



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO
DAS FASES PRÉ-ANALÍTICA, ANALÍTICA E PÓS-
ANALÍTICA DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PELA PRATA USANDO
MICROARRANJOS DE TECIDO**

**HER2 assessment in breast cancer: a study of the preanalytical, analytical and
postanalytical phases of immunohistochemistry and silver *in situ* hybridization assays in
tissue microarrays**

Doutoranda: Cristiana Buzelin Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi

Co-orientador: Prof. Rafael Malagoli Rocha

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal

Belo Horizonte

2013

CRISTIANA BUZELIN NUNES

**AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO
DAS FASES PRÉ-ANALÍTICA, ANALÍTICA E PÓS-
ANALÍTICA DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PELA PRATA USANDO
MICROARRANJOS DE TECIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Patologia Médica - área de concentração em Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi
Co-orientador: Prof. Rafael Malagoli Rocha

Belo Horizonte

2013

Nunes, Cristiana Buzelin

N972a Avaliação do HER2 em câncer de mama [manuscrito]: estudo das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica das técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* pela prata usando microarranjos de tecido. / Cristiana Buzelin Nunes. - - Belo Horizonte: 2013.

106f. : il.

Orientador: Helenice Gobbi.

Co-orientador: Rafael Malagoli Rocha

Área de concentração: Patologia Investigativa.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.

1. Imunoistoquímica. 2. Neoplasias da mama. 3. Hibridização In Situ. 4. Processamento de Imagem Assistida por Computador. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Gobbi, Helenice. II. Rocha, Rafael Malagoli. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 870



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA CRISTIANA BUZELIN NUNES

Realizou-se, no dia 18 de dezembro de 2013, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO DAS FASES PRÉ-ANALÍTICA, ANALÍTICA E PÓS-ANALÍTICA DAS TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDIZAÇÃO IN SITU PELA PRATA USANDO MICROARRANJOS DE TECIDO", apresentada por CRISTIANA BUZELIN NUNES, número de registro 2010748306, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Helenice Gobbi - Orientador (UFMG), Prof(a). Rafael Malagoli Rocha (Hospital do Câncer, FAP), Prof(a). Agostinho Pinto Gouvêa (Prefeitura de BH), Prof(a). Luciene Simões de Assis Tafuri (FUMEC e UNIFENAS), Prof(a). Marina de Brot Andrade (UFMG), Prof(a). Vanessa Fortes Zschaber Marinho (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

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

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2013.

Prof(a). Helenice Gobbi
Doutora - UFMG

Prof. Rafael Malagoli Rocha
Doutor - UFMG

Prof. Agostinho Pinto Gouvêa
Doutor - UFMG

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

Prof(a). Marina de Brot Andrade
Doutora - UFMG

Prof(a). Vanessa Fortes Zschaber Marinho
Doutora - UFMG

**Aos meus pais, Dr. Anísio Nunes e Eliana B. Nunes
(*in memoriam*), aos meus irmãos, Mauricio,
Patricia e Raquel, e ao meu marido, Fernando.**

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento:

À minha orientadora, Profa. Dra. Helenice Gobbi, pela oportunidade e confiança, pela amizade, dedicação, incentivo e acompanhamento constante, e, principalmente, pelo exemplo de ética e trabalho.

Ao meu marido Fernando Diniz Mendes, pela paciência, amor, apoio e compreensão.

Ao meu pai, Anísio Nunes pelo suporte, confiança, incentivo e principalmente pelos ensinamentos e amor na minha educação.

Aos meus irmãos, Maurício, Patrícia e Raquel, pela presença, carinho e incentivo.

À Dra. Anna Christina Lanna da Matta Machado Rodrigues, pela amizade, compreensão e equilíbrio.

Ao Marcelo Araújo Buzelin, pela colaboração constante nas etapas analíticas deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Mamária: Douglas, Amanda, Claudio Saliba, Henrique, Conceição, Renato, Marco Antônio, Marcio, Fernanda e Simone, pela amizade, convivência, momentos de alegria, especialmente à Débora Balabram pelo apoio e auxílio na estatística.

Ao meu co-orientador, Rafael Malagoli Rocha, pelo apoio, confiança e amizade e a todos os médicos e técnicos do AC Camargo Cancer Center, pela colaboração.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Patologia pelos ensinamentos que foram complementares e fundamentais à minha formação e crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia pela amizade e companheirismo.

Aos professores, residentes e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina e do Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas da UFMG pelo apoio, confiança e pela colaboração na aquisição de casos.

Aos médicos e funcionários do Instituto Moacyr Junqueira e do Laboratório da Santa Casa de Belo Horizonte pela confiança e apoio.

Aos professores, alunos e colegas do Centro Universitário UNIBH pela confiança, apoio e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

APOIO FINANCEIRO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 309807/2012-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ 02319-11) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

OBJETIVOS: Analisar a influência do controle da fase pré-analítica (CFPA) na imunohistoquímica (IHQ) para a expressão do HER2; determinar a sensibilidade e especificidade de anticorpos anti-HER2 comparando com a hibridização *in situ* (DDISH); comparar as metodologias de IHQ automatizada e manual e as análises visuais das reações de IHQ através de microscopia óptica (OM) e de imagem escaneada (WSI), para o HER2 no câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODOS: TMA contendo 200 carcinomas mamários (100 com e 100 sem CFPA) foram submetidos à IHQ (SP3, CB11, 4B5, HercepTestTM e A0485) e DDISH. A IHQ foi realizada por método manual (polímero Novolink) e automatizado (Benchmark®). As reações foram escaneadas e analisadas através de MO e WSI (Pannoramic Viewer, 3DHISTECH) segundo o guia ASCO/CAP.

RESULTADOS: 184 casos foram analisados pela IHQ e DDISH. Os casos com CFPA mostraram maior sensibilidade e especificidade dos anticorpos. Os casos com CFPA vs sem CFPA mostraram sensibilidade de 88,5 vs 87,2 (CB11) a 100 vs 94,7 (A0485), e especificidade de 95,2 vs 95,1 (A0485) a 98,1 vs 95,8 (CB11). 4B5 mostrou sensibilidade maior nos casos sem CFPA (96,1 vs 97,4). A concordância entre os anticorpos foi muito boa (κ : 0,82 a 0,9). A concordância global entre IHQ e DDISH variou de 94,1% (CB11) a 96,6% (A0485). A0485, HercepTestTM, SP3 e 4B5 mostraram sensibilidade e especificidade >95%. CB11 foi o mais específico (97,1%). 60% (CB11) a 83,3% (SP3) dos casos 2+ não mostraram amplificação gênica. Os casos falso negativos variaram de 0,5% (A0485) a 3,8% (CB11), e os falso positivos, de 1,6% (CB11) a 2,7% (HercepTestTM, SP3 e 4B5). A concordância entre os métodos manual (M) e automatizado (A) foi boa (A0485, $k=0,73$) a muito boa (SP3, $k=0,89$ e CB11, $k=0,85$). O método A mostrou maior sensibilidade do A0485 (M=85,0 vs A=98,4) e SP3 (M=92,3 vs A=97,0) e menor sensibilidade do CB11 (M=94,1 vs A=89,0). A especificidade do CB11 aumentou (M=92,3 vs A=97,1) e dos outros anticorpos diminuiu (A0485, M=96,4 vs A=95,3 e SP3, M=96,4 vs A=95,2). A concordância das análises WSI e OM foi boa (SP3, $k=0,80$) a muito boa (CB11-HercepTestTM, $k=0,81$). A análise WSI mostrou maior sensibilidade (100-SP3-HercepTestTM a 97-CB11), e menor especificidade (86,4-SP3 a 89,4-HercepTestTM) comparada com OM (sensibilidade de 92,1-CB11 a 98- SP3 e especificidade de 95,2- SP3-HercepTestTM a 97,1-CB11-SP3).

CONCLUSÕES: Os casos com CFPA mostraram maior sensibilidade e especificidade dos anticorpos, exceto o 4B5. Houve concordância muito boa entre os anticorpos anti-HER2. CB11 foi o anticorpo mais específico, mas teve mais casos falso negativos. O A0485, SP3, 4B5 e HercepTestTM mostraram sensibilidade e especificidade elevadas, mas tiveram mais casos falso positivos. As concordâncias entre os dois métodos IHQ e entre as avaliações por WSI e OM foram consideradas boas a muito boas, com alta sensibilidade e especificidade dos anticorpos utilizando-se ambos os métodos de avaliação.

Palavras-chave: Imunoistoquímica, HER2, Neoplasias da mama, Hibridização *in situ*, Processamento de Imagem Assistida por Computador

ABSTRACT

AIMS: To investigate the influence of preanalytical phase control (PAPC) for assessment of immunohistochemistry (IHC) HER2 expression against *in situ* hybridization (DDISH); to compare automated and manual IHC methodologies, and visual evaluations of the IHC assays through optical microscopy (OM) and whole slide imaging (WSI), for HER2 expression in breast cancer. **MATERIALS AND METHODS:** TMAs containing 200 breast carcinomas (100 with and 100 without PAPC) were submitted to DDISH and IHC (five anti-HER2 antibodies: SP3, CB11 4B5, HercepTest™ and A0485) applying manual (Novolink Polymer) and automated (Benchmark®) methods. Slides were scanned (3DHISTECH) and evaluated visually using OM and WSI on computer screen (Pannoramic MIDI and Viewer) following ASCO/CAP guidelines. **RESULTS:** 184 cases were assessed by IHC and DDISH. Cases with PAPC showed higher sensitivity and specificity of the antibodies. Sensitivity and specificity of cases with PAPC versus cases without PAPC ranged from 88.5 vs 87.2 (CB11), to 100 vs 94.7 (A0485); and 95.2 vs 95.1 (A0485), to 98.1 vs 95.8 (CB11). 4B5 antibody showed higher sensitivity in cases without PAPC (96.1 vs 97.4). The concordance among antibodies was very good ($k=0.82$ to 0.9). The overall concordance between IHC and DDISH was 94.1% (CB11) to 96.6% (A0485). A0485, HercepTest™, SP3 and 4B5 were over 95% sensitive and specific. CB11 was the most specific antibody (97.1%). 60% (CB11) to 83.3% (SP3) of the 2+ cases showed no gene amplification. False negative cases varied from 0.5% (A0485) to 3.8% (CB11), and false positive from 1.6% (CB11) to 2.7% (HercepTest, SP3 and 4B5). The concordance of the antibodies applying both IHC methods was good (A0485, $k=0.73$) to very good (SP3, $k=0.89$ and CB11, $k=0.85$). Comparing automated (A) and manual (M) methodologies, there was a higher sensitivity of A0485 (M=85.0 vs A=98.4) and SP3 (M=92.3 vs A=97.0) and a lower specificity (A0485, M=96.4 vs A=95.3 e SP3, M=96.4 vs A=95.2). CB11 showed higher sensitivity (M=94.1 vs A=89.0) by applying the M methodology and a higher specificity by applying the A methodology (M=92.3 vs A=97.1). Assessment of WSI and OM agreement was good (SP3, $k=0.80$) to very good (CB11 and HercepTest™, $k=0.81$). WSI evaluation led to a higher sensitivity (100-SP3-HercepTest™ to 97-CB11), and a lower specificity (86.4-SP3 to 89.4-HercepTest™) compared to OM evaluation (sensitivity 92.1-CB11 to 98-SP3; specificity 95.2-SP3-HercepTest™ to 97.1-CB11-SP3). **CONCLUSIONS:** Cases with PAPC showed a higher sensitivity and specificity for all antibodies, but 4B5. There was a very good agreement among the five anti-HER2 antibodies. CB11 was the most specific antibody, but showed more false negative cases. A0485, SP3, 4B5 and HercepTest were highly sensitive and specific, but showed more false positive cases. The agreement between both IHC methods and between WSI and OM analysis was good to very good. The antibodies were highly sensitive and specific using both methods of evaluation.

Keywords: Immunohistochemistry, HER2, Breast neoplasms, *In situ* hybridization, Image Processing, Computer-Assisted.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
BM	Banho-maria
CAP	Colégio de patologistas americanos
CC1	Cell conditioning solution (pH 8.5)
CEP17	centrômero do cromossoma 17
CI 95%	Intervalo de confiança de 95%
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
COEP	Comitê de ética em pesquisa da UFMG
DDISH	Hybridização <i>in situ</i> de dupla marcação em campo claro
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
<i>GEP</i>	<i>Perfis de Expressão Gênica</i>
HE	Hematoxilina e eosina
Her1	Receptor 1 do fator de crescimento epidérmico
Her2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico
Her3	Receptor 3 do fator de crescimento epidérmico
Her4	Receptor 4 do fator de crescimento epidérmico
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NEQAS	<i>UK National External Quality Assessment Service</i>
OM	Microscopia óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SISH	Hibridização <i>in situ</i> pela prata
TMA	Microarranjo de tecidos (<i>tissue microarray</i>)
TNM	<i>American Joint Committee on Cancer tumor, node and metastasis</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WSI	Imageamento de toda a lâmina

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS

FIGURA 1 - Figura 1: Principais achados genômicos, clínicos e proteômicos dos quatro subtipos moleculares do câncer de mama (CGAN, 2012)	20
FIGURA 2 - Família de Receptores Humanos do Fator de Crescimento Epidérmico (HER) e agentes terapêuticos disponíveis (GRADISHAR, 2011)	25
FIGURA 3 – Fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos do teste para HER2, segundo o guia de recomendações da ASCO/CAP 2007.....	27
FIGURA 4 – Lâmina digitalizada pela doutoranda, marcada fortemente para o HER2, visualizada pelo programa Panoramic Viewer da 3DHistech	36
FIGURA 5 – Sistemas de digitalização de lâminas (escaneadores) da 3DHistech (http://www.3dhistech.com)	36
FIGURA 6 – Planilha e corte histológico corado em HE do TMA deste trabalho contendo 200 casos de carcinoma mamário invasor	38
FIGURA 7 – Escores de classificação da expressão do HER2 segundo as recomendações da ASCO/CAP 2007 e 2013, respectivamente	42
QUADRO 1 - Anticorpos anti-HER2: clone, fabricante, método de detecção, recuperação antigênica e diluição utilizados nas reações manuais	41
QUADRO 2 - Anticorpos anti-HER2: clone, fabricante, método de detecção, recuperação antigênica e diluição utilizados nas reações automatizadas	41
GRÁFICO 1 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH	51
TABELA 1 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH em tumores com e sem controle da fase pré-analítica	52
TABELA 2 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada	54
FIGURA 8 – Superexpressão de HER2 em um caso sem controle da fase pré-analítica usando cinco anticorpos anti-HER2	53
GRÁFICO 2 – Sensibilidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada	55
GRÁFICO 3 – Especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada	55

FIGURA 9 – Expressão da proteína HER2 pelo anticorpo CB11 e status do gene pelo DDISH num caso discordante (a) Escore 3+ no método automatizado 400X; (b) Escore 1+ no método manual 400X; (c) Amplificação do gene HER2 pelo DDISH 1000X56

ARTIGO: FALSE POSITIVITY IN HER2 TESTING OF BREAST CANCER: NOVEL PATHS FOR APPROACHING AN OLD DILEMMA

TABLE 1 - Anti-HER2 antibody clones, sources, detection systems, antigen retrieval methods and dilutions used in the IHC assays47

TABLE 2 - Percentage of HER2 immunoexpression of five anti-HER2 antibodies in 184 invasive breast cancers 48

TABLE 3 - Kappa concordance rate and 95% Confidence Interval among five anti-HER2 antibodies48

TABLE 4 - Correlation of HER2 expression by immunohistochemistry using five anti-HER2 antibodies (A0485, HercepTest, CB11, SP3 and 4B5) with *HER2* gene status as determined by dual colour *in situ* hybridization49

TABLE 5 - Sensitivity and specificity of anti-HER2 antibodies compared to DDISH50

FIGURE 1 – HER2 protein expression and gene amplification in a discordant case. (a) 4B5 2+ immunostaining 400X; (b) HercepTest™ 3+ immunostaining; (c) A0485 2+ immunostaining 400X; (d) SP3 3+ immunostaining 400X; (e) CB11 1+ immunostaining 400X, (f) DDISH demonstrating HER2 amplification 1000X49

ARTIGO: HIGH AGREEMENT BETWEEN WHOLE SLIDE IMAGING AND OPTICAL MICROSCOPY FOR ASSESSMENT OF HER2 EXPRESSION IN BREAST CANCER

TABLE 1 - Histologic type, histologic grade and PT stage of the 200 breast cancers included in the study75

TABLE 2- Anti-HER2 antibody clones, sources, detection systems, antigen retrieval methods and dilutions used in the IHC assays76

TABLE 3 - Proportion of HER2 immunoexpression using optical microscopy and whole slide image evaluations in invasive breast cancer (%)76

TABLE 4 - Semiquantitative IHC scores using optical microscopy and whole slide image evaluations against amplification of *HER2* gene by DDISH77

TABLE 5 - Sensitivity and specificity of three anti-HER2 antibodies using optical microscopy and whole slide image evaluations compared to DDISH78

FIGURE 1 - Whole Slide Images of *TMA* cores displaying 0, 1+, 2+ and 3+ HER2 scores following new 2013 ASCO/CAP recommendations (SP3 antibody, 60X) [43]78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CÂNCER DE MAMA	14
1.2. HER2.....	22
1.3. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	26
1.4. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	31
1.5. ANÁLISE ATRAVÉS DE IMAGEM DIGITALIZADA	33
1.6. MICROARRANJOS DE TECIDO	37
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. SELEÇÃO DOS CASOS E CONSTRUÇÃO DOS MICROARRANJOS DE TECIDO.....	40
3.2. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	40
3.2.1. ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	42
3.3. REAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	43
3.4. ASPECTOS ÉTICOS	43
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5. RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES PARCIAIS	45
5.1. ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO E PUBLICADO NO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY EM JULHO DE 2013:	45
5.2. IMPORTÂNCIA DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA IHQ E NA ISH: COMPARAÇÃO DE CASOS COM CONTROLE E SEM CONTROLE DA FASE PRÉ-ANALÍTICA	51
5.3. ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS MANUAL E AUTOMATIZADO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA EM TODOS OS CASOS	54
5.4. ARTIGO CIENTÍFICO ENVIADO AO PATHOLOGY - RESEARCH AND PRACTICE EM OUTUBRO DE 2013:	57
6. CONCLUSÕES FINAIS	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8. ANEXOS	92
8.1. ANEXO A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM A TESE/DOCTORADO.....	92

8.2. ANEXO B – ALGORITMOS DAS RECOMENDAÇÕES DA ASCO/CAP 2013 PARA AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER DE MAMA.....	95
8.3. ANEXO C – QUADRO RESUMO DOS GUIAS DE RECOMENDAÇÕES DA ASCO/CAP PARA AVALIAÇÃO DO HER2 DE 2007 E 2013	98
8.4. ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG	103
8.5. ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO PATHOLOGY – RESEARCH AND PRACTICE.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, e o mais comum entre as mulheres, representando 21% dos novos casos de câncer em mulheres a cada ano. As estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Segundo a OMS, nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos registros de câncer de base populacional de diversos continentes (LAKHANI *et al.*, 2012). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos é de 57.120 para 2014. Os maiores valores das taxas médias de incidência anual, ajustadas por idade por 100 mil mulheres, foram encontrados em Porto Alegre (91,8), Belo Horizonte (72,7) e São Paulo (29,1). A menor taxa foi observada na cidade de Cuiabá (49,6). Em 2010 foram registradas 12.852 mortes por câncer de mama, sendo 147 homens e 12.705 mulheres (INCA Brasil, 2013).

