

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação Em Patologia**

Marcelo Araújo Buzelin

**IMPACTO DA PADRONIZAÇÃO DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA  
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CÂNCER DE  
MAMA**

Belo Horizonte

2015

Marcelo Araújo Buzelin

**IMPACTO DA PADRONIZAÇÃO DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA  
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CÂNCER DE  
MAMA**

**Versão final**

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

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiana  
Buzelin Nunes

Belo Horizonte

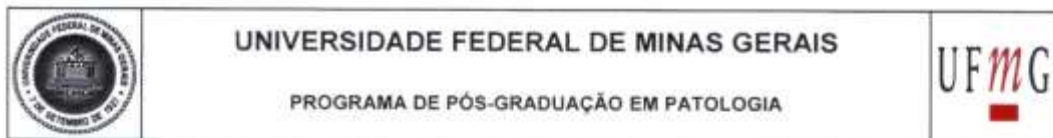
2015

B992i Buzelin, Marcelo Araújo.  
Impacto da padronização da fase pré-analítica na avaliação histológica e Imuno-Histoquímica do Câncer de Mama [manuscrito]. / Marcelo Araújo Buzelin. - - Belo Horizonte: 2015.  
64f.: il.  
Orientador (a): Helenice Gobbi.  
Coorientador (a): Cristiana Buzelin Nunes.  
Área de concentração: Patologia Investigativa.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Imuno-Histoquímica. 2. Receptor ErbB-2. 3. Estrogênios. 4. Receptores de Progesterona. 5. Neoplasias da Mama. 6. Dissertação Acadêmica. I. Gobbi, Helenice. II. Nunes, Cristiana Buzelin. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WX 153

# FOLHA DE APROVAÇÃO



## FOLHA DE APROVAÇÃO

IMPACTO DA PADRONIZAÇÃO DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA AVALIAÇÃO  
HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CÂNCER DE MAMA.

### MARCELO ARAUJO BUZELIN

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 27 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Helenice Gobbi- (Orientadora)  
UFMG



Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Coorientadora)  
UFMG



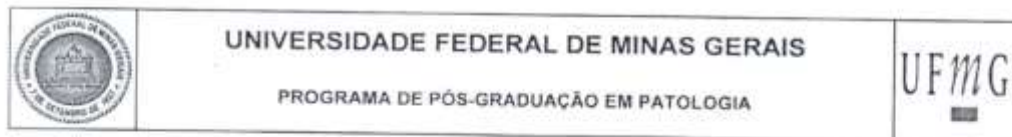
Prof(a). Rafael Malagoli Rocha  
Fundação Antônio Prudente



Prof(a). Marina De Brot Andrade  
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2015.

# ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO

### MARCELO ARAUJO BUZELIN

Realizou-se, no dia 27 de fevereiro de 2015, às 09:00 horas, FMUFMG Sala 340 3 andar, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *IMPACTO DA PADRONIZAÇÃO DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CÂNCER DE MAMA*, apresentada por MARCELO ARAUJO BUZELIN, número de registro 2013656097, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Helenice Gobbi (Orientadora), Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Coorientadora), Prof. Rafael Malagoli Rocha - (Fundação Antônio Prudente), Prof(a). Marina De Brot Andrade (UFMG).

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, 27 de fevereiro de 2015.



Prof(a). Helenice Gobbi (Doutora)



Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Coorientadora)



Prof. Rafael Malagoli Rocha (Doutor)



Prof(a). Marina De Brot Andrade (Doutora)

**À minha família.**

# AGRADECIMENTOS

## Meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora Profa. Dra. Helenice Gobbi, que acreditou que eu seria capaz e depositou sua confiança, amizade, dedicação, ensinamentos e apoio sempre.

À Profa. Dra. Cristiana Buzelin Nunes, sem a qual esse trabalho não seria possível, que me inseriu no meio acadêmico e me permitiu conhecer e conviver com pessoas de tão alto nível intelectual, por me co-orientar e ensinar tanto.

À Dra. Débora Balabram, que se mostrou presente sempre que necessário e colaboração nas análises estatísticas.

A todos os professores e colegas da Pós-Graduação, pelos ensinamentos, colaborações e possibilidade de conhecer novos caminhos.

Ao serviço de Mastologia, em especial à Dra. Fran, Dra Bertha, Dra. Lilian e Dra. Aline pela colaboração na coleta do material para o trabalho.

A todos do serviço de Anatomia Patológica, residentes e funcionários, pela colaboração.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Mamária, pelos momentos de apoio e bons momentos de confraternização.

Aos colegas do Laboratório Instituto Moacyr Junqueira, principalmente aos colegas da técnica: Lena, Letícia e Crislaine pela ajuda, confiança, trabalho e dedicação.

Ao Tio Anísio, e ao primo e padrinho Mauricio, pela credibilidade e confiança.

Ao amigo Abílio pela amizade e incentivo.

Aos meus irmãos Rodrigo, Adriane e Eduardo, pelo respeito, convívio e confiança.

À minha noiva Ariane, pela compreensão, companheirismo, amor e colaboração.

Aos meus pais Sérgio e Rosemary, pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amor.

A toda minha família.

A Deus.

Por todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e torceram por mim, para que esse momento se fizesse possível.

**APOIO FINANCEIRO:** Coordenação Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)



## RESUMO

**OBJETIVOS:** No presente estudo comparamos avaliação histológica e imuno-histoquímica (IHQ) para receptores de estrogênio e progesterona, expressão de HER2 e marcador de proliferação celular ki-67, em amostras de carcinomas mamários invasores com a fase pré-analítica controlada, seguindo as recomendações da ASCO/CAP, com amostras dos mesmos tumores com a fase pré-analítica não controlada.

**MATERIAL E MÉTODOS:** 49 carcinomas mamários invasores foram coletados prospectivamente no bloco cirúrgico do Hospital das Clínicas da UFMG (HC), entre 2011 e 2013, sendo uma amostra do tumor imediatamente retirada e imersa em formol tamponado a 10% e fixada por 08 a 72 horas (Grupo 1, amostra com a fase pré-analítica controlada). O restante da peça foi submerso em formol não tamponado a 10% para avaliação de rotina no serviço de anatomia patológica do HC (Grupo 2, amostra com a fase pré-analítica não controlada). Nas 98 amostras resultantes dos 49 carcinomas foi realizada avaliação histológica (presença de autólise, tipo e grau histológicos) e IHQ para RE, RP, HER2 e Ki-67. Estes marcadores foram interpretados segundo as recomendações atuais.

**RESULTADOS:** Dos 49 casos iniciais, um não apresentou componente invasor do carcinoma nos dois grupos, e foi excluído da análise. As avaliações de autólise e tipo histológico apresentaram resultados significativos estatisticamente. O Grupo 2 apresentou mais casos com autólise (16/48) do que o Grupo 1 (6/48). Na classificação histológica foram identificados mais casos com tipos específicos no grupo 1 (16/48). No Grupo 2 foram identificados mais casos de padrão ductal (38/48). A avaliação da graduação histológica e marcação IHQ para receptores hormonais e HER2 não mostraram diferença estatística significativa. Na marcação para HER2 tivemos variação de marcação nos casos equívocos e negativos: mais casos equívocos no grupo 1 (5/47) do que no grupo 2 (2/47) e mais casos negativos no grupo 2, (39/47) do que no grupo 1 (36/47). Um caso apresentou marcação heterogênea, com marcação 3+ no Grupo 2 e equívoca no Grupo 1. Na avaliação do Ki67 não tivemos diferença significativa quando comparamos as médias de positividade nos dois grupos; porém, quando comparado o nível de corte em 20% para a marcação do Ki67 houve diferença significativa, tendo mais casos acima de 20% no Grupo 2 (21/48) do que no grupo 1 (14/48).

**CONCLUSÕES:** Nosso estudo apresentou diferenças estatisticamente significativas quanto à avaliação histológica e imuno-histoquímica nos dois grupos, nos parâmetros autólise, tipo histológico e na marcação para ki67. O Grupo 2 obteve mais autólise e apresentou mais casos com tipo histológico de padrão ductal. Não houve diferença significativa entre os grupos na graduação histológica e na marcação IHQ para receptores de estrogênio e progesterona e HER2. Na avaliação IHQ para Ki67 tivemos um índice maior de casos considerados como alto índice proliferativo (> 20% das células) no grupo 2 quando comparado com o grupo 1.

Palavras-chave: imuno-histoquímica, HER2, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, Ki67, carcinomas invasores da mama, fator pré-analítico.

## ABSTRACT

**AIMS:** To investigate the influence of preanalytical phase control for assessment of histology and immunohistochemistry (IHC) for estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, HER2 expression and cell proliferation marker Ki67 in samples of invasive mammary carcinomas with the pre-analytical phase controlled, following the ASCO / CAP, with samples of the same tumor with the pre-analytical phase uncontrolled.

**MATERIALS AND METHODS:** 49 invasive mammary carcinomas were prospectively collected from the surgical room of the Hospital das Clínicas, UFMG (HC), between 2011 and 2013, and one tumor sample was immediately sliced and immersed in 10% neutral buffered formalin and fixed for 08-72 hours (Group 1, sample with pre-analytical phase control). The rest of the specimen was submerged in 10% unbuffered formaldehyde for clinical routine evaluation of the HC service of pathology (Group 2, sample with no pre-analytical phase control). In 98 of the 49 samples of carcinomas, histological evaluation (presence of autolysis, histological type and grade) and IHC for ER, PR, HER2 and Ki-67 was performed, and interpreted according to current recommendations.

**RESULTS:** Of the 49 initial cases, one had no invasive component of the carcinoma in both groups, and was excluded from the analysis. Evaluations of autolysis and histological type showed statistically significant results. Group 2 had more cases with autolysis (16/48) than Group 1 (6/48). In histological classification there were more cases with specific types in Group 1 (16/48). In Group 2 we identified more cases of ductal pattern (38/48). The evaluation of histological grading and IHC staining for hormone receptors and HER2 showed no significant statistical difference. HER2 expression had varying staining on equivocal and negative cases: more equivocal cases 2+ in Group 1 (5/47) than in Group 2 (2/47) and more negative cases in Group 2, (39/47) than in Group 1 (36/47). One case showed heterogeneous staining, with overexpression 3+ in Group 2 and equivocal 2+ in Group 1. Ki67 assessment did not have significant difference in the mean positivity in both groups; however, when the cut-off level of 20% for Ki67 was compared there was significant difference, with more cases over 20% in Group 2 (21/48) than in group 1 (14/48).

**CONCLUSIONS:** Our study showed statistically significant differences in histological and immunohistochemical results between both groups as autolysis, histological type and ki67 staining parameters. Group 2 had more autolysis and more cases with histological type of ductal pattern. There was no significant difference between groups in the histological grading and immunohistochemical staining for estrogen and progesterone receptors and HER2. IHC evaluation for Ki67 showed more cases considered as high proliferative index (> 20% of cells) in group 2 compared with group 1.

Keywords: immunohistochemistry, HER2, estrogen receptor, progesterone receptor, Ki67, invasive breast carcinomas, preanalytical factor.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
CAP	Colégio de Patologistas Americanos
CBN	Cristiana Buzelin Nunes
CI 95%	Intervalo de confiança de 95%
COEP	Comitê de ética em pesquisa da UFMG
DDISH	Hibridização <i>in situ</i> por dupla coloração
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
HER2	Receptor Epidérmico Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
TNM	<i>American Joint Committee on Cancer tumor, node and metastasis</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**TABELA 1** – Clone, fabricante e diluição dos anticorpos anti HER2, RE, RP e Ki67.....27

**TABELA 2** – Sistema de escore recomendado para avaliação do HER2 pelo guia ASCO/CAP (2013).....28

**TABELA 3** – Escore para interpretação de imunocoloração para RE E RP, segundo Allred (2010).....28

**TABELA 4** - Análise histomorfológica de 48 carcinomas mamários invasores com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2).....32

**TABELA 5** - Análise do status imuno-histoquímico do HER2 e dos receptores hormonais em carcinomas mamários invasores com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2).....33

**TABELA 6** – Intensidade de marcação para receptores de estrógeno e progesterona com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2)...33

**TABELA 7** - Média percentual de marcação do Ki67, Intervalo de Confiança de 95%.....34

**TABELA 8** - Análise imuno-histoquímica do Ki67 em carcinomas mamários invasores divididos em  $\leq 20\%$  e  $>20\%$  de células marcadas. Fase pré-analítica controlada (grupo 1) e fase pré-analítica não controlada (grupo 2).....34

**FIGURA 1** - Caso 16 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 200X ..... 35

**FIGURA 2** - Caso 17 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 200X .....35

**FIGURA 3** – Caso 44 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 400X.....36

**FIGURA 4** – Casos 21 (A e B), 37 (C e D), 48 (E e F) mostrando tipos histológicos diferentes nos dois grupos. Grupo 1- superior (A, C e E); Grupo 2 - inferior (B, D e F). HE 200X.....36

**FIGURA 5** - Caso 22 mostrando padrões diferentes de marcação dos receptores hormonais. A e B: grupo 1, Receptor de Estógeno e Receptor de Progesterona positivos; C e D: grupo 2, Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona negativos. IHQ, 400X.....37

**FIGURA 6** - Caso 16 mostrando padrões diferentes de marcação do HER2. A: grupo 1, 2+; B, grupo 2, 3+. IHQ, 400X.....37

**FIGURA 7** - Caso 48 mostrando padrões diferentes quanto à marcação do Ki67. A: grupo 1, 17%; B: grupo 2, 28%. IHQ, 400X.....38

**FIGURA 8** - Casos 8 (A e B), 11 (C e D) e 38 (E e F) mostrando marcações diferentes para ki67 nos dois grupos. Grupo 1- superior (A, C e E); Grupo 2 - inferior (B, D e F). IHQ 200X.....38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. FATORES PRÉ-ANALÍTICOS NO ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE MAMA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. RECEPTORES HORMONAIS.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4. HER2.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Ki67 .....</b>	<b>22</b>
<b>1.6. RECOMENDAÇÕES INTERNACIONAIS PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO CÂNCER DE MAMA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. SELEÇÃO DOS CASOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>29</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>51</b>
<b>9.1. ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG.....</b>	<b>51</b>
<b>9.2. ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY .....</b>	<b>52</b>
<b>9.3. ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY .....</b>	<b>53</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. FATORES PRÉ-ANALÍTICOS NO ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE MAMA

O carcinoma mamário é uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais. As estatísticas indicam aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, provavelmente devido ao avanço nos métodos de detecção através de imagem, levando ao diagnóstico precoce da doença (LAKHANI *et al.*, 2012). Em alguns lugares do mundo (América do Norte, Europa Ocidental e Austrália), a mortalidade por câncer de mama está começando a diminuir, provavelmente devido à ação combinada de diagnóstico precoce e terapias adjuvantes mais eficazes (JATOI & MILLER, 2003; VERONESI *et al.*, 2006). No Brasil, o número esperado de novos casos de câncer de mama em 2014 é de 57.120 (INCA, 2014).

