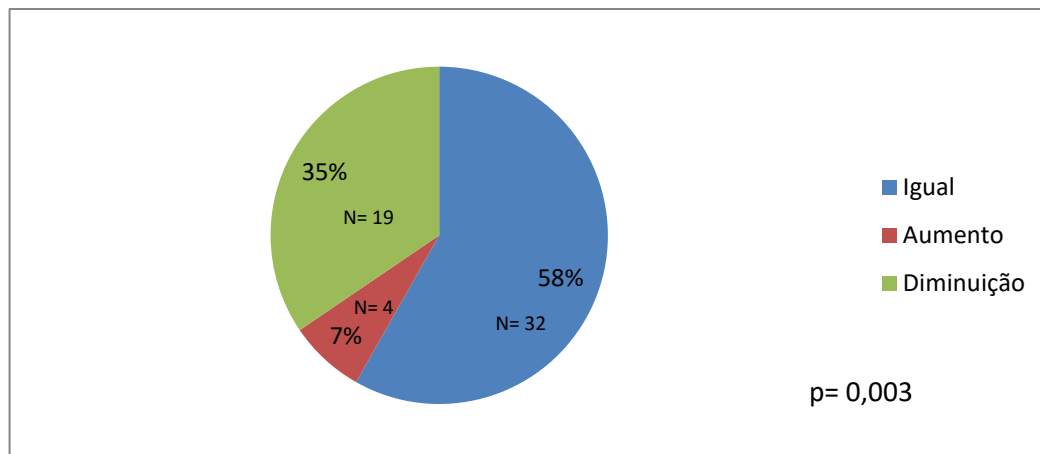


GRÁFICO 7: Alterações na densidade do infiltrado inflamatório identificadas após a quimioterapia neoadjuvante nos casos com RPP

5.5 Expressão dos biomarcadores

5.5.1 Tumores pré-quimioterapia

Os tumores foram mais comumente RH positivos e HER2 negativos (47,2%), seguidos pelos tumores triplo negativos (40%). Quando separamos perfil IHQ dos tumores de acordo com a idade das pacientes, nas pacientes com idade inferior a 50 anos, a maioria dos tumores foi triplo-negativo (47,7%).

Em relação à resposta, a maioria dos tumores do grupo RPP apresentou perfil RH+ e HER2- (48,2%); seguido pelos perfis triplo-negativo (35,7%); RH- e HER2+ (10,7%); e RH+ e HER2+ (5,4%). No grupo RPC a maior parte tinha perfil triplo-negativo (35,7%); seguido por valores iguais nos perfis RH+ e HER2-, e RH- e HER2+ (28,6%); e RH+ e HER2+ (7,1%).

Nas 70 amostras pré-terapia neoadjuvante, metade dos tumores foram positivos e metade negativos na marcação para RE. Nos tumores com RPC a maioria foi RE negativo (66,7%) e nos tumores com RPP a maioria era RE positivo (54,5%). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,145$). Para o receptor de progesterona, 42 (60%) tumores foram RP negativos, sendo que em ambos os grupos (RPC e RPP), a maioria foi RP negativo (RPC – 73,3% e RPP –

56,4%). A tabela 8 mostra os resultados da avaliação IHQ para RE, RP, HER2 e Ki67.

Na avaliação da expressão da proteína HER2, em 56 (80%) dos tumores não houve superexpressão protéica, sendo a maioria dos tumores HER2 negativos em ambos os grupos (RPC e RPP). Dois tumores considerados equívocos mostraram amplificação do gene por hibridização *in situ* fluorescente (FISH – realizada em outro serviço na biópsia inicial). Estes casos foram somados aos casos positivos para análise estatística e os resultados não foram significativos.

A média do percentual de marcação dos tumores na biópsia inicial para o Ki67 no grupo RPC foi de 29,5% e no grupo RPP foi de 31,7%, agrupando-se os resultados com o ponto de corte em 20%, a maioria dos tumores (53 = 75,7%) foram considerados com alto índice de Ki67 em ambos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa na marcação entre os grupos de resposta patológica para Ki67.

TABELA 8: *Status* da expressão imuno-histoquímica de HER2, receptores hormonais e Ki67 em carcinomas pré-terapia com RPC e RPP

Anticorpos IHQ		RPC	RPP	Total	Valor de p
		N (%)	N (%)		
HER2	Negativo	10 (66,7%)	46 (83,6%)	56 (80%)	p = 0,301
	2+	1 (6,7%)	1 (1,8%)	2 (2,9%)	
	3+	4 (26,7%)	8 (14,5%)	12 (17,1%)	
Receptor de Estrógeno	Negativo	10 (66,7%)	25 (45,5%)	35 (50%)	p = 0,145
	Positivo	5 (33,3%)	30 (54,5%)	35 (50%)	
		Negativo	11(73,3%)	31 (56,4%)	42 (60%)

Receptor de Progesterona	Positivo	4 (26,7%)	24 (43,6%)	28 (40%)	
Ki67	<20%	4 (26,7%)	13 (23,6%)	17 (24,3%)	P = 0,808
	>20%	11 (73,3%)	42 (76,4%)	53 (75,7%)	

N: número de tumores; RPC: resposta patológica completa; RPP: resposta patológica parcial; Teste McNemar.

5.5.2 Tumores pós-terapia

Houve uma marcação semelhante para RE nos tumores residuais pós-terapia, sendo 29 tumores RE negativos e 26 tumores RE positivos. Para o RP, a maioria dos tumores foi negativa.

Na avaliação da proteína HER2, 47 dos 55 tumores (85,5%) não mostraram superexpressão.

A média do percentual de marcação dos tumores para o Ki67 foi de 25%. Agrupando-se os resultados com o ponto de corte em 20%, a distribuição foi semelhante, com 27 tumores apresentando Ki67 menor que 20% sendo considerados com baixo e 28 tumores com alto índice de Ki67 (>20%) (TABELA 9).

TABELA 9: *Status* da expressão imuno-histoquímica de HER2, receptores hormonais e Ki67 nos tumores residuais pós-terapia neoadjuvante nos casos com RPP

Anticorpos IHQ		N	%
HER2	Negativo	47	85,5%
	2+	0	0,0%
	3+	8	14,5%
Receptor de Estrógeno	Negativo	29	52,7%
	Positivo	26	47,3%

Receptor de Progesterona	Negativo	34	61,8%
	Positivo	21	38,2%
Ki67	<20%	27	49,1%
	>20%	28	50,9%

N: número de tumores

5.5.3 Comparação da expressão dos biomarcadores nos tumores pré x pós-terapia

Na análise do Receptor de Estrógeno através das recomendações da ASCO/CAP, a maioria dos tumores pós-terapia (49/55 = 89,1%) permaneceu com a mesma marcação, cinco tumores que eram positivos na biópsia se tornaram negativos na ressecção (9,1%) e um tumor que era negativo na biópsia se tornou positivo na ressecção (1,8%). Analisando-se pelo escore de Allred (2010), 33 tumores não tiveram alteração para RE (60%), nove tumores tiveram aumento no escore (16,4%) e sete tumores tiveram diminuição no escore de Allred (12,7%).

Na análise do receptor de progesterona, a maioria dos tumores pós-terapia (46/55 = 83,6%) permaneceu com a mesma marcação, seis tumores que eram positivos na biópsia se tornaram negativos na ressecção (10,9%) e três tumores que eram negativos na biópsia se tornaram positivos na ressecção (5,5%). Analisando-se pelo escore de Allred (2010), 35 tumores não tiveram alteração para RP (63,6%), um tumor teve aumento no escore (1,8%) e 10 tumores tiveram diminuição do escore de Allred (18,2%).

A expressão do HER2 apresentou poucas diferenças entre as amostras pré e pós-terapia, sendo 53 tumores sem alterações na expressão (96,4%), um tumor tinha expressão 1+ na biópsia e na ressecção tumoral não teve marcação

(escore 0), um caso era 2+ na biópsia (FISH amplificado) e na ressecção tumoral apresentou ausência de marcação (escore 0).

Na comparação da marcação pelo Ki67, utilizando-se o ponto de corte de 20%, 36 tumores não tiveram alteração no índice de Ki67 (65,5%) e 19 tiveram alterações (34,5%). Somente um caso (1,8%) permaneceu com o mesmo valor de marcação; 16 tumores (29,1%) que eram considerados com alto índice de Ki67 passaram a ter baixo índice após a Qtneo; 3 tumores (5,5%) que eram considerados com baixo índice passaram a ter alto índice após a Qtneo; 13 tumores (23,6%) diminuíram o índice de marcação mas permaneceram com índice >20%; 12 tumores (21,8%) aumentaram o índice e permaneceram com índice >20%; 3 tumores (5,5%) aumentaram o índice de marcação mas permaneceram com índice <20%; 7 tumores (12,7%) diminuíram o índice de marcação e permaneceram com índice <20%. A distribuição dos dados em relação ao Ki67 se mostrou diferente ao se comparar os tumores pré com os tumores pós-terapia. Antes da terapia os dados apresentavam uma distribuição normal, após a terapia os dados se desviaram do valor esperado (Gráficos 8, 9, 10 e 11).