O câncer de mama representa um grupo heterogêneo de tumores com diferentes características biológicas e morfológicas, e variada resposta terapêutica. O tratamento do câncer de mama é baseado no controle local (cirúrgico) associado ou não à terapia sistêmica. Entretanto, com o tempo, pode surgir resistência inata ou adquirida ao tratamento, e uma proporção de tumores que inicialmente mostrou evidências de resposta poderá progredir (WILLIAMS *et al.*, 2006). Apesar dos altos índices de sobrevivência atingidos utilizando terapia sistêmica em mulheres com tumores iniciais, existem toxicidade significativa e efeitos colaterais que interferem na qualidade de vida da paciente, além dos custos associados a esta terapia. A variedade de tratamentos existentes para o câncer de mama tem impacto na clínica de rotina, que se baseia, cada vez mais, na disponibilidade de fatores prognósticos e preditivos clínicos e patológicos bem validados para dar suporte às decisões terapêuticas. Para garantir maior chance de obter benefício com menor efeito colateral negativo à paciente, existe uma necessidade crescente na identificação e validação dos fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama (RAKKA & ELLIS, 2011).

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 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 biológicas 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).

O câncer de mama possui marcadores específicos rotineiramente utilizados para prever resposta terapêutica e guiar 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 HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2) 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; GOLDBIRSCHE *et al.*, 2005; 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 receptor de estrogênio 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/neu ou trastuzumab isoladamente ou combinado com quimioterapia ou outros medicamentos anti-HER2 (GOLDBIRSCHE *et al.*, 2005).

O carcinoma mamário é uma doença genética complexa, caracterizada pelo acúmulo de alterações moleculares múltiplas. Existe uma percepção de que os fatores prognósticos e preditivos tradicionais disponíveis atualmente sejam insuficientes para explicar toda a heterogeneidade clínica e genética do câncer de mama, não explicando completamente o comportamento, evolução e resposta terapêutica variáveis da doença em pacientes apresentando fatores semelhantes, como tipo e grau histológicos, tamanho da neoplasia, status linfonodal, status dos receptores hormonais e do HER2 (PEROU *et al.*, 1999; PEROU *et al.*, 2000). Tumores classificados sob um mesmo termo descritivo, histologicamente idênticos, podem apresentar aspectos moleculares diferentes. Esta heterogeneidade molecular dos tumores mamários, não avaliável morfológicamente, é um importante desafio ao estudo e tratamento do câncer de mama (GOLDBIRSCHE *et al.*, 2005; PAYNE *et al.*, 2008).

É contínua a busca de novos esquemas de classificação, de marcadores e de fatores prognósticos adicionais que melhor determinem prognóstico e evolução clínica do câncer de mama, estratifiquem os grupos de risco, identifiquem com acurácia pacientes com risco ou não de recorrência e aqueles que responderiam ou não ao tratamento específico, evitando morbidade iatrogênica. Fatores que auxiliem a direcionar as alternativas terapêuticas para aqueles que efetivamente se beneficiariam, particularmente, para pacientes com tumores que não expressam as moléculas-alvo acima referidas, (SORLIE *et al.*, 2001; VAN DE RIJN *et al.*, 2002).

Avanços recentes na pesquisa do genoma humano e em tecnologias moleculares de larga escala começaram a destrinchar a complexidade molecular do câncer de mama. Na última década, o campo da pesquisa no carcinoma mamário foi dominado pelo conceito de taxonomia molecular, com o reconhecimento de classes moleculares distintas e a demonstração do valor prognóstico e preditivo de *multigene classifiers* (assinaturas gênicas). Com o desenvolvimento de diversas assinaturas gênicas, estas foram defendidas por predizerem a cura mais acuradamente do que fatores morfológicos clássicos. No início, esta tecnologia foi reconhecida como futura substituta do exame histopatológico. Mais recentemente, foi entendido que esta tecnologia deveria ser considerada como complementar aos sistemas clássicos de classificação do carcinoma mamário (RAKHA *et al.*, 2008b).

Métodos proteômicos de larga escala e métodos de perfis de expressão gênica (*GEP*) revolucionaram a pesquisa do câncer de mama, como ferramentas que prometem melhorar o diagnóstico e a capacidade de prever recorrência, adicionando melhor seleção terapêutica individualizada às pacientes. A premissa básica destes testes é a de simultaneamente quantificarem a expressão de múltiplos genes e combinarem as medidas de expressão gênica em escores de predição que possam definir a evolução clínica mais acuradamente do que qualquer um destes genes isoladamente (RAKKA & ELLIS, 2011).

Os dois tipos principais de microarranjos de expressão gênica são os de cDNA e os de oligonucleotídeos. Ambos os tipos de microarranjos são hibridizados com amostras de cDNA ou RNA obtidos dos tecidos de interesse, para avaliar as alterações em seus níveis de expressão (RAKHA *et al.*, 2008b). Como estas técnicas podem ser aplicadas a um número relativamente limitado de casos e utilizam genes que ainda requerem validação, outros métodos têm sido aplicados. A reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) permite, simultaneamente, a amplificação e a detecção do DNA alvo ou de

sequências de cDNA. Outra opção é a utilização de microarranjos de tecido ou *tissue microarrays* (TMA), um método que permite a análise de perfis de expressão proteica em grandes coortes, a partir de arquivos de amostras de tecido embebidas em blocos de parafina, possibilitando a correlação com bancos de dados clínico-patológicos e de seguimento (KONONEN *et al.*, 1998).

Expressão gênica é o termo técnico para descrever como um gene particular está ativo ou quantas vezes ele foi expresso ou transcrito para produzir a proteína que ele codifica. Esta atividade é medida pela contagem do número de moléculas de mRNA em determinado tipo de célula ou tecido, sendo a proteína, e não o RNA, o produto funcional dos genes. GEP tem sido realizado para: (a) identificar classes moleculares específicas de câncer de mama (descobrimiento de classes; taxonomia molecular) que apresentem relevância clínica e biológica que não possam ser identificadas por meios convencionais (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; ABD EL-REHIM *et al.*, 2005); (b) identificar perfis moleculares específicos “assinaturas gênicas” que possam predizer o comportamento tumoral (predição de classe) (FOEKENS *et al.*, 2006; VAN’T VEER *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005) e/ou resposta à terapia (preditor de classe) (ZHANG *et al.*, 2009; HESS *et al.*, 2006; POTTI *et al.*, 2006); (c) comparar classes “predefinidas” de câncer de mama (comparação de classes) visando determinar se os perfis de expressão são diferentes nestas classes e, se forem, identificar quais genes são expressos diferentemente (SCHUETZ *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2003; SETH *et al.*, 2003; TURASHVILI *et al.*, 2007).

O grupo de Stanford foi pioneiro em demonstrar que o câncer de mama pode ser classificado em subtipos moleculares distintos com base em seus perfis de expressão gênica e em suas semelhanças com as células não neoplásicas correspondentes (PEROU *et al.*, 2000). Utilizando um método de agrupamento hierárquico e sequências intrínsecas de genes, através de microarranjos de DNA, os pesquisadores classificaram os carcinomas mamários em quatro classes moleculares. Além da separação lógica dos tumores em RE positivos e RE negativos (sendo a ramificação principal), agrupamentos secundários foram observados. De acordo com este trabalho, o grupo RE positivo é caracterizado por elevada expressão de painel de genes tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (“câncer luminal”). O grupo RE negativo engloba três subgrupos de tumores: um com superexpressão de HER2 (“HER2 positivo”) um que expressa genes característicos das células basais/mioepiteliais da mama normal (“câncer basal”); e outro cujo perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal/fibroadenomas (Figura 1). Estudos subsequentes (SORLIE *et al.*, 2001;

SORLIE *et al.*, 2003) identificaram os mesmos grupos de tumores inicialmente descritos por Perou *et al.* (2000). Entretanto, alguns subgrupos parecem ser instáveis (RAKHA *et al.*, 2006). Por exemplo, a subclassificação dos tumores luminais pode compreender dois grupos (luminal A e luminal B); tumores não classificáveis ou tipo “mama normal” parecem ser indistinguíveis do grupo de carcinomas RE negativos. Existe uma controvérsia questionando se o subtipo “mama normal” realmente existe, baseada na opinião de que seja um artefato de representação inadequada do tumor nos estudos realizados (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001). Posteriormente foi descrito o subtipo claudin-low que apresenta as características genômicas do câncer com fenótipo de células-tronco CD44+/CD24-/low (HENNESSY *et al.*, 2009; HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Pesquisas avaliando perfis imuno-histoquímicos em microarranjos de tecido, foram capazes de, pelo menos parcialmente, replicar a referida classificação molecular (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; SORLIE *et al.*, 2003). A importância desta taxonomia molecular se reflete nos casos em que grupos moleculares distintos diferem também quanto ao comportamento clínico; além disto, as análises transcriptômicas forneceram informações sobre quais genes seriam responsáveis por cada subgrupo (PARKER *et al.*, 2009; RAKHA *et al.*, 2008).

Estes estudos permitiram identificar grupos distintos de tumores e desenvolver novo esquema de classificação molecular dos carcinomas mamários, associados a diferentes cursos clínicos (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001). O recente desenvolvimento de métodos adicionais de conteúdo de alta informação, focados em anormalidades na metilação do DNA, expressão de microRNA (miRNA) e de proteína abrem novas oportunidades para uma caracterização mais completa da arquitetura molecular do câncer de mama. Em 2012 o *Cancer Genome Atlas Network* analisou tumores e amostras de DNA de 825 pacientes utilizando seis plataformas tecnológicas diferentes e demonstrou a existência de quatro classes principais de câncer de mama e de novos subtipos moleculares (CGAN, 2012).

As classes moleculares principais são:

Luminal/RE+: classe mais heterogênea em termos de expressão gênica, espectro de mutação, alterações de número de cópias e sobrevida do paciente. Este grupo de tumores se divide em duas classes principais:

Luminal A: expressão de genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (RE e RP positivos, e HER2 negativos);

Luminal B: expressão de genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama, além da expressão de genes semelhantes ao do grupo de tumores com superexpressão de HER2;

HER2 Enriched: superexpressão de HER2 (RE e RP negativos; e HER2 positivos);

Tipo-basal: expressão de genes e proteínas característicos das células basais/mioepiteliais da mama (HER2, RE e RP negativos; e expressão de citoqueratinas basais);

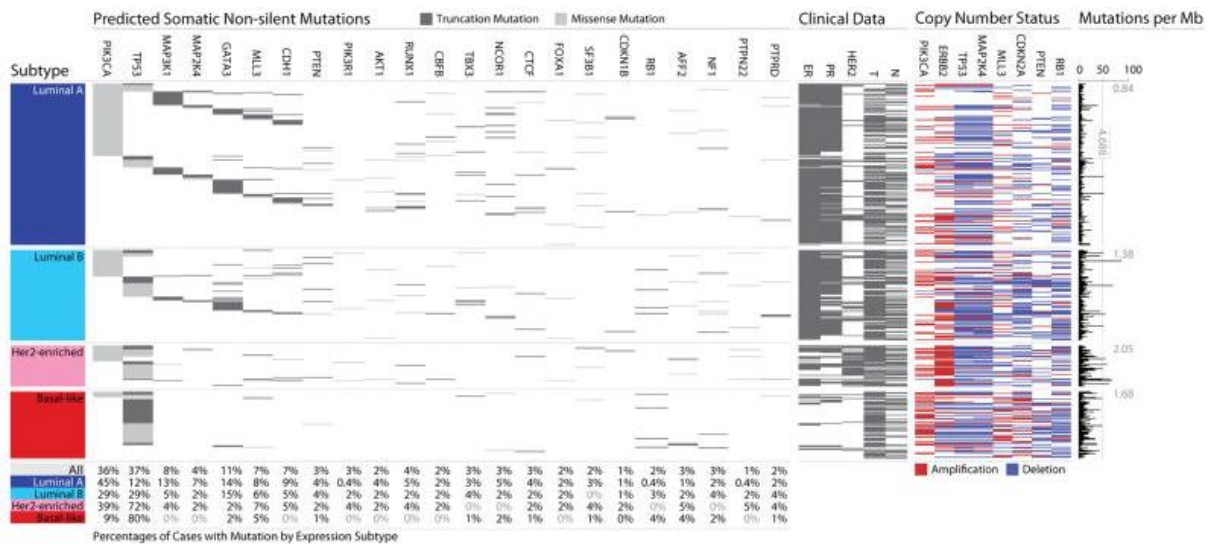


Figura 1: Principais achados genômicos, clínicos e proteômicos dos quatro subtipos moleculares do câncer de mama (CGAN, 2012)

A identificação de pelo menos dois tipos de carcinoma mamário RE positivo com evolução clínica diferente, foi uma das descobertas mais interessantes. O subgrupo luminal A foi caracterizado por uma alta expressão de RE, GATA3, X-box binding protein trefoil factor 3, hepatocyte nuclear factor 3 alpha, e LIV-1, enquanto o subgrupo luminal B mostrou expressão moderada para os genes expressos pelas células luminais da mama e, mais frequentemente, níveis maiores de proliferação celular e níveis menores de expressão de RP. O tipo basal foi caracterizado pela expressão de keratinas 5 e 17, e pela laminina e fatty-acid binding protein 7. O subgrupo HER2 mostrou alta expressão de vários genes do amplicon do HER2. Estas e

as alterações moleculares mais recentemente descobertas pelo *Cancer Genome Atlas Network*, 2012, estão listadas na figura 1 contendo a tabela do artigo original.

Esta taxonomia molecular é um reflexo do status dos receptores hormonais/status do HER2/status proliferativo do carcinoma mamário (RAKKA & ELLIS, 2011). Embora estudos imuno-histoquímicos não forneçam análise biológica dos tumores tão acurada quanto aquela baseada em microarranjos de cDNA, os trabalhos utilizando marcadores proteicos e *TMA* possibilitam identificar os grupos inicialmente determinados através da análise do perfil gênico. Há então boa reprodutibilidade entre os estudos utilizando imuno-histoquímica e aqueles que empregaram microarranjos de cDNA para identificação de subtipos tumorais com características biológicas e comportamento clínico semelhantes (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005). O sistema de classificação baseado em perfis imuno-histoquímicos da expressão dos receptores hormonais e do status do HER2 ainda é considerado como biomarcador chave permitindo investigações em grandes populações como classificação molecular mais prática na clínica de rotina (RAKKA & ELLIS, 2011). Acredita-se que o índice proliferativo dos tumores tenha um papel muito importante para prever o comportamento tumoral. O grupo de Sotiriou (2006) mostrou que nenhum teste de assinatura gênica (*gene signatures*) apresentou valor prognóstico quando os genes relacionados à proliferação celular foram excluídos da análise.

Fatores moleculares prognósticos e preditivos tradicionais em carcinoma mamários incluem o status dos receptores hormonais e o status do HER2, que 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).

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. Os receptores hormonais são estudados através de imuno-histoquímica em material representativo do tumor fixado em formol tamponado diluído a 10% e emblocado em parafina. Este teste diagnóstico é usado rotineiramente na clínica e a decisão terapêutica depende do resultado.

O receptor de progesterona é regulado pelo estrógeno e sua expressão é conhecida por indicar uma via funcionante do receptor de estrógeno. 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).

1.2. HER2

O proto-oncogene *HER2/neu* foi descoberto independentemente em quatro diferentes laboratórios e chamado de *neu*, *HER2*, e *c-erbB-2*. Inicialmente foi identificada uma versão mutante do gene que atuava como oncogene responsável pela transformação potencial do DNA isolado dos neuroblastomas de rato induzidos por etilnitrosouréia. Os outros três laboratórios descobriram o gene pesquisando genes relacionados ao receptor de fator de crescimento epidérmico – *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), através de ensaios de cDNA usando o gene *v-erbB* e por isso denominaram o gene de *HER-2*, relacionado ao EGFR humano ou *c-erbB-2*. O gene *HER2/neu* está localizado no cromossomo 17q21 e codifica uma proteína receptora transmembrana de 185kD com atividade tirosinoquinase intracelular. A proteína é estruturalmente composta de um domínio extracelular de união ao ligante, um domínio transmembrana e um domínio catalítico intracelular de tirosinoquinase (SLAMON, *et al.*, 1987).

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. Esta família de

receptores está envolvida na comunicação célula-célula e célula-estroma através de um processo conhecido como transdução de sinal. Neste processo, fatores externos de crescimento, ou ligantes, afetam a transcrição de vários genes através de fosforilação e desfosforilação de diversas proteínas transmembranares e de sinalizadores intermediários intracelulares, a maioria deles com atividade enzimática. A propagação do sinal ocorre quando a atividade enzimática de uma proteína ativa a atividade enzimática da próxima proteína na cadeia (ROSS, 2009).

Depois que o ligante se liga a qualquer membro da família EGFR/HER, o receptor HER2 pode dimerizar com os outros membros da família EGFR. A grande variedade de ligantes e de cadeias intracelulares que se cruzam e interagem com outras cadeias permite uma variedade significativa de sinalizações. Como ainda não foi identificado um ligante específico para o HER2, ele é o parceiro preferido para dimerizar com os outros membros da família. Os heterodímeros do HER2 são mais estáveis e sua sinalização é mais potente que outras combinações de receptores sem o HER2. (CHO *et al.*, 2003; ROSS 2009; SHA & CHEN, 2010).

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 estrógeno e progesterona, e apresentam metástase linfonodal ao diagnóstico inicial. (BÁNKFALVI, *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013)

A descoberta do HER2 na década de 80, e a demonstração da associação de tumores com amplificação gênica ou superexpressão proteica com pior prognóstico, apontaram para o potencial oncogênico do HER2. Os pesquisadores começaram, então, a buscar tratamentos mais eficazes às pacientes que apresentassem tumores com superexpressão do receptor HER2. Atualmente, a pesquisa de superexpressão proteica ou de amplificação gênica deve ser realizada rotineiramente em todos os carcinomas mamários invasores, segundo os guias de recomendações de determinação do status do HER2 de diversos países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Espanha (ALBANELL *et al.*, 2009; BARTLETT *et al.*, 2011; HAMMOND *et al.*, 2011; HANNA *et al.*, 2007; WALKER *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2007;

WOLFF *et al.*, 2013). Devido à grande demanda de realização do teste do HER2, e a possível resposta a tratamentos específicos, torna-se cada vez mais necessária a realização de testes confiáveis, com sensibilidade e especificidade elevadas, e que possam ser reproduzidos e realizados em laboratórios centrais e laboratórios periféricos, para atender à população em geral (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 (HerceptinTM), lapatinib (TykerbTM), pertuzumab (PerjetaTM). Mais recentemente, foi aprovado pelo *FDA* a quarta droga contra o HER2, trastuzumab-maytansine (KadcylaTM), também conhecida como T-DM1. Figura 2. (MILES *et al.*, 2001; ROSS *et al.*, 2009; SHA e CHEN, 2010; SLAMON *et al.*, 1987; WOLFF *et al.*, 2013).

O trastuzumab (HerceptinTM) é um anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 lançado em 1998; o lapatinib (TykerbTM) é um inibidor duplo das tirosinoquinases HER2 e EGFR; o pertuzumab (PerjetaTM) é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a um epítipo distinto do HER2 (domínio II, o trastuzumab se liga ao domínio IV), bloqueando a dimerização com outros receptores HER, agindo sinergicamente com o trastuzumab. O trastuzumab, o lapatinib e o pertuzumab podem utilizados isoladamente ou junto com quimioterapia associada à antraciclina, diminuindo a progressão tumoral do carcinoma mamário. A T-DM1 é um conjugado anticorpo-droga, onde o anticorpo da terapia alvo anti-HER2, trastuzumab, está quimicamente ligado à citotoxina meytansine, um inibidor de microtúbulos. O anticorpo identifica as células do carcinoma mamário liberando o quimioterápico diretamente no tumor, o que reduz o risco de toxicidade. Esta terapia é atualmente indicada como tratamento de segunda linha para pacientes com carcinomas mamários invasores e metastáticos com progressão tumoral após tratamento com trastuzumab (GRADISHAR, 2012; MULCAHY, 2013; ROSS *et al.*, 2009; SHA e CHEN, 2010).