Com o advento de novas técnicas para avaliação de fatores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica nas neoplasias malignas, como imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, a importância da qualidade da amostra vem sendo reforçada (GROENEN *et al.*, 2011).

A qualidade do exame anatomopatológico e de testes moleculares envolvem as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica envolve a fixação do material (tempo de fixação, tempo de isquemia fria e tipo de fixador) e processamento do material. A fase analítica compreende as técnicas utilizadas para a realização da reação, enquanto a fase pós-analítica inclui a interpretação do material e quantificação das reações pelo médico patologista. Todas as etapas são importantes e há grande variação nas metodologias empregadas pelos diferentes laboratórios. Alterações em qualquer uma destas fases poderão influenciar resultados de ensaios clínicos para testes de medicamentos, ou influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente (GOWN, 2008; WOLFF *et al.*, 2007; ROSS *et al.*, 2007; KHOURY *et al.*, 2009; HAMMOND *et al.*, 2010; LEONG *et al.*, 2010).

Os fatores pré-analíticos, incluindo tempo de isquemia fria, tempo de fixação e tipo de fixador, quando não aplicados são importantes como critério de exclusão para a interpretação da reação (HAMMOND, *et al.*, 2003; HAMMOND *et al.*, 2011; RHODES, *et al.*, 2002, WOLFF, *et al.*, 2007; WOLFF, *et al.*, 2013). Há necessidade de padronizar estes parâmetros, com o intuito de desenvolver métodos de procedimento e processamento do material. Estas variáveis podem afetar a qualidade do material para os testes de biomarcadores e análise molecular. É recomendado fixar o material em formol tamponado diluído a 10% por 6 a 72 horas. O tempo entre a retirada do material e a imersão em formol tamponado, e o tempo de fixação do material devem ser anotados e incorporados à requisição do exame (HAMMOND *et al.*, 2011; WOLFF, *et al.*, 2007; WOLFF, *et al.*, 2013).

A demora excessiva no tempo entre a retirada do material até a sua imersão no fixador (tempo de isquemia fria), pode agir negativamente na análise de testes de receptores hormonais e do HER2 (JUHL H, 2010). O tempo de isquemia superior a 60 e 120 minutos pode comprometer a acurácia na análise IHQ e de métodos de hibridização *in situ*, devido à perda de marcação ou de intensidade do sinal hibridizado. Alguns tumores com tempo de isquemia fria excessivo poderiam ser falsamente classificados como negativos para a expressão de importantes alvos terapêuticos (APPLE *et al.*, 2011; KHOURY *et al.*, 2009; KHOURY *et al.*, 2012; PORTIER *et al.*, 2013).

O propósito da fixação é preservar a amostra de material biológico (tecidos ou células) o mais próximo do seu estado natural *in vivo* nos processos de preparação do tecido para exame. Para atingir esta meta, diversas condições devem ser encontradas: a) o fixador deve atuar desabilitando biomoléculas intrínsecas – particularmente enzimas proteolíticas, as quais de outra maneira digeririam ou danificariam a amostra; b) o fixador deve proteger a amostra de dano extrínseco. Fixadores são tóxicos para a maioria dos microorganismos comuns (bactérias em particular) os quais podem existir em amostras de tecido ou podem colonizar o tecido fixado; c) alguns fixadores alteraram quimicamente o material fixado e torná-lo menos susceptível (tanto indigerível como tóxico) à ação de microorganismos oportunistas.; d) os fixadores também devem aumentar a resistência mecânica ou estabilidade celular. Este aumento de resistência e rigidez pode ajudar a preservar a morfologia (forma e estrutura) da amostra quando esta é processada para análises posteriores (OYAMA *et al.*, 2007).

Os fixadores evitam o processo de digestão celular pelas enzimas da própria célula chamado de autólise. Quando há autólise, cessa a produção de energia e as sínteses celulares, os



lisossomos perdem a capacidade de conter as hidrolases no seu interior que saem para o citosol e são ativadas pelas altas concentrações de calcio no citoplasma. No processo de autólise, as células perdem o contato com a matriz extracelular, sofrendo alterações na sua morfologia e na adesão celular. Quando há autólise após a morte celular em organismo vivo, esta é chamada de necrose (PEREIRA, 2011).

Os fixadores, por outro lado, frequentemente atuam nas células ou nos tecidos a nível molecular. Eles podem alterar o tecido e introduzir artefatos que podem interferir na interpretação da estrutura celular (NAMIMATSU *et al.*, 2005). A padronização da fixação e do processamento dos tecidos deve ser considerada na tentativa de minimizar estes artefatos, minimizando as alterações celulares causadas pela fixação. A padronização deve tentar estabelecer quais procedimentos introduzem artefatos com menor repercussão nos diagnósticos e testes moleculares (PARKER *et al.*, 2002; NONOGAKI *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2007; Yaziji & Taylor, 2007, Yaziji *et al.*, 2008; KHOURY *et al.*, 2009; HAMMOND *et al.*, 2010; TRISHE *et al.*, 2010).

É descrito que o formol produz grupos de hidroximetil em aminoácidos que fazem reação cruzada com proteínas e grandes moléculas necessárias para a reação imuno-histoquímica. Além disso, a proteólise geralmente causa ligações inespecíficas com moléculas não relacionadas. O formol pode romper pontes de hidrogênio e outras interações eletrostáticas que afetam a configuração das proteínas, aumentando, posteriormente, a possibilidade de alterações importantes nos alvos terapêuticos (KHOURY *et al.*, 2009; KHOURY *et al.*, 2012). Outros aspectos no processo de fixação, incluindo o pH e a temperatura, apresentam impacto na preservação antigênica. O pH do formol afeta o tipo de ligação cruzada que pode ocorrer. Em formol tamponado a 10%, os sítios de hidrogênio nas moléculas estão disponíveis para ligação, já que eles se encontram em estado neutro (não carregado). A diminuição do pH induz a formação de grupos amina carregados ( $\text{NH}_3^+$ ) que não apresentam sítios reativos de hidrogênio e favorecem interações com grupos amido ( $\text{CO-NH}_2$ ) (LEONG *et al.*, 2010).

O formol parece ser uma substância continuamente ativa e a fixação efetiva resulta da formação de ligações cruzadas entre grupos periféricos de proteínas que incluem amina, imina, amida, peptídio, guanidil, hidroxil, carboxil, SH, e anéis aromáticos. É descrito que a intensidade de marcação de vários tipos de antígenos varia inversamente com o tempo de exposição ao formol (LEONG *et al.*, 2010). A preocupação com o tempo de fixação do tecido

levou a estudos prospectivos de validação que compararam os resultados de testes de RE, RP e HER2 em tecidos fixados por um tempo padronizado com tecidos da mesma amostra que sofreram um tempo de fixação prolongado (de 72 a 96 horas). Os resultados destes estudos sugerem que o tempo de fixação em formol por até 72 horas não altera a reatividade de RE, RP e HER2, sendo assim, aceito como limite superior de tempo na prática clínica. A imunorreatividade dos marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama como o RE, RP e HER2 pode ser reduzida por fixação em formol por tempo muito longo (TONG *et AL.*, 2011).

## **1.2. FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA**

Consideram-se fatores prognósticos em câncer de mama as características clínicas das pacientes e os aspectos patológicos e biológicos dos tumores que permitem prever a evolução clínica da doença ou sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico inicial, não relacionados a tratamento. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas que são utilizadas para estimar a probabilidade de resposta a um tipo particular de terapia adjuvante. Pode existir superposição entre os fatores prognósticos e preditivos, e uma proporção deles exhibe ambas as características, apesar de uma delas geralmente predominar. Um marcador prognóstico deve ser validado tecnicamente, ter significado estatístico comprovado por testes clínicos e influenciar na decisão clínica (ALLRED *et al.*, 1998; FITZGIBBONS *et al.*, 2000; GOBBI *et al.*, 2008).

Os marcadores prognósticos primários em câncer de mama são aqueles determinados pelo exame clínico da paciente e exame anatomopatológico rotineiro do tumor. Os fatores prognósticos no câncer de mama incluem variáveis prognósticas tempo-dependentes e variáveis prognósticas biológicas, além de variáveis relacionadas às pacientes tais como idade e status menopausal. As variáveis prognósticas tempo-dependentes incluem o tamanho tumoral, o status linfonodal e a presença de metástase à distância. Estas variáveis constituem os três componentes do sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer tumor, node and metastasis* (TNM) (EDGE *et al.*, 2010). O status linfonodal e o tamanho tumoral são os principais componentes de outros algoritmos prognósticos como o *Adjuvant!Online* (MOOK *et al.*, 2009), guias como o *St. Gallen guidelines* (GOLDHIRSH *et al.*, 2009), e índices como o *Nottingham Prognostic Index* (GALEA *et al.*, 1992), utilizados

atualmente para determinar o comportamento tumoral e definir a utilização de terapia sistêmica para o carcinoma mamário inicial.

As variáveis prognósticas biológicas são características primárias dos tumores que determinam o comportamento tumoral e a resposta à terapia. Diversos trabalhos demonstraram a importância prognóstica da classificação e graduação dos tumores de mama (ELSTON & ELLIS, 1991; PAGE *et al.*, 1998). A graduação histológica dos tumores mamários considera a capacidade de diferenciação estrutural e nuclear das células. O sistema de graduação mais utilizado na atualidade é o proposto por SCARFF, BLOOM E RICHARDSON em 1957 e modificado por Elston e Ellis (ELSTON & ELLIS, 1998). As variáveis biológicas são identificadas através dos achados morfológicos, tais como diferenciação da lesão (tipo histológico e grau do tumor), índice proliferativo, índice de crescimento e parâmetros moleculares como o acesso ao status gênico/proteico (expressão de biomarcadores e perfil molecular ao nível de DNA, RNA ou proteico).

Fatores preditivos são considerados ferramentas essencialmente importantes para medicina personalizada na conduta de terapias alvo. (GRAMOND *et al.*, 2014).

O câncer de mama possui marcadores preditivos específicos rotineiramente utilizados para prever resposta terapêutica e orientar o tratamento. Estes marcadores são também fundamentais para categorizar pacientes em diferentes grupos prognósticos, quando combinados com os dados anatomopatológicos. Numerosos marcadores moleculares foram exaustivamente estudados nos últimos anos através da imuno-histoquímica (GOBBI *et al.*, 2008, ROCHA *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2008). No entanto, apenas os receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2) estão bem estabelecidos como fatores preditivos de resposta terapêutica, de forma que sua avaliação tornou-se rotineira na seleção de pacientes para tratamentos específicos (FITZGIBBONS *et al.*, 2000; GOBBI *et al.*, 2008; GOLDBIRSCH *et al.*, 2009; LAKHANI *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2008; WALKER *et al.* 2008). Pacientes com tumores positivos para RE e RP podem ser beneficiadas pelo tratamento com moduladores dos receptores estrogênicos e com inibidores de aromatase. O RE é provavelmente o marcador preditivo mais poderoso na conduta clínica do câncer de mama, tanto na determinação do prognóstico, quanto para prever a resposta à hormonioterapia (PAYNE *et al.*, 2008). Pacientes com tumores que superexpressam HER2 podem ter aumento da sobrevida e do tempo livre de doença, quando tratados com o anticorpo monoclonal

humanizado anti-HER2 ou trastuzumab isoladamente ou combinado com quimioterapia ou outros medicamentos anti-HER2 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009). Além destes, outros marcadores têm sido avaliados pela IHQ, incluindo o Ki-67, p53, marcadores vasculares, dentre outros (WOLFF *et al.*, 2007; PAYNE *et al.*, 2008; SALLES *et al.*, 2009; LAKHANI *et al.*, 2012).

Os fatores moleculares prognósticos e preditivos tradicionais em carcinoma mamários são considerados essenciais no acompanhamento clínico das pacientes com carcinoma mamário e são determinados rotineiramente utilizando técnicas e guias de recomendações bem estabelecidos (HAMMOND *et al.*, 2011; WOLFF *et al.*, 2007, WOLFF *et al.*, 2013). É atualmente reconhecido que a principal consideração para decisão terapêutica é a resposta endócrina. A terapia endócrina é responsável por quase dois terços do benefício global da terapia adjuvante em pacientes com receptores hormonais positivos. A terapia hormonal é a terapia primária em tumores de baixo risco, positivos para receptores hormonais (responsivos a hormonioterapia), enquanto a hormonioterapia associada à quimioterapia é utilizada em tumores de alto risco (resposta hormonal incerta). A quimioterapia isolada é utilizada apenas para tumores negativos para receptores hormonais, não responsivos a hormonioterapia (EBCTCG, 2005).

### **1.3. RECEPTORES HORMONAIS**

Os receptores hormonais exercem seus efeitos fisiológicos de regulação da proliferação e diferenciação do epitélio mamário normal através da ligação aos receptores de estrógeno, que são membros da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição induzidos por ligante.

O status do receptor de estrógeno tem sido utilizado desde 1970 na clínica do carcinoma mamário como indicador de resposta à terapia hormonal e como fator prognóstico de recorrência.

O RE representa um forte marcador preditivo a terapias hormonais, quando positivo o uso de Tamoxifeno é recomendado e se mostra significativamente importante na sobrevida das pacientes beneficiadas. A positividade para RE também têm se mostrado efetiva na resposta

clínica a novos tipos de terapias hormonais como os inibidores de aromatase que suprimem a produção de estrogênio.

Receptores de progesterona são membros de fatores de transcrição ativados por ligante da família de receptores nucleares esteróides. O receptor de progesterona é regulado pelo estrógeno e sua expressão é conhecida por indicar uma via funcionante do receptor de estrógeno.

Embora a expressão do RP ser altamente correlacionada com a expressão do RE, essa correlação é imperfeita resultando em quatro tipos de fenótipos de expressão combinados possíveis, sendo cada um com diferentes índices de resposta terapêutica hormonal considerada (ALLRED, 2010).

Aproximadamente 40% dos tumores RE positivos são RP negativos. A ausência de expressão para RP em tumores RE positivos pode ser um marcador de sinalização aberrante do fator de crescimento que poderia contribuir para a resistência ao tamoxifeno. Tumores RE positivos/RP negativos são geralmente menos responsivos do que tumores RE positivos/RP positivos à hormonioterapia (ARPINO *et al.*, 2005). O status do RP pode ajudar a prever resposta ao tratamento hormonal em pacientes com doença metastática como tratamento adjuvante (REGAN *et al.*, 2006; DOWSETT *et al.*, 2006).

No câncer de mama, a presença de RE e RP é investigada rotineiramente como indicador de terapia hormonal e como marcador prognóstico da doença. (GOBBI *et al.*, 2008, YAZIJI *et al.*, 2008).