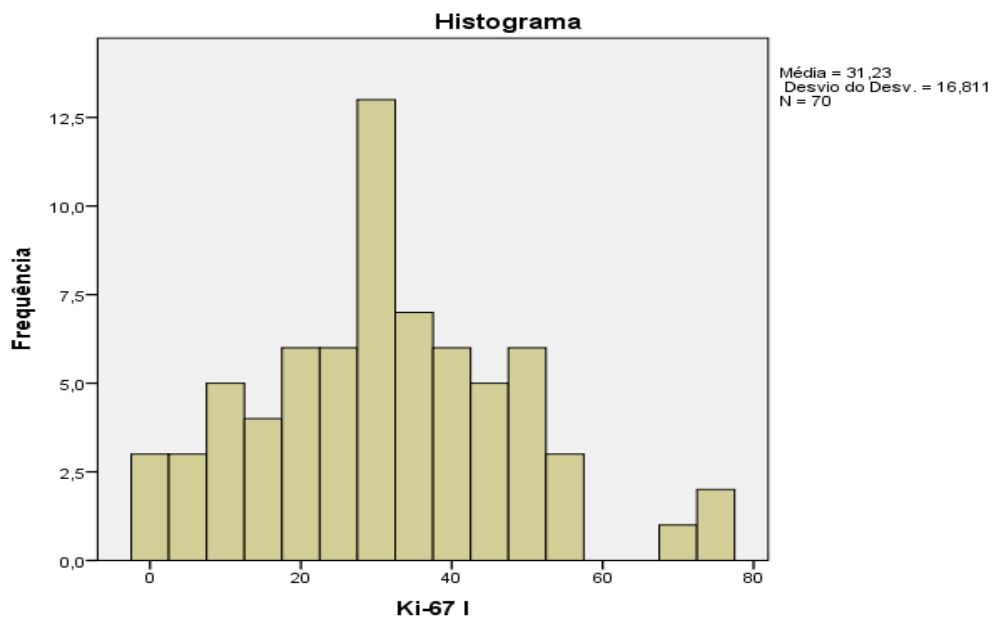


GRÁFICO 8: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pré-terapia

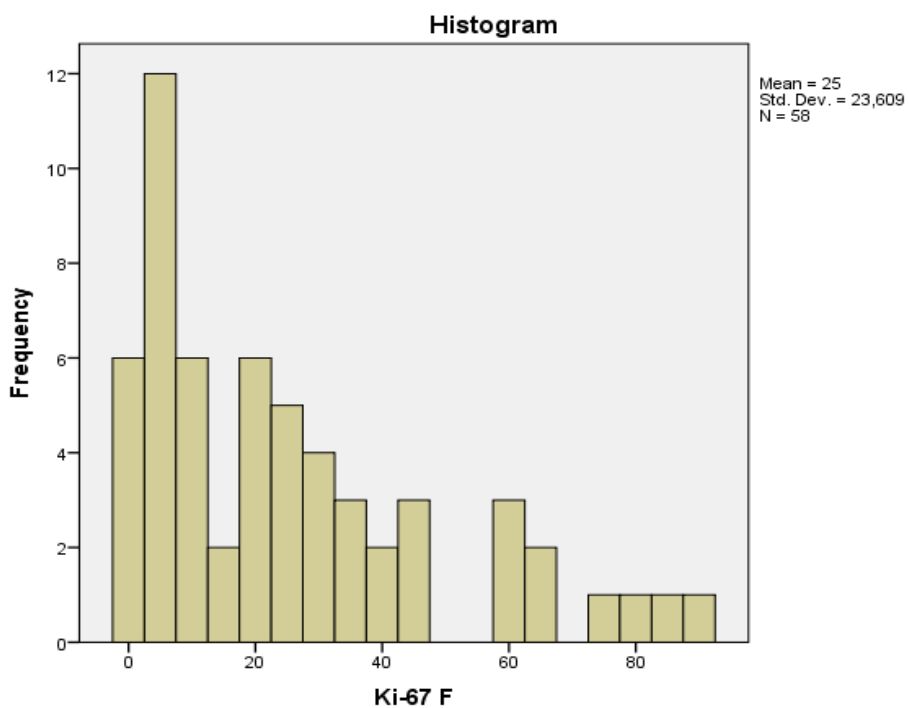


GRÁFICO 9: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pós-terapia

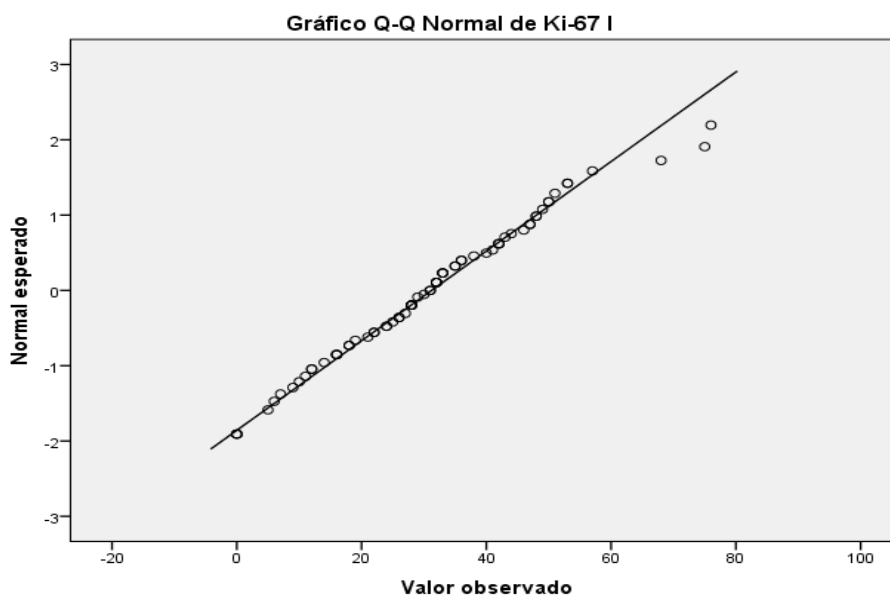


GRÁFICO 10: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pré-terapia

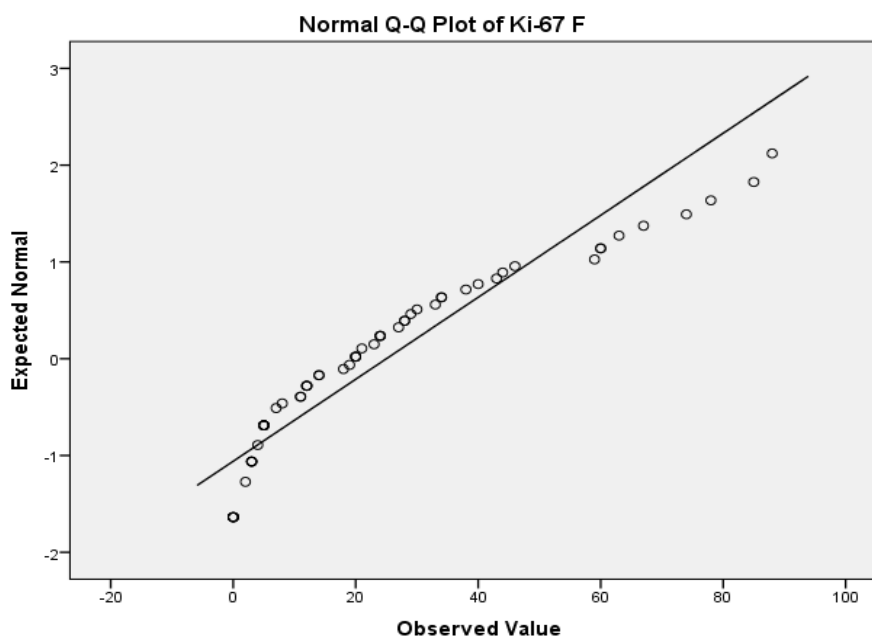


GRÁFICO 11: Distribuição das amostras pela marcação do Ki67 pós-terapia

6. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado em hospital público de referência em Minas Gerais no tratamento de câncer (Hospital das Clínicas da UFMG). A maioria das pacientes tratadas no hospital não realizaram todos os procedimentos (diagnóstico, tratamento e cirurgia) no hospital e isto dificultou a composição da nossa amostra. Todos os tumores foram revistos pela mesma patologista (CBN) quanto ao diagnóstico, classificação e graduação histológica. As reações imuno-histoquímicas foram repetidas, utilizando-se a mesma padronização, os mesmos anticorpos e reagentes, além de todas as baterias terem sido realizadas pela mesma pessoa (BJS), buscando uma padronização das reações. Todos estes cuidados foram tomados a fim de se controlar as etapas analíticas e pós-analíticas e eliminar viés de interpretação ou da técnica. Por se tratar de material arquivado, incluindo casos de 10 anos atrás, não conseguimos padronização da etapa pré-analítica tanto na fixação e processamento quanto do protocolo de exame das peças pós-quimioterapia neoadjuvante.

A lateralidade da mama acometida pelo carcinoma mamário tem uma distribuição parecida no mundo, sendo mais presente na mama esquerda em países como China, Japão e Argentina (CHENG *et al.*, 2018; LEONE *et al.*, 2017; SEGI *et al.*, 1957). No Brasil encontramos relatos de tumores com distribuição semelhante entre mama esquerda e direita (BARROS; UEMURA; MACEDO, 2013), alguns relatam prevalência de tumores na mama direita (MIRRA; COLE; MACMAHON, 1971) e em um trabalho anterior do nosso grupo, onde foram estudadas pacientes do mesmo hospital em um período de 10 anos, encontrou-se prevalência de tumores na mama esquerda (BALABRAM *et al.*, 2012). Em nosso estudo, incluindo somente

pacientes que receberam a terapia neoadjuvante encontramos mais pacientes com tumores na mama direita.

A avaliação das características histopatológicas é realizada rotineiramente em todos os carcinomas mamários. Inicialmente é realizada através de biópsia (incisional ou por agulha grossa) e posteriormente na amostra de ressecção cirúrgica. As principais características avaliadas são o tipo e o grau do tumor que fornecem informações sobre o prognóstico da doença.

O tipo histológico mais comum de carcinomas mamários invasores é o tipo não especial (Ductal SOE), representando cerca de 75% dos carcinomas mamários invasores. Nosso trabalho acompanhou a tendência mundial, apresentando 77,1% dos tumores com este subtipo, e a maioria (87,1%) não apresentou carcinoma *in situ* associado (ductal ou lobular). Não encontramos relatos associando a presença de carcinoma *in situ* no tumor inicial com resposta à Tneo (MENEN; TESHOME, 2019; ZHU *et al.*, 2018).

Nos tumores residuais pós-terapia identificamos carcinoma *in situ* em 17,1% dos casos a mais que nos tumores pré-terapia. Uma possível explicação para este fato, é a limitada amostragem do tumor que as biópsias iniciais fornecem, assim, a peça cirúrgica permite detectar carcinomas *in situ* que não foram alcançadas na biópsia (CALHOUN, B.C., 2018).

Na literatura, quando os tumores residuais são comparados com os iniciais, muitos autores não encontraram mudanças histológicas nos tumores após a quimioterapia neoadjuvante. Outros; porém, notaram mudanças no tipo histológico, assim como encontramos em nosso estudo (HONKOOOP *et al.*, 1997; SETHI *et al.*, 2013). Sethi *et al.*, 2013, descreveram um caso classificado como ductal SOE na biópsia e posteriormente classificado como metaplásico na ressecção cirúrgica,

assim como em uma das alterações do nosso estudo (DEMARIA *et al.*, 2001; HONKOOOP *et al.*, 1997; SETHI *et al.*, 2013; VAN DER WALL *et al.*, 1996). Em nosso estudo, alguns casos eram de tipo misto na biópsia e na ressecção cirúrgica apresentaram tipo específico único, indicando que a quimioterapia pode ter selecionado um tipo no tumor residual. Outros casos; porém, apresentaram um tipo especial na biópsia inicial, mas apresentaram tipo misto na ressecção cirúrgica, indicando que a biópsia inicial pode ter amostrado somente um tipo histológico. Estas alterações mostraram resultado significativo, indicando que a quimioterapia neoadjuvante pode alterar/selecionar o tipo histológico.

O grau histológico final se deve à soma de três parâmetros que são graduados de 1 a 3 e a soma deles corresponde ao grau final, são eles: o grau de formação tubular, o grau de pleomorfismo nuclear e o índice mitótico (ELSTON; ELLIS, 2002), decidimos estudar separadamente cada parâmetro em nossos casos. Os tumores pré-terapia apresentaram em sua maioria baixa formação tubular (3) e alto pleomorfismo nuclear (3), o que sugere tumores de alto grau histológico. A avaliação do índice mitótico é realizada contando-se o número de mitoses por campo de grande aumento no microscópio óptico na periferia do tumor, pois é onde se espera que esteja acontecendo uma maior proliferação celular. Em amostras de biópsia, principalmente aquelas obtidas por agulha, esta avaliação é dificultada devido ao fato da amostra ser pequena, com pouca representação do tumor e ser coletada, possivelmente, da área mais central do tumor, o que acaba levando a índices mitóticos 1 ou 2 e menor grau histológico final. Este fato corrobora com os nossos casos iniciais, que mostraram predomínio de tumores grau II em nossa análise (AHMEIDAT *et al.*, 2018).

Nos tumores residuais pós-terapia, observamos aumento do grau histológico em 15 tumores, estes apresentavam baixo índice mitótico na biópsia, provavelmente pela amostra tumoral reduzida, mas apresentavam um Ki-67 acima de 20%, indicando que estavam em alta proliferação. Estes tumores possivelmente seriam grau III, mas foram classificados como grau II na biópsia inicial. Já nos espécimes de ressecção cirúrgica, estes tumores apresentaram aumento no índice mitótico, o que fez o grau final aumentar. Apesar destas mudanças, não houve resultado significativo estatisticamente. As diferenças encontradas no grau histológico entre biópsias por agulha grossa e a ressecção cirúrgica já foram relatadas na literatura, mesmo em casos sem terapia neoadjuvante (AHMEIDAT *et al.*, 2018).

Ao associar o tipo e grau histológicos com o tipo de resposta patológica, encontramos resultados parecidos com os existentes na literatura em que não foi encontrada significância estatística, mostrando que não houve associação destes parâmetros ao tipo de resposta (BAULIES *et al.*, 2015; SASANPOUR *et al.*, 2018).

A quimioterapia neoadjuvante é mais frequentemente administrada a pacientes em estágios mais avançados da doença, com tumores de características conhecidas por levarem a um pior prognóstico, como tumores HER2 positivos, triplo negativos, e geralmente grau 3.

A única característica que se mostrou estar ligada à melhor resposta à terapia neoadjuvante, foi a presença do infiltrado inflamatório intra-tumoral. Nossos achados relacionados ao infiltrado inflamatório apontam para uma possível aplicação dessas informações e características no auxílio da conduta médica na terapia antes e após o tratamento neoadjuvante. Estudos vêm sendo realizados e muito se tem discutido quanto à possibilidade dessas informações se tornarem aplicáveis na

prática clínica como marcador isolado de resposta à quimioterapia, além de representar uma possibilidade de tratamento para tumores triplo negativos (CASTANEDA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; DIECI *et al.*, 2018; HAMY *et al.*, 2017)

Nossos resultados relativos à quantificação do infiltrado inflamatório intratumoral se encontram de acordo com a literatura. Quando associamos o infiltrado inflamatório à resposta patológica, os casos com RPC tinham uma porcentagem de infiltrado na biópsia inicial acima de 21%, demonstrando que o infiltrado inflamatório provavelmente exerce uma papel na resposta à terapia (YAMAGUCHI *et al.*, 2012). Isto se deve ao efeito da quimioterapia nas células tumorais, que cria um ambiente imunogênico necessário para o sucesso da terapia (APETOH *et al.*, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, as amostras dos tumores residuais após a terapia neoadjuvante, a densidade do infiltrado inflamatório, em sua maioria, permaneceu a mesma quando comparados à biópsia inicial; 12 tumores tiveram infiltrado inflamatório ausente, mostrando que a quimioterapia não alterou este parâmetro. Tumores de pacientes que não receberam terapia neoadjuvante geralmente apresentam boa concordância na densidade do infiltrado inflamatório entre as amostras de biópsia inicial e de ressecção cirúrgica (CHA *et al.*, 2018).

Em nossa amostra as pacientes mais jovens apresentaram mais frequentemente tumores com perfil IHQ triplo negativo. Estes tumores são considerados de pior prognóstico, pois ainda não possuem um tipo de tratamento específico, diferente dos tumores receptores hormonais positivos ou HER2 positivos. Geralmente, tumores de pacientes mais jovens apresentam pior prognóstico e maior índice de letalidade por câncer de mama (ANASTASIADI *et al.*, 2017).

Os receptores hormonais e a proteína HER2 são biomarcadores que devem ser testados rotineiramente em carcinomas mamários invasores, devido ao seu poder de predição de resposta a tratamentos específicos, além de fornecer informação prognóstica. Tumores triplo negativos ou HER2 superexpressos são considerados de pior prognóstico, mas podem predizer boa resposta à terapia neoadjuvante. Em nosso estudo, no grupo RPC (14 tumores), 5 apresentaram um perfil triplo-negativo, 5 perfil superexpressão de HER2 e 4 perfil RH positivo/ HER2 negativo, mostrando, assim, que apesar de não termos encontrado resultados significativos nestas análises, existe pequena predominância destes tipos específicos em pacientes com resposta patológica completa. Talvez o pequeno número de casos de nossa série possa ter influenciado nestes resultados (ASANO *et al.*, 2018; YAMAGUCHI *et al.*, 2012).

Tumores receptores hormonais positivos são considerados de melhor prognóstico. Metade dos tumores do nosso estudo foram negativos para o RE e a maioria foi negativa para o RP. Isto era esperado em nossa amostra, pois em geral a maioria das pacientes com tumores de pior prognóstico, em estágios avançados, são selecionados para a quimioterapia neoadjuvante.

Está bem estabelecido que pacientes com tumores receptores hormonais positivos podem se beneficiar do tratamento com terapias hormonais como tamoxifeno, inibidores da aromatase ou supressão ovariana, mas tumores receptores hormonais negativos tendem a responder melhor à quimioterapia neoadjuvante. Nos tumores das pacientes do nosso estudo que obtiveram resposta patológica completa pós-terapia a maioria não expressava receptores hormonais, estando de acordo com este fato (ALLISON, 2018).

Nos tumores residuais pós-terapia, verificamos poucas alterações no *status* dos receptores hormonais, condizentes com a literatura. Nossos resultados na conversão de RE de positivo para negativo foram mais altos que a média (5,7%) da literatura, mas parecido com os resultados de OZMEN *et al.*, 2015 e USTAALIOGLU *et al.*, 2014. Na conversão de RE de negativo para positivo, nossos achados foram abaixo da média relatada na literatura (1,8%), mas parecidos com os resultados de AHN *et al.*, 2018 e USTAALIOGLU *et al.*, 2014. Para RP, encontramos resultados semelhantes (média de 10,9%) na conversão de positivo para negativo e 5,5% de negativo para positivo nas amostras pré e pós-terapia. Possivelmente com um número maior de casos poderíamos ter alcançado significância estatística nestas análises (AHN *et al.*, 2018; DE LA CRUZ *et al.*, 2018; GALLI *et al.*, 2017; ILGUN *et al.*, 2016; KINSELLA *et al.*, 2012; MORRIS; EDWARDS; GELDER, 1991; USTAALIOGLU *et al.*, 2014; XIAN *et al.*, 2017).

Em aproximadamente 15 a 20% dos carcinomas mamários invasores é observada a superexpressão da proteína HER2 (NUNES, C. B. *et al.*, 2013; WOLFF *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, observamos superexpressão em 20% dos tumores. Apesar da positividade representar pior prognóstico quando não for realizado o tratamento anti-HER2, as pacientes podem receber tratamentos direcionados a esse receptor, o que aumenta sua sobrevida.

Nosso trabalho discorda da literatura na relação entre superexpressão de HER2 e resposta à terapia neoadjuvante, não demonstrando resultado significativo, pois tanto no grupo resposta parcial, quanto no grupo resposta completa a maioria das pacientes era negativa para a expressão de HER2. Apesar do tratamento neoadjuvante com a adição de trastuzumab ter sido aprovado pelo FDA, na rotina do nosso hospital isso não acontece no cenário neoadjuvante e pode ser a explicação

para não ter havido diferenças de resposta. Uma única paciente de nosso estudo que recebeu trastuzumab obteve RPC, e se todas as pacientes com tumores HER2 superexpressos tivessem recebido trastuzumab, talvez nosso resultado tivesse sido diferente neste parâmetro (ALLISON, 2018).