Existe uma variedade de métodos diferentes para detectar o status do HER2. A superexpressão da proteína pode ser detectada por imuno-histoquímica (IHQ), ELISA e *Western Blotting*. A amplificação gênica pode ser identificada por testes de hibridização *in situ* (ISH) fluorescente (FISH), cromogênica (CISH) ou pela prata (SISH), *Southern blotting* e reação em cadeia da polimerase (PCR) (WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013).

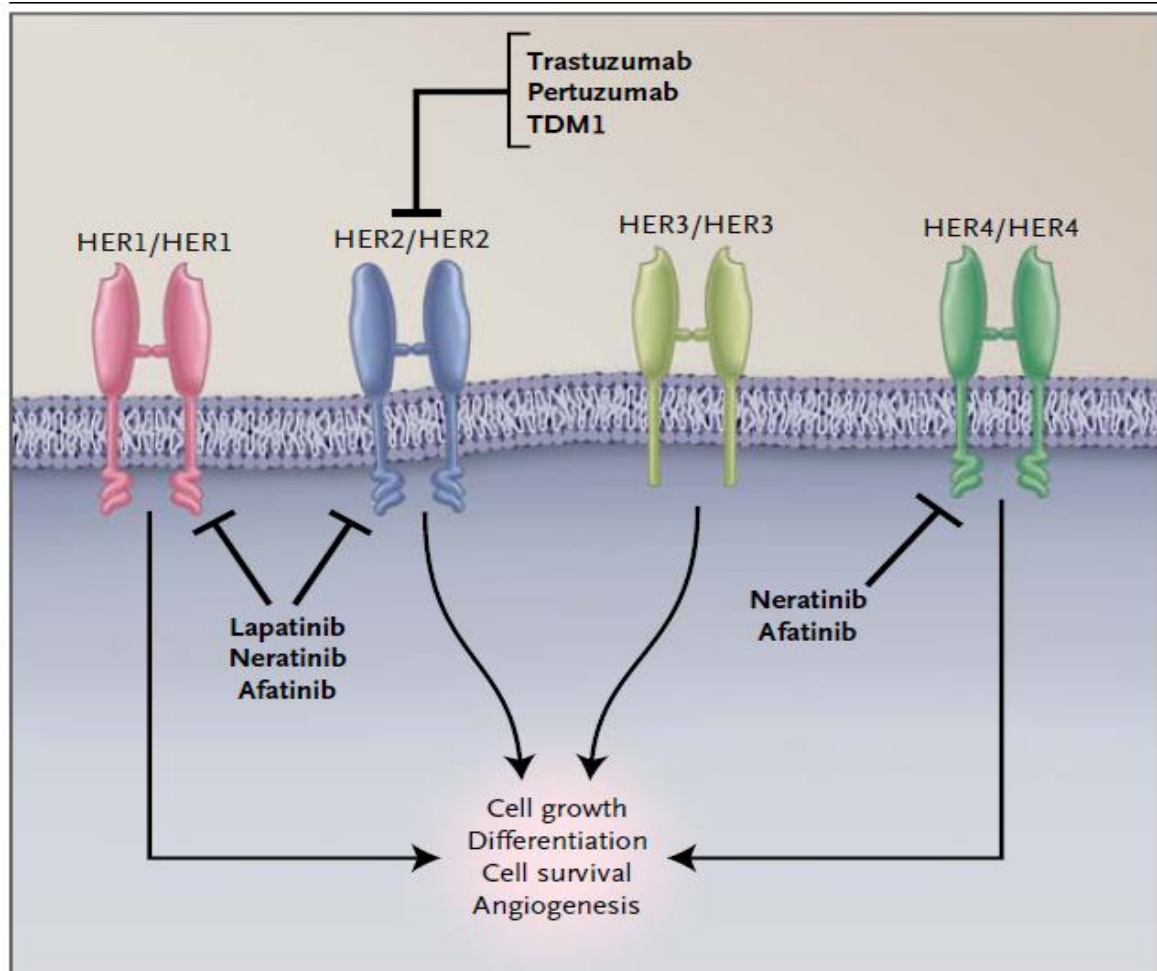


Figura 2: Família de Receptores Humanos do Fator de Crescimento Epidérmico (HER) e agentes terapêuticos disponíveis (GRADISHAR, 2012)

Os primeiros estudos do HER2 utilizavam as técnicas de *Southern* e *Western blotting* para detecção de amplificação gênica e superexpressão proteica, respectivamente, mas eram realizadas em material congelado ou à fresco, o que não é adequado para rotina diagnóstica (JACOBS *et al.*, 1999). A determinação de amplificação do *HER2* através de *real-time* PCR tem sido comparada ao FISH e à IHQ, mostrando tratar-se de método sensível e específico, com resultados comparáveis ao FISH, e potencial de categorizar os tumores com superexpressão duvidosa à IHQ (BENOHR *et al.*, 2005; NISTOR *et al.*, 2006). A dosagem sérica da concentração de HER2 não pode substituir a IHQ ou o FISH para avaliar o status do HER2. Também não pode ser usada como marcador tumoral em câncer de mama primário, devido à baixa prevalência da elevação de HER2 sérico (KONG *et al.*, 2006).

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). As técnicas de ISH ou IHC podem ser utilizadas como primeira opção de teste, ou devem ser utilizadas nos casos considerados equívocos, antes de se recomendar a terapia anti-HER2. (ARNOULD *et al.*, 2003; DOWSETT, *et al.*, 2003; WOLFF, *et al.*, 2007; WOLFF, *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2002).

1.3. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

A reação imuno-histoquímica para a detecção membranar da superexpressão do HER2 é o teste de rotina indicado para a sua avaliação em amostras de carcinoma mamário, devido ao menor custo, facilidade técnica e relevância biológica. Problemas com a variabilidade da marcação imuno-histoquímica têm sido reportados, especialmente diferenças na sensibilidade e especificidade entre os vários anticorpos comerciais disponíveis, variação da interpretação das reações e artefatos de técnica (DOWSETT *et al.*, 2007; SHA & CHEN, 2010).

A técnica imuno-histoquímica envolve as etapas pré-analítica (como preparar o material), etapa analítica (fases técnicas do ensaio imuno-histoquímico) e etapa pós-analítica (interpretação e quantificação dos resultados), Figura 3. Todas as etapas são importantes e ainda há grande variação nas metodologias e na padronização empregadas pelos diferentes laboratórios. A automação das reações tenta diminuir a variação metodológica, mas também pode sofrer influência do operador do equipamento e na padronização da técnica. Trabalhos europeus e americanos mostram variação nos resultados da avaliação do HER2 influenciados pelas três etapas (MOELANS *et al.*, 2010; SEIDAL *et al.*, 2001; WICK *et al.*, 2002; WOLFF, *et al.*, 2007).

Os fatores pré-analíticos, incluindo tempo de isquemia, tempo de fixação e tipo de fixador, 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 padronizados 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).

Preanalytic
Time to fixation
Method of tissue processing
Time of fixation
Type of fixation
Analytic
Assay validation
Equipment calibration
Use of standardized laboratory procedures
Training and competency assessment of staff
Type of antigen retrieval
Test reagents
Use of standardized control materials
Use of automated laboratory methods
Postanalytic
Interpretation criteria
Use of image analysis
Reporting elements
Quality assurance procedures
Laboratory accreditation
Proficiency testing
Pathologist competency assessment

Figura 3 – Fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos do teste para HER2, segundo o guia de recomendações da ASCO/CAP 2007

Artigos recentes na literatura sugerem que 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. O tempo de isquemia superior a 60 a 120 minutos pode comprometer a acurácia na análise IHQ e do FISH, 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).

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 (NH_3^+) que não apresentam sítios reativos de hidrogênio e favorecem interações com grupos amido (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, peptídeo, 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; al. Y-ALE, 2013).

Os problemas relacionados à fase analítica ou de processamento, como padronização das reações (manual ou automatizada), protocolos de reativação antigênica, escolha de reagentes como sistema de detecção, clones de anticorpos e suas diluições, são os principais responsáveis por baixas pontuações obtidas em avaliações nos programas externos de controle de qualidade. 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 tempo de exposição ao fixador (HARDY *et al.*, 2013).

Entre as variáveis que influenciam o processo imuno-histoquímico, está a etapa de reativação antigênica, importante na recuperação dos sítios antigênicos mascarados pela fixação em formol. Ela é influenciada pela temperatura e pelo tempo de duração da reativação induzida por calor. Estes fatores estão inversamente relacionados, assim, a reativação antigênica em baixas temperaturas requer um tempo maior para atingir os mesmos resultados obtidos em temperaturas mais altas. O tempo gasto para chegar até a temperatura desejada, o tempo necessário para esfriar até a temperatura ambiente, e a temperatura real obtida no processo são variáveis difíceis de serem controladas. A composição química e o pH da solução reativadora também podem afetar a eficácia do processo (LEONG *et al.*, 2010).

Embora amplamente empregados na rotina clínica e em estudos randomizados, ainda não há uma definição de quais anticorpos seriam mais acurados para avaliação do HER2, apesar de serem recomendados os anticorpos aprovados pelo *FDA* americano (BILOUS, *et al.* 2003; GOUVÊA, *et al.*, 2006; MOELANS *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2013). Atualmente, os anticorpos empregados para avaliação imuno-histoquímica do HER2 são o policlonal utilizado no HercepTestTM (A0485), os monoclonais de coelho SP3 e 4B5, e o monoclonal de camundongo CB11, sendo este último considerado mais específico e os primeiros, mais sensíveis para detecção da superexpressão da proteína HER2 (GOUVÊA, *et al.*, 2006, NUNES, 2007; NUNES *et al.*, 2008; RICARDO *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009a; VAN DER VEGT *et al.*, 2009).

Os dois testes de IHQ aprovados pelo *FDA* para identificação de superexpressão do HER2 são o HercepTestTM (da Dako, Carpinteria, CA, EUA) que utiliza o anticorpo policlonal A0485, e o Pathway (da Ventana, Tucson, AZ, EUA), que utiliza o anticorpo monoclonal de coelho 4B5. A concordância global entre o HercepTestTM, outros anticorpos anti-HER2 e ensaios de estudos clínicos foi considerada boa (SELVARAJAN *et al.*, 2004). A baixa especificidade do HercepTestTM também já foi ressaltada em outros estudos (JACOBS *et al.*, 1999; ROCHE & INGLE, 1999). O Kit Pathway foi introduzido em 2002 e utilizava o anticorpo monoclonal de camundongo CB11. Este anticorpo foi substituído pelo novo anticorpo monoclonal 4B5 em 2008, mostrando marcação de membrana mais precisa e menor marcação inespecífica de fundo, em comparação com o anticorpo CB11, e maior correlação com o método FISH, com excelente reprodutibilidade interlaboratórios (POWELL *et al.*, 2007).

Alguns autores recomendam a utilização de equipamentos de coloração automatizadas para garantir a padronização do processo de imunodeteção, embora tenha sido observado que

mesmo com metodologia automatizada, pode existir variação diária na densidade óptica da marcação em até 30% para o RE, quando o mesmo bloco de tecido é utilizado como controle diário da reação. Alterações na intensidade de cor do cromógeno podem ser percebidas a olho nu (HARDY *et al.*, 2013).

Desde a publicação do guia de recomendações para o teste do HER2 em 2007, tem sido identificada uma melhora na padronização do teste de IHQ pelos laboratórios, principalmente aqueles participantes de programas de acreditação, como o CAP e o *UK National External Quality Assessment Service* (NEQAS). Estes guias sugerem concordância de 95% entre os resultados da IHQ e a hibridização *in situ*, além de amplificação gênica inferior a 5% dos casos considerados 1+ pela IHQ. Vários ensaios clínicos compararam o resultado do teste do HER2 de laboratórios centrais com laboratórios locais e mostraram apenas 74 a 79% de concordância, sendo maior em laboratórios que realizavam mais de 100 testes por mês. É recomendado que os laboratórios realizem um mínimo de 250 testes por ano para assegurar a reprodutibilidade da reação, além de investirem em controles de qualidade interna da reação e participarem de testes de proficiência bianuais. O comitê de atualização da ASCO/CAP 2013 reenfaz a importância de que cada metodologia nova de testes utilizados para o mesmo diagnóstico clínico deva ser validada através de comparação com um teste de referência tendo o mesmo tipo de análise e utilidade clínica, incluindo pelo menos 25 a 100 amostras. As recomendações da ASCO/CAP de 2007 e 2013 enfatizam a validação dos resultados feita por um laboratório de referência (ALI *et al.*, 2011; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013).

Os termos validação e verificação são utilizados no contexto de desenvolvimento de novos testes. Entretanto, existe uma pequena confusão na utilização dos termos *validar* e *verificar*. O FDA define validação como “confirmação através de exame e provisão de evidência objetiva que os requerimentos particulares para uma utilização específica esperada possam ser consistentemente preenchidos”. Já verificação é definida como “um estudo utilizado para determinar se um tipo de teste atende às especificações” ou “processo único completo para determinar ou confirmar as características do desempenho de um teste antes que o teste seja utilizado em pacientes” (HARDY *et al.*, 2013). Pode-se interpretar validação como estarmos fazendo o teste correto, apropriado para o uso pretendido, e verificação, como estarmos fazendo o teste corretamente (JENNINGS *et al.*, 2009).

Estudos comparativos utilizando o teste imuno-histoquímico para detecção de superexpressão do HER2 entre laboratórios e entre observadores mostram maior índice de concordância entre

laboratórios de referência, destacando a importância do treinamento continuado, com maior volume de casos analisados, e a experiência do patologista (NUNES *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013). A análise automatizada das reações em computador, com programas específicos de interpretação das marcações vem sendo comparada com a análise óptica ou visual no microscópio, com boa correlação entre elas (ELLIS *et al.*, 2005; GUSTAVSON *et al.*, 2009; SKALAND *et al.*, 2008; TURASHVILI *et al.*, 2009).

A escolha dos anticorpos primários, as alterações da fase pré-analítica, e a interpretação das reações tem importância fundamental no resultado final dos testes imuno-histoquímicos. Este resultado poderá influenciar ensaios clínicos para testes de medicamentos, ou influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente individualmente (GOWN 2008; HAMMOND *et al.*, 2011; KHOURY *et al.*, 2009; KHOURY *et al.*, 2012; ROSS *et al.*, 2007; SAUTER *et al.*, 2009; WOLFF *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2013).

1.4. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A amplificação gênica identificada pela técnica de hibridização *in situ* é considerada o teste padrão-ouro (*gold standard*) para a determinação do status do HER2. A hibridização *in situ* fluorescente é uma técnica de custo elevado e requer equipamento e técnica especializados, como microscópio de luz fluorescente e avaliação das lâminas em campo escuro. Há perda das marcações com impossibilidade de arquivar as lâminas para revisão e ausência de identificação morfológica para diferenciar o componente *in situ* do componente invasor em carcinomas mamários. O FISH apresenta as vantagens de ter um sistema de *scoring* mais objetivo, quantitativo, e a presença de controle interno na reação (dois genes *HER2* presentes em todas as células). Os métodos de hibridização *in situ* cromogênica e pela prata apresentam as vantagens técnicas da IHQ com a reprodutibilidade do FISH. As técnicas de hibridização *in situ* com sonda dupla para marcação da amplificação gênica e do centrômero do cromossoma 17 (*Dual color dual hapten in situ brightfield hybridization* - DDISH) permitem a quantificação das marcações do gene e do cromossoma, e identificam os casos com amplificação verdadeira do HER2 e aqueles com polissomia do cromossoma 17. Vários estudos mostraram alta concordância (de 97 a 99%) entre DDISH, SISH, CISH e FISH (BARTLETT *et al.*, 2009; BHARGAVA *et al.*, 2005; DIETEL *et al.*, 2007; FRANCIS *et al.*, 2009; GRUVER *et al.*, 2010; HWANG *et al.*, 2011; KATO *et al.*, 2010; KOH *et al.*, 2011;

NITTA *et al.*, 2008; PAPOUCHADO *et al.*, 2010; PENAULT-LORCA *et al.*, 2009; SCHIAVON *et al.*, 2012; VAN DE VIJVER *et al.*, 2007).

A polissomia ocorre quando há duplicação completa de um cromossoma uma ou mais vezes, enquanto a monossomia é o resultado de deleção completa do cromossoma. A importância clínica de polissomia ou monossomia na ausência de superexpressão da proteína HER2 na IHQ é desconhecida. Entretanto, é pouco provável que a monossomia afete o tratamento do paciente, já que ela resultaria em menor expressão de HER2. A polissomia poderia aumentar a expressão de HER2 e, assim, necessita de maiores considerações. A incidência de polissomia do cromossoma 17 tem variado de 4% a mais de 30% em estudos de carcinomas mamários invasores. Esta grande variação reflete as diferenças na definição de polissomia, podendo ser definida como >2 cópias do cromossoma por célula até >4 cópias por célula. Alguns estudos relatam resposta a tratamento com trastuzumab de até 35% dos tumores com polissomia, mas esta resposta era restrita àqueles tumores que também superexpressavam a proteína HER2 (score 3+) (HOFMANN *et al.*, 2008). A polissomia parece ser mais comum do que a monossomia. Alguns estudos de hibridização genômica comparativa (aCGH) recentemente mostraram que a polissomia verdadeira (duplicação completa do cromossoma) é realmente rara, sendo a perda ou ganho da região pericentromérica do cromossoma 17 mais comumente observada e pode resultar em alterações na razão *HER2/CEP17* e em resultados falso negativos e falso positivos (HANNA *et al.*, 2013). A nova recomendação da ASCO/CAP para interpretação da amplificação gênica tenta minimizar estes resultados falsos (WOLFF *et al.*, 2013).

1.5. ANÁLISE ATRAVÉS DE IMAGEM DIGITALIZADA

Avanços tecnológicos, como programas de imagem, escaneadores e capacidade de arquivo de imagens, têm tornado o uso difundido de sistemas de imagem digitalizada uma realidade. Na anatomia patológica, uma especialidade médica baseada em imagem, o desenvolvimento da tecnologia de imagens digitalizadas levantou a possibilidade de se transformar o fluxo diagnóstico do laboratório em um fluxo completamente digital. Apesar dos vários benefícios que a tecnologia pode ter, é necessário conhecer suas limitações no diagnóstico clínico para prevenir riscos à população (JARA-LAZARO *et al.*, 2010).

A patologia digital envolve o uso de tecnologia computadorizada para converter imagens microscópicas analógicas em imagens digitais. É conhecida por imageamento de toda a lâmina (*whole slide imaging - WSI*) ou como imagem digitalizada, lâmina virtual ou microscopia virtual. Os sistemas de *WSI* consistem de um microscópio com câmera, um escaneador, um computador e um monitor associados a um programa de imagem. O sistema permite a aquisição, o processamento, o arquivamento e a recuperação da imagem. As lâminas digitalizadas podem ser vistas na tela do computador como são vistas tradicionalmente no microscópio de luz (Figuras 4 e 5). O patologista pode selecionar aumentos diferentes, ou pode dar ou tirar o *zoom* da imagem, permitindo uma avaliação mais próxima da área de interesse sem perder a resolução e a definição da imagem (AL-JANABI *et al.*, 2012a; ROCHA *et al.*, 2009d).