#### **1.4. HER2**

O gene *HER2* (*c-erbB-2* ou *HER2-neu*) é um análogo humano do gene *neu* identificado em neuroblastomas de rato. O proto-oncogene *HER2* está localizado no cromossomo 17 e codifica uma glicoproteína transmembrana de 185 kd, com atividade tirosina-quinase. O receptor *HER2* é um dos quatro membros da família dos fatores de crescimento epidérmico: *EGFR* (*HER1* ou *erbB1*), *HER2* (*erbB2*), *HER3* (*erbB3*) e *HER4* (*erbB4*) e está associado com proliferação, diferenciação, adesão e motilidade celular, progressão tumoral, metástases

regionais ou a distância, angiogênese e redução de apoptose (ROSS, 2009). As células normais e a maioria dos carcinomas de mama apresentam duas cópias do gene *HER2* no cromossomo 17 e expressam baixos níveis de p185 (proteína HER2) na membrana celular. A amplificação do gene *HER2* ou a superexpressão da proteína ocorre em cerca de 20% a 30% dos carcinomas mamários invasores em seres humanos, mais comumente ductais de alto grau histológico e têm relação com pior evolução clínica. A amplificação do gene ou a superexpressão da proteína são considerados fatores preditivos de resposta terapêutica ao trastuzumab (Herceptin) e lapatinib e à resistência de quimioterapia usual e terapia endócrina hormonal (SLAMON *et al.*, 1987; GOBBI *et al.*, 2008).

A superexpressão proteica de HER2 na mama tem sido relatada em 40-60% dos carcinomas ductais *in situ* e em 15-20% dos carcinomas invasores (variando de 5-55%, média de 26%). Nos carcinomas mamários, a superexpressão proteica está associada à amplificação gênica do HER2 em 90% dos casos. Os tumores positivos para superexpressão ou amplificação do HER2 são mais comumente de grau histológico intermediário ou alto, mais frequentemente são negativos para receptores de estrogênio e progesterona, e apresentam metástase linfonodal ao diagnóstico inicial. (BÁNKFALVI, *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013)

Nos últimos anos, a análise do status do HER2 se tornou ainda mais importante após aprovação pelo *Food and Drug Administration (FDA)* de tratamentos alvo-específicos: trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>), lapatinib (Tykerb<sup>TM</sup>), pertuzumab (Perjeta<sup>TM</sup>). Mais recentemente, foi aprovado pelo *FDA* a quarta droga contra o HER2, trastuzumab-maytansine (Kadcyla<sup>TM</sup>), também conhecida como T-DM1. (MILES *et al.*, 2001; ROSS *et al.*, 2009; SHA e CHEN, 2010; SLAMON *et al.*, 1987; WOLFF *et al.*, 2013).

Segundo os guias de recomendações do teste do HER2 em câncer de mama feito pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology-ASCO*) e Colégio de Patologistas Americanos (*College of American Pathologists-CAP*) em 2007 e 2013, o status do HER2 deve ser avaliado em todo carcinoma invasor primário da mama, no momento do diagnóstico, da recorrência, e na eventual metástase, utilizando os testes de IHQ ou ISH (WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013).

## 1.5. Ki67

O Ki-67 é uma proteína nuclear associada com RNA ribossomal de transcrição, necessária para ocorrer proliferação celular.

A marcação para Ki-67 foi observada pela primeira vez em 1991 por GERDES e colaboradores através da técnica de imuno-histoquímica identificada como uma proteína nuclear não-histona, detectadas nas células em proliferação, assim nomeada em razão de sua identificação na cidade de Kiel, (Ki) Alemanha, e por ter sido o 67º clone das 96 placas de células de camundongo infectadas pela linhagem L428 de células de Linfoma de Hodgkin. (YAMOTO *et al.*, 2013)

A inativação do antígeno Ki-67 leva à inibição da síntese de RNA ribossomal. O Ki-67 está presente em todas as fases ativas do ciclo celular e ausente quando as células estão em repouso, sendo usado como marcador imuno-histoquímico de proliferação celular. Este marcador vem sendo cada vez mais utilizado em painéis de imuno-histoquímica para fatores prognósticos do câncer de mama. A marcação do índice de proliferação celular e o número de mitoses estão diretamente relacionados com o crescimento de tumores, assim sendo, quanto maior o índice proliferativo, mais rápida a evolução tumoral. (YERUSHALMI *et al.*, 2010). Análises multivariadas de sobrevivência mostraram que ki67, tamanho tumoral e status linfonodal eram fatores prognósticos independentes para sobrevivência no câncer de mama (KNUTSVIK *et al.*, 2014). Além disso, tumores que apresentam receptores hormonais positivos e com alto índice proliferativo tem mostrado melhor resposta terapêutica ao se adicionar docetaxel ao tratamento quimioterápico adjuvante (PENAULT-LLORCA *et al.*, 2009).

As divergências relacionadas ao ponto de corte (*cut-off*) para avaliação prognóstica do Ki67, vem sendo discutidas na última década no intuito de se estabelecer o parâmetro ideal para que se defina o que será considerado e tratado como alto e baixo índice proliferativo nas células tumorais do câncer de mama. Em conferência realizada em 2013 em Saint Gallen, Suíça, foi indicado o score de > 20% de células tumorais marcadas pelo Ki-67, contagem feita em 200 células na área quente (*hot spot*) do tumor, como sendo considerado alto índice proliferativo (UNTCH *et al.*, 2013).

## **1.6. RECOMENDAÇÕES INTERNACIONAIS PARA ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO NO CÂNCER DE MAMA**

Segundo os guias de recomendações para a avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona e do HER2, da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e do Colégio Americano de Patologistas, os parâmetros da fase pré-analítica considerados ideais são: a) O tempo de isquemia fria para fixação do tecido deve ser tão curto quanto possível. Amostras para RE e RP deverá ser fixadas em formol tamponado a 10% entre 6 a 72 horas. b) As amostras devem ser cortadas em espessuras de 5mm após a inspeção macroscópica adequada e marcação das margens e colocadas em volume suficiente de formol tamponado para permitir a penetração adequada nos tecidos. c) Se a amostra estiver em local longe do laboratório, deve ser seccionado logo após a sua retirada e enviado para o laboratório imerso em volume suficiente de formol tamponado a 10%. d) O tempo de isquemia fria, o tipo de fixador, e o tempo de fixação em formol tamponado a 10%, devem ser registrados. e) O armazenamento de lâminas após secção dos blocos de parafina por tempo superior a seis semanas antes da realização da técnica de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* não é recomendada (ASCO/CAP) (HAMMOND *et al.*, 2010; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013).



## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

No Brasil, a fase pré-analítica do exame anátomo-patológico e imuno-histoquímico das reações geralmente não é padronizada na maioria dos laboratórios, mesmo existindo recomendações internacionais como as da ASCO/CAP. Achamos importante realizar estudo sobre o impacto da padronização da fase pré-analítica na avaliação histológica e imuno-histoquímica do câncer de mama.

Nossa hipótese é que o uso de formol tamponado, redução do tempo entre retirada do espécime e clivagem e imersão em formol (redução do tempo de isquemia fria) podem contribuir para a melhora das avaliações rotineiras e de marcadores prognósticos e preditivos.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

2.1 Comparar os diagnósticos histológicos (autólise, classificação e graduação) de amostras de carcinomas mamários com a fase pré-analítica controlada seguindo as recomendações da ASCO/CAP, com amostras dos mesmos casos, com a fase pré-analítica não controlada;

2.2 Comparar os resultados da avaliação imuno-histoquímica de receptores hormonais (RE e RP), oncoproteína HER2 e Ki67 em amostras de carcinomas mamários com a fase pré-analítica controlada usando as recomendações da ASCO/CAP com amostras dos mesmos casos, com a fase pré-analítica não controlada;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. SELEÇÃO DOS CASOS**

Trata-se de estudo prospectivo tipo caso-controle.

Neste trabalho foram utilizados 49 casos de carcinomas mamários invasivos sem tratamento prévio (quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia), operados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e examinados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, no período de 2011 a 2013. O número de casos foi calculado baseado no volume de cirurgias de câncer de mama do HC-UFMG nos anos anteriores. De cada caso foram obtidas duas amostras de tumor e separado para o estudo: uma com a fase pré-analítica controlada e outra com a fase pré-analítica não controlada, totalizando 98 amostras. Um caso foi excluído por não apresentar componente invasor nos dois grupos nas amostragens sequenciais.

As cirurgias de mastectomia e setorectomia para tratamento de câncer de mama no HC-UFMG foram comunicadas aos integrantes do estudo com antecedência. O exame da peça era realizado a fresco, logo após o procedimento cirúrgico de exérese do material. Um fragmento representativo do tumor era retirado da peça cirúrgica e inserido em formol tamponado diluído a 10% com tempo de isquemia fria inferior a uma hora. A data e os horários da exérese do tumor, da sua clivagem e imersão no formol tamponado a 10% eram registrados em planilha. Estas amostras foram consideradas como fase pré-analítica controlada e incluídas ao Grupo 1 do estudo.

O restante da peça cirúrgica de cada caso era recomposta. Após a clivagem feita pelo patologista era imersa em formol não tamponado a 10% e posteriormente avaliada macroscopicamente na rotina do laboratório em tempo variável de 24 a 72 horas após a exérese cirúrgica. A data e os horários da macroscopia e tempo de imersão em formol foram registrados. Esta amostra foi considerada como fase pré-analítica não controlada e considerada o Grupo 2 do nosso estudo.

### 3.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foi realizada a avaliação histológica e imuno-histoquímica das 98 amostras (49 amostras com fase pré-analítica controlada e 49 amostras com fase pré-analítica não controlada). Os casos foram classificados e graduados histologicamente usando os critérios propostos pela nova classificação de tumores da mama da Organização Mundial da Saúde (LAKHANI *et al.*, 2012). Para melhor avaliação estatística desta pequena amostra, resolvemos dicotomizar o tipo histológico em ductal (padrão ductal único ou misto com outros subtipos) e outros (subtipos puros ou em mais de 90% da amostra). O grau histológico foi baseado na formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico, todos graduados de I a III, e o grau histológico final, adquirido após a soma destes parâmetros.

As alterações celulares morfológicas, nucleares, citoplasmáticas ou membranares, foram chamadas de autólise. Estas alterações foram avaliadas em: ausente e presente. Autólise foi considerada ausente quando a morfologia celular estava preservada; e presente quando havia contração e condensação nuclear, acidose citoplasmática, alterações nucleares, perda da coesão e adesão celular, alterações importantes na morfologia.

### 3.3. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram avaliados os receptores hormonais, a superexpressão da proteína HER2, e a marcação para Ki67, utilizando anticorpos monoclonais/policlonais especificados na Tabela 1. As reações imuno-histoquímicas para receptores de estrogênio e progesterona, Ki67 e HER2 foram realizadas utilizando-se o método de polímeros não biotilado. Para os receptores hormonais utilizou-se o Kit PharmaDX (Dako Cytomation) para Ki67 foi utilizado o Kit EnVision Plus (Dako Cytomation) e a marcação para HER2 foi utilizado o Kit HercepTest, (Dako Cytomation). As reações foram realizadas *in house* em protocolo padronizado no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, seguindo as recomendações dos fabricantes.

Os casos foram examinados por uma patologista com experiência em imuno-histoquímica (CBN).

A análise da superexpressão da proteína HER2 foi baseada no guia de recomendação da ASCO/CAP para HER2 de 2013 (WOLFF *et al.*, 2013), tabela 2.

Os critérios empregados para análise imuno-histoquímica dos receptores hormonais foram baseados no guia de recomendação da ASCO/CAP (HAMMOND *et al.*, 2010), onde a marcação >1% das células neoplásicas é considerada como resultado positivo. Os casos foram também semi-quantitativamente e qualitativamente avaliados para RE e RP segundo Allred, 2010, 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 200 células (CURIGLIANO *et al.*, 2013; UNTCH *et al.*, 2013; YERUSHALMI *et al.*, 2010).

TABELA 1- Clone, fabricante e diluição dos anticorpos anti HER2, RE, RP e Ki67:

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
HER2	A0485 (HercepTest™)	Dako Cytomation, United States of America	Pronto para uso
RE	1D5 (PharmaDX™)	Dako Cytomation, United States of America	Pronto para uso
RP	PGR1294 (PharmaDX™)	Dako Cytomation, United States of America	Pronto para uso
Ki67	MIB1	Dako Cytomation, United States of America	1:100

TABELA 2 - Sistema de escore recomendado para avaliação do HER2 pelo guia ASCO/CAP (2013):

<b>Escore de interpretação</b>	<b>Achado microscópico</b>
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 incompleta e/ou fraca/moderada envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática $> 10\%$ das células neoplásicas ou completa, forte, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em $\leq 10\%$ das células neoplásicas.
3+ POSITIVO	Coloração completa, forte, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em $>10\%$ das células neoplásicas.

TABELA 3 - Escore para interpretação de imunocoloração para RE E RP, segundo Allred (2010):

<b>Intensidade da Imunorreatividade</b>	<b>Escore</b>	<b>Proporção de reatividade</b>	<b>Escore</b>
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

<b>Soma dos escores de proporção e intensidade</b>	
<b>Escore total</b>	<b>Interpretação</b>
0 -2	Negativo
3 -8	Positivo

### **3.4. ASPECTOS ÉTICOS**

Este trabalho é parte de um estudo 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: nº. ETIC 0297.1.203.000-10.

## **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para analisar as diferenças entre as variáveis categóricas de cada grupo (como tipo histológico e positividade de marcadores) foi usado o teste qui-quadrado de MecNemar Bower. Para analisar as variáveis contínuas foi utilizado o teste de t de student. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Caracterização da amostra: Quanto à lateralidade, houve distribuição semelhante em ambas as mamas, sendo 25 casos na mama direita (51%) e 23 casos na mama esquerda (46,9%). Dois casos estavam sem anotação quanto a lateralidade. O tamanho do tumor variou de 0,5 a 10,0 cm, com média de 3,0 cm no maior eixo. O tempo de isquemia fria foi considerado igual para os dois grupos e variou de 30 a 90 minutos, com média de 44 minutos.

Os achados referentes à presença de autólise, tipo de grau histológicos dos tumores, formação tubular, pleomorfismo nuclear, índice mitótico encontram-se na tabela 4 e figuras 1, 2 e 3. Ambos os grupos mostraram autólise no tecido. O grupo 2 mostrou 10 casos a mais de autólise do que o grupo 1, sendo este achado considerado estatisticamente significativo ( $p = 0,02$ ).

Realizamos comparação entre tamanho do tumor, tipo de espécime (mastectomia ou setorectomia) e peso do espécime, não sendo identificadas diferenças significativas que explicassem a autólise.

A classificação histopatológica dos tumores realizados nos casos com e sem padronização da fase pré-analítica mostrou diferença significativa no tipo histológico ( $p = 0,03$ ). O grupo 1 identificou 6 casos a mais de tipos histológicos invasores puros do que o grupo 2. Estes casos incluíram tipos lobular, colóide, micropapilar, com características medulares e com diferenciação apócrina (Figura 4).