Não tivemos muitas alterações no *status* do HER2 pós-terapia, somente um caso negativou, resultados parecidos com os de AHN *et al.*, 2018 e OZMEN *et al.*, 2015. Entretanto, nossa amostra de casos HER2 positivos era muito pequena (apenas 9 casos) e somente uma paciente recebeu a terapia anti-HER2.

Como o esperado em nossa amostra, tumores em estágios avançados, geralmente apresentam alta proliferação celular. A maioria dos tumores mostraram um índice de Ki67 acima de 20%. O Ki67 está presente em todas as fases do ciclo celular (exceto em G0) e como a quimioterapia tem como alvo principalmente células em divisão celular, o alto índice pode levar à melhor resposta (TOKUDA *et al.*, 2017).

O biomarcador Ki-67 está bem estabelecido como um marcador prognóstico em pacientes com câncer de mama. Tumores com um alto Ki-67 geralmente respondem bem à quimioterapia, pois ela ataca, principalmente as células em proliferação. A maioria das pacientes foram apresentaram alto índice de Ki67 em ambos os grupos não havendo diferenças estatísticas em relação ao tipo de resposta (ALLISON, 2018; TOKUDA *et al.*, 2017).

Nos tumores residuais pós-terapia, quase metade (27 de 55) foi considerada com baixo índice proliferativo e na ressecção, 16 tumores que eram de alto índice na biópsia, se tornaram baixo índice. A tendência é que após a terapia neoadjuvante, a expressão de Ki-67 caia, devido à ação da quimioterapia nas células em proliferação mitótica (TOKUDA *et al.*, 2017).

A frequência de conversão dos biomarcadores nos tumores residuais após terapia neoadjuvante é ainda controversa na literatura e muito estudada, pois levanta o questionamento da necessidade de repetição destes testes após a terapia neoadjuvante (AHN *et al.*, 2018; DE LA CRUZ *et al.*, 2018; GALLI *et al.*, 2017; ILGUN *et al.*, 2016; KINSELLA *et al.*, 2012; MORRIS; EDWARDS; GELDER, 1991; USTAALIOGLU *et al.*, 2014; XIAN *et al.*, 2017).

Várias explicações podem ser levantadas para a conversão dos biomarcadores: heterogeneidade tumoral, pequena amostragem da biópsia que não representa toda a área tumoral; resultados próximos ao limite entre negativo/positivo; resultados falso-negativos devido a erros na execução da técnica de imuno-histoquímica; problemas pré-analíticos, como má fixação das peças cirúrgicas que podem levar a um resultado falso-negativo nas peças.

Para minimizar resultados falso-negativos e falso-positivos provando que a mudança no perfil de biomarcadores é real, são necessárias mudanças no tratamento da peça cirúrgica como tomar cuidados com o tempo de isquemia, fatiar a peça para a correta fixação de toda a lesão, validação e execução correta da técnica de imunohistoquímica. Em nosso laboratório, infelizmente, os fatores pré analíticos como tempo de isquemia fria e tempo de fixação ainda não são controlados, o que pode ter influenciado na análise das peças cirúrgicas.

A possibilidade de conversão dos biomarcadores, mesmo que em poucos tumores, deve ser levantada, e os tumores residuais devem ser reavaliados para evitar que pacientes recebam tratamentos desnecessários, com muitos efeitos colaterais, cardiotoxicos (trastuzumab) sem obter benefício e deixem de receber tratamentos que mudariam seu prognóstico. Por isso, deve ser realizada a repetição

das reações IHQ em tumores residuais na peça cirúrgica retirada pós-terapia neoadjuvante para que haja reavaliação da terapia, quando necessário.

Acreditamos que é importante a continuação deste trabalho, caracterizando melhor o infiltrado inflamatório em todas as amostras, realizando a comparação entre os tumores e suas respectivas metástases linfonodais axilares, e correlacionando todos os parâmetros com a sobrevida e tempo livre de doença, na tentativa de identificar os marcadores de resposta terapêutica.

7. Conclusões

O Infiltrado Inflamatório foi o único marcador de resposta patológica completa à terapia neoadjuvante para carcinomas mamários. A avaliação histopatológica (tipo e grau histológicos), e expressão de biomarcadores preditivos de resposta terapêutica (receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2, e KI67), não mostraram associação com Resposta Patológica Completa.

A quimioterapia neoadjuvante alterou a classificação, graduação e a expressão imunohistoquímica de RE, RP, HER2 e Ki67 nos tumores residuais.

Não houve alterações na densidade de infiltrado inflamatório na maioria dos casos pós-terapia neoadjuvante.

8. Referências

ADAMCZYK, A. *et al.* Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and lymph nodes metastases: a comparative immunohistochemical analysis. *Pol. J. Pathol, Cracow Branch*, v.63, p.228-234, 2012.

AHMEIDAT, H. *et al.* Non-histopathological parameters associated with upgrade of breast tumours yielding a core biopsy report of histological grade 2 ductal no special type to grade 3 on excision. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 44, n. 11, p. 1720–1724, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.07.002>>.

AHN, S. *et al.* Negative Conversion of Progesterone Receptor Status after Primary Systemic Therapy Is Associated with Poor Clinical Outcome in Patients with Breast Cancer. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.4143/crt.2017.552>>.

AITKEN, S. J. *et al.* Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Annals Of Oncology*. v. 21, n. 6, p. 1254-1261, 2010.

ALLISON, K. H. Ancillary Prognostic and Predictive Testing in Breast Cancer: Focus on Discordant, Unusual, and Borderline Results. *Surgical Pathology Clinics*, v. 11, n. 1, p. 147–176, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.006>>.

ALLRED, D. Craig. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor and HER2 in breast cancer. *Modern Pathology*. v. 23, p. S52-S59, 2010.

AMOROSO, V. *et al.* International Expert Consensus on Primary Systemic Therapy in the Management of Early Breast Cancer: Highlights of the Fifth Symposium on Primary Systemic Therapy in the Management of Operable Breast Cancer, Cremona, Italy (2013). *J Natl Cancer Inst Monogr*. v. 51, p. 90-96, 2015.

ANASTASIADI, Z. *et al.* Breast cancer in young women: an overview. *Updates in Surgery*, v. 69, n. 3, p. 313–317, 2017.

APETOH, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, v. 13, n. 9, p. 1050–1059, 2007.

ARIAS, Vi.; MAZZA, P. L.; FUNKE, M. A. A. Processamento Tecidual para análise imunohistoquímica de receptores hormonais em carcinoma mamário: dois momentos em um laboratório de anatomia patológica; correlação dos resultados com método bioquímico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 39, n. 3, p. 223-228, 2003.

ASANO, Y. *et al.* Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Anticancer Research*, v. 38, n. 4, p. 2311–2321, 2018.

BA, J.; LIU, C.; JIN, F. Alterations in hormonal receptor expression and HER2 status between primary breast tumors and paired nodal metastases: discordance rates and prognosis. *Asian Pac J Câncer Prev*. v. 15, n. 21, p. 9233-9239, 2014.

BADVE, S. S. *et al.* *AJCC 8th Edition Breast Cancer*. [S.l: s.n.], 2017.

BALABRAM, D. *et al.* Changes in mastectomy rates at a Brazilian public hospital over 20 years (1989 to 2008). *São Paulo Med J*, v. 130, n. 6, p. 360-366, 2012.

BARROS, Â. F.; UEMURA, G.; MACEDO, J. L. S. Tempo para acesso ao tratamento do câncer de mama no Distrito Federal, Brasil Central. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 35, n. 10, p. 458–463, 2013.

BAULIES, S. *et al.* Hormone receptor and HER2 status: The only predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 35, n. 5, p. 485–489, 2015.

BEATSON, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. *Lancet*, p. 104–107, 1896.

BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). Distúrbios da proliferação e da diferenciação celulares. In: *Bogliolo: patologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap. 8, p. 219-276.

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, p. 394–424, 2018.

CALHOUN, B. C. Core Needle Biopsy of the Breast - Na evaluation of contemporary data. *Surgical Pathology*, v. 11, p. 1-16, 2018.

CASTANEDA, C. .A *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 7, n. 5, p. 387, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v7/i5/387.htm>>.

CHA, Y. J. *et al.* Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes of breast cancer in core needle biopsies and resected specimens: a retrospective analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 171, n. 2, p. 295–302, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4842-7>>.

CHEN, T. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict prognosis of breast cancer patients treated with anti-Her-2 therapy. *Oncotarget*, v. 8, n. 3, p. 5219–5232, 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/14124>>.

CHENG, S. *et al.* Breast cancer laterality and molecular subtype likely share a common risk factor. *Cancer management and research*, v. 10, p. 6549–6554, 2018.

CURIGLIANO, G., CRISCITIELLO, C., ANDRÈ, F., COLLEONI, M., DI LEO, A. Highlights from the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference 2013. Access to innovation for patients with breast cancer: how to speed it up? *Ecancermedicalscience*. 2013 Mar 26;7:299.

DE LA CRUZ, L. M. *et al.* Impact of Neoadjuvant Chemotherapy on Breast Cancer Subtype: Does Subtype Change and, if so, How?: IHC Profile and Neoadjuvant Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology*, p. 1–6, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1245/s10434-018-6608-1>>.

DEMARIA, S. *et al.* Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 7, n. 10, p. 3025–3030, 2001.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2007.

DENKERT, C. *et al.* Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical*

Oncology, v. 28, n. 1, p. 105–113, 2010.

DIECI, M. V. *et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Bre. *Seminars in Cancer Biology*, v. 52, n. September 2017, p. 16–25, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.10.003>>.

DIECI, M. V. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Annals of Oncology*, v. 25, n. 3, p. 611–618, 2014.

DOWSETT, M. *et al.* Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Modern Pathology*. v. 20, p. 84-591, 2007.

ELSTON, C W; ELLIS, I O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. AUTHOR COMMENTARY. *Histopathology*, v. 41, n. 3a, p. 151–151, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2559.2002.14691.x>>.

FERNANDES, P. D. *et al.* Neoplasia. In: *Robins & Cotran: bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 7, p.259-330.

FERNANDES, P. D. *et al.* A mama. In: *Robins & Cotran: bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 23, p.1073-1103.

GALLI, G. *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy Exerts Selection Pressure Towards Luminal Phenotype Breast Cancer. *Breast Care*, v. 12, n. 6, p. 391–394, 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, v. 28, n. 6, p. 690–714, 2015.

GARCÍA-MARTÍNEZ, E. *et al.* Garcia-Martinez et al 2014 BCR - Tumor Infiltrating immune cell profiles & changes after neoadjuvant chemo predict response.pdf. p. 1–17, 2014.

GNANT, M.; HARBECK, N.; THOMSEN, C. St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care*, v. 12, n. 2, p. 102–107, 2017.

GOBBI, H.. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442012000600013&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

GONZALEZ-ANGULO, A. M. *et al.* Gene expression, molecular class changes and pathway analysis after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res*, v. 18, n. 4, p. 5–11, 2012.

GOWN, A. M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*. v. 21, p. S8-S15, 2008.

HAMBURG, M. A.; COLLINS, F. S. The Path to Personalized Medicine. *N Engl J Med*. v.363, n.4, p.301-304, jul. 20106.

HAMMOND, M. E. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. v. 134, n. 6, p. 907–922, 2011.

HAMY, A. S. *et al.* Stromal lymphocyte infiltration after neoadjuvant chemotherapy is associated with aggressive residual disease and lower disease-free survival in HER2-positive breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 28, n. 9, p. 2233–2240, 2017.

HONKOOP, A. H. *et al.* Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 107, n. 2, p. 211–218, 1997.

ILGUN, S. *et al.* Receptor discordance rate and its effects on survival in primary and recurrent breast cancer patients. *Journal of B.U.ON.*, v. 21, n. 6, p. 1425–1432, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativas 2018 - Incidência do Câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. *O que é o câncer*. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 11 out. 2016.

JATOI, I.; MILLER, A. Why is breast-cancer mortality is declining. *Lancet Oncology*. v. 4, p. 251-254, 2003

JENSEN, J. D. *et al.* ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. v. 132, p. 511-521, 2012.

KINSELLA, M. D. *et al.* Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post- neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: A single institutional experience. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 5, n. 6, p. 530–536, 2012.

KRUG, D. *et al.* Individualization of post-mastectomy radiotherapy and regional nodal irradiation based on treatment response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: A systematic review. *Strahlentherapie und Onkologie*, v. 194, n. 7, p. 607–618, 2018.

LADOIRE, S. *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating Foxp3 + regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 8, p. 2413–2420, 2018.

LAKHANI, S. R. *et al.* *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Breast*. [S.l: s.n.], 2012.

LEONE, B. A. *et al.* Prognostic impact of metastatic pattern in stage IV breast cancer at initial diagnosis. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 161, n. 3, p. 537–548, 2017.

LEONG, T. Y-M *et al.* Immunohistology: Past, Present, and Future. *Adv. Anat. Pathol.*, v. 17, n. 6, p.404–418, nov. 2010.

LI, P. *et al.* Influence of Neoadjuvant Chemotherapy on HER2/neu Status in Invasive Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. v. 13, p. 53-60, 2013.

MATSUBARA, N. *et al.* Different prognostic significance of Ki-67 change between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 137, n. 1, p. 203–212, 2013.

MCSHANE, L. M. *et al.* Reporting Recommendations for Tumor Marker: Prognostic Studies. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 97, n.16, p.1180-1184, ago. 2005

MENEN, R. S.; TESHOME, M. Invasive Breast Cancer. In: BARRY W. FEIG (Org.). . *The MD Anderson Surgical Oncology Handbook*. 6. ed. [S.l: s.n.], 2019. v. 2. . Disponível em: <<http://about-cancer.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/types/invasive-breast-cancer>>.

MINCKWITZ, G. V. *et al.* Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. **Breast Cancer Res Treat.** v. 125, p. 145-156, 2011

MIRRA, A. P.; COLE, P.; MACMAHON, B. Breast cancer in an area of high. *Cancer Res.*, v. 31, n. 2, p. 77–83, 1971.

MORRIS, D. M.; EDWARDS, J.; GELDER, F. Hormonal receptors in locally advanced breast cancer: Change with response to neoadjuvant chemotherapy? *Journal of Surgical Oncology*, v. 46, n. 3, p. 156–158, 1991.

NUNES, C. B. *et al.* Comparative analysis of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*, v. 61, n. 8, p. 934–938, 2008.

NUNES, C. B. *et al.* False positivity in HER2 testing of breast cancer: Novel paths for approaching an old dilemma. *Journal of Clinical Pathology*, v. 66, n. 11, p. 946–950, 2013.

OYAMA, T. *et al.* The Effects of Fixation, Processing and Evaluation Criteria on Immunohistochemical Detection of Hormone Receptors in Breast Cancer. *Breast Cancer*. v. 14, n.2, p. 182-188. abr. 2007.