A *WSI* pode ter utilidade para o patologista para fins diagnósticos de lâminas microscópicas sem o uso do microscópio de luz, além de um espectro completo na patologia, como a portabilidade e o aumento da acessibilidade, podendo ver as lâminas de qualquer local, a qualquer hora, evita atrasos provocados pelo transporte físico das lâminas entre os diversos departamentos, se interligado a redes, facilidade de colaboração entre os patologistas, com a utilização de conferências em tempo real das lâminas digitalizadas, a possibilidade de visualizar imagens de fluorescência em múltiplos canais de formas variadas, e facilidade no arquivo de material (AL-JANABI *et al.*, 2012b; HO *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2009d).

Aparelhos automatizados de identificação celular incluem analisadores hematológicos, que fazem a contagem diferencial das células do sangue, analisadores de cromossomas, analisadores de sedimentos urinários e sistemas de imagem de citologia oncológica ginecológica. Todos eles localizam, contam e identificam as células, mas a interpretação final

deve ser realizada por uma pessoa treinada. O analisador de imagens tem sido usado como adjunto no diagnóstico pela microscopia de luz, na quantificação e na análise da intensidade de marcação na imuno-histoquímica, como HER2, Ki-67 e receptores hormonais. A imagem digitalizada pode ser interpretada manualmente pelo patologista criando uma estimativa de intensidade de marcação e porcentagem de positividade através da imagem apenas, ou pode ser utilizado um programa de interpretação de imagens, geralmente oferecido pelo fabricante. (CHEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012;).

As técnicas automatizadas de análise de imagens envolvem algoritmos que permitem o computador automaticamente interpretar testes imuno-histoquímicos, com medidas analíticas como quantificação de intensidade de marcação. Na avaliação do status do HER2, vários estudos mostraram alta acurácia e reprodutibilidade com a utilização de algoritmos dos analisadores de imagens para quantificar a expressão do HER2. Quando comparada com a microscopia ótica convencional, houve maior concordância com o FISH e menor variação inter e intra observador (DOLLED-FILHART 2012 *et al.*, GAVRIELIDES *et al.*, 2011; GUSTAVSON *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2007; KEAY *et al.*, 2013; LAURINAVICIENE *et al.*, 2011; MASMOUDI *et al.*, 2009; SKALAND *et al.*, 2008; SŁODKOWSKA *et al.*, 2010).

As empresas que desenvolveram os programas de análise de imagens solicitaram e receberam a aprovação do *FDA* americano para a avaliação da marcação do HER2 e de outras marcações, incluindo os receptores de estrógeno e progesterona. Uma das limitações mais importantes dos sistemas analisadores de imagens é a impossibilidade de reconhecimento de tipos celulares específicos, como tumor versus normal, e de separar componentes distintos da lesão, como componente invasor e componente *in situ*. A análise é, na verdade, semi-automatizada, significando que o patologista deve selecionar a área de interesse a ser interpretada e sempre confirmar o resultado da avaliação do analisador de imagem (HEDVAT, 2010).

Algumas questões foram levantadas quanto à utilização da *WSI* para a rotina diagnóstica; entre elas, se a qualidade das imagens digitalizadas poderia permitir o mesmo diagnóstico feito através de microscopia de luz para todos os espécimes e órgãos da patologia cirúrgica, ou se haveria alguma diferença na utilização dos dois métodos, como por exemplo, visualizar e navegar na tela do computador versus no microscópio de luz (LÓPEZ *et al.*, 2009). O *FDA* americano considerou os sistemas de *WSI* como artigos médicos classe III. Os artigos classe III são aqueles com a maior regulamentação de todos os artigos médicos. Eles são regulados

pelo sistema de qualidade e pelos procedimentos de confecção e devem receber aprovação antes de serem vendidos no mercado. Cada sistema de *WSI* deve ser rigorosamente validado para cada intenção de uso. Para se conhecer esta efetividade, os riscos, benefícios e as limitações do método, estudos de análise diagnóstica e clínicos estão sendo realizados para validar a performance diagnóstica da *WSI* (KRENACS *et al.*, 2009; PANTANOWITZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). O Colégio Americano de Patologistas (CAP) criou um grupo de trabalho para a validação em *WSI* e, recentemente, descreveu 12 recomendações para os laboratórios seguirem, se desejarem trabalhar com sistemas de *WSI* (PANTANOWITZ *et al.*, 2013).

Outras aplicações importantes da imagem digitalizada encontram-se na área de educação e ensino da patologia, e na pesquisa. No ensino da patologia, ela permite arquivar imagens de alta resolução que podem ser levantadas e utilizadas a qualquer momento e em qualquer lugar, solucionando problemas como quebra e reposição de lâminas nas aulas, e manutenção de material de ensino. A interatividade no ensino entre o professor e os alunos pode melhorar a eficiência do aprendizado. O arquivo pode ficar disponível online através de um acesso seguro permitindo que mais pessoas visualizem, editem ou façam comentários (AL-JANABI *et al.*, 2012b; ROCHA *et al.*, 2009d).

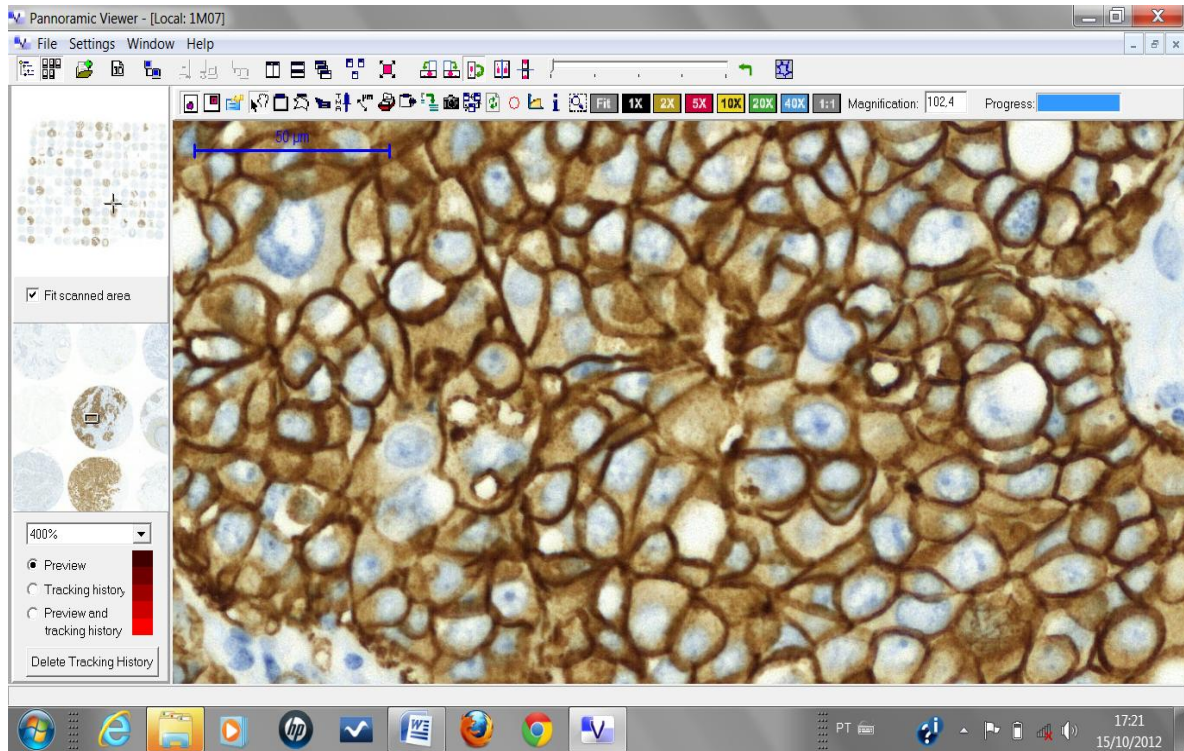


Figura 4 – Lâmina digitalizada pela doutoranda, marcada fortemente para o HER2, visualizada pelo programa Pannoramic Viewer da 3DHistech.



Figura 5 – Sistemas de digitalização de lâminas (escaneadores) da 3DHistech (<http://www.3dhistech.com>).

1.6. MICROARRANJOS DE TECIDO

O advento de estudos moleculares baseados no genoma de doenças levou à identificação de centenas de moléculas potencialmente associadas com o processo de doença. Surgiu então, a necessidade de analisar melhor estas moléculas em amostras de tecido para elucidar sua importância como biomarcadores ou alvos fisiológicos de prevenção baseados em drogas ou tratamentos específicos. (SAUTER *et al.*, 2002).

A técnica de microarranjos de tecido (*Tissue Microarray-TMA*) permite a análise retrospectiva em larga escala da expressão proteica dos tumores através da IHQ. Esta técnica apresenta acurácia comprovada que justifica seu emprego com amplas vantagens de custo e tempo para os estudos retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (BUBENDORF, *et al.*, 2001; MILANES – YEARSLEY, *et al.*, 2002; SAUTER, *et al.*, 2002).

Em 1986, Battifora *et al.* desenvolveram a técnica do *sausage ou multi-tissue tumor block*, onde tecidos diferentes eram processados juntos em um mesmo bloco de parafina de modo aleatório e não ordenado. Esses blocos eram utilizados para teste de novos anticorpos e como controle de qualidade das reações imuno-histoquímicas. Kononen *et al.* (1998), aprimoraram a técnica de Battifora: cilindros de amostras eram retiradas de tecidos de blocos de parafina pré-existent e reembebidos em um novo bloco de forma ordenada, com coordenadas pré-estabelecidas, tamanhos e formas regulares. Havia um maior número e melhor preservação das amostras e dos blocos, permitindo o estudo de um grande número de casos analisando-se apenas uma ou poucas lâminas. Essa técnica adicionou a vantagem de todas as amostras serem processadas em um mesmo momento e em condições idênticas, e ainda preserva o material remanescente para outras pesquisas ou necessidades diagnósticas, Figura 6.

Os estudos para validação do método *TMA* no carcinoma da mama demonstraram 98% de concordância com as reações nos cortes histológicos usuais para marcadores imuno-histoquímicos como o receptor de estrógeno e HER2, utilizando-se três amostras de 0.6mm de diâmetro de cada caso. Quando se utilizou apenas duas amostras a concordância obtida foi de 94% (CAMP *et al.*, 2000; DE MARZO & FEDOR, 2004). Este bom nível de concordância com cortes histológicos usuais permite utilizar os *TMA*s em estudos de comparação entre laboratórios e de qualidade dos testes (SELVARAJAN *et al.*, 2006).

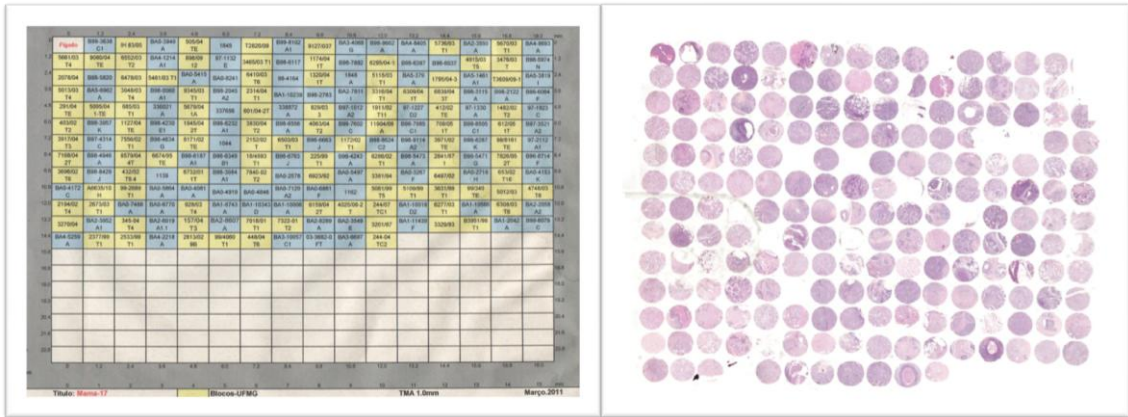


Figura 6 – Planilha e corte histológico corado em HE do TMA deste trabalho contendo 200 casos de carcinoma mamário invasor.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Devido à variação existente na identificação do status do HER2 pela reação imuno-histoquímica, com diferentes metodologias e anticorpos anti-HER2 disponíveis no mercado e à variação na interpretação destas reações em carcinomas mamários, e continuando os estudos comparativos já realizados em nosso laboratório de patologia mamária entre anticorpos anti-HER2 (policlonais, monoclonais), entre anticorpos anti-HER2, FISH e CISH, e avaliação interobservador na interpretação da reação imuno-histoquímica (GOUVEA *et al.* 2006, NUNES *et al.* 2007, NUNES *et al.* 2008), tivemos interesse em continuar a linha de pesquisa incluindo o novo anticorpo monoclonal de coelho 4B5 e o novo método de hibridização *in situ* de dupla marcação, DDISH, realizando avaliação das três fases das reações de imuno-histoquímica, reação manual e automatizada, e avaliação por método de imagem.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar a sensibilidade e especificidade de cinco anticorpos anti-HER2 monoclonais e policlonais em carcinomas mamários invasores, utilizando a hibridização *in situ* pela prata como padrão ouro;
2. Analisar a influência do controle da fase pré-analítica nas reações de imuno-histoquímica para HER2 em carcinomas mamários invasores;
3. Comparar duas metodologias da reação imuno-histoquímica para o HER2 em carcinomas mamários invasores, uma manual e outra automatizada;
4. Comparar duas análises visuais das reações de imuno-histoquímica na determinação da expressão do HER2 em carcinomas mamários invasores, uma através de microscopia óptica da lâmina e outra através da imagem escaneada visualizada na tela de computador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS CASOS E CONSTRUÇÃO DOS MICROARRANJOS DE TECIDO

Foram selecionados 200 casos de carcinomas mamários invasores diagnosticados no período de 1990-2010, previamente testados para a expressão do HER2 na rotina, sendo 100 casos provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG (considerados casos sem controle da fase pré-analítica) e 100 casos provenientes dos arquivos do AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, com fixação em formol tamponado, tempo entre clivagem e fixação inferior a uma hora e tempo de fixação entre 6 e 72 horas (considerados casos com controle da fase pré-analítica). Dos 200 casos selecionados, 70 casos (35%) eram negativos para superexpressão do HER2 (escore 0 ou 1+), 60 casos (30%) apresentavam expressão equívoca (escore 2+) e 70 casos (35%) apresentavam superexpressão para HER2 (escore 3+).

Todas as lâminas dos casos selecionados coradas por Hematoxilina e Eosina e imunomarcadas para HER2 na rotina dos serviços foram revisadas, sendo selecionada a área que melhor representasse o tumor. A partir dos blocos de parafina doadores foi construído o bloco receptor (*TMA*) contendo um cilindro de tecido de cada caso medindo 1,0mm de diâmetro. A posição dos casos foi identificada em uma planilha com referências de coluna e linha. Esta etapa foi realizada em colaboração com o AC Camargo Cancer Center, São Paulo.

O bloco de *TMA* foi submetido à microtomia, com espessura de 4 µm, obtendo-se cortes histológicos sequenciais até o esgotamento do bloco, colhidos em lâminas de carga elétrica.

3.2. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para avaliar a superexpressão da proteína HER2, foram utilizados anticorpos policlonais A0485 e HercepTestTM (Dako, EUA), um anticorpo monoclonal de camundongo CB11 (Novocastra, UK) e dois anticorpos monoclonais de coelho: clone SP3 (Lab Vision, EUA) e 4B5 (Ventana, EUA). As reações para os anticorpos A0485, CB11 e SP3 foram realizadas tanto manualmente (polímero Novolink, Novocastra), como automatizadas utilizando o

protocolo e equipamento da Ventana (Benchmark® Ventana, EUA) no AC Camargo Cancer Center. A reação para o anticorpo do HercepTest™ foi realizada apenas manualmente utilizando o sistema de detecção do kit, e a reação para o anticorpo 4B5 foi realizada apenas em automação, pois ambos são quites manual e automatizado, respectivamente, aprovados pelo FDA (QUADROS 1 e 2).

QUADRO 1- Anticorpos anti-HER2: clone, fabricante, método de detecção, recuperação antigênica e diluição utilizados nas reações manuais

Clone	Fabricante	Método de detecção	Recuperação antigênica	Diluição
A0485	Dako, EUA	Novolink, Novocastra	PT Link, Dako	1:1000
HercepTest	Dako, EUA	Visualization Reagent, Dako	BM, 96°C	pronto para uso
CB11	Novocastra, UK	Novolink, Novocastra	BM/citrato pH6,0	1:500
RabMab SP3	Lab Vision	Novolink, Novocastra	BM/citrato pH6,0	1:500

BM, banho-maria

QUADRO 2- Anticorpos anti-HER2: clone, fabricante, método de detecção, recuperação antigênica e diluição utilizados nas reações automatizadas

Clone	Fabricante	Método de detecção	Recuperação antigênica	Diluição
A0485	Dako, EUA	UltraView Universal DAE Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:1000
CB11	Novocastra, UK	UltraView Universal DAE Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500
RabMab SP3	Lab Vision	UltraView Universal DAE Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500
RabMab 4B5	Ventana	UltraView Universal DAE Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	Pronto para uso

BM, banho-maria

3.2.1. ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Todas as lâminas das reações de imuno-histoquímica foram escaneadas em equipamento de digitalização de imagens (3DHISTECH digital microscopy scanner) e foram analisadas através de microscopia óptica, como na rotina diagnóstica, e através da visualização da imagem digitalizada da lâmina escaneada em tela de computador, utilizando o programa de visualização de imagens Panoramic Viewer (3DHISTECH), disponível gratuitamente na internet. O sistema de escore utilizado para avaliar a reação IHQ para o HER2 em ambas as análises foi o descrito nos guias ASCO/CAP (2007 e 2013), resumidos no ANEXO 3. A figura 7 mostra os escores segundo as recomendações dos guias de 2007 e 2013.

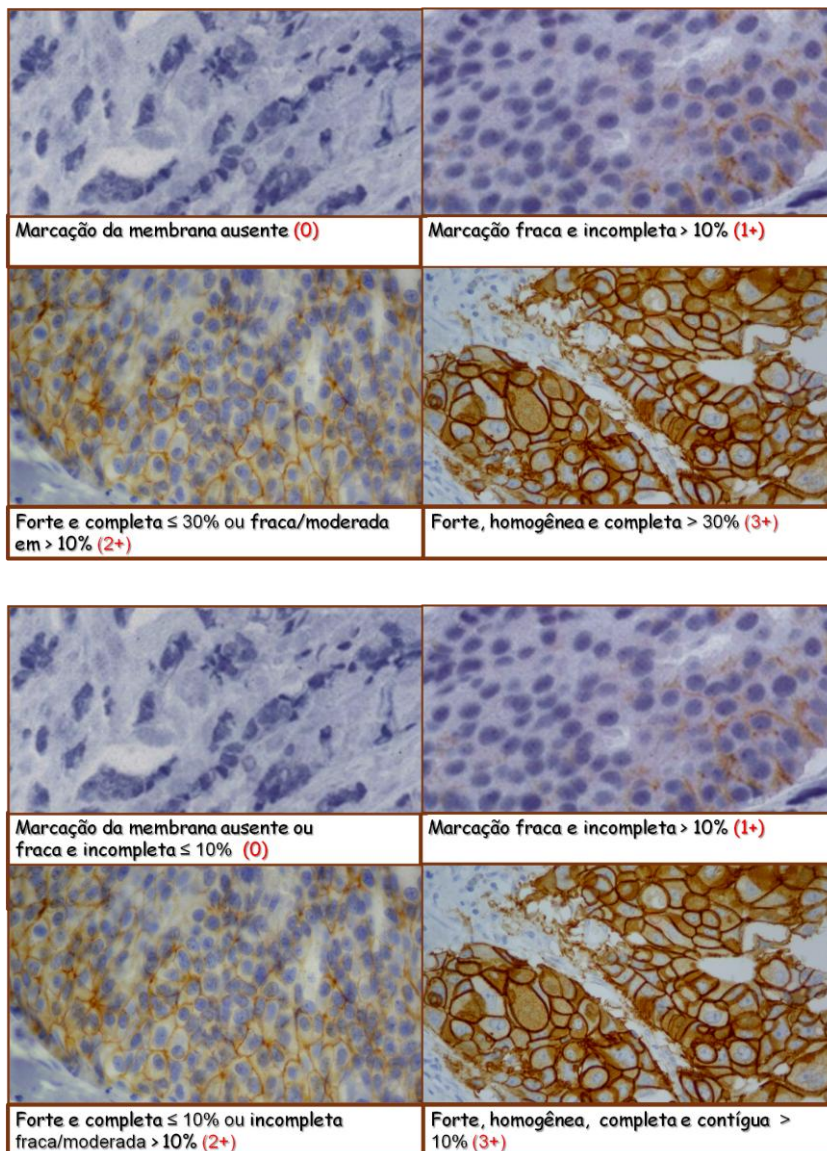


Figura 7 – Escores de classificação da expressão do HER2 segundo as recomendações da ASCO/CAP 2007 e 2013, respectivamente.