Nossos achados mostraram variação na graduação histológica dos tumores entre os dois grupos. Sete casos classificados como grau 2 no grupo 1 passaram para grau 1 no grupo 2, e cinco casos grau 2 do grupo 1 passaram para grau 3 no grupo 2. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à formação tubular ( $p = 0,10$ ), pleomorfismo celular ( $p = 0,250$ ), índice mitótico ( $p = 0,51$ ) e grau histológico final ( $p=0,08$ )

A tabela 5 mostra os resultados da avaliação IHQ para RE, RP e HER2. Para a análise dos resultados dos receptores hormonais, a positividade foi baseada no guia de recomendações da ASCO/CAP e foram avaliados também a intensidade e porcentagem de marcação nuclear segundo Allred. Houve diferença de marcação para receptor de estrógeno em apenas um caso, que foi positivo no grupo 1 e negativo no grupo 2. Esta diferença não foi significativa ( $p = 1$ ). Para o receptor de progesterona, três casos que eram negativos no grupo 1 positivaram no grupo 2, e um caso que era positivo no grupo 1 negativo no grupo 2. Esta diferença não foi significativa ( $p = 1,0$ ). Um caso foi positivo para RE e RP no grupo 1 e negativo para os dois marcadores no grupo 2, esse resultado poderia mudar o tratamento da paciente (Figura 5). Dois casos foram excluídos da avaliação para ER, um caso para RP e um caso HER2 por não mostrar componente invasivo residual no bloco. Comparamos ainda, a intensidade e porcentagem de marcação IHC em ambos os grupos, sem resultado estatisticamente significativo (TABELA 6).

O grupo 2 mostrou mais casos HER2 negativos (0 - 1+) (39/47) em relação ao grupo 1 (36/47). O status equívoco do HER2 (2+) foi mais freqüente no grupo 1 (5/47) do que no grupo 2 (2/47). Os tumores equívocos do grupo 1 não mostraram amplificação do gene, por hibridização in situ de dupla marcação (DDISH) (dados não mostrados). Estatisticamente, estes resultados não foram significativos; no entanto, houve um caso com superexpressão de HER2 (3+) no grupo 2, e equívoco no grupo 1 (2+) que não foi amplificado por DDISH. Este caso mostrou uma marcação heterogênea na lâmina e poderia ser um resultado falso-positivo, sem resposta a terapia alvo para HER2. Houve outro caso com marcação 3+ no grupo 1 que teve interpretação 2+ no grupo 2. Neste caso não foi realizado DDISH.

As tabelas 7 e 8 mostram os resultados da marcação do Ki67. A média do percentual de marcação dos casos para o Ki67 no grupo 1 foi de 20,75% e no grupo 2 foi de 23,98% (tabela 2). Não houve diferença estatisticamente significativa nesta média de marcação entre os grupos para Ki67. Entretanto, a avaliação do Ki67 baseada no corte de 20% de marcação, mostrou ser significativa entre os grupos ( $p = 0,02$ ). Houve maior marcação para o Ki67 no grupo 2 (21/48) (Figura 3).



TABELA 4: Análise histomorfológica de 48 carcinomas mamários invasores com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2)

Características		Grupo 1	Grupo 2	Teste Estatístico: $\chi^2$
		N (%)	N (%)	valor de p
Autólise	ausente	42 (87,5%)	32 (66,7%)	<b>p = 0,02</b>
	presente	6 (12,5%)	16 (33,3%)	
Tipo Histológico	ductal	32 (66,7%)	38 (79,2%)	<b>p = 0,03</b>
	outros	16 (33,3%)	10 (20,8%)	
Grau Histológico	I	9 (18,8%)	15 (31,2%)	p = 0,08
	II	26 (54,2%)	18 (37,6%)	
	III	13 (27,0%)	15 (31,2%)	
Formação Tubular	1	2 (4,2%)	3 (6,2%)	p = 0,10
	2	16 (33,3%)	21 (43,8%)	
	3	30 (62,5%)	24 (50,0%)	
Pleomorfismo Nuclear	1	4 (8,3%)	5 (10,4%)	p = 0,250
	2	20 (41,7%)	18 (37,5%)	
	3	24 (50,0%)	25 (52,1%)	
Mitose	1	25 (52,1%)	27 (56,2%)	p = 0,51
	2	16 (33,3%)	14 (29,2%)	
	3	7 (14,6%)	7 (14,6%)	

N: número de casos; Grupo 1: fase pré-analítica controlada; Grupo 2: fase pré-analítica não controlada;  $\chi^2$ : teste qui-quadrado de McNemar. Resultados estatisticamente significativos estão ressaltados em negrito.

TABELA 5: Análise do status imuno-histoquímico do HER2 e dos receptores hormonais em carcinomas mamários invasores com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2)

Anticorpos IHQ		Grupo 1	Grupo 2	Teste Estatístico: $\chi^2$ valor de p
		N (%)	N (%)	
HER2	0 – 1+	36/47 (76,6%)	39/47 (82,9%)	p = 0,22
	2+	5/47 (10,6%)	2/47 (4,3%)	
	3+	6/47 (12,8%)	6/47 (12,8%)	
Receptor de Estrógeno	negativo	6/46 (13,0%)	7/46 (15,2%)	p = 1,0
	positivo	40/46 (87,0%)	39/46 (84,8%)	
Receptor de Progesterona	negativo	10/47 (21,3%)	9/47 (19,1%)	p = 1,0
	positivo	37/47 (78,7%)	38/47 (80,9%)	

N: número de casos; Grupo 1: fase pré-analítica controlada; Grupo 2: fase pré-analítica não controlada;  $\chi^2$ : teste qui-quadrado de McNemar.

TABELA 6: Intensidade de marcação para receptores de estrógeno e progesterona com a fase pré-analítica controlada (grupo 1) e com a fase pré-analítica não controlada (grupo 2)

Características		Grupo 1	Grupo 2	Teste Estatístico: $\chi^2$ valor de p
		N (%)	N (%)	
Intensidade de Marcação RE em 46 casos	0	6 (13,04%)	7 (15,21%)	p = 0,46
	1	2 (4,34%)	2 (4,34%)	
	2	7 (15,21%)	10 (21,74%)	
	3	31 (67,39%)	27 (58,69%)	
Intensidade de Marcação RP em 47 casos	0	10 (21,3%)	9 (19,1%)	p = 0,75
	1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	2	3 (6,4%)	3 (6,4%)	
	3	34 (72,3%)	35 (74,5%)	

N: número de casos; Grupo 1: fase pré-analítica controlada; Grupo 2: fase pré-analítica não controlada;  $\chi^2$ : teste qui-quadrado de McNemar.

TABELA 7: Média percentual de marcação do Ki67, Intervalo de Confiança de 95%

	Ki67 (média, IC 95%)	Teste t-student
Grupo 1	0,21 (0,16-0,25)	p = 0,088
Grupo 2	0,24 (0,18-0,29)	

Grupo 1: fase pré-analítica controlada; Grupo 2: fase pré-analítica não-controlada; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

TABELA 8: Análise imuno-histoquímica do Ki67 em carcinomas mamários invasores divididos em  $\leq 20\%$  e  $>20\%$  de células marcadas. Fase pré-analítica controlada (grupo 1) e fase pré-analítica não controlada (grupo 2)

Anticorpo IHQ	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	Teste Estatístico: $\chi^2$ valor de p
Ki-67	$\leq 20\%$	34 (70,8%)	<b>p = 0,02</b>
	$> 20\%$	14 (29,2%)	
		21 (43,7%)	

N: número de casos; Grupo 1: fase pré-analítica controlada; Grupo 2: fase pré-analítica não controlada;  $\chi^2$ : teste qui-quadrado de McNemar.

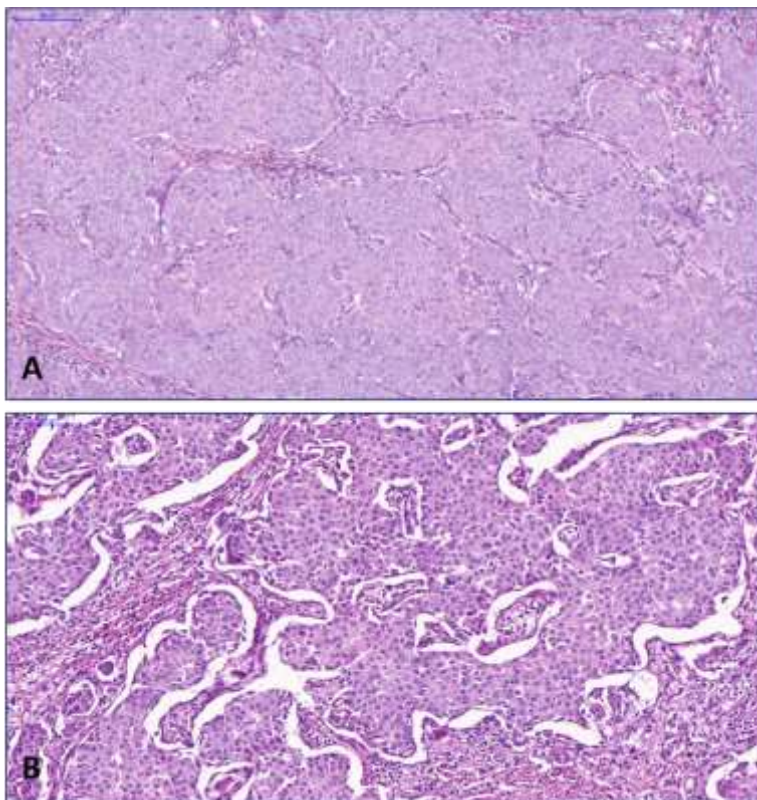


Figura 1: Caso 16 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 200X

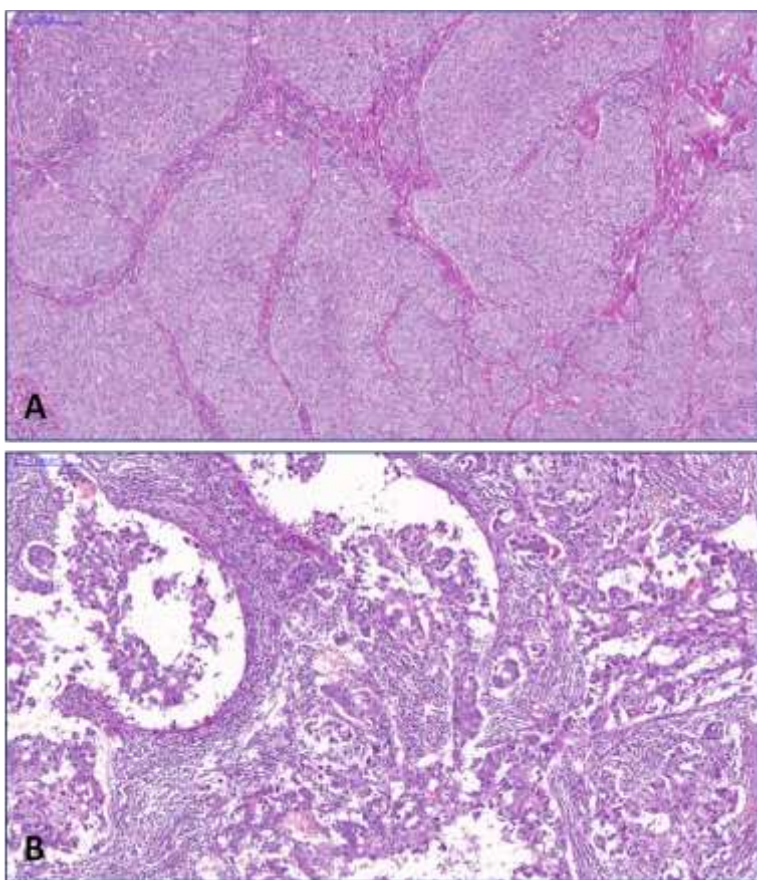


Figura 2: Caso 17 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 200X

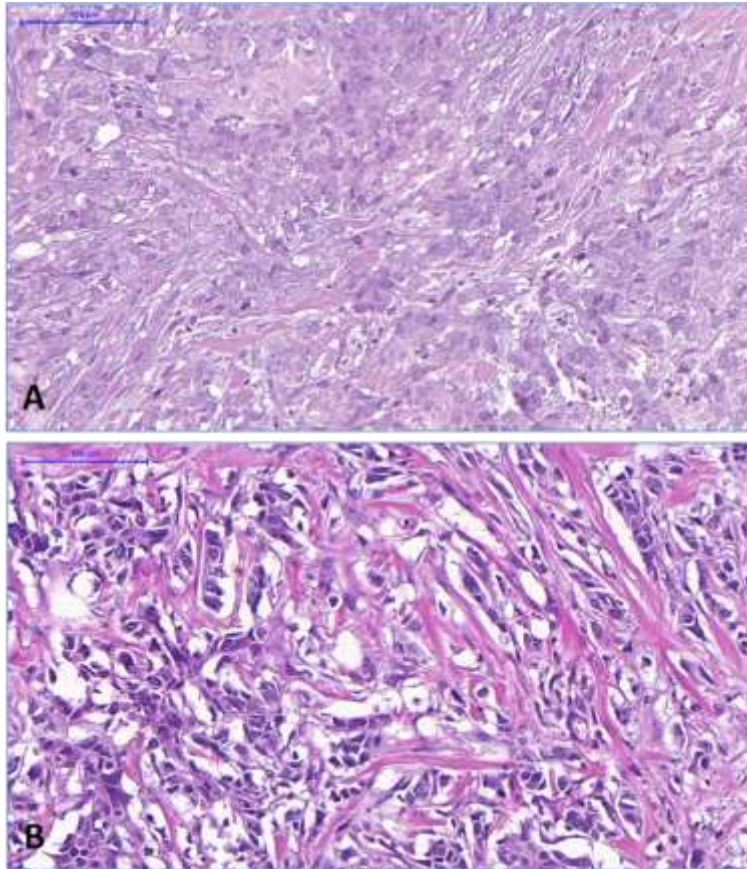


Figura 3: Caso 44 mostrando padrões diferentes quanto à autólise. A: grupo 1, sem autólise; B, grupo 2, com autólise moderada. HE, 400X