OZMEN, V. *et al.* Prognostic value of receptor status change following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Cancer Treatment Communications*, v. 4, p. 89–95, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrc.2015.07.001>>.

PELEKANOU, V. *et al.* Erratum: Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance [Breast Cancer Res., 19 (91)(2017)] DOI: 10.1186/s13058-017-0884-8. *Breast Cancer Research*, v. 19, n. 1, 2017.

RAICA, M. *et al.* Hormone Receptors and HER2 Expression in Primary Breast

Carcinoma and Corresponding Lymph Node Metastasis: Do we need Both?. *Anticancer Research*. v. 34, p.1435-1440, 2014.

RAKHA, E.A.; ELLIS, I.O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv Anat Pathol*. v.18, p.255-67, 2011.

ROCHA, R. M. *et al*. Rabbit antibodies for hormone receptors and her2 evaluation in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*. v.55, n. 2, p. 163-168, 2009.

ROSS, J. S. *et al*. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist*, v. 14, n. 4, p. 320–368, 2009. Disponível em: <<http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2008-0230>>.

SALGADO, R. *et al*. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group. *Annals of Oncology*, v.1, n. 26(2), p. 259-271, 2015.

SASANPOUR, P. *et al*. Predictors of Pathological Complete Response in Women with Clinical Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Carcinoma. *Oncology (Switzerland)*, v. 95, n. 4, p. 229–238, 2018.

SATTI, M. B. Oestrogen receptor/progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor status in breast cancer: a 9-year study at Princess Noorah Oncology Center, Saudi Arabia. *Histopathology*. p. 1-6, 2016

SEGI, M *et al*. AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY ON CANCER IN JAPAN. *Supplement*, v. 48, 1957.

SETHI, D *et al*. Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Indian Journal of Cancer*, v. 50, n. 1, p. 58, 2013. Disponível em: <<http://www.indianjcancer.com/text.asp?2013/50/1/58/112301>>.

TAN, W. *et al*. Predicting the response to neoadjuvant therapy for early-stage breast cancer : tumor- , blood- , and imaging-related biomarkers. *Cancer Management and Research*, p. 4333–4347, 2018.

TOKUDA, E. *et al*. Differences in Ki67 expressions between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. *Human Pathology*, v. 63, p. 40–45, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.005>>.

UNTCH, M. *et al.* 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: Primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - Opinion of a German team of experts (Zurich 2013). *Breast Care*, v. 8, n. 3, p. 221–229, 2013.

USTAALIOGLU, B. B. O. *et al.* Clinical importance of discordance of hormone receptors and HER2/neu status after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of B.U.ON.*, v. 19, n. 4, p. 879–886, 2014.

VAN DER WALL, E. *et al.* Efficacy of up-front 5-fluorouracil - Epi-doxorubicin - cyclophosphamide (FEC) chemotherapy with an increased dose of epidoxorubicin in high-risk breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, v. 73, n. 9, p. 1080–1085, 1996.

VON MINCKWITZ, G. *et al.* Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: Pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 125, n. 1, p. 145–156, 2011.

WALKER, R. A. *et al.* Current issues in diagnostic breast pathology. *J. Clin. Pathol.* v. 65, p. 771-785, jul. 2012.

WILLIAMS, C. *et al.* Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technology Assessment*, v. 10, n. 34, p. 1–153, 2006.

WOLFF, A. C. *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 142, n. 11, p. 1364–1382, 2018.

WOLFF, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 2013.

WÜRFEL, F. *et al.* TILGen: A Program to Investigate Immune Targets in Breast Cancer Patients-First Results on the Influence of Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Breast Care*, v. 13, n. 1, p. 8–14, 2018.

XIAN, Z. *et al.* Breast cancer biomarkers before and after neoadjuvant

chemotherapy: does repeat testing impact therapeutic management? *Human Pathology*, v. 62, p. 215–221, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.12.019>>.

YAMAGUCHI, R. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Human Pathology*, v. 43, n. 10, p. 1688–1694, 2012.

YAMAZAKI, N. *et al.* High expression of post-treatment Ki-67 status is a risk factor for locoregional recurrence following breastconserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. *EJSO*. v. 41, p. 617-624, 2015.

YAO, Z. *et al.* Discordance and clinical significance of ER, PR, and HER2 status between primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastasis. *Med. Oncol.* v. 31, p. 1-7, 2014.

YAZIJI, H. *et al.* Consensus Recommendations on Estrogen Receptor Testing in Breast Cancer By Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008 Dez; v. 16, n. 6, p.513-520, dez. 2008.

YERUSHALMI, R; WOODS, R; RAVDIN, PM; *et al.* Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. 2010 Feb;11(2):174-83.

YEUNG, C. *et al.* Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours—a review. *Cancer Metastasis Rev.* p. 1-11, 2016.

ZHU, Y. C. *et al.* Correlation between histopathological grading and shear-wave elastography in evaluating invasive carcinoma of no special type. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 16, n. 6, p. 4700–4706, 2018.

9. Anexos

9.1 Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética – Plataforma Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da terapia neoadjuvante na expressão de marcadores imuno-histoquímicos e no padrão histológico em carcinomas mamários invasores e nas metástases ganglionares

Pesquisador: Cristiana Buzelin Nunes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68441217.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.109.565

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.109.565

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Junho de 2017

9.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Consentimento Livre e Esclarecido

Será solicitada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), pois conforme disposto na Resolução do Conselho Nacional de Saúde / CNS 466/2012, nos casos em que serão utilizados Dados Secundários como prontuários e arquivos, em que não tragam prejuízos nem benefícios para o paciente ou não interfiram no curso da doença ou no tratamento, este termo poderá ser dispensado após análise, aprovação e parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.

Serão preservados o sigilo e a confidencialidade dos dados e do anonimato dos indivíduos pesquisados, garantindo a privacidade dos pacientes.

O foco deste estudo são os efeitos da terapia neoadjuvante em marcadores imuno-histoquímicos e no padrão morfológico, que serão analisados em lâminas e blocos de parafina contendo amostras do tumor de pacientes com câncer de mama, não havendo portanto, contato direto com os pacientes.

Solicitação de Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Referência: Efeitos da terapia neoadjuvante na expressão de marcadores imuno-histoquímicos e no padrão histológico em carcinomas mamários invasores e nas metástases ganglionares.

Responsável: Cristiana Buzelin Nunes

Ao Comitê de Ética em Pesquisa Faculdade de Medicina da UFMG

Venho por meio deste documento solicitar a dispensa de obtenção de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo intitulado "Efeitos da terapia neoadjuvante na expressão de marcadores imuno-histoquímicos e no padrão histológico em carcinomas mamários invasores e nas metástases ganglionares", proposto por Cristiana Buzelin Nunes.

A dispensa do uso de TCLE se fundamenta:

a) por ser um estudo observacional, analítico e descritivo retrospectivo, que empregará apenas informações de prontuários médicos, sistemas de informação institucionais e/ou demais fontes de dados e informações clínicas disponíveis na instituição e no laboratório de Anatomia Patológica responsável pela realização dos exames Anatomopatológicos e Imuno-histoquímicos das pacientes com Diagnóstico de Carcinoma Mamário Invasivo tratadas no Hospital das Clínicas da UFMG de Belo Horizonte, sem previsão de coletas de Novos materiais Biológicos nestas pacientes, onde serão objetos de estudos as lâminas e peças já existentes e previamente coletadas durante o diagnóstico e tratamento;

b) todos os dados serão arquivados e analisados de forma anônima e sigilosa, sem identificação nominal dos participantes de pesquisa;

c) os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos participantes,

d) Trata-se de um estudo não intervencionista (sem intervenções clínicas) e sem alterações/influências na rotina/tratamento do participante de pesquisa, e consequentemente sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos e a cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Res. CNS Nº 466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Belo Horizonte, 19/04/2017

Cristiana Buzelin Nunes - Pesquisador Responsável

9.3 Anexo C: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit HERCEPTEST™

Padronização adotada pelo Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina/UFMG

➤ **Desparafinizar:**

- 1- Imergir as lâminas em 3 banhos de xilol – 2 de 10 minutos + mergulhar 20x
- 2- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 2 banhos- mergulhar 20x +1 banho - 3 min.
- 3- Colocar as lâminas em água destilada mergulhar 20x + 1 banho de 5 minutos

➤ **Reativação antigênica:**

- 1- Colocar uma cuba contendo a solução de recuperação do epítipo diluída no banho –maria aquecendo a 95-99/C e fechar a tampa
- 2- Imergir as lâminas na cuba com a solução de recuperação do epítipo aquecida
- 3- Após atingir 95-99/C deixar 35min □
- 4- Deixar as lâminas resfriando em temperatura ambiente por 20 a 30min □
- 5- Depois de frias, enxaguar as lâminas em tampão de lavagem por 5min □

➤ **Bloqueio da peroxidase endógena**

- 1- Secar ao redor dos cortes e circundar com a caneta DAKOCytomation
- 2- Pingar 3 gotas (100µl) do Reagente de Bloqueio da Peroxidase nos cortes
- 3- Incubar por 5min □
- 4- Lavar as lâminas uma a uma com o Tampão de Lavagem ou água destilada com pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos com tampão fresco por 5min cada □

➤ **Anticorpo primário ou Reagente controle negativo:**

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Anticorpo anti-HER2 ou do Reagente controle negativo nos cortes
- 2- Incubar em câmara úmida em temperatura ambiente por 30min □
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o Tampão de Lavagem ou água destilada com pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos com tampão fresco por 5min cada □

➤ **Reagente de Visualização:**

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Reagente de visualização em cada corte,
- 2- Incubar em câmara úmida por 30min □
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o Tampão de Lavagem ou água destilada com pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos com tampão fresco por 5min cada □

➤ **Revelação da reação (DAB):**

- 1- Preparar a solução de DAB momentos antes do uso

1 gota do cromógeno para cada ml de substrato

- 2- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl da solução de DAB
- 3- Incubar por 10min □
- 4- Colocar as lâminas em um recipiente com água destilada para parar a revelação
- 5- Lavar as lâminas em água corrente por 5min □

➤ **Contracoloração:**

- 1- Mergulhar rapidamente (2seg □) as lâminas na hematoxilina de Harris
- 2- Lavar as lâminas em água corrente por 7min □

➤ **Desidratação, diafanização e montagem:**

- 1- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 3' □ em cada uma das 4 cubas
- 2- Imergir as lâminas em xilol: 10X em cada uma das 2 cubas
- 3- Manter as lâminas na 2ª cuba de xilol enquanto realiza a montagem com lamínula e Enthelan®.

9.4 Anexo D: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit PharmaDx™

Padronização adotada pelo Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina/UFMG

➤ **Desparafinizar:**

- 1- Imergir as lâminas em 3 banhos de xilol – 2 de 10 minutos + mergulhar 20x
- 2- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 2 banhos- mergulhar 20x +1 banho - 3 min.
- 3- Colocar as lâminas em água destilada mergulhar 20x + 1 banho de 5 minutos

➤ **Reativação antigênica:**

- 1- Colocar uma cuba contendo a solução de recuperação do epítipo diluída na panela à vapor, aquecendo a 95-99/C
- 2- Imergir as lâminas na cuba com a solução de recuperação do epítipo aquecida
- 3- Após atingir 95-99/C deixar 30 min □
- 4- Deixar as lâminas resfriando em temperatura ambiente por 20 a 30min
- 5- Depois de frias, enxaguar as lâminas em água destilada

➤ **Bloqueio da peroxidase endógena**

- 1- Secar ao redor dos cortes e circundar com a caneta DAKOCytomation
- 2- Pingar 3 gotas (100µl) do Reagente de Bloqueio da Peroxidase nos cortes
- 3- Incubar por 5min □
- 4- Lavar as lâminas uma a uma com o Tampão de Lavagem ou água destilada com pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos com tampão fresco por 5min cada □

➤ **Anticorpo primário ou Reagente controle negativo:**

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Anticorpo anti-RE, anti-RP ou do Reagente controle negativo nos cortes
- 2- Incubar em câmara úmida em temperatura ambiente por 1 hora
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos de tampão fresco por 5min cada

➤ **Reagente de Visualização:**

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Reagente de visualização em cada corte,
- 2- Incubar em câmara úmida por 30min
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos de tampão fresco por 5min cada

1 gota do cromógeno para cada ml de substrato

➤ **Revelação da reação (DAB):**

- 1- Preparar a solução de DAB momentos antes do uso
- 2- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl da solução de DAB
- 3- Incubar por 10min □
- 4- Colocar as lâminas em um recipiente com água destilada para parar a revelação
- 5- Lavar as lâminas em água corrente por 5min □

➤ **Contracoloração:**

- 1- Mergulhar rapidamente (2seg □) as lâminas na hematoxilina de Harris
- 2- Lavar as lâminas em água corrente por 7min □

➤ **Desidratação, diafanização e montagem:**

- 1- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 3' □ em cada uma das 4 cubas
- 2- Imergir as lâminas em xilol: 10X em cada uma das 2 cubas
- 3- Manter as lâminas na 2ª cuba de xilol enquanto realiza a montagem com lamínula e Enthelan®.