3.3. REAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Foi realizada a reação de hibridização *in situ* com dupla marcação: HER2 e centrômero do cromossoma 17 (CEP17) (VENTANA INFORM HER2 Dual ISH) em equipamento de automação (Benchmark® Ventana, EUA) e utilizado o protocolo da Ventana (Figura 3).

Na ISH de dupla marcação, um gene *HER2* individual apresenta-se como um único e pequeno ponto preto e o CEP17 como um ponto vermelho. A amplificação do gene *HER2* é visível como múltiplos pontos pretos individuais dentro do núcleo ou aglomerados nucleares. Pequenos aglomerados foram considerados como 6 pontos e grandes aglomerados foram considerados como 12 pontos. As lâminas foram examinadas em microscopia óptica, com aumentos de 40X a 100X e contados os pontos em 20 núcleos das células neoplásicas. Foi realizada a razão entre o número de pontos do *HER2* e do CEP17 de acordo com os guias de interpretação da ASCO/CAP (2007 e 2013), resumidos no ANEXO 3. Quando o status da amplificação era considerado equívoco, foram contados mais 20 núcleos para nova determinação da amplificação.

3.4. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer nº. ETIC 0314.0.203.000-10. (ANEXO D).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os anticorpos e na determinação de sensibilidade e especificidade na reação IHQ, foram construídas tabelas 2x2, e o intervalo de confiança de 95% foi determinado. Os casos considerados equívocos (2+) foram excluídos desta análise, pois não representam resultado positivo ou negativo e todos seriam retestados pela ISH para resultado final. Foi empregado o teste de concordância Kappa para a concordância entre as metodologias das reações de imuno-histoquímica (manual e automatizada) e entre a análise visual das reações (microscópio óptico e visualização da imagem da lâmina escaneada) na comparação entre os diferentes anticorpos empregados. Os valores de Kappa foram divididos em intervalos para avaliar o grau de concordância segundo os critérios de Landis e Koch (1977). O grau de concordância foi considerado baixo quando o valor do kappa ficou entre 0 e 0,2; razoável, entre 0,21 e 0,4; moderado, entre 0,41 e 0,6; bom, entre 0,61 e 0,8; e muito bom, entre 0,8 e 1. Para a determinação de p, foi utilizado o teste McNemar (X^2). A análise deve ser considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS, DISCUSSÕES E CONCLUSÕES PARCIAIS

5.1. ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO E PUBLICADO NO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY EM JULHO DE 2013:

Downloaded from jcp.bmj.com on November 26, 2013 - Published by group.bmj.com



False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma

Cristiana Buzelin Nunes, Rafael Malagoli Rocha, Marcelo Araújo Buzelin, et al.

J Clin Pathol 2013 66: 946-950 originally published online July 18, 2013
doi: 10.1136/jclinpath-2013-201647

Updated information and services can be found at:
<http://jcp.bmj.com/content/66/11/946.full.html>

These include:

References

This article cites 30 articles, 10 of which can be accessed free at:
<http://jcp.bmj.com/content/66/11/946.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

Breast cancer (435 articles)
Molecular genetics (294 articles)

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Original article

False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma

Cristiana Buzelin Nunes,¹ Rafael Malagoli Rocha,² Marcelo Araújo Buzelin,¹ Débora Balabram,¹ Fernanda de Souza Foureaux,¹ Simone Souza Porto,¹ Helenice Gobbi¹

¹Department of Anatomic Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
²Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

Correspondence to
Dr Cristiana Buzelin Nunes, Department of Anatomic Pathology, Avenida Alfredo Balena 190, sala 315 Belo Horizonte, MG CEP 30130-100, Brazil; cristianabnunes@gmail.com

Received 27 March 2013
Revised 14 June 2013
Accepted 20 June 2013
Published Online First
18 July 2013

ABSTRACT

Aims Variability in determining HER2 status has been reported, especially, differences in sensitivity and specificity among commercially available antibodies, with false positive and false negative results. We compared the sensitivity and specificity of five anti-HER2 antibodies by immunohistochemistry (IHC), using the new dual colour brightfield in situ hybridisation (DDISH) as the gold standard, on invasive breast carcinomas (IBC) arrays.

Material and methods Serial sections from tissue microarrays (TMA) containing 200 preselected primary IBC were submitted to DDISH (VENTANA INFORM HER2 Dual ISH assay), and immunohistochemistry, using Dako A0485 and HercepTest (polyclonal), Novocastra CB11 (mouse monoclonal), NeoMarkers SP3 and Ventana 4B5 (rabbit monoclonal).

Results From the initial 200 cases, 184 were assessed by DDISH and IHC. The concordance among the antibodies was considered very good (kappa statistics varied from 0.82 to 0.9). The overall concordance between IHC and DDISH ranged from 94.1% for CB11 to 96.6% for A0485. The antibodies A0485, HercepTest, SP3 and 4B5 were over 95% sensitive and specific. CB11 was the most specific antibody (97.1%). 60% (CB11) to 83.3% (SP3) of the 2+ cases showed no gene amplification by DDISH. False negative cases varied from 0.5% (A0485) to 3.8% (CB11) of the cases, and false positive from 1.6% (CB11) to 2.7% (HercepTest, SP3 and 4B5) of the 184 cases.

Conclusions There was very good agreement among the five anti-HER2 antibodies. CB11 was the most specific antibody, but showed more false negative cases. A0485, SP3, 4B5 and HercepTest were highly sensitive and specific, but showed more false positive cases.

INTRODUCTION

The *HER2* gene encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor protein that is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR), or human epidermal growth factor receptor (HER).¹

Invasive breast carcinomas (IBC) with *HER2* gene amplification or protein overexpression are associated with increased cell proliferation, cell motility, tumour invasiveness, progressive regional and distant metastases, accelerated angiogenesis, reduced apoptosis, earlier relapse and poor prognosis.²⁻³ *HER2*-positive IBC predict response to anti-*HER2* target therapy which improves outcome and disease-free survival. Accurate determination of the *HER2* status has implications for selecting patients to therapy and minimise overtreatment in

the setting where potential side effects, like cardiotoxicity, may occur.^{4,5}

The American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) and the UK guidelines recommend that *HER2* status should be determined for all IBC using immunohistochemistry (IHC) for protein expression or in situ hybridisation (ISH) for gene amplification status. The guidelines were designed to improve the overall precision and reliability of all types of slide-based *HER2* tests.⁶⁻⁸

Immunohistochemistry is the most frequent initial test for *HER2* status. A good to excellent correlation between gene copy status and protein expression levels are expected when a standardised IHC assay is performed on specimens that are carefully fixed, processed and embedded. Advantages of IHC testing include its wide availability, relatively low cost, preservation of stained slides and use of a routine microscope. The IHC detection rates for *HER2* protein can vary considerably based on fixation procedures, selection and dilution of antibody, detection system, antigen retrieval and interpretation of the scoring criteria. Laboratories performing high volumes of *HER2* IHC testing (more than 100 tests per month) produce higher concordance with ISH. Since most are reference laboratories that cannot control tissue fixation or storage, it has been suggested that although preanalytical issues are considered the major cause of interlaboratory variability, analytical and interpretation factors may also be important.^{3,9-11}

There are many commercially available antibodies against *HER2* protein receptor. The most frequently used antibodies are A0485, CB11, SP3 and 4B5. A0485 is the antibody included in the Dako HercepTest kit, a rabbit polyclonal antibody directed against the internal domain of the protein. CB11 is a mouse monoclonal antibody, also with antigenicity to the internal domain of the protein. SP3 and 4B5 are rabbit monoclonal antibodies. SP3 is directed to the extracellular domain of the protein receptor and 4B5, the new FDA approved antibody used in the Ventana Pathway, a fully automated assay, is directed against the internal domain of *HER2* protein.¹²⁻¹⁴

Fluorescent in situ hybridisation (FISH) is a slide-based DNA hybridisation assay using fluorescent-labelled probes. FISH has the advantage of a more objective scoring system than IHC and the presence of internal controls. The disadvantages include higher cost of each test, longer time for slide scoring, requirement of a fluorescent

To cite: Nunes CB, Rocha RM, Buzelin MA, et al. *J Clin Pathol* 2013;66:946-950.

microscope, inability to preserve the slides for storage and review, and greater difficulty in assessing background morphology. Chromogenic and silver in situ hybridisation (CISH and SISH, respectively) feature the advantages of both IHC and FISH. CISH and SISH show a high concordance rate with FISH (97–99%). Single probe (HER2 probe) and dual probe hybridisation (HER2 probe plus chromosome 17 centromere probe) are available for FISH, CISH and SISH techniques. DDISH is a dual colour dual hapten brightfield in situ hybridisation recently approved by FDA, and completely automated.^{15 16}

The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of five different anti-HER2 antibodies (polyclonal, mouse and rabbit monoclonal antibodies) by immunohistochemistry (IHC) performed by a reference laboratory, highlighting the false positive and false negative cases, using the new dual colour in situ hybridisation (DDISH) as the gold standard, on an IBC tissue microarray.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by our local ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais), under the protocol number ETIC 0314.0.203.000-10.

Paraffin embedded tissue samples from 200 archival symptomatic primary IBC, resected between 1997 and 2005, with known HER2 expression levels were retrospectively selected from the files of two Brazilian institutions: Laboratory of Breast Pathology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) and AC Camargo Hospital (São Paulo, SP). There were 188 invasive ductal carcinomas, five invasive lobular carcinomas, three tubular carcinomas, two carcinomas with apocrine differentiation and two mucinous carcinomas. Twenty-two tumours were histologic grade I, 98 tumours were grade II and 80 tumours were grade III. Fifty-one tumours were classified as T1, 120 tumours as T2, 20 tumours as T3, and 9 tumours as T4. The inclusion criteria were based on previous IHC in house routine test results in order to include a wide range of HER2 overexpressed and equivocal tumours. We selected 70 cases previously scored as negative (0/1+), 60 cases scored as equivocal (2+) and 70 cases scored as positive (3+), using the ASCO/CAP HER2 guideline scoring recommendations.⁶

A tissue microarray (TMA) block was constructed by sampling 1 mm-diameter core with representative areas of the invasive carcinomas from 200 donor blocks previously selected from the haematoxylin and eosin (H&E) and HER2 immunostained slides, to avoid heterogeneity. Four-micrometre-thick sequential

sections from the TMA were mounted on positively charged glass slides and submitted to IHC and DDISH.¹⁷

Immunohistochemistry and DDISH

Immunohistochemical and in situ hybridisation procedures for HER2 were performed at AC Camargo Hospital (São Paulo, SP). Five anti-HER2 antibody clones were tested: polyclonal HercepTest and A0485, mouse monoclonal CB11, rabbit monoclonal SP3 and 4B5. Table 1 summarises antibody clones, detection systems, antigen retrieval methods and dilutions.

TMA slide sections were deparaffinised, dehydrated in graded alcohols, manually immunostained for Dako HercepTest Kit (Dako, Carpinteria, California, USA), and automatically immunostained using the Ventana Benchmark XT staining system (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) for the other four antibodies, according to the manufacturer's instructions. Slides were counterstained with haematoxylin and coverslipped.

Immunostainings were performed with known positive and negative tumour controls. HercepTest immunostaining run with a control provided by the kit.

The dual colour dual hapten brightfield in situ hybridisation method (DDISH; VENTANA INFORM HER2 Dual ISH assay), was automatically performed in a Benchmark XT instrument (Ventana), following the manufacturer's instructions.

Interpretation of immunohistochemistry and DDISH

The immunostained TMA slides were blindly evaluated by an expert pathologist (CBN), following ASCO/CAP guidelines (0, no staining; 1+, faint part of membrane staining in any proportion of invasive tumour cells or complete membrane staining in <10% of invasive tumour cells; 2+, weak to moderate complete membrane staining in $\geq 10\%$ of invasive tumour cells, or strong complete membrane staining $\leq 30\%$ of invasive tumour cells; 3+, strong complete membrane staining in $> 30\%$ of invasive tumour cells); 3+ cases were considered positive, 0 or 1+ cases were considered negative and 2+ cases were considered equivocal.⁶

DDISH HER2 and Chr17 copies were counted on a light microscope following ASCO/CAP guidelines and the HER2/Chr17 ratio was calculated. At least 20 non-equivocal and non-overlapping neoplastic nuclei of IBC cells were counted per case. A single dot was counted as one dot, a small cluster as six dots and a large cluster as 12 dots. Non-amplified cases were defined as those with a ratio < 1.8 , and amplified cases, with a ratio > 2.2 . For cases with a ratio between 1.8 and 2.2, 20 additional nuclei were counted and a new ratio was calculated.⁶

Table 1 Anti-HER2 antibody clones, sources, detection systems, antigen retrieval methods and dilutions used in the IHC assays

Clone	Source	Detection system	Antigen retrieval	Dilution
HercepTest	Dako, USA	Polymer Visualization Reagent, DAKO	Epitope retrieval solution, DAKO	Prediluted
A0485	Dako, USA	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:1000
CB11	Novocastra, UK	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500
SP3	Lab Vision, USA	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500
4B5	Ventana, France	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	Prediluted

CC1, cell conditioning solution (pH 8.5); IHC, immunohistochemistry.

Original article

Table 2 Percentage of HER2 immunoexpression of five anti-HER2 antibodies in 184 invasive breast cancers

IHC score	HER2 antibodies				
	A0485	HercepTest	CB11	SP3	4B5
0/1+	44.6	55.4	59.2	54.9	50.5
2+	20.6	8.2	8.2	6.5	13.0
3+	34.8	36.4	32.6	38.6	36.5

IHC, immunohistochemistry.

False negative cases were considered when they showed IHC score 0/1+ and DDISH gene amplification. False positive cases were considered when they showed IHC score 3+ and DDISH gene no amplification.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS V.19 and the *varsarstats*.¹⁸ Kappa test was applied to compare HER2 expression by the antibody clones and three categories were included (0/1+, 2+ and 3+). Kappa values followed Landis and Koch criteria (1977), and 95% CIs were calculated.¹⁹ DDISH was used as the gold standard, and overall sensitivity and specificity were calculated for each antibody staining, considering 3+ cases (positive) and 0/1+ cases (negative). For the purpose of sensitivity and specificity analysis, 2+ cases were excluded as they were uninformative and would ask for a complimentary ISH study.

RESULTS**Immunohistochemistry and DDISH**

Totally, 184 cases were assessed by DDISH for gene amplification and by immunohistochemistry for protein expression.

Tumours with HER2 protein overexpression (3+) ranged from 32.6% (CB11) to 38.6% (SP3); equivocal expression (2+), from 6.5% (SP3) to 20.6% (A0485) and no protein overexpression (0/1+), from 44.6% (A0485) to 59.2% (CB11) of the 184 cases (table 2).

Kappa concordance among the different antibodies was considered very good. Kappa statistics varied from 0.82 to 0.9 (table 3).

DDISH identified HER2 gene amplification in 70/184 tumours (38.0%). The overall percentage of IHC positivity (including IHC 2+ cases amplified by DDISH) was 34.2% for CB11, 36.4% for HercepTest, 36.9% for SP3 and 4B5, and 37.5% for A0485. CB11 detected 63 (90%) of the amplified cases; HercepTest, 67 cases (95.7%); 4B5 and SP3, 68 (97.1%) cases, and A0485 detected 69 (98.6%) of the amplified cases. Correlation between HER2 gene amplification and protein expression is summarised in table 4. The overall concordance rate between IHC score (0/1+ vs 3+ cases) and DDISH (amplified vs not amplified) was 96.6% for A0485, 95.9% for SP3, 95.6% for 4B5, 95.3% for HercepTest and 94.1% for CB11.

IHC equivocal cases (2+) showed no gene amplification by DDISH in 9/15 cases (60%) for CB11, 10/15 cases (66.7%) for HercepTest, 18/24 cases (75%) for 4B5, 29/38 cases (76.3%) for A0485 and 10/12 cases for SP3 (83.3%). False negative cases ranged from 1/184 cases (0.5%, A0485) to 7/184 cases (3.8%, CB11). False positive cases ranged from 3/184 cases (1.6%, CB11) to 5/184 cases (2.7%, HercepTest, SP3 and 4B5). HER2 expression and gene amplification of an IBC case is illustrated in figure 1.

Sensitivity and specificity of the five antibodies compared with DDISH as gold standard are shown in table 5. A0485, HercepTest, SP3 and 4B5 were over 95% sensitive. CB11 was the most specific antibody (97.1%). We found one case with chromosome 17 polysomy (data not shown) and it was considered not amplified for final analysis, as it was associated with negative HER2 protein overexpression.

DISCUSSION

After two decades, the importance of HER2 testing in breast cancer is now well established. However, accurate determination of HER2 status remains a challenge for pathologists and oncologists. Validated, standardised tests and scoring are still under discussion. Immunohistochemistry for protein expression is considered suitable for HER2 status determination, as a high concordance rate with in situ hybridisation for gene amplification has been demonstrated in several studies.^{3 9 20-23}

In this study, we compared five anti-HER2 commercially available antibodies commonly used in pathology laboratories, on IBC tissue arrays. Sensitivity and specificity was calculated for each antibody, highlighting false positive and false negative cases, using a DDISH as the gold standard. DDISH is a recently FDA approved silver and chromogenic in situ hybridisation assay that is fully automated and has a high concordance with FISH. DDISH has the advantage of being a brightfield test with permanently stained preparations.^{9 16 21 22}

The frequency of HER2 overexpression in IBC range from 15% to 20%.^{24 25 31} For this comparative study, we included an enriched sample with 2+ and 3+ previously tested tumours, and HER2 overexpression ranged from 32.6% to 38.6%. HER2 gene amplification was found in 38.0% of the cases. The correlation between IHC 3+ with DDISH amplified cases ranged from 57/70 cases (81.4%–CB11) to 66/70 cases (94.3%–SP3). When we included the 2+ DDISH amplified cases, the IHC antibodies detected 63/70 cases (90%–CB11) to 69/70 cases (98.6%–A0485). The concordance rate with DDISH ranged from 94.1% (CB11) to 96.6% (A0485) for 0/1+ and 3+ cases. ASCO/CAP guideline recommends that the concordance rate between IHC and FISH should be at least 90% for IHC negative and positive tumours.^{6 21}

For the purpose of this study, we included 60 equivocal tumours previously tested by IHC. After the new immunostains, we detected 12–38 equivocal cases. The use of TMA could have led to sampling discordances (1 mm TMA core vs the whole

Table 3 Kappa concordance rate and 95% CI among five anti-HER2 antibodies

	A0485	HercepTest	CB11	SP3
HercepTest	0.86 (0.81–0.91)			
CB11	0.82 (0.76–0.88)	0.87 (0.81–0.92)		
SP3	0.82 (0.76–0.88)	0.89 (0.84–0.94)	0.83 (0.77–0.9)	
4B5	0.9 (0.85–0.94)	0.89 (0.84–0.94)	0.87 (0.81–0.92)	0.86 (0.81–0.91)

Table 4 Correlation of HER2 expression by immunohistochemistry using five anti-HER2 antibodies (A0485, HercepTest, CB11, SP3 and 4B5) with HER2 gene status as determined by dual colour in situ hybridisation

	Immunohistochemical expression														
	A0485			HercepTest			CB11			SP3			4B5		
	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+
DDISH	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+
NA	81	29	4	99	10	5	102	9	3	99	10	5	91	18	5
A	1	9	60	3	5	62	7	6	57	2	2	66	2	6	62
Total	82	38	64	102	15	67	109	15	60	101	12	71	93	24	67

HER2 gene status refers to the ratio of HER2/chromosome 17 signals per nucleus.