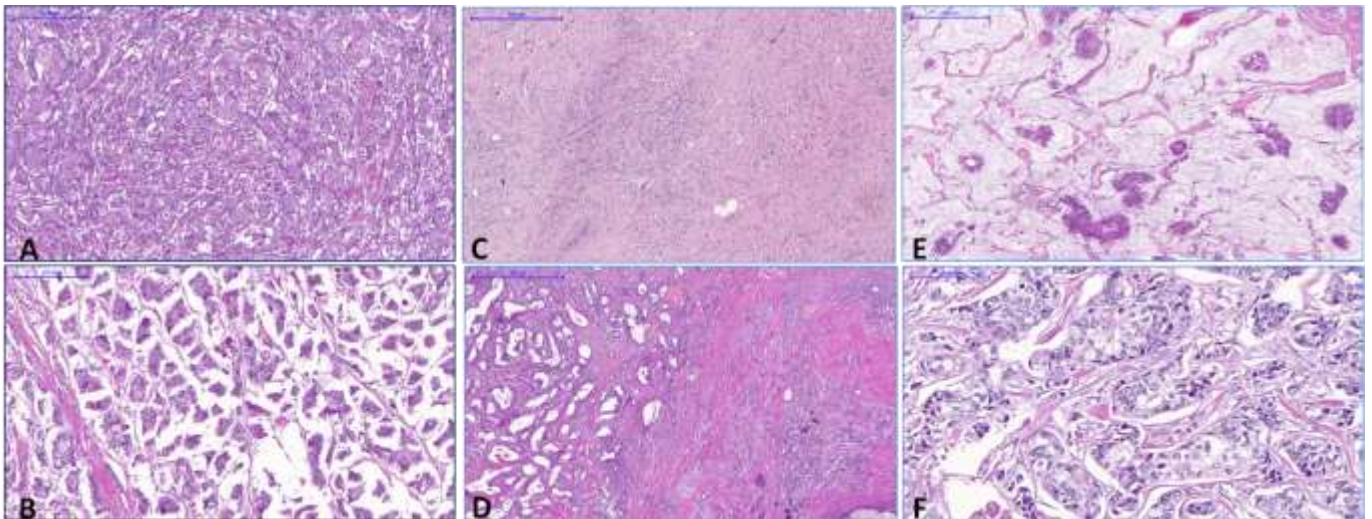


Figura 4: Casos 21 (A e B), 37 (C e D), 48 (E e F) mostrando tipos histológicos diferentes nos dois grupos. Grupo 1- superior (A, C e E); Grupo 2 - inferior (B, D e F). HE 200X

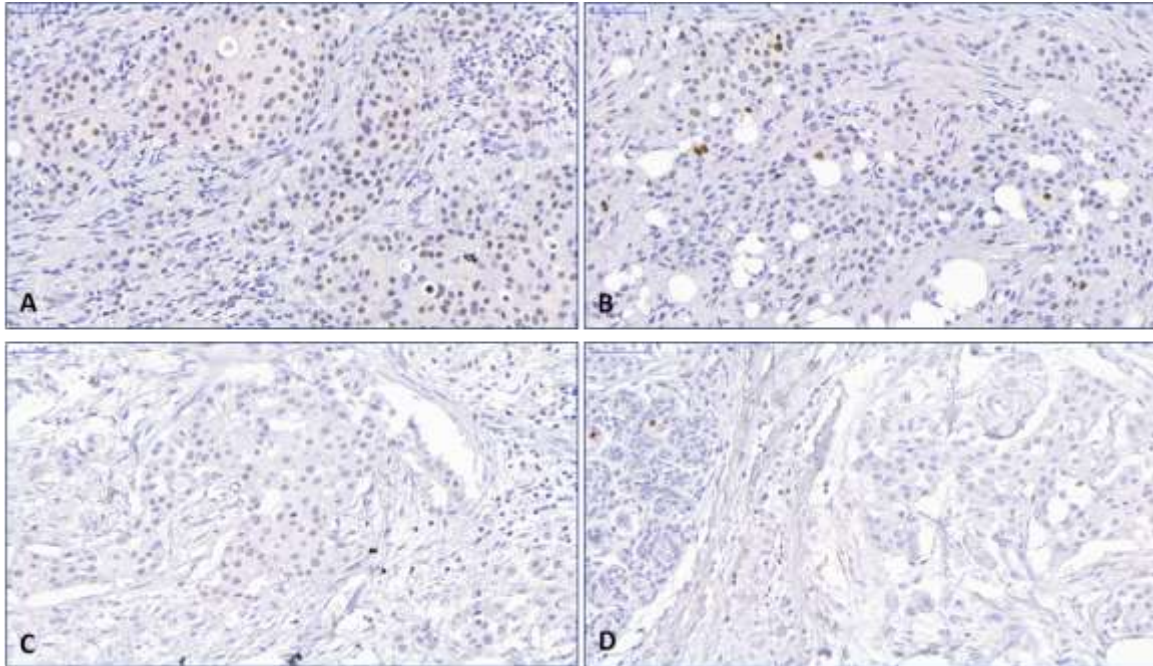


Figura 5: Caso 22 mostrando padrões diferentes de marcação dos receptores hormonais. A e B: grupo 1, Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona positivos; C e D: grupo 2, Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona negativos. IHQ, 400X

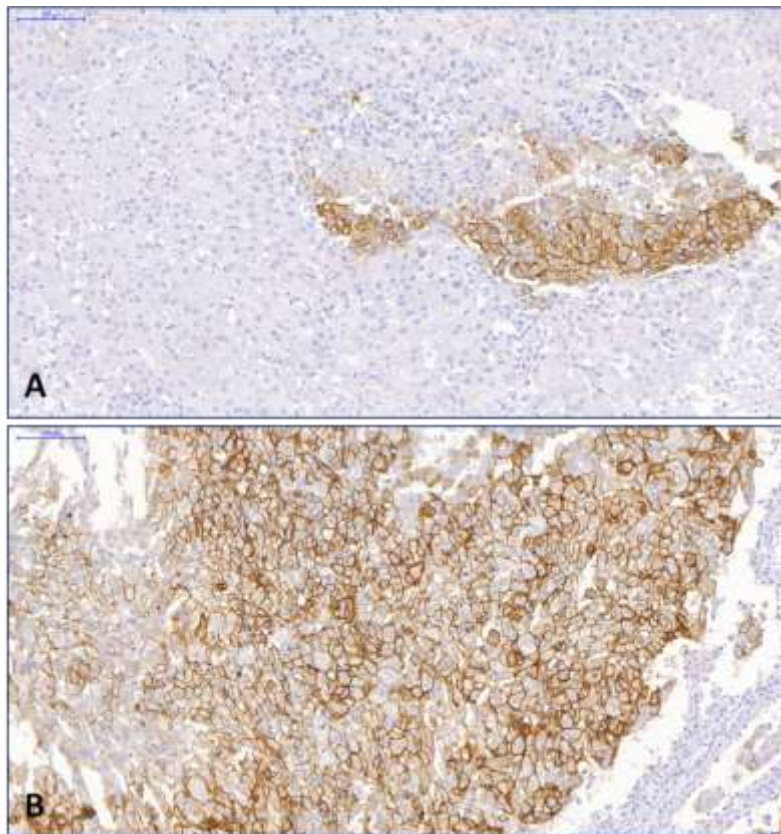


Figura 6: Caso 16 mostrando padrões diferentes de marcação do HER2. A: grupo 1, 2+; B, grupo 2, 3+. IHQ, 400X

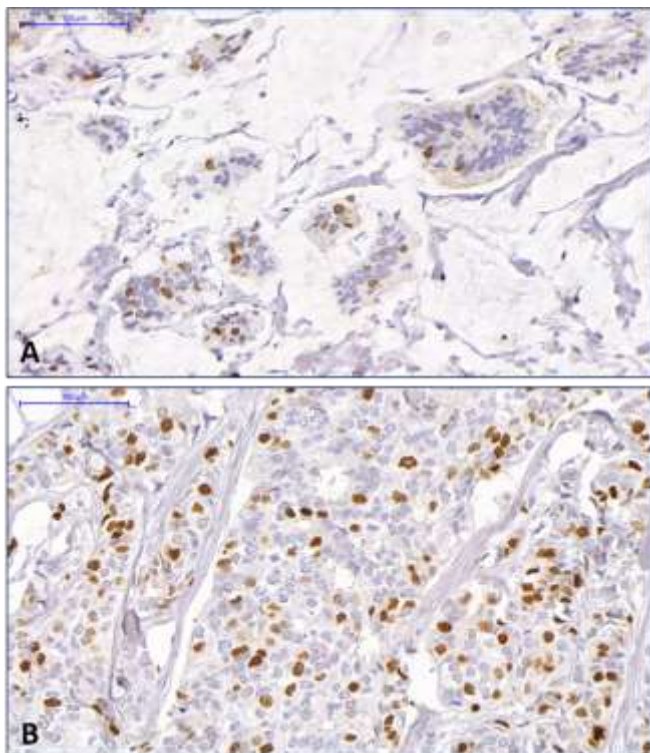


Figura 7: Caso 48 mostrando padrões diferentes quanto à marcação do Ki67. A: grupo 1, 17%; B: grupo 2, 28%. IHQ, 400X

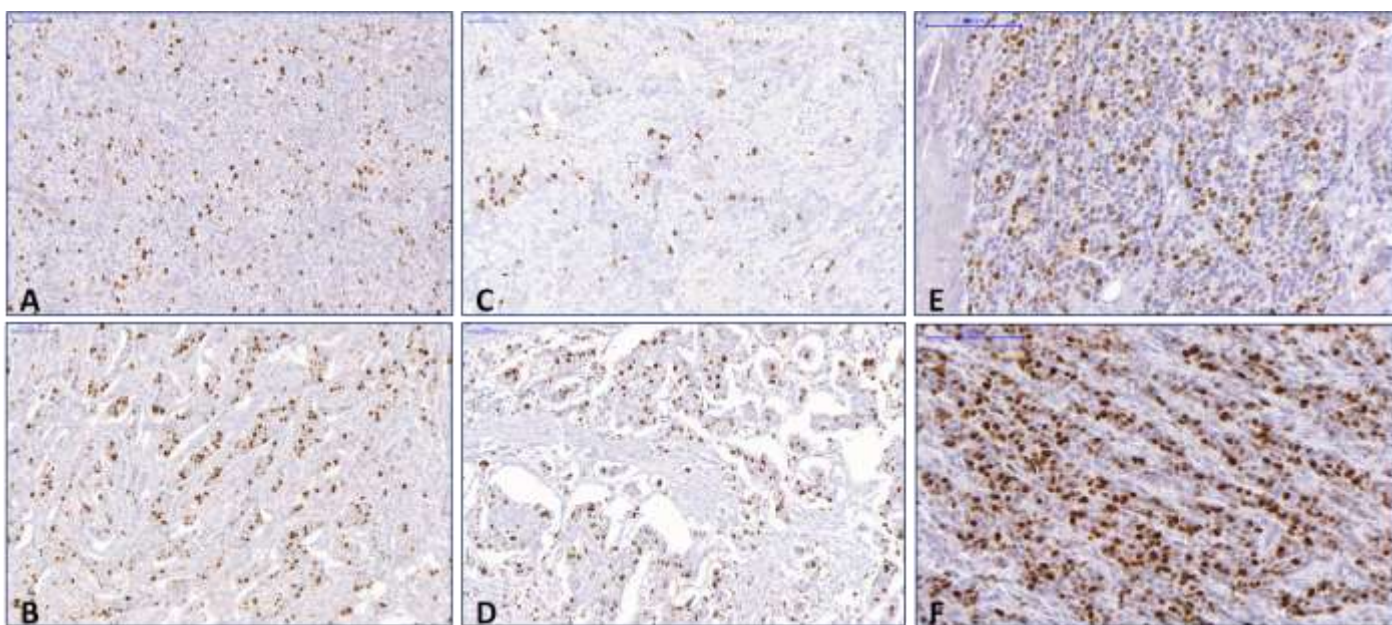


Figura 8: Casos 8 (A e B), 11 (C e D) e 38 (E e F) mostrando marcações diferentes para ki67 nos dois grupos. Grupo 1- superior (A, C e E); Grupo 2 - inferior (B, D e F). IHQ 200X

## 6. DISCUSSÃO

A importância da padronização pré-analítica no diagnóstico e na detecção dos fatores prognósticos e preditivos é recomendada por pesquisadores, patologistas e oncologistas há alguns anos. O controle desta fase foi valorizado nos guias de recomendações de interpretação de exames de imuno-histoquímica, sendo importante fator de rejeição na análise das amostras (HAMMOND *et al.*, 2010; WOLFF *et al.*, 2013). Como a padronização desta fase é variável em diferentes laboratórios, a comparação dos resultados da reação entre laboratórios fica prejudicada, mesmo os resultados no mesmo laboratório podem variar entre amostras diferentes devido aos fatores pré-analíticos, como o tipo de fixador e o tempo de exposição ao fixador (HARDY *et al.*, 2013).

No presente trabalho, avaliamos amostras de 48 casos de câncer de mama, com e sem padronização da fase pré-analítica. Tentamos reproduzir o que acontece em nosso laboratório e em grande parte dos laboratórios do Brasil e em material de arquivo no grupo 2, isto é, sem controle algum da fase pré-analítica. O tamanho médio dos tumores foi de 3,0 cm, o que indica que os diagnósticos foram efetuados em tumores com estágio mais avançado, isto é, maiores do que 2,0 cm, com melhor prognóstico de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

Em nosso trabalho, utilizamos o mesmo tumor em dois grupos para comparação de fatores pré-analíticos. Os grupos estudados foram separados pelo tipo de fixador e tempo de fixação.

O tempo de isquemia fria recomendada deve ser de até uma hora (HAMMOND 2011; RAKHA *et al.*, 2015; WOLF *et al.*, 2013). Depois de 2 a 4 horas, a intensidade da marcação imuno-histoquímica pode diminuir ou tornar-se negativa (APPLE *et al.*, 2011; KHOURY *et al.*, 2009; KHOURY *et al.*, 2012). Quando as amostras são refrigeradas, há uma diminuição da expressão de receptores hormonais após 4 horas de tempo de isquemia fria (YILDZ-AKTAS *et al.*, 2012). Em estudos de influência pré-analítica na determinação do status do HER2, não houve degradação tumoral ou diferença na imunomarcação, exceto por isquemia fria por mais de 3 horas, hipofixação (1 hora em formol tamponado a 10%) e fixação em solução de Bouin (MOATAMED *et al.*, 2011; PORTIER *et al.*, 2013; YILDIZ-



AKTAS *et al.*, 2012). Muitos estudos compararam amostras de *core biopsy* com o bloco do tumor ressecado para a avaliação pré-analítica, e encontraram uma boa concordância para RE e status do HER2. O RE é mais confiável do que RP na avaliação de *core biopsy* (ARNEDOS *et al.*, 2009; LI 2012; UY *et al.*, 2010).

O tempo médio de isquemia fria dos tumores foi de 44 minutos. Embora o tempo de isquemia fria ter sido inicialmente o mesmo em ambos os grupos (todas as amostras foram seccionadas antes de serem imersas no fixador), o momento em que a peça é imersa no formol não significa necessariamente que iniciou-se o processo de fixação. O fixador precisa alcançar o tumor para fixação e o formol penetra o tecido em torno de 1mm / hora e a fixação só começa quando ocorre a penetração do formol (CREE *et al.*, 2014). Assim consideramos que o grupo 1 teve um tempo de isquemia fria inferior ao grupo 2 (espécime inteiro: mastectomia radical ou setor).