9.5 Anexo E: Protocolo de Imunohistoquímica – Kit Novolink™

Padronização adotada pelo Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina/UFMG

Desparafinizar:

- 1- Imergir as lâminas em 3 banhos de xilol – 2 de 10 minutos + mergulhar 20x
- 2- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 2 banhos- mergulhar 20x +1 banho - 3 min.
- 3- Colocar as lâminas em água destilada mergulhar 20x + 1 banho de 5 minutos

Reativação antigênica:

- 1- Colocar uma cuba contendo a solução de recuperação do epítipo diluída na panela à vapor, aquecendo a 95-99/C
- 2- Imergir as lâminas na cuba com a solução de recuperação do epítipo aquecida
- 3- Após atingir 95-99/C deixar 30min □
- 4- Deixar as lâminas resfriando em temperatura ambiente por 20 a 30min □
- 5- Depois de frias, enxaguar as lâminas em água destilada

Bloqueio da peroxidase endógena

- 1- Secar ao redor dos cortes e circundar com a caneta DAKOCytomation
- 2- Pingar 3 gotas (100µl) do Reagente de Bloqueio da Peroxidase nos cortes
- 3- Incubar por 5min □
- 4- Lavar as lâminas uma a uma com o Tampão de Lavagem ou água destilada com pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos com tampão fresco por 5min cada □

Anticorpo primário ou Reagente controle negativo:

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Anticorpo anti-RE, anti-RP ou do Reagente controle negativo nos cortes
- 2- Incubar em câmara úmida em temperatura ambiente por 1 hora
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos de tampão fresco por 5min cada □

Reagente de Visualização:

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Reagente de amplificação em cada corte,
- 2- Incubar em câmara úmida por 30min □
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos de tampão fresco por 5min cada □
- 4- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl do Reagente de visualização em cada corte,
- 5- Incubar em câmara úmida por 30min □
- 6- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisceta (garrafa de esguicho) e imergi-las em 2 banhos de tampão fresco por 5min cada □

Revelação da reação (DAB):

- 1- Preparar a solução de DAB momentos antes do uso

1 gota do cromógeno para cada ml de substrato

- 2- Secar ao redor dos cortes e pingar 3 gotas +/-100µl da solução de DAB
- 3- Incubar por 10min □
- 4- Colocar as lâminas em um recipiente com água destilada para parar a revelação
- 5- Lavar as lâminas em água corrente por 5min □

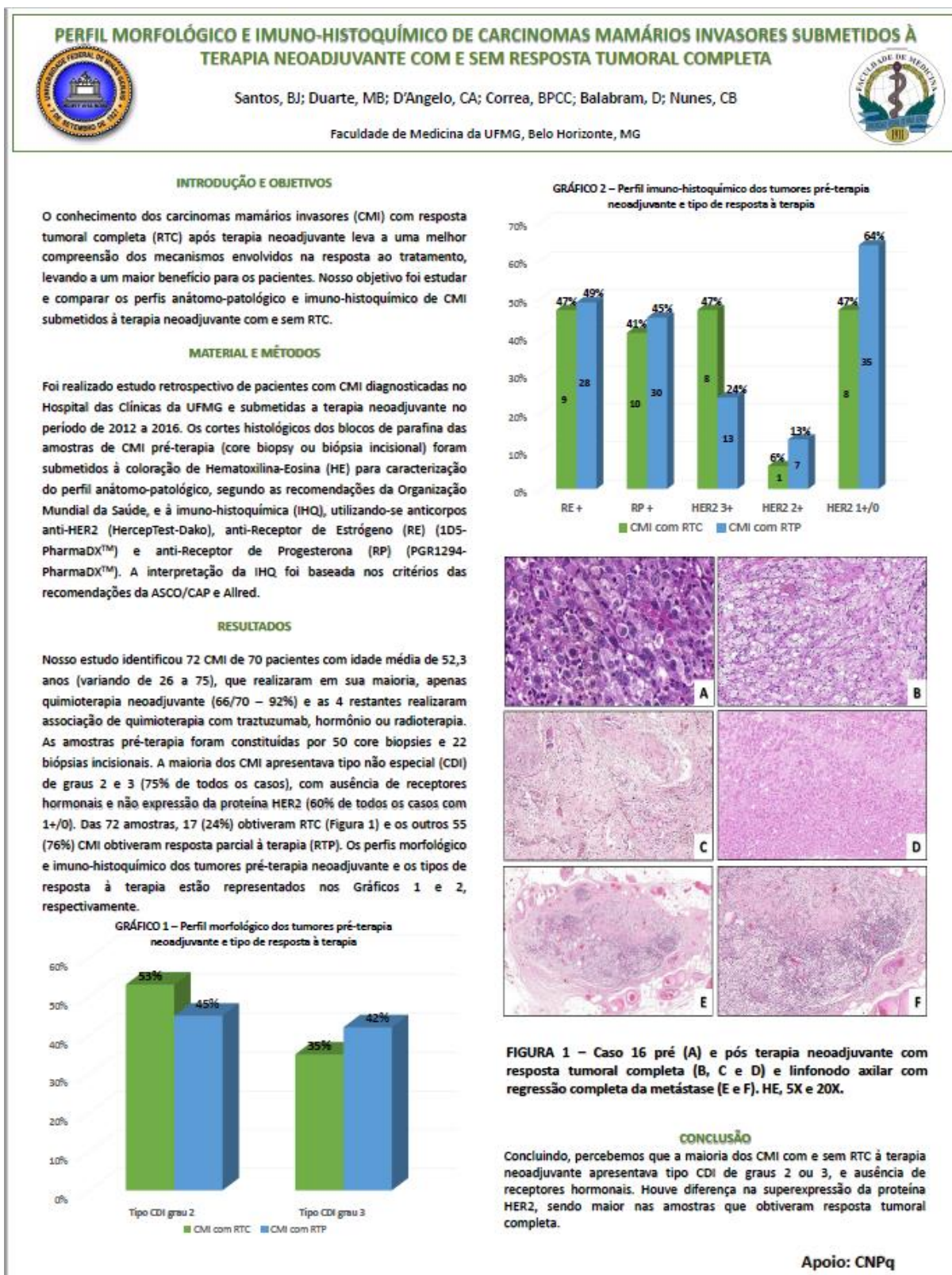
Contracoloração:

- 1- Mergulhar rapidamente (2seg □) as lâminas na hematoxilina de Harris
- 2- Lavar as lâminas em água corrente por 7min □

Desidratação, diafanização e montagem:

- 1- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 3' □ em cada uma das 4 cubas
- 2- Imergir as lâminas em xilol: 10X em cada uma das 2 cubas
- 3- Manter as lâminas na 2ª cuba de xilol enquanto realiza a montagem com lamínula e Enthelan®.

9.6 Anexo F: Apresentação de parte do trabalho - pôster 1



9.7 Anexo G: Certificado de apresentação de pôster -1

CERTIFICADO



31º Congresso Brasileiro de PATOLOGIA
Belo Horizonte 02 A 05 DE NOV 2017

Certificamos que o trabalho

PERFIL MORFOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES SUBMETIDOS À TERAPIA NEOADJUVANTE COM E SEM RESPOSTA TUMORAL COMPLETA

dos autores: SANTOS, B. J.; BALABRAM, D.; DUARTE, M. B.; CORREA, B. P. C. C.; D'ANGELO, C. A.; NUNES, C. B.;

foi apresentado, na modalidade Pôster, durante o 31º Congresso Brasileiro de Patologia, ocorrido de 02 a 05 de novembro, no Centro de Convenções Minascentro, em Belo Horizonte – MG.

Belo Horizonte, 05 de novembro de 2017



Katia R M Leite
Presidente da
Comissão Científica



Gil Pena
Presidente
do Congresso



Clóvis Klock
Presidente da Sociedade
Brasileira de Patologia





9.8 Anexo H: Certificado de apresentação de pôster – Encontro da Pós-graduação



9.9 Anexo I: Publicação de resumo – 1

ISSN 2237-3446
Volume 53
Novembro 2017

JORNAL BRASILEIRO DE
**PATOLOGIA E
MEDICINA LABORATORIAL**
BRAZILIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE

Uma publicação conjunta das sociedades: SBPCML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial), SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia)

SUPLEMENTOS PATOLOGIA



31^o Congresso Brasileiro de
PATOLOGIA
Belo Horizonte 02 A 05 DE NOV 2017



Sociedade
Brasileira de
PATOLOGIA



AMB
Associação Brasileira de Patologia

TÍTULO

PERFIL MORFOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES SUBMETIDOS À TERAPIA NEOADJUVANTE COM E SEM RESPOSTA TUMORAL COMPLETA

Autor	Instituição	Cidade	UF	País
BÁRBARA JAIME DOS SANTOS	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL

Autor	Instituição	Cidade	UF	País
SANTOS, B. J.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
BALABRAM, D.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
DUARTE, M. B.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
CORREA, B. P. C. C.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
D'ANGELO, C. A.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
NUNES, C. B.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL

Área de Conhecimento
PATOLOGIA MAMÁRIA

INTRODUÇÃO / OBJETIVO

O conhecimento dos carcinomas mamários invasores (CMI) que tiveram resposta tumoral completa (RTC) após terapia neoadjuvante pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta ao tratamento, levando a um maior benefício para as pacientes. Objetivamos estudar e comparar os perfis anátomo-patológico e imuno-histoquímico de CMI submetidos à terapia neoadjuvante com e sem RTC.

MÉTODOS

Estudo retrospectivo de 72 CMI de 70 pacientes submetidas à terapia neoadjuvante no período de 2012 a 2016, sendo 17 delas com história clínica e histológica de RTC após-terapia neoadjuvante. Cortes histológicos dos blocos de parafina das 72 amostras de CMI pré-terapia (core biopsy 50/72-69% ou biópsia incisional 22/72-31%) foram submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para caracterização do perfil anátomo-patológico (segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde) e à imuno-histoquímica (IHQ), utilizando-se anticorpos anti-HER2 (HercepTest-Dako), anti-Receptor de Estrógeno (RE) (1D5-PharmaDXTM) e anti-Receptor de Progesterona (RP) (PGR1294-PharmaDXTM) (sistema de escore da ASCO/CAP para HER2 e de Allred para os receptores hormonais).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade média das 70 pacientes foi de 52,3 anos (variando de 26 a 75). 66/70 (92%) das pacientes realizaram apenas quimioterapia neoadjuvante, o restante realizou associação de quimioterapia com traztuzumab, hormônio ou radioterapia. Das 72 amostras, 17 (24%) obtiveram RTC, destas, 15/17 (88%) foram classificadas

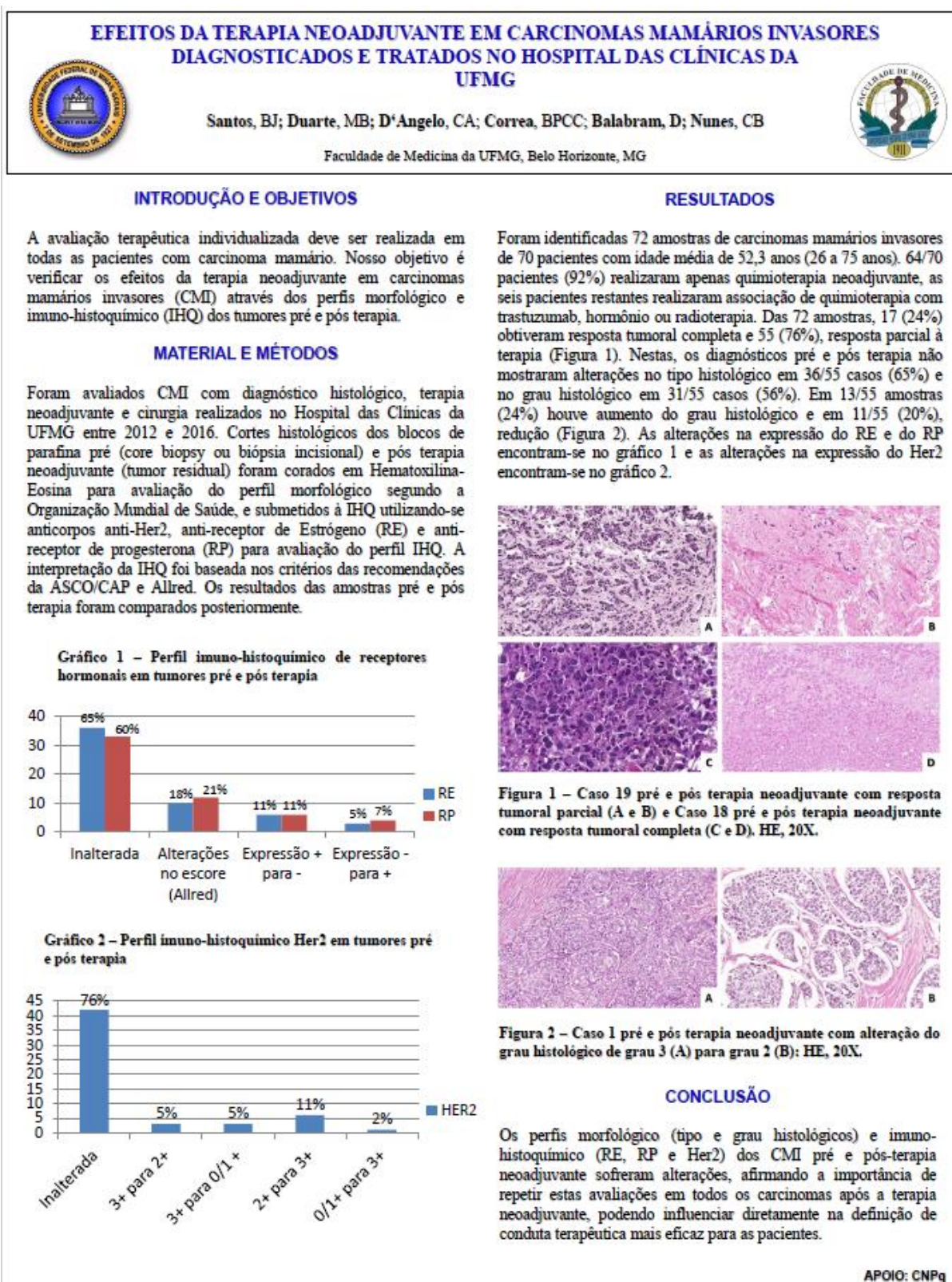
como carcinomas ductais invasores (CDI), sendo os graus 2 (53%) e 3 (35%) mais frequentes. A maioria das amostras foram negativas para RE e RP (53% e 59%, respectivamente). Em relação ao HER2, a expressão foi positiva (3+) em 47% dos casos, indeterminada (2+) em 6% e negativa (0 ou 1+) em 47% dos casos. Nos 55 CMI que obtiveram resposta parcial à terapia, predominou o tipo CDI (39/55-70%), sendo os graus 2 e 3 mais frequentes (45% e 42% respectivamente). A maioria foi negativa para RE e RP (51% e 55% dos casos). Em relação ao HER2, a expressão foi 3+ em 24% dos casos, 2+ em 13% e negativa (0 ou 1+) em 64% dos casos.

CONCLUSÃO

Concluindo, percebemos que a maioria dos CMI com e sem RTC à terapia neoadjuvante apresentava tipo CDI de graus 2 ou 3, e ausência de receptores hormonais. Houve diferença na superexpressão da proteína HER2, sendo maior nas amostras que obtiveram resposta tumoral completa.

Apoio: CNPq

9.10 Anexo J: Apresentação de parte do trabalho – pôster 2



9.11 Anexo K: Certificado de apresentação de pôster – 2

CERTIFICADO		
 31º Congresso Brasileiro de PATOLOGIA Belo Horizonte 02 A 05 DE NOV 2017		
Certificamos que o trabalho		
EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES DIAGNOSTICADOS E TRATADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG		
dos autores: SANTOS, B. J.; DUARTE, M. B.; CORREA, B. P. C. C.; D'ANGELO, C. A.; BALABRAM, D.; NUNES, C. B.;		
foi apresentado, na modalidade Pôster, durante o 31º Congresso Brasileiro de Patologia, ocorrido de 02 a 05 de novembro, no Centro de Convenções Minascentro, em Belo Horizonte – MG.		
Belo Horizonte, 05 de novembro de 2017		
 _____ Katia R M Leite Presidente da Comissão Científica	 _____ Gil Pena Presidente do Congresso	 _____ Clóvis Klock Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia
 Sociedade Brasileira de PATOLOGIA	 AMB Associação Médica Brasileira	 CNA

9.12 Anexo L: Certificado de apresentação de pôster – Encontro da Pós-graduação



9.13 Anexo M: Publicação de resumo – 2



TÍTULO

EFEITOS DA TERAPIA NEOADJUVANTE EM CARCINOMAS MAMÁRIOS INVASORES DIAGNOSTICADOS E TRATADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFMG

Autor	Instituição	Cidade	UF	País
BÁRBARA JAIME DOS SANTOS	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL

Autor	Instituição	Cidade	UF	País
SANTOS, B. J.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
DUARTE, M. B.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
CORREA, B. P. C. C.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
D'ANGELO, C. A.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
BALABRAM, D.	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL
NUNES, C. B.	FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG	BELO HORIZONTE	MG	BRASIL

Área de Conhecimento
PATOLOGIA MAMÁRIA

INTRODUÇÃO / OBJETIVO

Avaliação individualizada de terapias adjuvantes deve ser realizada em todos os casos de carcinoma mamário. Nossos objetivos são verificar os efeitos da terapia neoadjuvante em carcinomas mamários invasores (CMI) através dos perfis morfológico e imuno-histoquímico (IHQ) dos tumores pré e pós terapia.