A, amplified, ratio >2.2; DDISH, dual colour in situ hybridisation; NA, not amplified, ratio <1.8.

tumour block). The multiple levelling of the TMA block and IHC protocols with different detection systems, antigen epitope retrieval, antibody clones and dilutions, could also explain the different IHC results.⁶

Our results showed that CB11 is more specific than rabbit monoclonal antibodies and polyclonal antibodies. Equivocal tumours (2+) using CB11 correlated better with gene amplification by DDISH. However, we observed that 7/184 cases (3.8%) showed HER2 DDISH amplification and no CB11 immunoreactivity. False-negative cases should be considered in view of patients who could respond to trastuzumab therapy.⁴

A0485, HercepTest, SP3 and 4B5 were highly sensitive and specific, but showed 4/184 (2.2%–A0485) to 5/184 (2.7%–HercepTest, SP3 and 4B5) false positive cases. Comparing the 3+ cases that were not amplified with total 3+ cases, they showed 4/64 (6.2%–A0485) to 5/67 (7.5%–HercepTest and 4B5) false positive cases. Retrospective analysis of patient outcomes and survival from trastuzumab pivotal clinical trials and other series have suggested that, although trastuzumab was approved for HER2 protein overexpression, FISH analysis have higher accuracy and is superior to IHC analysis in predicting response to trastuzumab therapy. IHC false positive cases have a low probability of responding to HER2 targeted therapy.^{13 23} Reducing false positive HER2 results is important for patient safety and treatment costs. There is a risk of cardiac dysfunction

associated with trastuzumab, thereby patients should not be unnecessarily exposed to risks.^{24 25}

The HercepTest kit is a Food and Drug Administration approved anti-HER2 manual assay with a standardised detection system, antibody dilution and antigen retrieval. A0485 is the antibody used in the HercepTest kit, and as we tested A0485 separately from the kit, we found different sensitivity and specificity rates in our study. A0485 also showed 20.6% of 2+ tumours, which would need gene amplification analysis and generate higher diagnostic costs. Polyclonal antibodies also have the disadvantage of increased background staining, and a low inter-observer scoring agreement.²⁶

Rabbit monoclonal antibodies are reputed to be potentially superior immunohistochemical reagents for clinical use. The manufacturers claim that they retain the high affinity of rabbit polyclonal antisera and the high specificity achieved with monoclonal antibodies. In our study, SP3 and 4B5 were highly sensitive and specific. With respect to sharpness of immunohistochemical staining, the rabbit monoclonal antibodies produced less cytoplasmic and inspecific staining than A0485, HercepTest and CB11 antibodies.²⁷

Results of the present study are in accordance with previous studies from our group and from other groups, comparing mouse, rabbit monoclonal antibodies (CB11, 4B5 and SP3), and polyclonal antibodies (A0485 and HercepTest) with CISH,

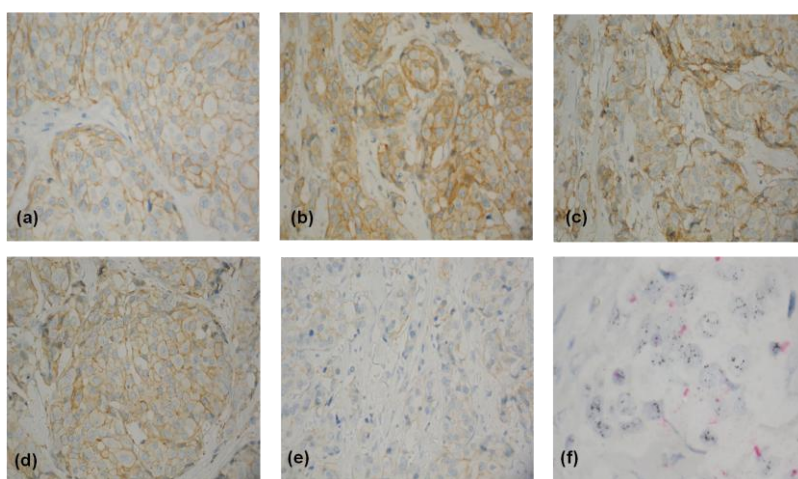


Figure 1 HER2 protein expression and gene amplification in a discordant case. (A) 4B5 2+ immunostaining 400X; (B) HercepTest 3+ immunostaining; (C) A0485 2+ immunostaining 400X; (D) SP3 3+ immunostaining 400X; (E) CB11 1+ immunostaining 400X, (F) DDISH demonstrating HER2 amplification 1000X.

Original article

Table 5 Sensitivity and specificity of anti-HER2 antibodies compared with DDISH

Antibodies	Sensitivity	(95% CI)	Specificity	(95% CI)
A0485	98.4	(90.0 to 99.9)	95.3	(87.7 to 98.5)
HerceptTest	95.4	(86.2 to 98.8)	95.2	(88.6 to 98.2)
CB11	89.0	(78.1 to 95.1)	97.1	(91.3 to 99.2)
SP3	97.0	(88.8 to 99.5)	95.2	(88.6 to 98.2)
4B5	96.9	(88.2 to 99.4)	94.8	(87.7 to 98.1)

SISH or FISH. Others, along with us, found higher specificity for the mouse monoclonal antibody CB11 and higher sensitivity for polyclonal and rabbit monoclonal antibodies.^{28–30} Conversely, other comparative studies using rabbit and mouse monoclonal antibodies showed a higher performance of rabbit monoclonal antibodies, and a higher concordance with FISH and SISH, with a higher reproducibility between laboratories.^{26 27 31}

In conclusion, our study showed very good agreement among the five anti-HER2 antibodies tested. CB11 was the most specific antibody, but showed more false negative cases, whereas, A0485, SP3, 4B5 and HerceptTest were highly sensitive and specific, but showed more false positive cases compared with DDISH.

Take home messages

- ▶ There was very good agreement (over 0.82) among the five antibodies in immunohistochemical analyses.
- ▶ CB11 was the most specific antibody, but showed a higher false negative rate.
- ▶ A0485, SP3, 4B5 and HerceptTest were highly sensitive and specific, but showed a higher false positive rate. A0485 showed more 2+ cases.

Acknowledgements The authors thank José Ivanildo Neves (Department of Anatomic Pathology, Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil) for the technical support. 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 review of the cases. RMR was responsible for TMA construction and the immunohistochemistry and DDISH reactions. CBN made the tests analysis and diagnosis. DB was responsible for the statistics.

Funding Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ 02319-11) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 309807/2012-3). 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 UFMG under the number ETIC 0314.0.203.000-10.

REFERENCES

- 1 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–82.
- 2 Offersen BV, Alsner J, Ege Olsen K, *et al.* A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnosed with early breast cancer. *Acta Oncol* 2008;47:618–32.
- 3 Ross JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect* 2009;22:93–106.
- 4 Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1409–11.
- 5 Hayes DF, Picard MH. Heart of darkness: the downside of trastuzumab. *J Clin Oncol* 2006;24:4056–8.
- 6 Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, *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* 2007;25:118–45.
- 7 Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, *et al.* HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008;61:818–24.
- 8 Bartlett JM, Starczynski J, Atkey N, *et al.* HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods. *J Clin Pathol* 2011;64:649–53.
- 9 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* 2013;137:19–25.
- 10 Dowsett M, Hanna WM, Kocx M, *et al.* Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol* 2007;20:584–91.
- 11 Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:1–7.
- 12 Hammond ME. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19:499–500.
- 13 Sauter G, Lee J, Bartlett JM, *et al.* Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27:1323–33.
- 14 Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: a Continuing Evolution. *Patholog Res Int* 2010;6:2011:903202.
- 15 Koh YW, Lee HJ, Lee JW, *et al.* Dual-color silver-enhanced in situ hybridization for assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 2011;24:794–800.
- 16 Schiavon BN, Jasani B, De Brot L, *et al.* Evaluation of Reliability of FISH Versus Brightfield Dual-probe In Situ Hybridization (BDISH) for Frontline Assessment of HER2 Status in Breast Cancer Samples in a Community Setting. Influence of Poor Tissue Preservation. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1489–96.
- 17 Camp RL, Charaette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80:1943–9.
- 18 <http://www.vassarstats.net> (accessed Jan 2013).
- 19 Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159–74.
- 20 Mohsin SK. HER2 testing: state of the laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:660–2.
- 21 Nakhleh RE, Grimm EE, Idowu MO, *et al.* Laboratory compliance with the American Society of Clinical Oncology/college of American Pathologists guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: a College of American Pathologists survey of 757 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:728–34.
- 22 Mollerup J, Henriksen U, Müller S, *et al.* Dual color chromogenic in situ hybridization for determination of HER2 status in breast cancer: a large comparative study to current state of the art fluorescence in situ hybridization. *BMC Clin Pathol* 2012;12:3–7.
- 23 Perez EA, Press MF, Dueck AC, *et al.* Immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization assessment of HER2 in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer (NCCTG N9831, BCIRG 006, and BCIRG 005). *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:99–108.
- 24 Grimm EE, Schmidt RA, Swanson PE, *et al.* Achieving 95% cross-methodological concordance in HER2 testing: causes and implications of discordant cases. *Am J Clin Pathol* 2010;134:284–92.
- 25 Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol* 2008;129:263–73.
- 26 Rhodes A, Sarson J, Assam EE, *et al.* The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2010;134:621–32.
- 27 Powell WC, Hicks DG, Prescott N, *et al.* A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:94–102.
- 28 Gouvêa AP, Milanezi F, Olson SJ, *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:103–8.
- 29 Nunes CB, Rocha RM, Reis-Filho JS, *et al.* Comparative analysis of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2008;61:934–8.
- 30 Ricardo S, Milanezi F, Carvalho S, *et al.* HER2 evaluation through the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007;9:1001–5.
- 31 van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, *et al.* Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining Her2/neu status in breast cancer. *Mod Pathol* 2009;22:879–86.

5.2. IMPORTÂNCIA DA FASE PRÉ-ANALÍTICA NA IHQ E NA ISH: COMPARAÇÃO DE CASOS COM CONTROLE E SEM CONTROLE DA FASE PRÉ-ANALÍTICA

Analizamos separadamente as reações imuno-histoquímicas dos casos com controle da fase pré-analítica (casos selecionados no AC Camargo Cancer Center) e sem controle da fase pré-analítica (casos selecionados no laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica da FM-UFMG). As reações de IHQ e DDISH foram interpretadas segundo as recomendações da ASCO/CAP 2007. Procuramos determinar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos usando a amplificação gênica pelo DDISH como padrão ouro. Os resultados encontram-se na tabela 1 e gráfico 1. Podemos notar que houve uma maior sensibilidade e especificidade dos anticorpos nos casos com controle da fase pré-analítica. Para o anticorpo 4B5, a sensibilidade foi um pouco maior nos casos sem controle da fase pré-analítica, entretanto, não houve significado estatístico nos resultados.

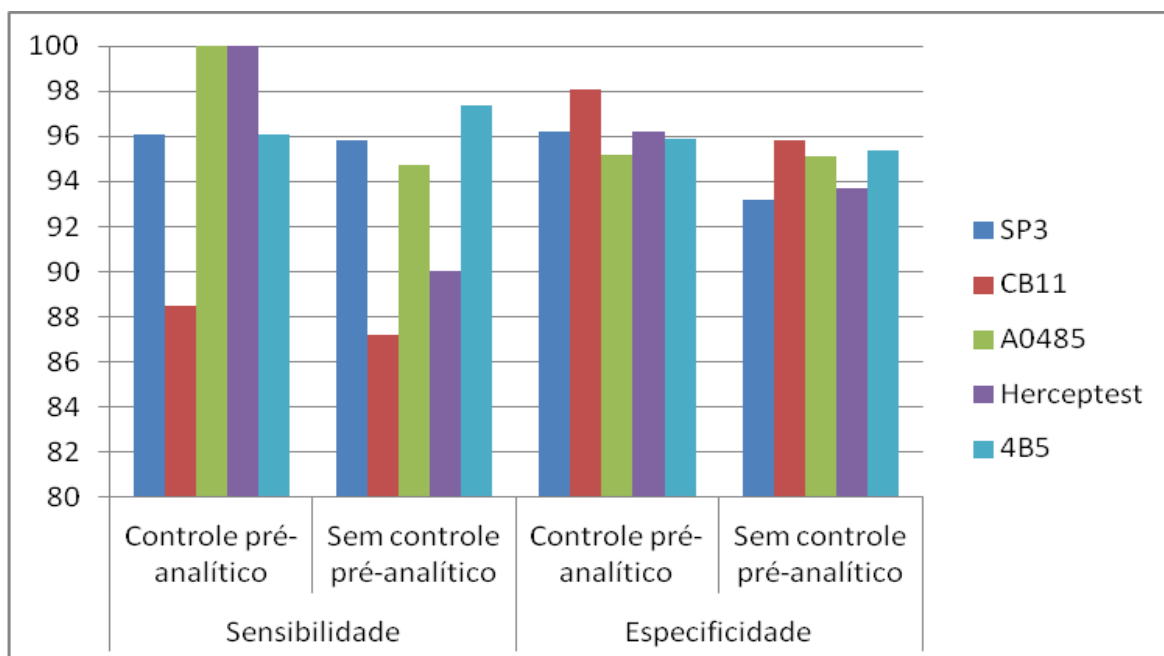


Gráfico 1 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH

Tabela 1 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH em tumores com e sem controle da fase pré-analítica

Sensibilidade (95% CI)			
Anticorpos	Controle pré-analítico	Sem controle pré-analítico	P
SP3	96,1 (78,4-99,8)	95,8 (84,6-99,2)	1,0
CB11	88,5 (68,7-97)	87,2 (71,8-95,2)	1,0
A0485	100 (82,8-100)	94,7 (80,9-99,1)	1,0
HercepTest	100 (84-100)	90 (75,4-96,7)	1,0
4B5	96,1 (78,4-99,8)	97,4 (84,9-99,9)	1,0

CI, Intervalo de confiança; DDISH, dual colour *in situ* hybridisation

Especificidade (95% CI)			
Anticorpos	Controle pré-analítico	Sem controle pré-analítico	P
SP3	96,2 (85,9-99,3)	93,2 (84,6-99,3)	1,0
CB11	98,1 (88,8-99,9)	95,8 (84,6-99,3)	1,0
A0485	95,2 (82,6-99,2)	95,1 (82,2-99,1)	1,0
HercepTest	96,2 (85,9-99,3)	93,7 (81,8-98,4)	1,0
4B5	95,9 (84,9-99,3)	95,4 (83,3-99,2)	1,0

CI, Intervalo de confiança; DDISH, dual colour *in situ* hybridisation

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os casos com controle da fase pré-analítica mostraram maior sensibilidade e maior especificidade dos anticorpos nas reações imuno-histoquímicas, apesar de não ter sido estatisticamente significativo. Vários estudos vêm demonstrando os efeitos da isquemia fria e da fixação do material submetido à IHQ para avaliação da expressão do HER2. Eles concluem que não houve degradação tumoral ou diferença na marcação IHQ e do FISH, 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.*, 2012; YILDIZ-AKTAS *et al.*, 2012). Entretanto, SAUTER *et al.* (2009) e LEE *et al.* (2011)

descreveram menor dependência aos métodos de fixação do material pelo FISH do que pela IHQ, tornando este método mais reproduzível entre laboratórios centrais e periféricos. Como é descrito que os resultados do FISH mostram maior correlação com a resposta ao tratamento com trastuzumab ou lapatinib, estes autores defendem a utilização do FISH como teste primário do status do HER2 em casos sem controle da fase pré-analítica.

Em nosso estudo, nós percebemos uma maior dificuldade em padronizar a reação imunohistoquímica e de hibridização *in situ*, pois todos os casos (com e sem controle da fase pré-analítica) encontravam-se na mesma lâmina. Os casos com controle exigem menor tempo de exposição aos reagentes, opostamente aos casos sem controle da fase pré-analítica Figura 8. Todas as alterações da fase pré-analítica foram estudadas em conjunto, como tempo de isquemia fria, tempo de fixação e tipo de fixador, sendo necessários mais estudos comparando cada fator da fase pré-analítica separadamente para definir melhor sua influência na diferente marcação dos anticorpos.

Podemos concluir neste estudo que, embora pequena, pode existir influência na avaliação do HER2 e variação na sensibilidade e especificidade dos anticorpos quando utilizamos material com e sem controle da fase pré-analítica, sendo melhor naqueles casos com controle da fase pré-analítica. A padronização da técnica poderia ser importante na diminuição desta diferença.

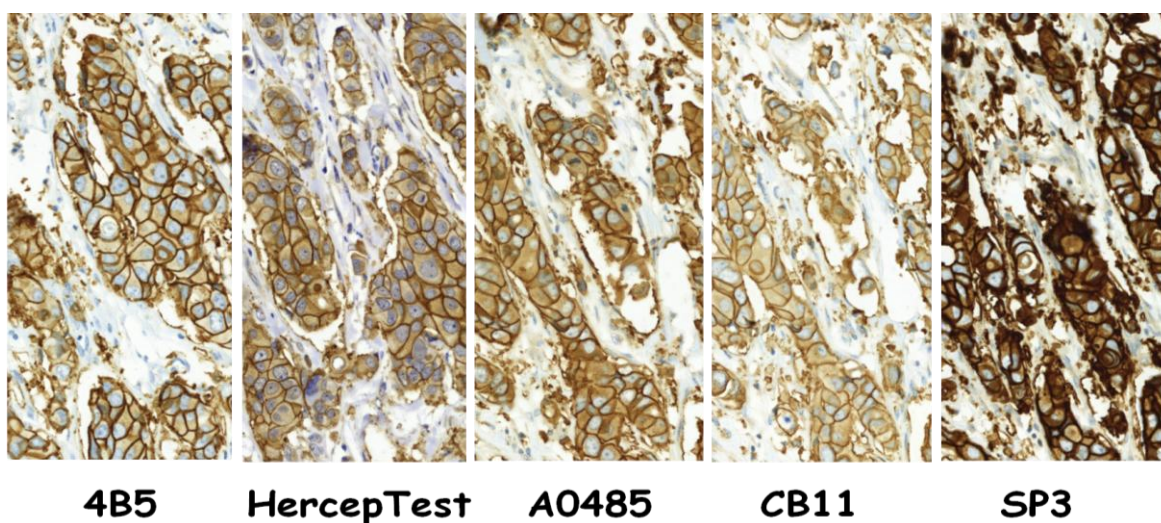


Figura 8 – Superexpressão de HER2 em um caso sem controle da fase pré-analítica usando cinco anticorpos anti-HER2.