O formol produz grupos de hidroximetil em aminoácidos que fazem reação cruzada com proteínas e grandes moléculas necessárias para a reação imuno-histoquímica (KHOURY *et al.*, 2009;. KHOURY *et al.*, 2012). Outros aspectos no processo de fixação, incluindo o pH e a temperatura, apresentam impacto na preservação antigênica. O pH do formol afeta o tipo de ligação cruzada que pode ocorrer. Em formol tamponado a 10%, os sítios de hidrogênio nas moléculas estão disponíveis para ligação, já que eles se encontram em estado neutro (não carregado). A diminuição do pH induz a formação de grupos amina carregados ( $\text{NH}_3^+$ ) que não apresentam sítios reativos de hidrogênio e favorecem interações com grupos amido ( $\text{CO-NH}_2$ ) (LEONG *et al.*, 2010).

Em nosso estudo as diferentes amostras dos casos tiveram tempos diferentes de isquemia fria e de fixação e fixador com pHs diferentes, levando a alterações morfológicas associadas a fixação na avaliação histológica, com significância estatística. As alterações morfológicas ao HE, que chamamos de autólise neste estudo, compreenderam: distorção da arquitetura do tumor, destacamento das células entre si e entre o tecido conjuntivo adjacente, e alterações nucleares. Tais artefatos de autólise podem se transformar em um desafio diagnóstico para o patologista. Identificamos maior grau de autólise nos tumores do grupo 2 com fase pré-analítica não controlada, o que seria esperado, pois o tempo de fixação e o tipo de fixador não estavam dentro do preconizado na literatura. Para evitar

atrasos de fixação em grandes espécimes, como a mastectomia, sugerimos incisão de grandes peças cirúrgicas respeitando margens de ressecção para permitir a penetração do fixador.

Em nosso trabalho, comparamos também a avaliação histopatológica do tumor, incluindo tipo e grau histológicos. Encontramos uma diferença estatística na classificação do tipo histológico dos tumores. Acreditamos que as alterações morfológicas tenham influenciado esta classificação, mas na maioria dos tumores com diferentes classificações, identificamos heterogeneidade na morfologia e a representação das diferentes áreas tumorais foi o principal fator que levou aos diagnósticos diferentes. Sugerimos, então que sejam analisados pelo menos duas amostras de áreas diferentes do tumor para avaliação histopatológica.

Na avaliação do grau histológico não houve diferença estatística, assim como na formação tubular, no pleomorfismo nuclear, e no índice mitótico. A nossa hipótese é de que a heterogeneidade morfológica não se reflete totalmente no grau histológico.

É descrito que a intensidade da marcação de vários antígenos varia inversamente com o tempo de exposição ao formaldeído (LEONG *et al.*, 2010). A preocupação com tempo de fixação do tecido levou a estudos de validação prospectivos que compararam os resultados dos testes RE, RP e HER2 em tecidos fixados por um tempo padronizado, com os mesmos tecidos de amostras que tiveram um tempo de fixação prolongada (72-96 horas). Os resultados destes estudos sugerem que o tempo de fixação em formol até 72 horas não alteraram a reatividade de RE, RP e HER2 e, por conseguinte, é aceito como o tempo limite superior na prática clínica. A imunorreatividade de marcadores prognósticos e preditivos de câncer de mama, como RE, RP e HER2 pode ser reduzida pela fixação em formol por tempo muito prolongado (TONG *et al.*, 2011). Alguns trabalhos mostraram redução na marcação do HER2 mais importante no grupo equívoco, alterando o status do HER2 de 2+ para 1+. Estes mesmos estudos mostraram diminuição na marcação dos casos 2+; entretanto insuficientes para alterar o status do HER2 (HASHIZUME *et al.*, 2003; YAMASHITA-KASHIMA *et al.*, 2014).

Nossos resultados não mostraram diferença significativa na marcação imuno-histoquímica dos receptores hormonais e na expressão do HER2 nos dois grupos, o que está de acordo

com alguns artigos na literatura. A maioria dos estudos mostrou início de diferença na marcação quando o tempo de isquemia fria foi superior a 3 e 4 horas (MOATAMED *et al.*, 2011; PORTIER *et al.*, 2013; YILDIZ-AKTAS *et al.*, 2012).

Houve diferença nas marcações dos receptores hormonais em quatro casos, embora na comparação entre os grupos não tenha sido detectada diferença significativa. Em três destes casos (casos 5, 34 e 38), o receptor de estrógeno foi positivo tanto no grupo 1 quanto no grupo 2, e o receptor de progesterona foi negativo no grupo 1 e positivo no grupo 2, o que não mudaria o tratamento da paciente. Em um caso (caso 22), os receptores hormonais foram positivos no grupo 1 e negativos no grupo 2, o que mudaria a conduta terapêutica da paciente. Como RE e RP mostram geralmente uma marcação homogênea, acreditamos que a amostragem não seria uma resposta para essa discordância. Não existe um padrão ouro para a acurácia verdadeira deste resultado, podendo esta paciente receber e responder ou não à terapia anti-hormonal.

Tivemos um caso com morfologia heterogênea e diferente expressão de HER2. A amostra do grupo 1 apresentou apenas um pequeno grupo de células com super-expressão de HER2, levando ao escore 2+. No grupo 2, o mesmo tumor mostrou mais de 50% das células com super-expressão de HER2. Em ambas as amostras, notamos uma nítida separação entre as células com e sem expressão de HER2. Este tumor não foi amplificado por DDISH. Todos os tumores são conhecidos por serem heterogêneos e esse problema tem levantado questões relacionadas à amostragem tumor (NEUMEISTER *et al.*, 2012).

Os resultados comparando a média percentual de marcação pelo Ki67 não obtiveram diferença estatística relevante. Quando comparamos o índice de marcação dividindo as áreas marcadas (*hot spot*) em  $\leq$  de 20% e  $>$  de 20%, encontramos diferença significativa apontando o grupo 1 com 14 casos e o grupo 2 com 21 casos de marcação  $>$  20%. Realizamos essa análise levando em consideração o consenso de Saint Gallen que divide esses índices em dois grupos: alto índice proliferativo mais de 20% de células neoplásicas marcadas e baixo índice proliferativo igual ou menos de 20% de células neoplásicas marcadas, influenciando na conduta terapêutica das pacientes (GOLDHIRISCH *et al.*, 2013; UNTCH *et al.*, 2013). Há anos vem-se discutindo o melhor *cut-off* para o ki-67 e o tipo de material a ser estudado (microarranjo de tecidos, core biopsy ou corte inteiro), devido ao seu valor prognóstico e possível valor preditivo de resposta a quimioterapia

adjuvante. Vários estudos foram feitos em material de microarranjo de tecidos e core biopsy e os resultados não mostram correspondência com os achados clínicos e nos cortes inteiros da peça. Mesmo quando comparadas diferentes amostras de cortes inteiros do mesmo tumor, foi identificada heterogeneidade na proliferação celular em 23% dos casos. Esta questão é muito importante, pois precisa-se definir qual seria a melhor amostra a ser estudada, qual a área e qual a porcentagem correta de *cut off* em cada amostra (GOLDHIRISCH *et al.*, 2009; GOLDHIRISCH *et al.*, 2013; KNUTSVIK *et al.*, 2014; UNTCH *et al.*, 2013). Diante de toda esta discussão na literatura, achamos que não podemos relacionar as diferenças na marcação do ki67 entre os dois grupos apenas às alterações pré-analíticas do material. As diferentes áreas representadas nos grupos também podem ter influenciado nossos resultados.

Sabemos que as condições de fixação de amostras enviadas para laboratórios são, em geral, desconhecidas. Além disso, a fixação depende de inúmeras variáveis além de apenas o tempo de fixação, incluindo a composição do tecido (células de gordura, do estroma e do tumor), a razão entre os volumes de formol e tecido, e o tempo de análise macroscópica e recorte do material. Além disso, a qualidade da fixação pode variar em todo o tecido, dependendo de quando o formol atingiu uma região específica em uma determinada concentração. Melhorar a qualidade do material para diagnóstico confiável na histologia e maior acurácia na imunohistoquímica para os receptores hormonais e HER2 no câncer de mama é um desafio constante. A padronização das condições e tempos de fixação é difícil e requer uma abordagem de toda a equipe, envolvendo os cirurgiões, assistentes de sala de cirurgia, enfermeiros e patologistas. A preocupação com este assunto é mundial com publicações recentes contendo orientações para laboratórios que trabalham com bioespécimes e realizam testes de patologia molecular em câncer (CREE *et al.*, 2014).

## 7. CONCLUSÕES

1 – Houve diferença estatisticamente significativa na presença de autólise e na classificação histológica dos tumores estudados. A autólise foi mais frequente no grupo sem controle da fase pré-analítica. A diferença na classificação histológica poderia ser pela heterogeneidade dos tumores uma vez que as comparações foram feitas em amostras tumores retirados de diferentes áreas, fazendo com que essa avaliação possa sofrer variação mesmo se tratando do mesmo tumor. A graduação histológica, incluindo: pleomorfismo nuclear, formação tubular e contagem de mitoses não mostrou diferença entre os dois grupos.

2 – As avaliações dos receptores hormonais e do HER2 não mostraram diferença significativa. A marcação para Ki-67 mostrou alteração significativa entre os dois grupos, com maior índice proliferativo no grupo 2. Este achado deve ser mais estudado uma vez que essa variação não está bem descrita na literatura consultada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED, D. C. *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, v.11, n.2, p.155-68, Feb 1998.

ALLRED DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 May;23 Suppl 2:S52-9.

APPLE S, *et al.* The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, v.135, n.4, p.592-8, Apr 2011.

ARNEDOS M, *et al.* Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Ann Oncol*. 2009Dec;20(12):1948-52.

ARPINO, G. *et al.* Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*, v.97, n.17, p.1254-61 Sep 2005.

BÁNKFALVI, À. *et al.* Comparative methodological analysis of *erbB-2/HER-2* gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, v.37, p.411-9, 2000.

CREE, IA, *et al.* Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *Journal of Clinical Pathology* 2014;67(11):923-931.

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.

DOWSETT, M. *et al.* Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol*, v.17, n.5, p.818-26, May 2006.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, v.14-20, n.365(9472), p.1687-717, May 2005.

EDGE, S.B.; COMPTON, C.C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, v.17, n.6, p.1471-4, Jun 2010.

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. *Histopathology*, v.19, n.5, p.403-10, Nov 1991.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histologic grade. In: ELSTON CW & ELLIS IO eds. *Systemic Pathology* 3rd Ed. Vol. 13, 365-84, Churchill-Livinstone. Edinburgh, Scotland, UK, 1998.

FITZGIBBONS, P.L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol Lab Med*, v.124, p.966-78, 2000.

GALEA, M.H. *et al.* The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.22, n.3, p.207-19, 1992.

GOBBI, H; ROCHA, RM; NUNES, CB. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry/ Fatores preditivos do câncer de mama avaliados pela imunohistoquímica; *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2008 Apr 44(2): 131-140.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, v.20, n.8, p.1319-29, Aug 2009.

GOLDHIRSCH A, *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013 Sep;24(9):2206-23.

GOUVÊA AP, *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006 Mar;14(1):103-8.

GOWN, A.M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol*, v.21 Suppl 2, p.S8-S15, 2008.

GRAMONT, A. *et al.* Pragmatic issues in biomarker evaluation for target therapies in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* advance online publication 25 November 2014.

GROENEN PJ, BLOKX WA, DIEPENBROEK C, *et al.* Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. *Histopathology.* 2011 Jul;59(1):1-7

HAMMOND, M.E.H. *et al.* Report of a National Institute of Standards and Technology sponsored Consensus Workshop. *Applied Immunohistochem Molec Morphol*, v.11, p.103-6, 2003.

HAMMOND, ME; HAYES, DF; WOLFF, AC. *et al.* American society of clinical oncology/college of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract.* 2010 Jul;6(4):195-7.

HAMMOND, M.E. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.19, n.6, p.499-500, Dec 2011.

HARDY, L.B. *et al.* Immunohistochemistry validation procedures and practices: a College of American Pathologists survey of 727 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*, v.137, n.1, p.19-25, Jan 2013.

HASHIZUME K, *et al.* Interlaboratory comparison in HercepTest assessment of HER2 protein status in invasive breast carcinoma fixed with various formalin-based fixatives. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Dec;11(4):339-44.

INCA. Base de dados. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>> acessado em 10 Out.2014.

JATOI, I.; MILLER, A. B. Why is breast-cancer mortality declining? *Lancet Oncol*, Apr. 2003 4(4): 251-254.

JUHL H, Preanalytical aspects: a neglected issue. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2010;242:63-5.

KHOURY, T. *et al.* Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol*, v.22, n.11, p.1457-67, Nov 2009.

KHOURY, T. Delay to formalin fixation alters morphology and immunohistochemistry for breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.20, n.6, p.531-42, Dec 2012.

KNUTSVIK G, *et al.* Evaluation of Ki67 Expression across Distinct Categories of Breast Cancer Specimens: A Population-Based Study of Matched Surgical Specimens, Core Needle Biopsies and Tissue Microarrays. Sapino A, ed. *PLoS ONE* 2014;9(11):e112121..

LAKHANI, S.R. *et al* (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors of the Breast. IARC: Lyon, 2012. 240p.

LEONG ANTHONY S-Y. Pitfalls in Diagnostic Immunohistology; *Adv Anat Pathol*. 2004 Mar;11(2):86-93.

LEONG, T. Y-M *et al*, Immunohistology—Past, Present, and Future. *Adv Anat Pathol*, v.17, p.404–18, 2010.

LI X, *et al.* The Effect of Prolonged Cold Ischemia Time on Estrogen Receptor Immunohistochemistry in Breast Cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013;26(1):10.1038/modpathol.2012.135.

MOATAMED, N.A. *et al.* Effect of ischemic time, fixation time, and fixative type on HER2/neu immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization results in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, v.136, n.5, p.754-61, Nov 2011.



MOOK, S. *et al.* Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol*, v.10, n.11, p.1070-6, Nov 2009.

NAMIMATSU, S; GHAZIZADEH, M; SUGISAKI, Y. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method; *J Histochem Cytochem*. 2005 Jan;53(1):3-11.

NEUMEISTER VM, *et al.* Quantitative Assessment of Effect of Preanalytic Cold Ischemic Time on Protein Expression in Breast Cancer Tissues. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2012;104(23):1815-1824.

NONOGAKI, S; KANAMURA, CT; OLIVEIRA, LF; *et al.* Análise de indicadores internos e externos relevantes à resolatividade diagnóstica em laboratório de referência em imuno-histoquímica; *J Bras Patol Med Lab*. 2007 Agosto;43(4): 297-304.

NUNES CB, *et al.* False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *J Clin Pathol*. 2013 Nov;66(11):946-50.

NUNES C, *et al.* High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer: whole slide imaging for the assessment of HER2 expression. *Pathol Res Pract*. 2014 Nov;210(11):713-8.