MÉTODOS

Foram avaliadas pacientes com diagnóstico de CMI, terapia neoadjuvante e cirurgia realizados no Hospital das Clínicas da UFMG entre 2012 e 2016. Foram realizados cortes dos blocos de parafina pré (core biopsy ou biópsia incisional) e pós-terapia neoadjuvante (tumor residual), e corados em Hematxilina-Eosina para avaliação do perfil morfológico segundo a Organização Mundial de Saúde, e submetidos à IHQ utilizando-se anticorpos anti-HER2, anti-receptor de Estrógeno (RE) e anti-receptor de progesterona (RP) para avaliação do perfil IHQ, segundo a ASCO/CAP para HER2 e Allred para os receptores hormonais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 72 amostras de carcinomas mamários invasores de 70 pacientes com idade média de 52,3 anos (26-75). 66/70 (92%) pacientes realizaram apenas quimioterapia neoadjuvante, o restante realizou associação da quimioterapia com trastuzumab, hormônio ou radioterapia. Do total das amostras, 17/72 (24%) obtiveram resposta tumoral completa. Nos casos com resposta parcial à terapia, não identificamos alterações no tipo histológico em 36/55 (65%). Quanto ao grau histológico, não houve alteração em 31/55 (56%), em 13/55 (24%) houve aumento e em 11/55 (20%), redução. A expressão do RE se manteve a mesma em 36/55 (65%),

Mostrar próxima página (seta à direita)

06/55 (11%) dos casos positivos ficaram negativos, 03/55 (5%) dos casos negativos ficaram positivos, e 10/55 (18%) dos casos positivos tiveram alterações no escore. A expressão do RP se manteve a mesma em 33/55 (60%), em 06/55 (11%) dos casos positivos ficaram negativos, 04/55 (7%) dos casos negativos ficaram positivos, e 12/55 (21%) dos casos positivos tiveram alterações no escore. Dos casos 3+, a expressão do HER2 se manteve a mesma em 42/55 (76%), 03/55 (5%) se tornaram 2+, e 03/55, (5%) se tornaram 0/1+; dos casos 2+, 06/55 (11%) se tornaram 3+; dos casos 0/1+, 01/55, (2%) se tornaram 3+.

CONCLUSÃO

Concluindo, o tipo, grau histológico e o perfil imuno-histoquímico dos tumores pré e pós-terapia neoadjuvante sofreram alteração, levantando a importância de rever os perfis morfológico e imuno-histoquímico após a terapia neoadjuvante, pois influencia diretamente a conduta terapêutica.

Apoio: CNPq

9.15 Anexo O: Artigo a ser submetido à revista *Pathology Research and Practice*

Effects of neoadjuvant therapy on invasive mammary carcinomas

Bárbara Jaime dos Santos, ¹ Marcelo Araújo Buzelin, ² Débora Balabram, ² Cristiana Buzelin Nunes¹

¹ Laboratory of Mammary Pathology, Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais ² Institute of Teaching and Research of Santa Casa de Belo Horizonte

Corresponding author: Dr^a Cristiana Buzelin Nunes, Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia, Belo Horizonte - MG, 30130-100. Brazil.

ABSTRACT

Neoadjuvant therapy is the standard treatment for locally advanced mammary carcinomas. Predictive factors for better response to therapy should be studied and post therapy tumor changes should be identified for treatment adjustments to increase the survival. We aimed to identify histological and immunohistochemical (IHC) parameters (Hormonal Receptors, HER2 expression and Ki67 index) of invasive mammary carcinomas (IMC) related to better pathological response to neoadjuvant therapy (NT); and to evaluate the effect of therapy on the residual tumors. We analyzed 70 cases of IMC (70 samples of initial pre-therapy biopsy and 70 samples of postoperative surgical specimens). According to pathological response, the cases were divided in two groups (complete pathological response – CPR, and partial pathological response - PPR). Histological analysis and IHC expressions of the initial tumors were compared among both groups and the same parameters were compared between the initial tumor samples and post-therapy samples in the PPR group. Results: 56 cases had PPR and 14 had CPR. The level of inflammatory infiltrate showed an association with response to therapy ($p = 0.003$): all tumors in CPR group showed some level of inflammatory infiltrate (over 21%), whereas PPR tumors had low level (under 20%). In both groups, the comparison of histological type, grade, ER, PR, HER2 expression and Ki67 index showed no statistical difference. In the evaluation of the effects of therapy on residual tumors (PPR group), the parameters with statistical significance were histological type and the Ki67 index. 19/55

residual tumors (34.5%) showed changes in histological type ($p=0.024$). Although not statistically significant, 26/55 residual tumors had changes in histological grade, such as increase (27.3%) or decrease (10.9%) in tumor grade. 7% of the residual tumors showed increase in the levels of inflammatory infiltrate and 35%, showed a decrease. 22/55 (40%) of the residual tumors showed ER status or Allred score changes and 20/55 (36,4%) showed PR changes. 96.4% of cases kept the same HER2 expression. 34.5% of the cases showed some changes in the Ki67 index. Ki67 distribution was turn different in post-therapy tumors (non-normal distribution), diverting from expected ($p = 0.014$). Conclusion: The level of tumor inflammatory infiltrate in histological evaluation demonstrated association with CPR. Histological type and grade, ER, PR, HER2 and Ki67 had no effect on therapy response. When compared to the initial biopsies, post therapy residual tumors showed some changes in histological type and grade and in the expression of ER, PR, HER2 and Ki67 after neoadjuvant therapy, but only changes in histological type and Ki67 index were statistically significant.

Keywords: breast cancer; immunohistochemistry; estrogen receptor; progesterone receptor; HER2; Ki67; neoadjuvant therapy; therapy response.

INTRODUCTION

The systemic therapeutic approach to breast cancer is based on prognostic and predictive factors, that is, tumor stage, histological characteristics of the tumors and the status of consolidated biomarkers for invasive mammary carcinomas (IMC): hormone receptors (estrogen - ER and progesterone - PR), HER2 protein and the proliferation marker, Ki67. These factors give information about clinical outcome of the patients and help predict the response to specific therapies. The histological analysis and immunohistochemical test (IHC) are performed in the moment of initial diagnosis, usually on material from core needle biopsy (CNB) or incision biopsy, and subsequently in the surgical specimens [1-4].

Treatment of breast cancer is based on local (surgical) control usually associated with systemic therapy that can be administered before and / or after surgical resection [5]. Neoadjuvant therapy (NT) aims to reduce tumor size before surgical resection. Initially, in the 1970s, it was indicated for patients with locally advanced and inoperable tumors to become operable. It is currently also indicated for patients with large, operable tumors to become candidates for breast conserving surgery. The response to neoadjuvant therapy is considered

an important prognostic factor, especially in cases with pathological complete response (PCR), that is, in the absence of residual disease after therapy, including absence of lymph node metastases, since patients with a pathologic complete response have a better prognosis in comparison to those with no such response as it provides a better prognosis for the patient. Neoadjuvant therapy is generally applied to patients with locally advanced mammary carcinomas, especially triple-negative, HER2-positive or high-proliferative tumors, as they show better response to neoadjuvant therapy [6-9]. The major difference between adjuvant and neoadjuvant therapy is the opportunity to verify the response to the neoadjuvant therapy, allowing therapeutic revision in cases that did not respond as expected. After NT, some tumors show pathological complete response, others show pathological partial response (PPR), and some progress. Breast tumors having the same histological type may present variations in response to therapy, due to several factors, mainly intratumoral molecular heterogeneity, where different cell clones may respond differently to therapy. [10,11]

In this study, we compared pre- and post-therapy samples of IMC from patients submitted to NT. We aimed to investigate histopathological parameters and biological markers that could predict better response to therapy. We also evaluated therapy effects on tumors.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (COEP) under protocol # 2.109.565.

From the archives of the Mammary Pathology Laboratory of the Faculty of Medicine of Federal University of Minas Gerais, IMC samples were retrospectively collected from 68 patients diagnosed and treated at the Clinical Hospital of UFMG between 2008 and 2016, treated with NT, and who subsequently submitted to surgical excision (setorectomy or mastectomy). Only tumors from which paraffin block and histological slides stained hematoxylin-eosin (HE) of pre and post-therapy samples were available in the laboratory were included in this study.

According to the response to NT, our cases were divided into two groups: PCR group and PPR group.

The histological analysis was performed by an expert breast pathologist (CBN), through revision of the original slides stained in HE. Tumors were classified and graded according to the World Health Organization diagnostic criteria, 2012 [12]. Histological grade was performed according to the modified Scarff-Bloom-Richardson system [13].

Immunohistochemistry

The paraffin blocks of pre and post-therapy samples were submitted to microtomy, obtaining histological sections with 4 μm thickness, which were placed on electric charged slides and then submitted to IHC for ER, PR, HER2 and Ki67.

All tests were performed at the Mammary Pathology Laboratory of the Medical School of UFMG, using standardized protocols according to the manufacturers' recommendations. PharmaDX - Dakocytomation kit, Carpinteria, California, USA was used for ER and PR, HercepTest Kit - Dakocytomation, Carpinteria, California, USA for HER2 and Novolink detection kit for Ki67. Information on antibody clones and dilutions, detection systems and antigen retrieval are presented in Table 1.

After dewaxing and hydrating the slides, antigenic retrieval and endogenous peroxidase blockade were performed, and the slides were incubated for 5 minutes with the blocking reagents provided in the kits. Primary antibodies were incubated in wet chamber (ER, PR and Ki67 - 1 hour, and HER2 - 30 minutes). Non-biotinylated polymeric detection systems were used with 3,3'-diaminobenzidine visualization; the slides were then stained with hematoxylin and mounted with coverslips. All tests were performed using known positive and negative controls provided in the kits (ER, PR and HER2) or inhouse controls (Ki67).

The tests were analyzed by an expert breast pathologist. ASCO/CAP recommendations were followed for hormone receptors and HER2 expression: 1% labeling of neoplastic cells is considered a positive result for hormonal receptors [14]. HER2 scores: 0, absence of labeling or weak labeling partially involving cytoplasmic membrane circumference in $\leq 10\%$ of neoplastic cells; 1+, weak marking partially involving the circumference of the cytoplasmic membrane in $> 10\%$ of neoplastic cells; 2+, weak / moderate intensity marking involving the entire circumference of the cytoplasmic membrane $> 10\%$ of neoplastic cells; 3+, complete labeling, of strong intensity, involving the entire circumference of the cytoplasmic membrane in $> 10\%$ of neoplastic cells. The 3+ scored cases were positive, cases 0 or 1+ were negative, and 2+ cases were considered equivocal (these were sent to HER2 gene amplification analysis in an external service) [15]. Ki67 index analysis was semi-quantitative, and the percentage of stained nuclei were counted in hot spot areas, on average, 300 tumor cells [2,16,17].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical program (SPSS, Inc, Chicago, III). Pearson's chi-square test was used to analyze the differences between the categorical

variables of each group (type, histological grade and marker positivity). To compare pre and post-therapy variables, the McNemar test was used for dichotomous variables and the McNemar-Bowker for variables with more categories. The Wilcoxon's test was used to analyze pre and post-therapy continuous variables. The tests were considered statistically significant when p value was <0.05 .

RESULTS

Characterization of the cases

70 IMC were analyzed from 68 patients, ranging from 25 to 72 years old, mean 47 years. 41 tumors (60%) were in the right breast, 25 (37%) in the left breast, and 2 patients (3%) had bilateral tumors. After neoadjuvant therapy, 14 cases (20%) had CPR and 55 cases (80%), had partial pathological response. One tumor had complete pathological response, without residual tumor in the breast, but had lymph node metastasis; therefore, it was classified as PPR but was not included in the analysis of post therapy tumor effects (Figure 1).

Comparison between the PCR group and PPR groups

Most pre-therapy samples were core needle biopsy samples. Table 2 shows comparison of clinical and pathological parameters between both groups in pre NT samples. For histological type analysis, we divided the diagnosis in invasive carcinoma of no special type (Ductal NST), invasive lobular carcinoma and other invasive breast carcinomas. Invasive carcinoma of no special type (Ductal NST) was the most frequent, detected in 54/70 tumors (77.1%) and the distribution was similar in both groups (PCR and PPR). Histological grades II and III were more frequent in all tumors, grade II was more frequent in PCR group tumors and grade III, in PPR group tumors. Most tumors in both groups showed low tubule formation (score 3), marked pleomorphism (score 3), and low mitotic count (score 1). Histological type and histological grade (tubular formation, nuclear pleomorphism and mitotic counts) showed no statistical difference between both groups.

The analysis of the tumor inflammatory infiltrate was divided in four levels based on the percentage of inflammatory compared with tumor cells: absent, low (1 to 20%), moderate (21 to 50%) and high (over 50%). PCR group tumors had 8 cases (53.3%) with moderate inflammatory infiltrate (above 21%) and one (6.7%) with high inflammatory infiltrate. The majority of PPR group tumors had low inflammatory infiltrate: 7 cases (12.7%) had absent and 39 cases (70.9%) had low inflammatory infiltrate ($p=0.003$).

ER was positive in 35/70 (50%) of all tumors. In both groups, the majority was negative (66.7% of the PCR group and 54.5% of the PPR group). PR was negative in 42/70 tumors (60%), and in both groups, the majority of the tumors was PR negative (PCR: 73.3% and PPR: 56.4%).

In 56/70 tumors (80%) there was no HER2 protein overexpression. Two tumors had equivocal HER2 expression and showed gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH).

The mean Ki67 index of the tumors in the PCR group was 29.5% and in the PPR group, 31.7%. Considering a Ki67 cutoff point in 20%, most tumors (53-75,7%) showed high Ki67 index in both groups. Statistically, the comparison of the biomarkers expression (ER, PR, HER2 and Ki67) in both groups was not significant.

Post-therapy tumor effects

The results of the comparative analysis of the tumor parameters between pre- and post-therapy samples in the PPR group are showed in TABLE 3.