5.3. ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS MANUAL E AUTOMATIZADO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA EM TODOS OS CASOS

A análise da concordância entre os métodos manual e automatizado foi realizada para os anticorpos SP3, CB11 e A0485. A concordância foi considerada muito boa para os anticorpos SP3 $k=0,892$ (0,843-0,941) e CB11 $k=0,846$ (0,780-0,912). O anticorpo A0485 mostrou concordância considerada boa $k=0,726$ (0,654-0,78).

A sensibilidade e especificidade dos anticorpos foram calculadas utilizando-se os dois métodos de reação imuno-histoquímica, manual e automatizado e o DDISH. As reações de IHQ e DDISH foram interpretadas segundo as recomendações da ASCO/CAP 2007. Os resultados encontram-se na tabela 2 e nos gráficos 2 e 3. Podemos notar que no método automatizado houve um aumento da sensibilidade dos anticorpos A0485 e SP3 e diminuição da sensibilidade do CB11. A especificidade do CB11 aumentou, e dos outros anticorpos, diminuiu. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em nossos resultados, Figura 9.

Tabela 2 – Sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada

Anticorpos	Sensibilidade (95% CI)		Especificidade (95% CI)	
	Manual	Automatizado	Manual	Automatizado
A0485	85.0 (73.0-92.5)	98.4 (90.0-99.9)	96.4 (90.6-98.8)	95.3 (87.7-98.5)
CB11	94.1 (84.9-98.1)	89.0 (78.1-95.1)	92.3 (84.9-96.4)	97.1 (91.3-99.2)
SP3	92.3 (82.2-97.1)	97.0 (88.8-99.5)	96.4 (90.4-98.8)	95.2 (88.6-98.2)

CI, Intervalo de confiança; DDISH, dual colour *in situ* hybridisation, $p>0,05$

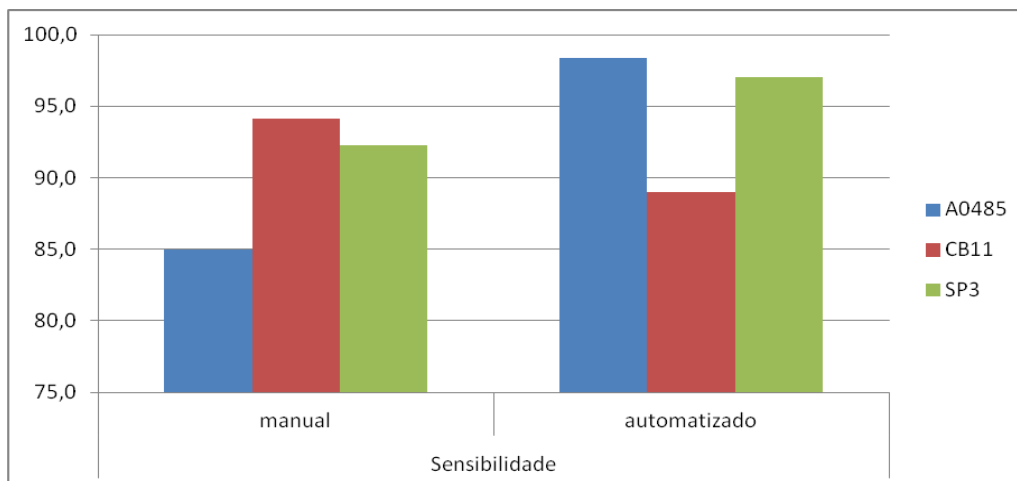


Gráfico 2 – Sensibilidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada

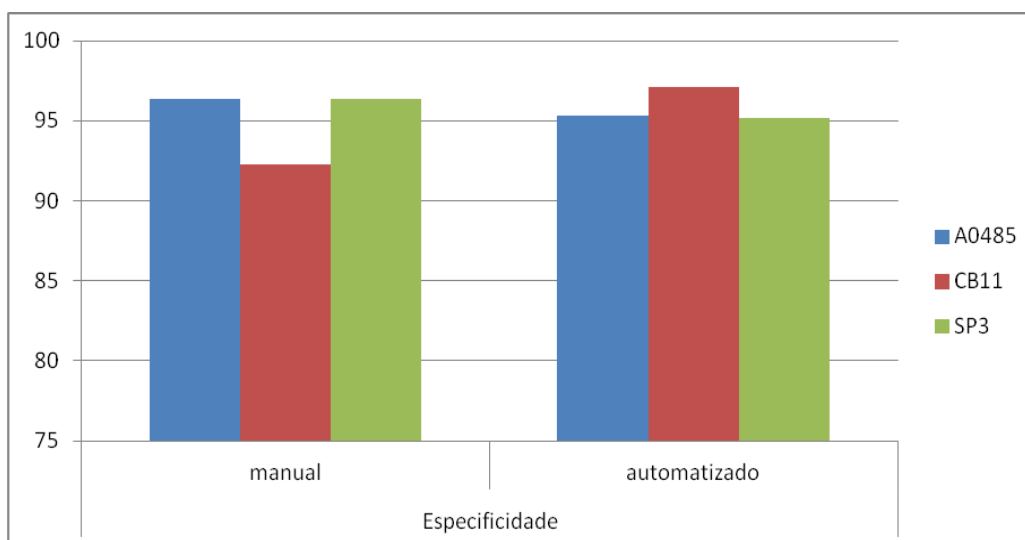


Gráfico 3 – Especificidade dos anticorpos anti-HER2 comparados ao DDISH, utilizando metodologia manual e automatizada

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nesta parte do estudo, utilizamos três anticorpos rotineiramente utilizados por laboratórios nos testes IHQ para a expressão de HER2. Como não existe metodologia padronizada para o uso destes anticorpos, resolvemos comparar duas metodologias, manual e automatizada. Existem alguns estudos que realizaram comparação entre metodologias manuais e automatizadas para a detecção do HER2; entretanto, estes estudos utilizaram kits manuais e automatizados, padronizados pelos fabricantes, contendo anticorpos primários diferentes,

como o kit HercepTest™ da Dako - manual e o kit Pathway da Ventana - automatizado (BANKFALVI *et al.*, 2004), e o kit HercepTest™ da Dako - manual e o kit Oracle HER2 Bond – automatizado (MOELANS *et al.*, 2010; O'GRADY *et al.*, 2010). Estes estudos identificaram uma concordância muito boa entre os dois métodos, com maior especificidade dos anticorpos pelo método automatizado, e concluíram que a automação melhora a acurácia da detecção do HER2 em carcinomas mamários, melhorando a padronização dos testes. Em estudos anteriores do nosso grupo comparamos diversos sistemas de visualização, utilizando metodologia manual e automatizada para o estudo do RE, e concluímos que os testes manuais, utilizando sistemas de visualização com polímeros de segunda geração, como o Advance (Dako, Carpinteria, California, USA) e o Novolink (Leica, Newcastle, UK) podem ter resultados muito satisfatórios (ROCHA *et al.*, 2009b, ROCHA *et al.*, 2009c).

Podemos concluir neste estudo que a concordância entre os métodos foi boa a muito boa. Não houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade e especificidade dos anticorpos ao se empregar os métodos manual e automatizado, indicando segurança no uso do método manual quando adequadamente padronizado.

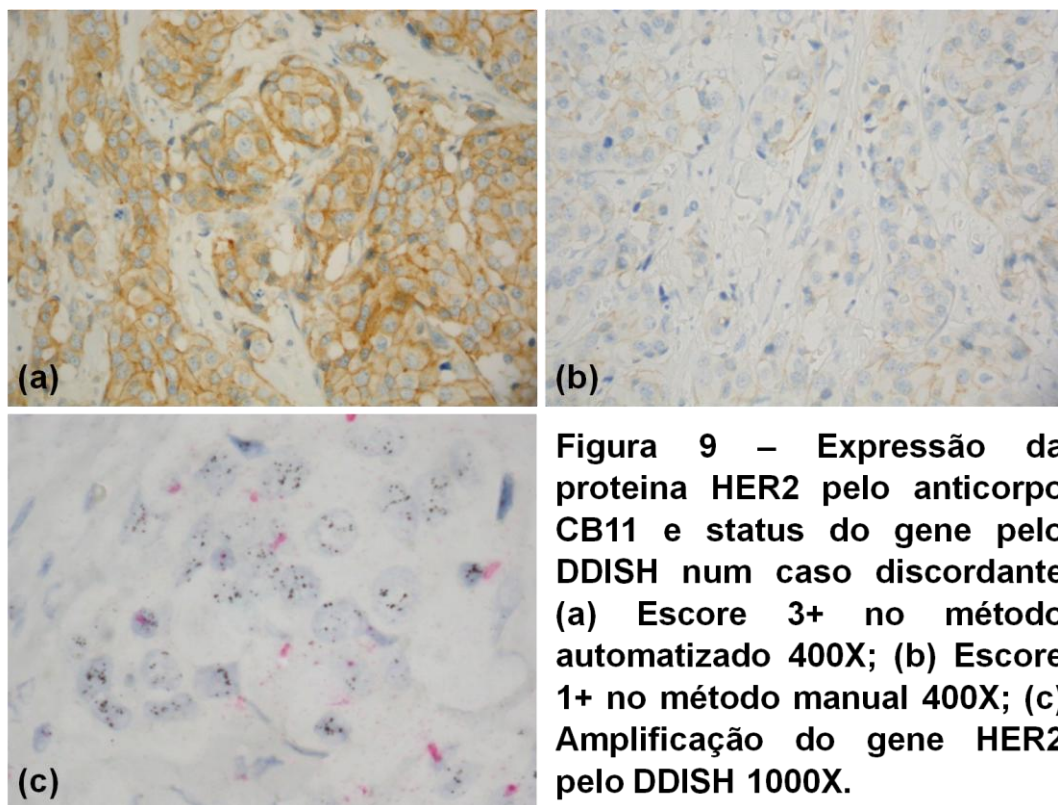


Figura 9 – Expressão da proteína HER2 pelo anticorpo CB11 e status do gene pelo DDISH num caso discordante (a) Escore 3+ no método automatizado 400X; (b) Escore 1+ no método manual 400X; (c) Amplificação do gene HER2 pelo DDISH 1000X.

**5.4. ARTIGO CIENTÍFICO ENVIADO AO PATHOLOGY - RESEARCH
AND PRACTICE EM OUTUBRO DE 2013:**

REVISÃO ENVIADA EM DEZEMBRO DE 2013

Elsevier Editorial System(tm) for Pathology - Research and Practice
Manuscript Draft

Manuscript Number: PRP-D-13-00468

Title: High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of
HER2 expression in breast cancer

Article Type: Original Article

Keywords: HER2, breast cancer, whole slide imaging, digital pathology, immunohistochemistry

Corresponding Author: Dr. Cristiana Buzelin Nunes, M.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Minas Gerais

First Author: Cristiana Buzelin Nunes, M.D.

Order of Authors: Cristiana Buzelin Nunes, M.D.; Rafael Rocha, PhD; Marcelo Buzelin,BS; Débora
Balabram, M.D.; Fernanda Foureaux; Simone Porto; Helenice Gobbi, MD PhD

TITLE PAGE**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**

Cristiana Nunes¹, Rafael Rocha², Marcelo Buzelin¹, Débora Balabram¹, Fernanda Foureaux¹, Simone Porto, Helenice Gobbi¹

Affiliations:

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

2- Antonio PRudente Foundation, AC Camargo Cancer Centre, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Cristiana Buzelin Nunes, MD

Department of Anatomic Pathology, School of Medicine

Av. Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, MG Brazil

CEP 30130-100

cristianabnunes@gmail.com Tel: (55) (31) 34098067 Fax: (55) (31) 32262591

Keywords: HER2, breast cancer, whole slide image, digital pathology, immunohistochemistry

ABSTRACT

Whole slide imaging (WSI) technology has been used for training, teaching, researching, and remote consultation. Few studies compared HER2 expression using optical microscopy (OM) and WSI evaluations in breast carcinomas. However, no consensus has been achieved comparing both assessments.

Material and methods: Sections from tissue microarray containing 200 preselected invasive breast carcinomas were submitted to immunohistochemistry applying three anti-HER2 antibodies (HercepTest™, CB11, SP3) and *in situ* hybridisation (DDISH). Slides were evaluated using OM and WSI (Pannoramic MIDI and Viewer, 3DHISTECH). Sensitivity and specificity were calculated comparing the anti-HER2 antibodies and DDISH.

Results: WSI and OM HER2 evaluations agreement was considered good (SP3, $k=0.80$) to very good (CB11 and HercepTest™, $k=0.81$). WSI evaluation led to higher sensitivity (ranged from 100 of SP3 and HercepTest™ to 97 of CB11), and lower specificity (ranged from 86.4 of SP3 to 89.4 of HercepTest™) compared to OM evaluation (sensitivity ranged from 92.1 of CB11 to 98 of SP3 and specificity ranged from 95.2 of SP3 and HercepTest™ to 97.1 of CB11 and SP3).

Conclusion: High agreement was achieved between WSI and OM evaluations. All three antibodies were highly sensitive and specific using both evaluations. WSI can be considered a useful tool for HER2 immunohistochemical assessment.

INTRODUCTION

Recent technological advances in anatomic pathology have brought new equipments to the laboratory workflow including automated whole slide imaging scanners. These devices are capable of digitizing entire glass slides, outputting image files which are faithful reproductions of the glass slides [3,18]. The virtual image may represent an entire glass slide and is referred to as a whole slide image (WSI) or digitized slide. Upon retrieval of the digital file, the captured image of the slide can be viewed on a computer monitor, navigating through the slide or image at varying magnifications without direct use of an optical microscope. The software interface used to view digital slides simulates the operation of optical microscopy [29,30].

Whole slide imaging technology has several advantages over conventional microscopy such as portability (i.e., images are accessible anywhere at any time), ease of sharing and retrieval of archival images, and the ability to make use of computer-aided diagnostic tools. The development of automated, high-speed, high-resolution WSI has affected education, digital image preservation and storage, research, image evaluation [32], second-opinion consultations in real time across the internet [4,41], quality assurance and primary clinical diagnosis [12]. Validation studies using WSI have concluded that these digital systems generally show good concordance with glass slides for diagnostic purposes [14].

The American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) and United Kingdom guidelines recommend determination of HER2 status for all invasive breast carcinomas. The guidelines also recommend computer aided image analysis as an effective tool for achieving consistent interpretation of immunohistochemistry, provided that a pathologist confirms the result [6,10,42,43].

Automated computer-based techniques involve computer algorithms to automatically score immunohistochemical tests. They are becoming an increasingly significant part of pathology practice for quantitative assessment of tissue-based biomarkers [5,7,9,15,16,22,36,37]. One limitation of most current image evaluation systems is the inability to recognize particular cell types (e.g.,

tumour versus normal) and to distinguish between invasive and non invasive components. It is a semi-automated tool, which means that pathologists should select the region of interest to be interpreted and confirm the image evaluation results [11].

There are several advantages in HER2 status evaluation based on WSI, most of which stem from the fact that compared to glass slides, digital slides are very portable entities; thus, easily retrieved from a digital archive. It allows simultaneous viewing by multiple pathologists; they are accessible through a computer network from remote locations allowing teleconsultation with experts of equivocal or undetermined cases, or in a distributed environment, where one pathologist covers more than one hospital. It also offers advantages for quality control programs, residency, and pathologist training courses [38].

Most studies trying to validate WSI in breast pathology are meant for research or for diagnostic purposes, with haematoxylin and eosin (H&E) stained slides and for hormonal receptors and HER2 status using computer aided softwares with quantitative staining algorithms [1,7,12,23-25,40]. As HER2 expression evaluation is quantitative and qualitative, depending on morphology, intensity of colour, and contrast, few studies evaluated sensitivity and specificity of HER2 immunostained slides without computer aided IHC systems, comparing to conventional optical microscopy [18].

The aim of this study was to compare HER2 expression assessment using real glass slides and WSI, in invasive breast carcinomas.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the local Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, under the protocol number ETIC 0314.0.203.000-10.

Paraffin embedded tissue samples from 200 archived primary invasive breast carcinomas (IBC), resected between 1997 and 2005, with known HER2 expression levels were retrospectively selected from the files of two Brazilian

Institutions: Laboratory of Breast Pathology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) and A. C. Camargo Cancer Centre (São Paulo, SP). The inclusion criteria were based on previous IHC routinely tested in our own hospital. The cases were chosen considering a balanced distribution of HER2 categories, including 70 cases previously scored as negative (0/1+), 60 cases scored as equivocal (2+), and 70 cases scored as positive (3+), according to the 2007 ASCO/CAP HER2 guideline scoring recommendations [42]. Histologic type, histologic grade and stage of the cases included are shown in Table 1.

A tissue microarray (TMA) block was constructed by sampling 1mm-diameter core with representative areas of the invasive carcinomas from 200 donator blocks previously selected from the H&E and HER2 immunostained slides. Four-micrometre-thick sequential sections from the TMA were mounted on positively charged glass slides and submitted to immunohistochemistry (IHC) and dual-colour dual-hapten brightfield *in situ* hybridisation (DDISH) [2].

Immunohistochemistry and dual-colour *in situ* hybridisation

Immunohistochemical and *in situ* hybridisation procedures for HER2 were performed at A.C. Camargo Cancer Centre (São Paulo, SP). Three anti-HER2 FDA approved antibody clones were tested: polyclonal HercepTest™, mouse monoclonal CB11, and rabbit monoclonal SP3. Table 2 summarises antibody clones, detection systems, antigen retrieval methods, and dilutions.

One TMA slide section was deparaffinised, dehydrated in graded alcohols, and manually immunostained for Dako HercepTest™ Kit (Dako, Carpinteria, CA, USA). Two TMA slide sections were automatically deparaffinised and immunostained using the Ventana Benchmark XT staining system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) for SP3 and CB11 antibodies, according to the manufacturer's instructions. Slides were counterstained with haematoxylin and coverslipped.

Immunostainings were performed with known positive and negative tumour controls. HercepTest™ immunostaining run with a control provided by the kit.

The dual-colour dual-hapten brightfield *in situ* hybridisation method (DDISH; VENTANA INFORM HER2 Dual ISH assay), was automatically performed in a Benchmark XT instrument (Ventana), following the manufacturer's instructions.

Whole slide image acquisition and image viewing

The immunostained TMA slides were scanned using a digital microscopy scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) with a 20X microscope objective. The images were viewed on a 20" monitor screen with 1920 X 1080 primary resolution of an HP Omni 200 all in one desktop PC. The computer software, Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) was used for image viewing.

Interpretation of immunohistochemistry and dual-colour *in situ* hybridisation

The immunostained TMA glass slides were blindly evaluated by the same expert pathologist (CBN), using a conventional optical light microscope (Nikon Eclipse E200) and then, after a 2 week washout period, the correspondent whole slide scanned images were evaluated using the computer viewer software. The recently published 2013 ASCO/CAP scoring recommendations was followed (0, no staining or incomplete faint/barely perceptible membrane staining in ≤ 10 per cent of invasive tumour cells; 1+, faint/barely perceptible incomplete membrane staining in >10 per cent of invasive tumour cells; 2+, incomplete and/or weak/moderate membrane staining in >10 per cent of invasive tumour cells, or intense complete circumferential membrane staining ≤ 10 per cent of invasive tumour cells; 3+, intense complete circumferential membrane staining observed in a homogeneous and contiguous population and in >10 per cent of invasive tumour cells). The 3+ cases were considered positive, 0 and 1+ cases were considered negative, and 2+ cases were considered equivocal [43] (Figure 1).