OYAMA, T; ISHIKAWA, Y; HAYASHI, M; *et al.* The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer; *Breast Cancer*. 2007;14(2):182-8.

PAGE, D.L.; JENSEN, R.A.; SIMPSON, J.F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.51, n.3, p.195-208, 1998.

PARKER, RL; HUNTSMAN, DG; LESACK, DW; *et al.* Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray; *Am J Clin Pathol*. 2002 May;117(5):723-8.

PAYNE, S.J.L.; BOWEN, R.L.; JONES, J.L.; WELLS, C.A. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*. v.52, n.1, p.82-90, Jan. 2008.

PENAULT-LLORCA F, *et al.* Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10;27(17):2809-15.

PEREIRA, F.E.L. Degenerações/ Morte Celular/ Lesões do Interstício/ Cicatrização/ Regeneração. In: FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia*. 8. ed. Rio do Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 101.

PHENOPATH, Laboratories, Seattle, WA 98103, USA. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer; 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15.

PORTIER , B.P. *et al.* Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol* v.26, n.1, p.1-9, Jan 2013 .

RAKHA, EA *et al.* National Coordinating Committee for Breast Pathology. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2015 Feb;68(2):93-9.

REGAN, M.M. *et al.* International Breast Cancer Study Group. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst,* v.98, n.21, p.1571-81, Nov 2006.

ROCHA, R *et al.* Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract,* v.204, n.9, p.655-662, 2008.

ROSS, J.S. *et al.* Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res,* v.13, n.10, p.2831-2835, 2007.

ROSS, JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect,* v.22, n.2, p.93-106, 2009.

SALLES MA; CÚRCIO VS; PEREZ AA; *et al.* Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias; *J Bras Patol Med Lab.* 2009 45(3):213-222.

SLAMON, D.J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science,* v.235, p.177-182, 1987.

TONG, L.C. *et al.* The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study. *Am J Surg Pathol,* v.35, p.545-52, 2011.

TRISHE, Y-M LEONG; MBBS (Hons), FRCPA, FCAP,\*KUMARASEN; COOPER, MB; ChB, DPhil, FRCPATH, FCAP,w and ANTHONY, S-Y LEONG, MBBS, FRCPA, FRCPATH, FCAP, FHKAM (Pathol), Honorary FHKCPATH, Honorary FRCPTzLeong *et al.* Immunohistology—Past, Present, and Future. *Adv Anat Pathol* 2010;17:404–418.

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 (Basel).* 2013 Jun;8(3):221-9.

UY GB, *et al.* Breast cancer hormone receptor assay results of core needle biopsy and modified radical mastectomy specimens from the same patients. *Clinical breast cancer* 2010;10(2):154-159.

VERONESI, U. *et al.* Breast cancer. *Lancet,* 2005 365:1727-41.

WALKER, R.A. *et al.* HER2 testing in the UK: further update to recommendations *J Clin Pathol* v.61,p.818-24, 2008.

WOLFF, A.C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J. Clin Oncol*, v.25, n.1, p.118-145, 2007.

WOLFF, A.C. *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, Oct 2013.

YAMASHITA-KASHIMA, Y *et al.* Importance of formalin fixing conditions for HER2 testing in gastric cancer: immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridization. *Gastric Cancer*. 2014 Oct;17(4):638-47.

YAMOTO S, *et al.* Clinical relevance of Ki67 gene expression analysis using formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens. *Breast Cancer* 2013; 20:262-70.

YAZIJI, H; TAYLOR, CR; GOLDSTEIN, NS; *et al.* Members of the Standardization Ad-Hoc Consensus Committee. Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry; *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008 Dec;16(6):513-20

YAZIJI, H; TAYLOR, CR; Begin at the beginning, with the tissue! The key message underlying the ASCO/CAP Task-force Guideline Recommendations for HER2 testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Sep;15(3):239-41

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

YILDIZ-AKTAS, I.Z.; DABBS, D.J.; BHARGAVA, R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, v.25, n.8, p.1098-105, Aug 2012.

## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0297.1.203.000-10

Interessado(a): **Profa. Helenice Gobbi**  
Depto de Anatomia Patológica e Medicina Legal  
Faculdade de Medicina - UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de outubro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo epidemiológico, prospectivo e observacional sobre o status do HER2 em carcinomas invasores de mama avaliados por imuno-histoquímica (IHC) e hibridização in situ (ISH) em uma grande amostra de pacientes brasileiras"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## 9.2. ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY

2/11/2015

ScholarOne Manuscripts

 Journal of Clinical Pathology

---

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Clinical Pathology*.

Manuscript ID: 2015-202950

Title: POSITIVE IMPACT OF PRE-ANALYTICAL PHASE CONTROL IN  
HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF BREAST  
CANCER

Authors: Buzelin, Marcelo  
Nunes, Cristiana  
Balabram, Debora  
Gobbi, Helenice

Date Submitted: 11-Feb-2015

 Print  Return to Dashboard

**9.3. ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO JOURNAL OF  
CLINICAL PATHOLOGY**

**POSITIVE IMPACT OF PRE-ANALYTICAL PHASE CONTROL IN  
HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF BREAST  
CANCER**

Marcelo Araújo Buzelin <sup>1</sup>, Cristiana Buzelin Nunes <sup>1</sup>, Debora Balabram <sup>1</sup>, Helenice Gobbi <sup>1</sup>

Affiliations:

1- Department of Anatomic Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author: Helenice Gobbi, MD, PhD

Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da UFMG, Avenida Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, MG Brazil  
30130-100

[helenicegobbi@gmail.com](mailto:helenicegobbi@gmail.com) Tel: (55) (31) 34099118. Fax: 55-31-34099664

Keywords: histopathology, immunohistochemistry, HER2, breast cancer, estrogen receptor, progesterone receptor, formalin fixation

Word count: 2631

## ABSTRACT

**Aims:** To compare histopathological diagnosis and predictive factors of invasive mammary carcinomas (IMC) in samples with and without control of pre-analytical phase.

**Material and methods:** 48 IMC resected between 2011 and 2013 were freshly collected from the operating room. One section was taken and immediately immersed in 10% neutral buffered formalin (group 1). The whole specimen was then immersed in 10% non buffered formalin. The whole specimen was reexamined and sectioned 24 to 72h later for pathological diagnosis (group 2) following the hospital routine. Histopathological analysis (histological tumor type and grade) and immunohistochemistry (IHC) for HER2 and estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) were performed.

**Results:** Histopathological alterations were more evident in group 2 (16/48 cases) than group 1 (6/48). Special tumour subtypes were more diagnosed in group 1 (16/48). Group 2 presented more ductal non special type (38/48). There was no statistical difference in histological grade, ER, PR and HER2 status between both groups. There was more HER2 negative status in group 2 (39/47 cases) compared to group 1 (36/47). HER2 equivocal status (2+) was more frequent in group 1 (5/47) than group 2 (2/47).

**Conclusions:** Our study showed more histopathological differences in samples with no pre-analytical control, such as autolysis and histological tumor type. There was no difference in immunohistochemical analysis of predictive markers in both groups.

Word-count: 219

## INTRODUCTION

For a long time, tissue fixation was considered necessary only to preserve morphology for histological and diagnostic evaluation. Molecular studies have become important to pathology practice, used to aid in diagnosis, but also for assessing important predictive markers of cancers. These techniques brought up the possibility to study changes in proteins, RNA and DNA of cells in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples, leading to an increasing need for preservation and conservation of tumor samples. After the advent of immunohistochemistry (IHC), pre-analytical factors showed effects on the results of the reactions. Cold ischaemia time, fixative type, and fixation time are part of the pre-analytical phase of IHC technique. Different studies have shown that ischaemia time longer than one hour is harmful to tissues and has a tendency to decrease the detection of antigens by IHC [1-6]. Formalin has been the most commonly used fixative in pathology practice for many years, leading to morphological preservation and consistency of staining. The over-fixation has been implicated in the loss or masking of epitopes during immunohistochemistry. Compared with other fixatives, formalin still provides the best results for most IHC reactions, associated with heat induced epitope retrieval, which can break the majority of the nonspecific bridges formed by formalin fixing process and expose the antigenic sites of cells. Guidelines from the American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists (ASCO/CAP) and British Recommendations included instructions for better fixation of tissues to improve quality of immunohistochemical reactions in breast cancer. Both guidelines recommend of a minimum of six hours and up to 72 hours of fixation time in buffered formalin immediately after tissue section. It is an exclusion criteria to

perform or interpret an IHC assay if this time is longer or shorter than that recommendation [7-9]. Many studies disagree with the guidelines and show that overfixation does not seem to be a significant concern in routine IHC studies [6,1,10-14].

Prognostic and predictive factors are important for therapeutic decision in breast cancer. Prognostic factors are based on clinical features and pathological characteristics of the tumour, such as size, histological type, and grade, lymphovascular invasion and lymph node status. These factors are dependent on good preservation of morphology of the tumour for better accuracy, including better fixation. Estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors are also prognostic factors, and are predictors of response to hormonal therapy. HER2 is predictor of response to trastuzumab and other HER2 targeted therapies [7,9,15]. IHC is the standard method of detecting ER, PR and HER2 status in breast cancer. Many pre-analytical, analytical and post-analytical factors may affect ER, PR and HER2 immunohistochemistry results. Our group has already studied analytical and post-analytical factors in archived FFPE breast cancer tissue from the files of our Institution (Laboratory of Breast Pathology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais) [16-20]. The aim of this study is to compare histopathological features and prognostic and predictive factors in breast cancer samples with and without control of pre-analytical phase.

## **MATERIAL AND METHODS**

This case control study was approved by the ethics committee of our institution (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais), under the protocol number ETIC 0297.1.203.000-10.

Ninety six consecutive tumour specimens were collected prospectively from forty eight patients with invasive mammary carcinomas who did not receive neoadjuvant chemotherapy, and underwent surgery at the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais between 2011 and 2013. All resection samples were freshly collected from the operating room and sent immediately to the Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais. The specimens were inked, and grossly examined by the same pathologist after surgical resection. One tumor sample measuring 10x10x2 mm was taken from each specimen with care, not to compromise routine specimen processing, and immediately immersed in 10% neutral buffered formalin. These tumour samples were assigned to group 1 for subsequent analysis. The ischaemia time for this group had a median of 44 minutes (ranging from 30 to 90 minutes). The rest of the specimen was recomposed and immediately immersed in 10% non buffered formalin (as the routine of our hospital). The whole specimen was reexamined 24 to 72 hours later and sectioned following the routine of the pathology service of our hospital. The tumour samples obtained from the rest of the specimen, fixed in non buffered formalin, without control of fixation time, were assigned to group 2.

### **Histopathological study**

The histomorphology was analysed and if there were any changes in the nucleus, cytoplasm or cell membrane (retraction from the surrounding stroma, loss of cohesion of the cells, nuclear chromatin margination, cell membrane disruption and autolysis) in the tumours, they were considered as positive for morphological changes. Correlation between Nottingham grading system (percentage of tubular formation, nuclear pleomorphism, and number of mitotic figures) and histological



classification of tumor type were made through the samples of each tumour. We decided to dichotomize histological classification in two types: ductal no other specified (NOS) and others (including special subtypes and variants), following the 2012 World Health Organization classification of breast tumors [21].

### **Immunohistochemical study**

For each tumour, IHC was performed for ER, PR and HER2 on a tumour block from both group 1 (with control of pre-analytical phase) and on a second tumour block selected from the routinely processed tissue, referred to as group 2 (without control of pre-analytical phase). Antibody clones, sources, detection systems, antigen retrieval and dilutions are listed in Table 1. Sections were cut at 4µm and placed on charged slides. They were deparaffinised, dehydrated in graded alcohols, and immunostained with HercepTest™ Kit (Dakocytomation, Carpinteria, California, USA) and with PharmaDX™ Kit (Dakocytomation, Carpinteria, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Slides were counterstained with haematoxylin and coverslipped. All immunostainings were performed with known positive and negative tumour controls provided by the kits.

**Table 1- Antibody clones, types, sources, detection system, antigen retrieval methods and dilution used**

<b>Clone</b>	<b>Source</b>	<b>Detection system</b>	<b>Antigen retrieval</b>	<b>Dilution</b>
<b>HercepTest™ M</b>	<b>Dako, USA</b>	<b>Polymer Visualization Reagent, DAKO</b>	<b>Epitope retrieval solution, Ph6 DAKO</b>	<b>predilute d</b>
<b>ER PharmaDX™ (1D5)</b>	<b>Dako, USA</b>	<b>Polymer Visualization Reagent, DAKO</b>	<b>Epitope retrieval solution, High Ph, DAKO</b>	<b>predilute d</b>
<b>PR PharmaDX™ (PGR1294)</b>	<b>Dako, USA</b>	<b>Polymer Visualization Reagent, DAKO</b>	<b>Epitope retrieval solution, High Ph, DAKO</b>	<b>predilute d</b>

ER: estrogen receptor; PR progesterone receptor

### **Immunohistochemical Interpretation**

The immunostained slides of both groups were blindly evaluated by the same pathologist (CBN). ER and PR analysis were performed using Allred's criteria, i.e., more than 1% of cells with moderate staining was considered as positive [22]. HER2 expression was evaluated following ASCO/CAP guidelines (0, no staining or membrane staining in ≤10% of tumour cells; 1+, faint part of membrane staining in >10% of tumour cells; 2+, weak to moderate complete membrane staining in >10% of tumour cells, or strong complete membrane staining ≤10% of tumour cells; 3+, strong complete membrane staining in >10% of tumour cells). 3+ cases were considered positive, 0 or 1+ cases were considered negative and 2+ cases were considered equivocal [9].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS V.19. To evaluate the differences among categorical variables of each group (histological grade and IHC status) the Mc Nemar-Bowker  $\chi^2$  test was used. Student t test was used for the analysis of continuous variables. P-value of < 0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

### Characterization of the specimens

From the 48 cases, two were excluded from ER and one was excluded from PR and HER2 analysis for not having representation of invasive mammary carcinoma in both groups. The tumour specimens were equally distributed 52% in the right and 48% in the left breast. Tumour size ranged from 0.5 to 10.0 cm, with a median of 3.0 cm.

Table 2 shows the results of the histomorphological analysis in group 1 (with pre-analytical phase control) and group 2 (without pre-analytical phase control). Both groups showed variable morphological alterations in the tissue interpreted as retraction from the surrounding stroma, loss of cohesion of the cells, nuclear chromatin margination, cell membrane disruption and autolysis. They were more evident in group 2, where we found 16/48 cases (33.3%) with these alterations, 10 more cases than group 1 (6/48 cases) ( $p = 0.02$ ) (FIGURE 1).

Histological tumor type classification also showed a statistically significant result ( $p = 0.03$ ). We found more invasive breast carcinomas with special subtypes in group 1 (16/48 cases). These subtypes included colloid, tubular, lobular, and tumors with medullary and apocrine features. Group 2 had more ductal carcinomas of no special type (38/48 cases) (FIGURE 2).