Following neoadjuvant therapy, 36/55 residual tumors (65.5%) had no alterations in histological type, 15 tumors (27.3%) showed changes in histological type ($p=0.024$) and four tumors (7.3%) had a good response to NT. 26 residual tumors (47.3%) showed grade changes. The alterations in tumor histologic type and grade in residual tumors were:

- 4 cases (7.3%) had a different histological type;
- 1 case (1.8%) had cellular changes caused by therapy making the tumor unclassifiable;
- 3 cases (5.4%) had initial sample classified as mixed type (two or more subtypes) that altered to one specific type in the residual tumor;
- 7 cases (12.7%) had initial sample classified as one specific type that altered to a mixed type in surgical specimen;
- 15 cases (27.3%) showed an increase in histological grade;
- 6 cases (10.9%) showed a decrease in histological grade
- 5 cases (9%) could not have the degree evaluated due to therapy tumor changes.

Most cases (58%) maintained similar levels of intratumoral inflammatory infiltrate, 35% showed lower levels of inflammatory infiltrate, and 7% showed higher levels of inflammatory infiltrate in the residual tumor.

Most post-therapy tumors (49/55 = 89.1%) maintained the same ER expression, 5 cases (9.1%) became ER negative and one initially ER negative case (1.8%) become ER positive on the residual tumor. Analyzing the Allred score (2010), 33 cases (60%) maintained the same

ER score, in the post-therapy samples 9 cases (16.4%) had a higher ER score and 7 cases (12.7%) had a lower ER score.

PR expression remained the same in most post-therapy tumors (46/55 = 83.6%). Six cases (10.9%) became PR negative, and 3 cases (5.5%) became PR positive on the residual tumor. Analyzing the Allred score (2010), 35 cases (63.6%) had no PR change, one case (1.8%) had a higher PR score and 10 cases (18.2%) had a lower PR score.

HER2 expression showed few changes between pre- and post-therapy samples; 53 cases (96.4%) showed the same HER2 expression, one case changed from score 1+ to score 0, one case changed from score 2+ (FISH-amplified) to score 0 in the residual tumor.

Using a 20% cut-off point of Ki67 expression, 19 cases (34.5%) showed some change. 16 cases (29.1%) changed from high to low Ki67 index after NT; 3 cases (5.5%) changed from low to high Ki67 index after NT; 13 cases (23.6%) lost Ki67 expression but remained with high index (>20%); 12 cases (21.8%) increased the Ki67 index but remained with index >20%; 3 cases (5.5%) increased Ki67 index but remained with index <20%; 7 cases (12.7%) decreased Ki67 index and remained with index <20%. The distribution of the data in relation to Ki67 was different when comparing the pre-therapy samples with the post-therapy samples. Before NT, the data showed a normal distribution, after NT the data deviated from the expected value (GRAPHS 1 and 2)

DISCUSSION

Current studies have not shown a survival benefit, even though any patient who is eligible for systemic therapy can be treated with neoadjuvant therapy. Complete response to treatment is a strong prognostic factor and is useful for individual patient care. In our hospital, it is indicated for patients with more advanced tumor stages of the disease at diagnosis. These tumors present characteristics already known as worse prognostic factors, such as HER2 overexpression, triple negative and histological grade 3 tumors.

The only histological parameter detected in our study that could predict a better response to NT was the level of inflammatory infiltrate. Our findings point to a possible application of this pathological information in medical choices of therapy, before and after neoadjuvant treatment. Other studies found similar results, and much has been discussed regarding the possibility to include the analysis of the inflammatory infiltrate level in clinical practice as an isolated marker of better response to chemotherapy [18,19].

All cases with PCR showed high levels of inflammatory infiltrate cells. This makes us believe that the inflammatory infiltrate could interact with chemotherapeutic drugs, increasing the

response to therapy [20]. It is already known that the effect of chemotherapy on tumor cells creates an immunogenic environment necessary for a successful therapy [21,22].

After NT, the level of inflammatory infiltrate remained the same in the residual tumor when compared to the initial biopsy. Curiously, in 12 tumors there was no inflammatory infiltrate cells, showing chemotherapy may not change this parameter. In general, tumors from patients who did not receive NT also show good concordance in the level of the inflammatory infiltrate between the initial biopsy and residual tumors [23].

When associating the histological type and grade with pathological response, we found results similar to the literature, and there was no association between these parameters with the type of NT response [24,25].

Many studies did not show changes in residual tumors after chemotherapy, but others noted histological type changes as we did in our study [26,27]. Sethi, described a case classified as Ductal NST type in the initial biopsy that became metaplastic type in surgical resection, as we have shown [26-29]. Some cases had more than one histological type (mixed type) in the initial biopsy sample and showed only one special type in the tumor surgical resection post-therapy, indicating that chemotherapy may have selected a tumor type. Other cases, however, changed from one special type to the mixed types in the surgical resection. These cases could be true changes in histological type or as tumor sample under representation, as the tumor could be heterogenous and the biopsy only reached part of the tumor showing one histological type. These changes had a statistically significant result, indicating that neoadjuvant chemotherapy may alter the histologic type or select certain cellular subtypes of the tumor.

In residual post-therapy samples we detected 17.1% more *in situ* carcinomas than in pre-therapy samples. This may also be considered as tumor sample under representation as the surgical specimen allows the detection of carcinomas *in situ* that were not reached in the initial biopsy [30].

In residual post-therapy tumors we observed a higher histological grade in 15/55 tumors. These tumors showed low mitotic index on the initial biopsy, probably due to the small tumor sample, but had a Ki-67 index over 20%, indicating that they were in high proliferation. These tumors could have been misdiagnosis, and were probably grade III, not grade II. Most residual tumors on surgical resection showed a higher mitotic index, which led to a higher grade. However those results were not significant. The changes in histological grade between the core needle biopsy and surgical resection samples have been reported in the literature even in cases without neoadjuvant therapy [31].

Hormone receptors and HER2 protein are biomarkers that must be routinely tested for invasive mammary carcinomas as predictive factors of target therapy and to provide prognostic information. Triple negative or HER2 overexpressed tumors are considered to have worse prognosis but may predict better response to neoadjuvant therapy [18,20]. In the PCR group (14 tumors), five were triple-negative, five were HER2 positive and four were HR positive, thus showing that although we did not find significant results in these analyzes, there were some predominance of these IHC profiles with pathological complete response. Perhaps our number of cases may have influenced our results and we could not show any significance. As already established in medical literature, patients with hormone receptor positive tumors may benefit from treatment with hormonal therapies such as tamoxifen, aromatase inhibitors or ovarian suppression, and hormone receptor negative tumors tend to respond better to neoadjuvant chemotherapy. Most of our cases with pathological complete response were HR negative, what also corroborates this finding [32].

We did not find, as described in the literature, the relationship between HER2 overexpression and a better response to neoadjuvant therapy. Maybe because in our study, most tumors showed no HER2 overexpression. Even though neoadjuvant treatment with the addition of trastuzumab has already been approved by the FDA, in our hospital clinical routine, it is not common in the neoadjuvant scenario, and may have contributed to our results. One single patient in our study received trastuzumab during NT and had PCR; so, if all patients with HER2 overexpression tumors in our study had received target-specific therapy, the outcome could have been different in this parameter [32].

The Ki-67 proliferative marker is well established as a prognostic factor in breast cancer patients. Tumors with a high Ki-67 index respond better to chemotherapy, as it this treatment acts mainly in the proliferating cells. Most tumors were considered to have a high Ki67 index in both groups, with no statistical difference in response to therapy [8,32,33].

The frequency of conversion of the biomarkers in residual tumors after neoadjuvant therapy is still controversial in the literature and much studied, since it raises the question of retesting tumor markers after neoadjuvant therapy [4, 9, 34-39]. In post-therapy tumors, we found little alterations in hormone receptor status consistent with the literature. Similar results were found on the conversion of ER and PR from positive to negative, ER and PR negative to positive in pre and post-therapy samples [34, 37, 40].

We haven't found many changes in the status of post-therapy HER2 expression, our results are similar to those of other studies [9,40]. One case changed from positive to negative and it

may be due to an heterogeneous tumor with response of the HER2 positive cells clone and a selection of the HER2 negative clone.

In post-therapy tumors, nearly half the patients (27/55) had a low proliferative index and 16/55 tumors change from high on biopsy to low. Ki67 index changed after neoadjuvant therapy, due to the action of the therapy targeting proliferating cells [8].

There are several hypothesis that could explain tumor changes post NT: tumor heterogeneity, small sampling of the initial biopsy that does not represent the entire tumor area; results close to the negative/positive limit; false-negative results due to errors in the immunohistochemical technique (analytical factors); pre-analytical factors of samples that could lead to a false-negative result as cold ischemia time, type and fixation time.

In order to minimize false-negative and false-positive results proving that the conversion is real, pre-analytical factors should be taken into consideration as slicing the surgical sample, complete fixation, standardization and validation of the immunohistochemical technique. In our study there is a possibility that pre-analytical factors such as cold ischemia time and fixation time may have influenced the test results in the surgical specimens.

Changes in the expression of tumor biomarkers after NT can occur and it can lead to unnecessary treatments with many side effects (e.g., cardiotoxicity - trastuzumab), without any benefit, or not to receive treatments that could change their prognosis. Thus, we agree with the literature that IHC tests should be repeated on post-neoadjuvant residual tumors, so that clinicians could re-evaluate their patient's treatment according to the new results, when necessary.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Untch M, Gerber B, Harbeck N, *et al.* 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: Primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - Opinion of a German team of experts (Zurich 2013). *Breast Care* 2013;**8**:221–9. doi:10.1159/000351692
- 2 Von Minckwitz G, Untch M, Nüesch E, *et al.* Impact of treatment characteristics on

- response of different breast cancer phenotypes: Pooled analysis of the German neoadjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat* 2011;**125**:145–56. doi:10.1007/s10549-010-1228-x
- 3 de la Cruz LM, Harhay MO, Zhang P, *et al.* Impact of Neoadjuvant Chemotherapy on Breast Cancer Subtype: Does Subtype Change and, if so, How?: IHC Profile and Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2018;**1**:1–6. doi:10.1245/s10434-018-6608-1
 - 4 Gobbi H, Rocha RM, Nunes CB. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol e Med Lab* 2008;**44**:131–40. doi:10.1590/S1676-24442008000200010
 - 5 Williams C, Brunskill S, Altman D, *et al.* Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technol Assess (Rockv)* 2006;**10**:1–153. doi:10.3310/hta10340
 - 6 Krug D, Baumann R, Budach W, *et al.* Individualization of post-mastectomy radiotherapy and regional nodal irradiation based on treatment response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: A systematic review. *Strahlentherapie und Onkol* 2018;**194**:607–18. doi:10.1007/s00066-018-1270-x
 - 7 Amoroso V, Generali D, Buchholz T, *et al.* International expert consensus on primary systemic therapy in the management of early breast cancer: Highlights of the Fifth Symposium on Primary Systemic Therapy in the Management of Operable Breast Cancer, Cremona, Italy (2013). *J Natl Cancer Inst - Monogr* 2015;**2015**:90–6. doi:10.1093/jncimonographs/lgv023
 - 8 Tokuda E, Horimoto Y, Arakawa A, *et al.* Differences in Ki67 expressions between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. *Hum Pathol* 2017;**63**:40–5. doi:10.1016/j.humpath.2017.02.005
 - 9 Ahn S, Kim HJ, Kim M, *et al.* Negative Conversion of Progesterone Receptor Status after Primary Systemic Therapy Is Associated with Poor Clinical Outcome in Patients with Breast Cancer. 2018. doi:10.4143/crt.2017.552
 - 10 Yang L, Zhong X, Pu T, *et al.* Clinical significance and prognostic value of receptor conversion in hormone receptor positive breast cancers after neoadjuvant

- chemotherapy. *World J Surg Oncol* 2018;**16**:51. doi:10.1186/s12957-018-1332-7
- 11 Bossuyt V. Processing and Reporting of Breast Specimens in the Neoadjuvant Setting. *Surg Pathol Clin* 2018;**11**:213–30. doi:10.1016/j.path.2017.09.010
 - 12 Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, *et al.* *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Breast*. 2012.
 - 13 ELSTON CW, ELLIS IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;**19**:403–10. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
 - 14 Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. 2011;**134**:907–22.
 - 15 Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *J Clin Oncol* 2013;**31**:3997–4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984
 - 16 Curigliano G, Criscitiello C, Andrè F, *et al.* Highlights from the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference 2013. Access to innovation for patients with breast cancer: How to speed it up? *Ecancermedicalscience* 2013;**7**:1–8. doi:10.3332/ecancer.2013.299
 - 17 Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, *et al.* Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;**11**:174–83. doi:10.1016/S1470-2045(09)70262-1
 - 18 Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, *et al.* Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Anticancer Res* 2018;**38**:2311–21. doi:10.21873/anticancer.12476
 - 19 Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, *et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Bre. *Semin Cancer*

- Biol* 2018;**52**:16–25. doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.003
- 20 Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol* 2012;**43**:1688–94. doi:10.1016/j.humpath.2011.12.013
- 21 Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;**13**:1050–9. doi:10.1038/nm1622
- 22 Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, *et al.* Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 2015;**28**:690–714. doi:10.1016/j.ccell.2015.10.012
- 23 Cha YJ, Ahn SG, Bae SJ, *et al.* Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes of breast cancer in core needle biopsies and resected specimens: a retrospective analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2018;**171**:295–302. doi:10.1007/s10549-018-4842-7
- 24 Sasanpour P, Sandoughdaran S, Mosavi-Jarrahi³ A, *et al.* Predictors of Pathological Complete Response in Women with Clinical Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Carcinoma. *Oncol* 2018;**95**:229–38. doi:10.1159/000489785
- 25 Baulies S, Cusidó M, González-Cao M, *et al.* Hormone receptor and HER2 status: The only predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2015;**35**:485–9. doi:10.3109/01443615.2014.968113
- 26 Sethi D, Sen R, Parshad S, *et al.* Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Indian J Cancer* 2013;**50**:58. doi:10.4103/0019-509X.112301
- 27 Honkoop AH, Pinedo HM, De Jong JS, *et al.* Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1997;**107**:211–8. doi:10.1093/ajcp/107.2.211
- 28 Van Der Wall E, Rutgers EJT, Holtkamp MJ, *et al.* Efficacy of up-front 5-fluorouracil - Epidoxorubicin - cyclophosphamide (FEC) chemotherapy with an increased dose of epidoxorubicin in high-risk breast cancer patients. *Br J Cancer* 1996;**73**:1080–5. doi:10.1038/bjc.1996.208