**Table 2- Histomorphologic analysis of 48 invasive mammary carcinomas with pre-analytical phase control (group 1) and without pre-analytical phase control (group 2)**

Features		Group 1 N (%)	Group 2 N (%)	Statistical test: $\chi^2$ p value
Morphological changes	absent	42 (87.5%)	32 (66.7%)	<b>p = 0.02</b>
	present	6 (12.5%)	16 (33.3%)	
Tumor type	ductal	32 (66.7%)	38 (79.2%)	<b>p = 0.03</b>
	other	16 (33.3%)	10 (20.8%)	
tumor grade	I	9 (18.8%)	15 (31.2%)	p = 0.08
	II	26 (54.2%)	18 (37.6%)	
	III	13 (27.0%)	15 (31.2%)	
Tubular formation	1	2 (4.2%)	3 (6.2%)	p = 0.10
	2	16 (33.3%)	21 (43.8%)	
	3	30 (62.5%)	24 (50.0%)	
Nuclear pleomorphism	1	4 (8.3%)	5 (10.4%)	p = 0.25
	2	20 (41.7%)	18 (37.5%)	
	3	24 (50.0%)	25 (52.1%)	
Mitosis	1	25 (52.1%)	27 (56.2%)	p = 0.51
	2	16 (33.3%)	14 (29.2%)	
	3	7 (14.6%)	7 (14.6%)	

N: number of cases; Group 1: with pre-analytical phase control; Group 2: without pre-analytical phase control;  $\chi^2$ : qui-squared McNemar-Bowker test. Statistically significant results are highlighted.

Histological tumor grade, including tubular formation, nuclear pleomorphism and mitotic counting, did not show statistically significant difference results between both groups (TABLE 2).

Hormonal receptors and HER2 status results of both groups are shown in table 3. There were no differences between group 1 and 2 for hormonal receptors status, but there was one tumour that was ER and PR positive in the sample with control of pre-analytical phase and was negative in the same collected without control (FIGURE 3), and this result would change patient's treatment. We also compared the percentage and intensity of IHC staining of ER and PR in both groups, but there was no statistical difference in the results of this analysis. One tumour had to be excluded for ER evaluation, for not showing a residual invasive tumor component in the tissue block.

**Table 3- HER2 and hormonal receptors status of invasive breast carcinomas evaluated with pre-analytical phase control (group 1) and without preanalytical phase control (group 2)**

IHC antibodies		Group 1 N (%)	Group 2 N (%)	Statistical test: $\chi^2$ p value
HER2	0 – 1+	36/47 (76.6%)	39/47 (82.9%)	p = 0.22
	2+	5/47 (10.6%)	2/47 (4.3%)	
	3+	6/47 (12.8%)	6/47 (12.8%)	
Estrogen receptor	negative	6/46 (13.0%)	7/46 (15.2%)	p = 1.0
	positive	40/46 (87.0%)	39/46 (84.8%)	
Progesterone receptor	negative	10/47 (21.3%)	9/47 (19.1%)	p = 1.0
	positive	37/47 (78.7%)	38/47 (80.9%)	

Group 1: with pre-analytical phase control; Group 2: without pre-analytical phase control;  $\chi^2$ : qui-squared McNemar-Bowker test. Statistically significant results are highlighted.

There were more HER2 negative status (0 and 1+) cases in group 2 (39/47 cases) compared to group 1 (36/47 cases). HER2 equivocal status (2+) was more frequent in group 1 (5/47 cases) than in group 2 (2/47 cases). The group 1 equivocal tumours showed no gene amplification by dual-colour-in situ hybridization (DDISH) (data not shown). In the statistical analysis, these findings were not significant; nevertheless, there was one tumour with HER2 overexpression (3+) in group 2, and equivocal in group 1 (2+) that was not amplified by DDISH. This last tumour showed heterogeneous staining and could be a false-positive result with no response to HER2 targeted therapy (FIGURE 4).

## DISCUSSION

Immunohistochemistry is part of the daily work in a Pathology lab, as is histomorphologic interpretation for diagnosis and treatment decision. IHC detection of ER, PR and HER2 can vary considerably based on fixation procedures, selection and dilution of antibody, detection system, antigen retrieval and interpretation of the assay [23,24]. In the present study we evaluated the impact of pre-analytical phase (cold ischaemia time, fixation type-buffered *versus* non-buffered formalin, and fixation time) in the histological and immunohistochemical evaluation of invasive mammary

carcinomas. Although specimens from both groups were immersed in fixative at the same time, cold ischaemia time may not be the same for both groups, as the time the specimen is immersed in formalin is not the same time it begins the fixation process. The fixative needs to achieve the tumour for fixation and formalin takes around 1mm per hour to penetrate tissue. Fixation will only start when penetration occurs [25]. Thus, group 1 (10x10x2 mm sample) may have shorter cold ischaemia time than group 2 (whole specimen: mastectomy or lumpectomy). The different times to fixation of the samples lead to morphological changes in histological evaluation with statistical significance in this study. Morphological changes, such as autolysis and tissue retraction, can turn diagnosis into a challenge to the pathologist. We also found statistical difference in histological tumor classification, group 1 showed more breast carcinomas with special subtypes and group 2, more ductal NOS. To avoid tumor fixation delay in large specimens such as mastectomies, we suggest incising the specimen and respecting resection margins to allow penetration of the fixative. The recommended cold ischaemia time should be up to one hour [7-9]. After 2 to 4 hours, the intensity of the immunohistochemical staining can decline or become negative [1,2,26,27]. When samples are refrigerated, there is a decline in hormonal receptors expression after 4 hours of cold ischaemia time [6]. Delayed time to cutting and immersion of tissue in formalin might also affect different areas of a given tumour at different rates [4]. Previous studies compared samples with different sizes and representations, as core biopsy and tissue microarray samples with complete excised tumours and they found a good concordance for ER and HER2 status. PR status was not highly concordant showing that ER was more reliable than PR status in different samples [3,28,29].

It is described that formaldehyde produces hydroxymethyl groups of amino acids that cross-react with large molecules and proteins required for the immunohistochemical reactions. Furthermore, proteolysis often causes non-specific binding with non-related molecules. Formaldehyde can break hydrogen bonds and electrostatic interactions affecting the configuration of the protein, increasing thereafter the possible significant changes in therapeutic targets [2,26]. Other aspects of the fixation process, including pH and temperature, have an impact on the antigenic conservation. The pH of formaldehyde affects the type of crosslinking which may occur. In 10% buffered formalin, the hydrogen sites of molecules are available for binding, as they are in a neutral state (not loaded). The decrease of pH induces the formation of charged amino groups ( $\text{NH}_3^+$ ) which do not show reactive hydrogen sites and promote interactions with amide groups ( $\text{CO-NH}_2$ ) [30].

Formaldehyde appears to be a continuously active substance and the effective fixing results from the formation of cross-links between the peripheral groups of proteins that include amine, imine, amide, peptide, guanidyl, hydroxyl, carboxyl, SH, and aromatic rings. It is described that the staining intensity of various antigens varies inversely with the time of exposure to formaldehyde [30]. Concern for tissue fixation time led to prospective validation studies that compared the results of ER testing, PR, and HER2 in fixed tissues by a standardized time with the same sample tissues that have suffered a prolonged fixation time (from 72 to 96 hours). The results of these studies suggest that formalin fixation time up to 72 hours did not change the reactivity of ER, PR, and HER2 and is therefore accepted as the upper limit time in clinical practice. The immunoreactivity of prognostic and predictive markers of breast cancer such as ER, PR and HER2 can be reduced by prolonged formaldehyde fixation [14]. Our study showed no significant differences in ER and PR staining in both groups, but there was one tumour with different hormonal receptors results. As ER and PR

usually show homogeneous staining, we do not believe sampling would be an answer for this disagreement. We believe that tumour sample representation could explain the different results of histological classification of the tumours. Tumours with heterogeneous morphology and phenotype were not equally represented in both groups. Breast tumours may show heterogeneous features in different areas and this heterogeneity pattern in the same tumor has raised issues related to tumour sampling [4]. This might be a limitation of our study since we compared only two samples of the tumor assigned in two different groups. There was one tumour in our series with heterogeneous morphology and HER2 expression. The sample included in group 1 showed a small group of cells with HER2 overexpression, leading to score 2+. In group 2, the same tumour showed more than 50% of the cells with HER2 overexpression, and there was a clear cut from the cells with no HER2 expression. This tumour had no HER2 amplification in DDISH (FIGURE 4).

In our country, the fixation conditions of specimens sent to pathology laboratories are, in general, unknown. In addition, fixation is dependent on numerous variables beyond fixation times, including proportion of tissue components (fat, stroma and proportion of cancer cells), ratio of tissue formalin, and time to gross inspection and dissection of specimens. Furthermore, the quality of fixation may vary across the tissue depending on whether formalin has reached a specific region at a particular concentration. Improving the accuracy of histology and immunohistochemistry for reliable diagnosis, hormonal receptors and HER2 status evaluation to increase the utility of the predictive markers in breast cancer is an ongoing challenge. Standardization of the fixation conditions and times is difficult and requires a team approach, involving surgeons, operating room assistants and pathologists. Therefore, Cree et al. recently published guidelines for laboratories performing molecular pathology for cancer patients [25].

In conclusion, our study showed more histological differences in samples with no pre-analytical control, such as morphological changes and histological tumor type classification. Predictive factors (ER, PR and HER2) showed no statistical differences in immunohistochemical staining in both groups.

#### Take Home Messages:

- 1) Pre-analytical phase control is important for tissue sample preservation and histopathological evaluation of invasive mammary carcinomas;
- 2) Cold ischaemia time, fixation time and fixation type did not influence immunohistochemistry staining for hormone receptors and HER2;

**Acknowledgements:** The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

**Contributors:** The plan of this project was suggested by HG. All authors contributed with the selection and gross procedure of the cases. MAB was responsible for the immunohistochemistry reactions, datasheet construction and for this manuscript writing. CBN made the tests analysis and diagnosis. DB was responsible for the statistics and manuscript revision.

**Funding:** Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Grant number APQ 02319-11) and Fundação de Desenvolvimento de Pesquisa (FUNDEP, Grant number 17923\*1). The authors have no relevant financial interest in the products or companies described in this article.

Competing interests: None.

Patient consent: Obtained

Ethics approval: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP, under the protocol number ETIC 0297.1.203.000-10.

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article to be published in Journal of Clinical Pathology editions and any other BMJPGJL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence.

## REFERENCES

- 1- Apple S, Pucci R, Lowe AC, et al. The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011Apr;135(4):592-8.
- 2-Khoury T. Delay to formalin fixation alters morphology and immunohistochemistry for breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012Dec;20(6):531-42
- 3-Li X, Deavers MT, Guo M, et al. The Effect of Prolonged Cold Ischemia Time on Estrogen Receptor Immunohistochemistry in Breast Cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013;26(1):10.1038/modpathol.2012.135.
- 4-Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, et al. Quantitative Assessment of Effect of Preanalytic Cold Ischemic Time on Protein Expression in Breast Cancer Tissues. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*2012;104(23):1815-1824.
- 5-Siddiqui S, Rimm DL. Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast Cancer Research : BCR*2010;12(6):113.
- 6-Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2012 Aug;25(8):1098-105.
- 7-Hammond ME. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: na update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011 Dec;19(6):499-500.
- 8-Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JM, et al. National Coordinating Committee for Breast Pathology. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2015Feb;68(2):93-9
- 9-Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013Nov 1;31(31):3997-4013.
- 10-Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002 Jun;10(2):183-6.
- 11-Ibarra JA, Rogers LW, Kyshtoobayeva A, et al. Fixation time does not affect the expression of estrogen receptor. *Am J Clin Pathol.* 2010May;133(5):747-55.

12-Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, et al. Effect of ischemic time, fixation time, and fixative type on HER2/neu immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization results in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011Nov;136(5):754-61.

13-Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, et al. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(2):182-8.

14-Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, et al. The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study. *Am J Surg Pathol*. 2011Apr;35(4):545-52.

15- 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*. 1991Nov;19(5):403-10.

16-Gouvêa AP, Milanezi F, Olson SJ et al.. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006Mar;14(1):103-8.

17-Nunes CB, Rocha RM, Buzelin MA, et al. False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *J Clin Pathol*. 2013 Nov;66(11):946-50.

18-Nunes C, Rocha R, Buzelin M, et al. High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer: whole slide imaging for the assessment of HER2 expression. *Pathol Res Pract*. 2014 Nov;210(11):713-8.

19-Rocha R, Nunes C, Rocha G, et al. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract*. 2008;204(9):655-62.

20-Rocha RM, Nunes CB, Sanches FS, et al. Rabbit antibodies for hormone receptors and HER2 evaluation in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2009 Mar Apr;55(2):163-8.

21-Lakhani, S.R. *et al* (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors of the Breast. IARC: Lyon, 2012. 240p.

22-Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha,



progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol*. 2010May;23 Suppl 2:S52-9.

23-Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol*. 2006May;17(5):818-26.

24-Hardy LB, Fitzgibbons PL, Goldsmith JD, et al. Immunohistochemistry validation procedures and practices: a College of American Pathologists survey of 727 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 2013Jan;137(1):19-25.

25-Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJL, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *Journal of Clinical Pathology* 2014;67(11):923-931.

26-Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol*. 2009Nov;22(11):1457-67.

27-Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2013Jan;26(1):1-9.

28-Arnedos M, Nerurkar A, Osin P, et al. Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Ann Oncol*. 2009Dec;20(12):1948-52.

29-Uy GB, Laudico AV, Carnate JM, et al. Breast cancer hormone receptor assay results of core needle biopsy and modified radical mastectomy specimens from the same patients. *Clinical breast cancer* 2010;10(2):154-159.

30-Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol*. 2010Nov;17(6):404-18.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Histomorphological alterations in tumour tissue caused by cold ischaemia time. Case 17: group 1, with pre-analytical phase control (A) and group 2, without pre-analytical phase control (B); case 44: group 1 (C) and group 2 (D). HE, 200X.

Figure 2 – Different histological classification of case 37 (A, ductal NOS; B, micropapillary), case 21 (C, lobular; D, tubular and lobular), case 48 (E, colloid; F, ductal NOS), in group 1, with pre-analytical phase control (left, A, C and E) and group 2, without pre-analytical phase control (right, B,D,F). HE, 200X.

Figure 3 – Estrogen (ER) and progesterone (PR) nuclear immunohistochemical staining in case 22: positive in group 1, with pre-analytical phase control (ER, A; PR, B) and negative in group 2 without pre-analytical phase control (ER, C; PR, D). 400X

Figure 4 – HER2 heterogeneous immunohistochemical membrane expression in case 16: equivocal (score 2+) in group 1, with pre-analytical phase control (A, 50X; B, 400X) and positive (score 3+) in group 2, without pre-analytical phase control (C, 50X; D, 400X).