- 29 Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, *et al.* Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:3025–30. doi:10.2106/JBJS.K.01088
- 30 Calhoun BC. Core Needle Biopsy of the Breast: An Evaluation of Contemporary Data. *Surg Pathol Clin* 2018;**11**:1–16. doi:10.1016/j.path.2017.09.001
- 31 Ahmeidat H, Purdie C, Jordan L, *et al.* Non-histopathological parameters associated with upgrade of breast tumours yielding a core biopsy report of histological grade 2 ductal no special type to grade 3 on excision. *Eur J Surg Oncol* 2018;**44**:1720–4. doi:10.1016/j.ejso.2018.07.002
- 32 Allison KH. Ancillary Prognostic and Predictive Testing in Breast Cancer: Focus on Discordant, Unusual, and Borderline Results. *Surg Pathol Clin* 2018;**11**:147–76. doi:10.1016/j.path.2017.09.006
- 33 Shuai Y, Ma L. Prognostic value of pathologic complete response and the alteration of breast cancer immunohistochemical biomarkers after neoadjuvant chemotherapy. *Pathol Res Pract* 2018;**215**:29–33. doi:10.1016/j.prp.2018.11.003
- 34 Kinsella MD, Nassar A, Siddiqui MT, *et al.* Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post- neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: A single institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;**5**:530–6.
- 35 Xian Z, Quinones AK, Tozbikian G, *et al.* Breast cancer biomarkers before and after neoadjuvant chemotherapy: does repeat testing impact therapeutic management? *Hum Pathol* 2017;**62**:215–21. doi:10.1016/j.humpath.2016.12.019
- 36 Ustaalioglu BBO, Vardar FA, Bilici A, *et al.* Clinical importance of discordance of hormone receptors and HER2/neu status after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J BUON* 2014;**19**:879–86.
- 37 Galli G, Bregni G, Cavalieri S, *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy Exerts Selection Pressure Towards Luminal Phenotype Breast Cancer. *Breast Care* 2017;**12**:391–4. doi:10.1159/000479582
- 38 Morris DM, Edwards J, Gelder F. Hormonal receptors in locally advanced breast

- cancer: Change with response to neoadjuvant chemotherapy? *J Surg Oncol* 1991;**46**:156–8. doi:10.1002/jso.2930460306
- 39 Ilgun S, Sarsenov D, Erdogan Z, *et al.* Receptor discordance rate and its effects on survival in primary and recurrent breast cancer patients. *J BUON* 2016;**21**:1425–32.
- 40 Ozmen V, Atasoy A, Bozdogan A, *et al.* Prognostic value of receptor status change following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Cancer Treat Commun* 2015;**4**:89–95. doi:10.1016/j.ctrc.2015.07.001

TABLE 1- Antibodies, clones, manufacturers, detection systems, dilutions and antigenic retrieval of anti HER2, ER, PR and Ki67 antibodies:

Antibody	Clone	Manufacturers	Detection systems	Dilution	Antigenic retrieval
HER2	A0485 (HercepTest™)	DakoCytomation, United States of America	Visualization reagent , DAKO	Ready to use	Water bath – Epitope retrieval solution, Ph6 DAKO, 35 minutes
RE	1D5 (PharmaDX™)	DakoCytomation, United States of America	Visualization reagent , DAKO	Ready to use	Steamer – Epitope retrieval solution, High Ph, DAKO, 30 minutes
RP	PGR1294 (PharmaDX™)	DakoCytomation, United States of America	Visualization reagent , DAKO	Ready to use	Steamer – Epitope retrieval solution, High Ph, DAKO, 30 minutes
Ki67	MIB1	DakoCytomation, United States of America	Detection and amplification system , Novolink, Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK	Ready to use	Steamer – Target Retrieval Solution high pH, Dako, 30 minutes

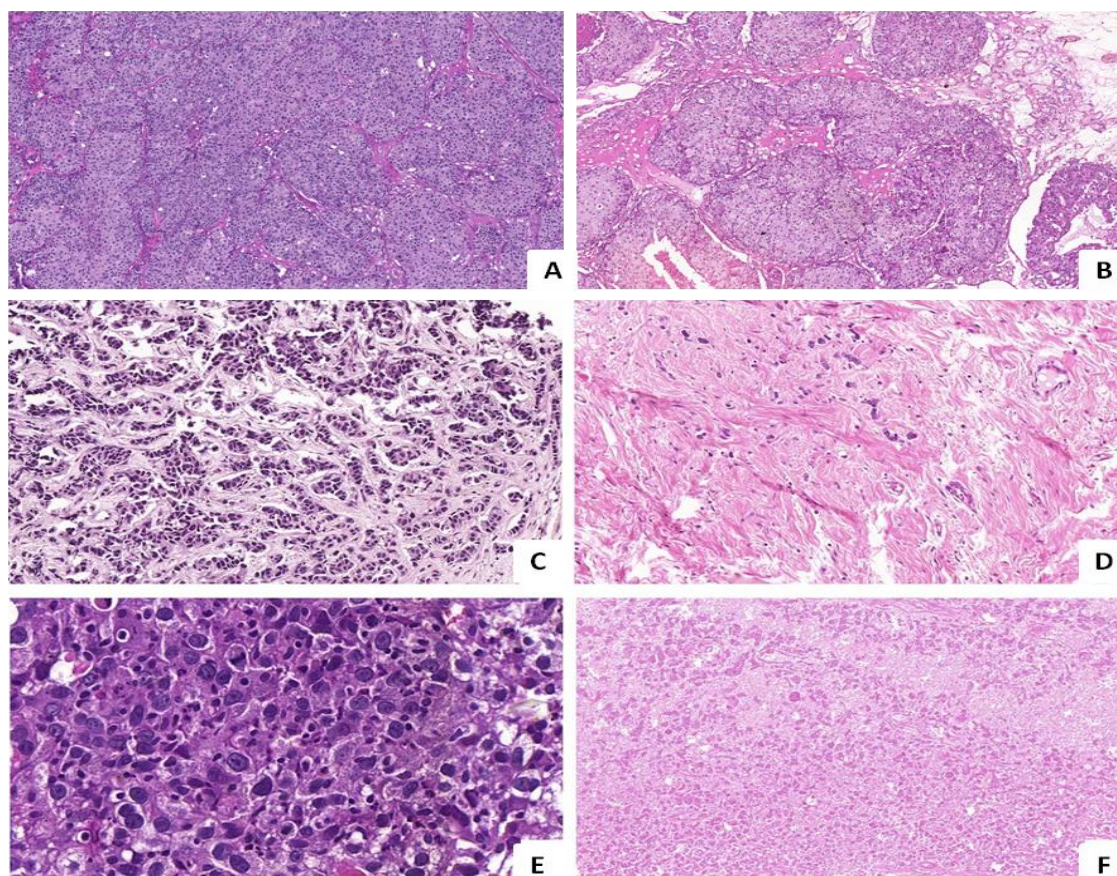


FIGURE 1 - Response to neoadjuvant therapy - Case 31 pre- (A) and post-therapy (B) with 90% of residual cellularity; Case 18 pre (C) and post-therapy (D) with 5 to 10% residual cellularity; and case 19 pre- (C) and post-therapy (D) with pathological complete response.

Table 2: Analysis of 70 invasive mammary carcinomas in groups with pathological complete response (PCR) and pathological partial response to neoadjuvant therapy (PPR)

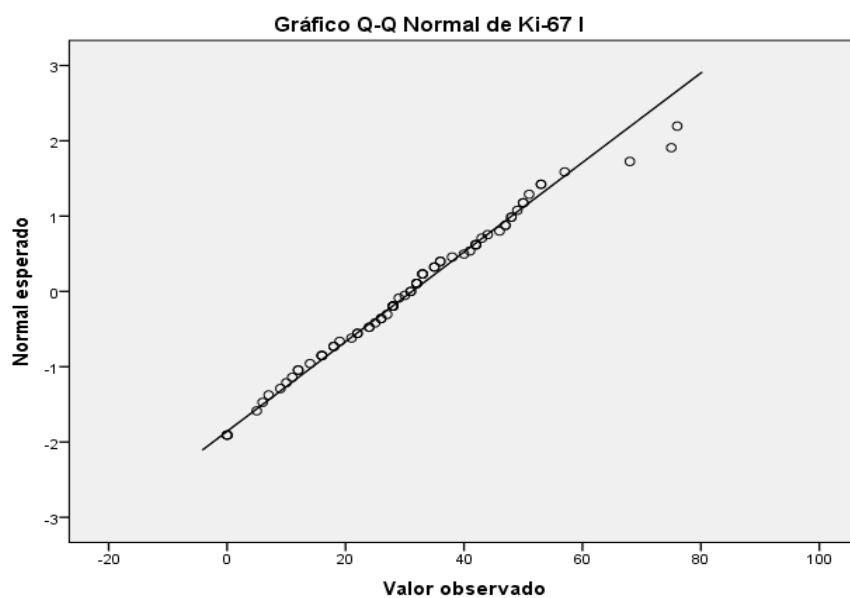
Parameters		PCR N (%) (15 cases)	PPR N (%) (55 cases)	Total (70 cases)	P value
Histological type	Non-special type carcinoma (Ductal NOS)	11 (78,6%)	43 (76,8%)	54 (77,1%)	p = 0,986
	Invasive lobular carcinoma	1 (7,1%)	4 (7,1%)	5 (7,1%)	
	others	2 (14,3%)	9 (16,1%)	11 (15,7%)	
Histological grade	I	0 (0%)	9 (16,4%)	9 (12,9%)	p = 0,081
	II	9 (60%)	18 (32,7%)	27 (38,6%)	
	III	6 (40%)	28 (50,9%)	34 (48,6%)	
Tubular formation	1	0 (0%)	2 (3,6%)	2 (2,9%)	p = 0,245
	2	0 (0%)	7 (12,7%)	7 (10%)	
	3	15 (100%)	46 (83,6%)	61 (87,1%)	
Nuclear Pleomorphism	1	0 (0%)	7 (12,7%)	7 (10%)	p = 0,346
	2	4 (26,7%)	13 (23,6%)	17 (24,3%)	
	3	11 (73,3%)	35 (63,6%)	46 (65,7%)	
Mitotic count	1	8 (53,3%)	22 (40%)	30 (42,9%)	p = 0,073
	2	0 (0%)	15 (27,3%)	15 (21,4%)	
	3	7 (46,7%)	18 (32,7%)	25 (35,7%)	
Inflammatory Infiltrate	0%	0 (0%)	7 (12,7%)	7 (10%)	p = 0,003
	1 to 20%	6 (40%)	39 (70,9%)	45 (64,3%)	
	21 to 50%	8 (53,3%)	9 (16,4%)	17 (24,3%)	
	Over 50%	1 (6,7%)	0 (0%)	1 (1,4%)	
HER2	0 – 1+	10 (66,7%)	46 (83,6%)	56 (80%)	p = 0,301
	2+	1 (6,7%)	1 (1,8%)	2 (2,9%)	
	3+	4 (26,7%)	8 (14,5%)	12 (17,1%)	
Estrogen receptor	Negative	10 (66,7%)	25 (45,5%)	35 (50%)	p = 0,145
	Positive	5 (33,3%)	30 (54,5%)	35 (50%)	
Progesterone receptor	Negative	11(73,3%)	31 (56,4%)	42 (60%)	p = 0,234
	Positive	4 (26,7%)	24 (43,6%)	28 (40%)	
Ki67 index	<20%	4 (26,7%)	13 (23,6%)	17 (24,3%)	p = 0,808
	>20%	11(73,3%)	42 (76,4%)	53 (75,7%)	

N: number of cases; Statistical test: Pearson's chi-square. Statistically significant results highlighted in bold.

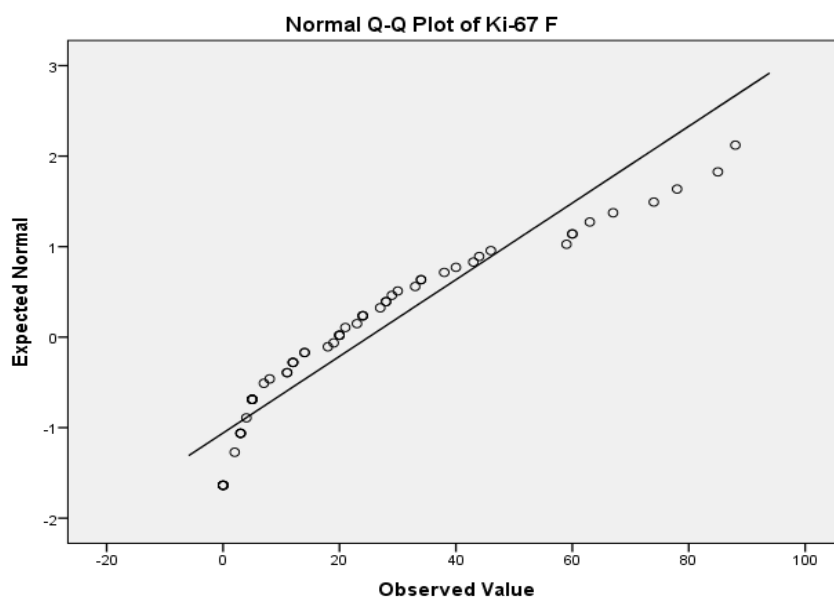
Table 3: Analysis of the 55 IMC in the RPP group, comparing the parameters between the initial samples (pre-therapy) and the residual samples (post-therapy)

Parameters		Pre-therapy N (%)	Post-therapy N (%)	p value
Histological type	Invasive carcinoma of no special type (Ductal NST)	42 (76,4%)	32 (58,2%)	p = 0,024
	Invasive lobular carcinoma	4 (7,2%)	3 (5,5%)	
	others	9 (16,4%)	20 (36,3%)	
Histological grade	I	9 (16%)	3 (5%)	p = 0,153
	II	18 (32%)	18 (33%)	
	III	28 (52%)	29 (53%)	
	Not evaluable	0	5 (9%)	
Tubular Formation	1	2 (3,6%)	2 (4%)	p = 1,000
	2	7 (12,7%)	7 (14%)	
	3	46 (83,7%)	41 (82%)	
Nuclear Pleomorphism	1	7 (12,7%)	0 (0%)	p = 0,105
	2	13 (23,6%)	11 (22%)	
	3	35 (63,7%)	39 (78%)	
Mitotic count	1	22 (40%)	19 (38%)	p = 0,221
	2	15 (27,3%)	7 (14%)	
	3	18 (32,7%)	24 (48%)	
Inflammatory Infiltrate	0%	7 (13%)	7 (12,7%)	p = 0,004
	1 to 20%	39 (71%)	39 (70,9%)	
	21 to 50%	9 (16%)	9 (16,4%)	
	over 50%	0	0 (0%)	
HER2	0 – 1+	46 (83,6%)	47 (85,5%)	p = 1,000
	2+	1 (1,8%)	0	
	3+	8 (14,5%)	8 (14,5%)	
Estrogen receptor	Negative	25 (45,5%)	29 (52,7%)	p = 0,219
	Positive	30 (54,5%)	26 (47,3%)	
Progesterone receptor	Negative	31 (56,4%)	34 (61,8%)	p = 0,508
	Positive	24 (43,6%)	21 (38,2%)	
Ki67 index	<20%	13 (23,6%)		p = 0,004

		27 (49,1%)
>20%	42 76,4%)	28 (50,9%)



Graph 1: Distribution of pre-therapy Ki67 index



Graph 2: Distribution of post-therapy Ki67 index