DDISH *HER2* and Chr17 copies were counted on the optical microscope following ASCO/CAP recommendations and the *HER2*/Chr17 ratio was calculated. At least 20 non-equivocal and non-overlapping neoplastic nuclei of IBC cells were counted per case. A single dot was counted as one dot, a small cluster as six dots and a large cluster as 12 dots. Non-amplified cases were defined as those with a ratio

<2.0 with an average *HER2* copy number <4.0 signals/cell, and amplified cases, with a ratio ≥ 2.0 , or with a ratio <2 with an average *HER2* copy number ≥ 6.0 signals/cell. For cases with a ratio <2.0 with an average *HER2* copy number ≥ 4.0 and <6.0 signals/cell, additional 20 nuclei were counted and a new ratio was calculated [42,43].

Statistical Evaluation

Statistical analysis was performed using software SPSS V.19 and software Vassarstats [13]. The weighted Kappa test was applied to compare *HER2* expression by the different antibody clones in both evaluations (OM and WSI), and three categories were included (0/1+, 2+ and 3+). Kappa values followed Landis and Koch criteria (1977), and 95 per cent confidence intervals (CIs) were calculated [20]. DDISH was used as the gold standard for *HER2* status, and overall sensitivity and specificity were calculated for each antibody staining and evaluation, considering 3+ cases positive and 0/1+ cases negative. Sensitivity and specificity of each staining was compared with the McNemar's test. For the sensitivity and specificity evaluation, 2+ cases were excluded, as they are uninformative and would ask for a complimentary ISH study.

The cases with IHC scores 0 and 1+ and DDISH gene amplification were considered false negative. The cases with IHC score 3+ and no DDISH gene amplification were considered false positive.

RESULTS

Whole Slide Image and Real glass slide agreement

In total, 185 cases were assessed by dual-colour in situ hybridisation for gene amplification and by immunohistochemistry for protein expression in WSI and OM evaluations. The remaining 15 cases had incomplete results, due to folding of the core, loss of tumour material, or insufficient amounts of invasive breast cancer for scoring.

There was a good to very good WSI and OM immunohistochemical evaluation agreement (weighted kappa): SP3, $k=0.80$ (95 per cent CI 0.74-0.86); CB11, $k=0.81$ (95 per cent CI 0.75-0.87) and HercepTest™, $k=0.81$ (95 per cent CI 0.75-0.87).

The detection of HER2 protein overexpression (3+) was higher using WSI evaluation (40 per cent to 42.7 per cent of the 185 cases) compared to OM evaluation (33 to 38.4 per cent of the 185 cases) (Table 3).

Immunohistochemistry and dual-colour in situ hybridisation

DDISH identified *HER2* gene amplification in 70 tumours (37.8 per cent). WSI and OM evaluations showed similar overall concordance rates between IHC and DDISH. WSI evaluation overall concordance was 92.3 per cent (HercepTest™), 92.5 per cent (CB11) and 92.8 per cent (SP3), and OM evaluation overall concordance was 95.2 per cent (CB11), 95.9 per cent (HercepTest™) and 97.6 per cent (SP3).

The correlation between HER2 gene amplification and HER2 protein expression using WSI and OM evaluations is summarised in Table 4. There was no statistical difference between protein expression by the three antibodies and gene amplification of the 185 cases using both evaluations (McNemar's test $p>0.05$, data not shown).

Sensitivity and specificity comparing the three anti-HER2 antibodies and DDISH, using both evaluations are shown in Table 5. Although not significant, WSI evaluation tended to a bit higher sensitivity and lower specificity of the three antibodies compared to OM evaluation (McNemar's test $p=1.0$).

The number of equivocal cases (2+) was higher when they were determined by WSI evaluation as compared to OM, ranging from 13.5 per cent (CB11) to 17.3 per cent (SP3). These cases were not amplified by DDISH from 21/25 2+ cases (84 per cent, CB11) to 30/32 2+ cases (93.7 per cent, SP3). Equivocal cases determined by OM evaluation ranged from 6.5 per cent (HercepTest™) to 9.2 per

cent (CB11). These equivocal cases were not amplified by DDISH from 10/17 2+ cases (58.8 per cent, CB11) to 13/15 2+ cases (86.7 per cent, SP3).

There were more false negative cases using OM evaluation (from 1/100 [1%, SP3] to 5/107 [4.7%, CB11] negative cases) than using WSI evaluation (from 0 to 2/86 [2.3%, CB11] negative cases). False positive cases ranged from 10/74 positive cases (13.5%, CB11) to 12/79 positive cases (15.2%, HercepTest™) using WSI evaluation, and there were less false positive cases using OM evaluation (from 3/70 [4.3%, SP3] to 5/71 [7%, HercepTest™ positive cases).

As the original HER2 scoring of the cases was according to the 2007 HER2 ASCO/CAP guidelines, and the TMA's stained slides evaluation used the new 2013 recommendations, both results using optical microscopy were also compared, although the original is a whole slide and the study was on TMA. For SP3, three 1+ cases became 2+ and were not amplified by DDISH, one 2+ case became 3+ and was amplified by DDISH. For CB11, two 1+ cases became 2+, one was amplified and one was not amplified by DDISH, one 2+ case became 3+ and was amplified by DDISH. For HercepTest™, one 1+ case became 2+ and was not amplified by DDISH, and four 2+ cases became 3+ and were amplified by DDISH.

DISCUSSION

In the present study, we evaluated WSI for upfront digital assessment of HER2 expression in breast pathology practice for diagnosis and research. We compared conventional optical microscopy of real glass slides with whole slide image evaluations, using three different anti-HER2 antibodies, in invasive breast carcinomas tissue microarray. There was no significant difference between these evaluations.

We decided to work with three different FDA approved antibodies. They direct against different protein domains and are monoclonal and polyclonal antibodies; therefore, intensity of colour, contrast, sharpness of the staining and nonspecific backgrounds could vary and influence digital image and optical microscopy evaluations. Monoclonal antibodies are considered highly specific and polyclonal

antibodies, highly sensitive [8,26,27,31,39]. The Dako HercepTest™ kit includes the antibody A0485, a rabbit polyclonal antibody directed against the internal domain of the protein. CB11 is a mouse monoclonal antibody, also with antigenicity to the internal domain of the protein. SP3 is a rabbit monoclonal antibody directed to the extracellular domain of the protein receptor [27,33,35].

We used the DDISH method that has been FDA approved as an *in situ* hybridisation method, which is fully automated, has high concordance with FISH, and has the advantages of a bright field test [17,34].

HER2 overexpression using WSI evaluation ranged from 40 per cent (CB11) to 42.7 per cent (SP3 and HercepTest™), and from 33 per cent (CB11) to 38.4 (HercepTest™), using OM evaluation. The overall concordance rate with DDISH ranged from 92.3 per cent (HercepTest™) to 92.8 per cent (SP3) using WSI evaluation and was higher when we used OM evaluation, 95.2 per cent (CB11) to 97.6 per cent (SP3). Only OM evaluation overall concordance rates follow the ASCO/CAP guideline, which recommends that the concordance rate between IHC and FISH should be at least 95 per cent for IHC negative and positive tumours [42,43].

The WSI and OM immunohistochemical evaluations agreement (weighted kappa) was considered from good to very good. Although not statistically significant, the WSI evaluation tended to show more HER2 overexpressed, more equivocal cases, and more false positive cases. In contrast, OM evaluation tended to show more false negative cases. Kondo et al. [18] found a very good interobserver agreement between digital image and glass slide diagnosis ($k=0.72$), with a tendency for observers to assign higher scores with digital image than with glass slides. We also noted that WSI evaluation led to higher sensitivity of the antibodies than OM evaluation, and OM evaluation led to higher specificity of the antibodies. Laurinaviciene et al. [21] described an almost perfect intraobserver agreement between visual evaluation and digital image analysis at the spot level of a TMA digitised slide ($k=0.86$ and 0.87 in two visualisations). They used maximum TMA spot values (instead of mean or median value), which increases the sensitivity of HER2 detection.

TMAAs are well-suited for intra- and interlaboratory validation of immunohistochemistry. TMA digital images or WSI can be used for quality assurance [19]. In our experience, WSI evaluation of the TMA scanned slide was more time consuming than OM evaluation, although no formal time measurements were performed, possibly because of lack of familiarity in this different reading environment. The time described for a pathologist to make a diagnosis using WSI is longer than using a traditional glass slide, which can initially add up to 60 per cent [38]. Formal training and the opportunity to gain experience with the display program may benefit readers. An important advantage of digital microscopy is that it offers a complete overview image of the whole slide along with high power view, which helps systematically navigate the slide, enabling better orientation. It is easier to identify the region of interest or, when using a TMA, the TMA core, decreasing the risk of skipping a core or getting lost in the array, and it is possible to show two or more slides or cores, side by side.

Therefore, digital microscopy has all the advantages of digital pathology, most software have free access and there are no difficulties in operating them. Image evaluation is a new tool for interlaboratory comparative studies and certifications, helping solving postanalytic problems with diagnostic, prognostic, and predictive pathology. [14,19].

The US Food and Drug Administration (FDA) has recently declared WSI systems class III medical devices, which are the most highly regulated of all medical devices, requiring general controls and premarket approval. As validation of WSI is recommended, the College of American Pathologists (CAP) has created a working group on WSI validation, which has recently drafted 12 recommendations laboratories must follow, if they want to validate WSI systems [28].

In conclusion, there was good to very good agreement between OM and WSI when evaluating different antibodies against HER2 in breast cancer. All three antibodies were highly sensitive and specific using both types of evaluation. WSI can be considered a useful tool for HER2 immunohistochemical assessment in breast cancer.

Contributors: HG was responsible for the study design and helped draft the manuscript. RMR was responsible for TMA construction, immunohistochemistry and DDISH reactions; CBN made test evaluations and diagnosis and was responsible for drafting the manuscript. DB was responsible for the statistics. All authors contributed with the selection and review of the cases, besides revising and approving the manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge the support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and A. C. Camargo Cancer Centre, Brazil.

Competing interests: None

REFERENCES

1. S. Al-Janabi, A. Huisman, S.M. Willems, P.J. Van Diest, Digital slide images for primary diagnostics in breast pathology: a feasibility study. *Hum Pathol* 43 (2012) 2318-2325.
2. R.L. Camp, L.A. Charaette, D.L. Rimm, Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 80 (2000) 1943-1949.
3. Y. Chen , C.P. Liang, Y. Liu, A.H.Fischer, A.V. Parwani, L. Pantanowitz, Review of advanced imaging techniques. *J Pathol Inform* 3 (2012) 22.
4. S.S. Costello, D.J. Johnston, P.A. Dervan, D.G. O'Shea, Development and evaluation of the WSI pathology slide: A new tool in telepathology. *J Med Internet Res* 5 (2003) e11.
5. M.P. Dolled-Filhart, M.D. Gustavson, Tissue microarrays and quantitative tissue-based image evaluation as a tool for oncology biomarker and diagnostic development. *Expert Opin Med Diagn* 6 (2012) 569-583.

6. I.O. Ellis, J. Bartlett, M. Dowsett, S. Humphreys, B. Jasani, K. Miller, S.E. Pinder, A. Rhodes, R. Walker, Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 57 (2004) 233-237.
7. M.A. Gavrielides, B.D. Gallas, P. Lenz, A. Badano, S.M. Hewitt, Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 135 (2011) 233-242.
8. A.P. Gouvêa, F. Milanezi, S.J. Olson, D. Leitaó, F.C. Schmitt, H. Gobbi, Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14 (2006) 103-108.
9. M.D. Gustavson, B. Bourke-Martin, D. Reilly, M. Cregger, C. Williams, J. Mayotte, M. Zerkowski, G. Tedeschi, R. Pinard, J. Christiansen, Standardization of HER2 immunohistochemistry in breast cancer by automated quantitative evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 133 (2009) 1413-1419.
10. M.E. Hammond. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19 (2011) 499-500.
11. C.V. Hedvat. Digital microscopy: past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med*. 134 (2010) 1666-1670.
12. J. Ho, A.V. Parwani, D.M. Jukic, Y. Yagi, L. Anthony, J.R. Gilbertson, Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: Design and pilot validation studies. *Hum Pathol* 37 (2006) 322–331.
13. <http://www.vassarstats.net> accessed on October 30th of 2013.
14. A.R. Jara-Lazaro, T.P. Thamboo, M. Teh, P.H. Tan, Digital pathology: exploring its applications in diagnostic surgical pathology practice. *Pathology* 42 (2010) 512-518.
15. A.S. Joshi, G.M. Sharangpani, K. Porter, S. Keyhani, C. Morrison, A.S. Basu, G.A. Gholap, A.S. Gholap, S.H. Barsky, Semi-automated imaging system to

quantitate Her-2/neu membrane receptor immunoreactivity in human breast cancer. *Cytometry A* 71 (2007) 273-285.

16. T. Keay, C.M. Conway, N. O'Flaherty, S.M. Hewitt, K. Shea, M.A. Gavrielides, Reproducibility in the automated quantitative assessment of HER2/neu for breast cancer. *J Pathol Inform* 4 (2013) 19.

17. Y.W. Koh, H.J. Lee, J.W. Lee, J. Kang, G. Gong, Dual-colour silver-enhanced in situ hybridization for assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 24 (2011) 794-800.

18. Y. Kondo, T. Iijima, M. Noguchi, Evaluation of immunohistochemical staining using whole-slide imaging for HER2 scoring of breast cancer in comparison with real glass slides. *Pathol Int* 62 (2012) 592-599.

19. T. Krenacs, I. Zsakovics, C. Diczhazi, L. Ficsor, V.S. Varga, B. Molnar, The potential of digital microscopy in breast pathology. *Pathol Oncol Res* 15 (2009) 55-58.

20. J.R. Landis, G.G. Koch, The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33 (1977) 159-174.

21. A. Laurinaviciene, D. Dasevicius, V. Ostapenko, S. Jarmalaite, J. Lazutka, A. Laurinavicius, Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol* 6 (2011) 87.

22. H. Masmoudi, S.M. Hewitt, N. Petrick, K.J. Myers, M.A. Gavrielides, Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. *IEEE Trans Med Imaging* 28 (2009) 916-925.

23. A. Nassar, C. Cohen, S.S. Agersborg, W. Zhou, K.A. Lynch, M. Albitar, E.A. Barker, B.L. Vanderbilt, J. Thompson, E.R. Heyman, H. Lange, A. Olson, M.T. Siddiqui, Trainable immunohistochemical HER2/neu image analysis: a multisite

performance study using 260 breast tissue specimens. *Arch Pathol Lab Med* 7 (2011) 896-902.

24. A. Nassar, C. Cohen, S.S. Agersborg, W. Zhou, K.A. Lynch, E.A. Barker, B.L. Vanderbilt, J. Thompson, E.R. Heyman, A. Olson, H., Lange M.T. Siddiqui, A multisite performance study comparing the reading of immunohistochemical slides on a computer monitor with conventional manual microscopy for estrogen and progesterone receptor analysis. *Am J Clin Pathol* 3 (2011) 461-467.

25. A. Nassar, C. Cohen, M. Albitar, S.S Agersborg, W. Zhou, K.A. Lynch, E.R. Heyman, H. Lange, M.T. Siddiqui, Reading immunohistochemical slides on a computer monitor—a multisite performance study using 180 HER2-stained breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 3 (2011) 212-217.

26. C.B. Nunes, R.M. Rocha, M.A. Buzelin, D. Balabram, F. de Souza Foureaux, S.S. Porto, H. Gobbi, False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *J Clin Pathol* 18 (2013) [Epub ahead of print].

27. C. B. Nunes, R. M. Rocha, J.S. Reis-Filho, M.B. Lambros, G.F.S. Rocha, F. S. F. Sanches, F.N. Oliveira, H. Gobbi, Comparative evaluation of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 61(2008) 934-938.

28. L. Pantanowitz, J.H. Sinard, W.H. Henricks, L.A. Fatheree, A.B. Carter, L. Contis, B.A. Beckwith, A.J. Evans, C.N. Otis, A. Lal, A.V. Parwani, Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 1 (2013) [Epub ahead of print].

29. S. Park, L. Pantanowitz, A.V. Parwani, Digital imaging in pathology. *Clin Lab Med*. 32 (2012) 557-584.

30. S.L. Park, L. Pantanowitz, G. Sharma, A.V. Parwani, Anatomic pathology laboratory information systems: a review. *Adv Anat Pathol* 19 (2012) 81-96.

31. S.A. Ricardo, F. Milanezi, S.T. Carvalho, D.R. Leitão, F.C. Schmitt, HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 60 (2007) 1001-1005.
32. R. Rocha, J. Vassallo, F. Soares, K. Miller, H. Gobbi, Digital slides: present status of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. *Pathol Res Pract*. 205 (2009) 735-741.
33. J.S. Ross, Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect*. 22 (2009) 93-106.
34. B.N. Schiavon, B. Jasani, L. de Brot, J. Vassallo, A. Damascena, J. Cirullo-Neto, J. Ivanildo Neves, F. Augusto Soares, H. Gobbi, R. Malagoli Rocha, Evaluation of Reliability of FISH Versus Brightfield Dual-probe In Situ Hybridization (BDISH) for Frontline Assessment of HER2 Status in Breast Cancer Samples in a Community Setting. Influence of Poor Tissue Preservation. *Am J Surg Pathol* 36 (2012) 1489–1496.
35. S. Shah, B. Chen, Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog Res Int* 6 (2010) 2011 903202.
36. I. Skaland, I. Ovestad, E.A. Janssen, J. Klos, K.H. Kjellevold, T. Helliesen, J.P. Baak, Digital image evaluation improves the quality of subjective HER-2 expression scoring in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16 (2008) 185-90.
37. J. Słodkowska, V. Filas, E. Buszkiewicz, P. Trzeciak, M. Wojciechowski, R. Koktysz, W. Staniszewski, J. Breborowicz, M.G. Rojo, Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images evaluation systems: ACIS III [Dako] and ScanScope [Aperio]. *Folia Histochem Cytobiol* 48 (2010) 19-25.
38. N. Stathonikos, M. Veta, A. Huisman, P.J. van Diest, Going fully digital: Perspective of a Dutch academic pathology lab. *J Pathol Inform* 4 (2013) 15.

39. T.A. Thomson, M.M. Hayes, J.J. Spinelli, E. Hilland, C. Sawrenko, D. Phillips, B. Dupuis, R.L. Parker, HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 14 (2001) 1079-86.
40. R.S. Weinstein, A.R. Graham, L.C. Richter, G.P. Barker, E.A. Krupinski, A.M. Lopez, K.A. Erps, A.K. Bhattacharyya, Y. Yagi, J.R. Gilbertson, Overview of telepathology, WSI microscopy, and whole slide imaging: Prospects for the future. *Hum Pathol* 40 (2009) 1057–1069.
41. D.C. Wilbur, K. Madi, R.B. Colvin, L.M. Duncan, W.C. Faquin, J.A. Ferry, M.P. Frosch, S.L. Houser, R.L. Kradin, G.Y. Lauwers, D.N. Louis, E.J. Mark, M. Mino-Kenudson, J. Misdraji, G.P. Nielsen, M.B. Pitman, A.E. Rosenberg, R.N. Smith, A.R. Sohani, J.R. Stone, R.H. Tambouret, C.L. Wu, R.H. Young, A. Zembowicz, W. Klietmann, Whole-slide imaging digital pathology as a platform for teleconsultation: a pilot study using paired subspecialist correlations. *Arch Pathol Lab Med* 133 (2009) 1949-1953.
42. A.C. Wolff, M.E. Hammond, J.N. Schwartz, K.L. Hagerty, D.C. Allred, R.J. Cote, M. Dowsett, P.L. Fitzgibbons, W.M. Hanna, A. Langer, L.M. McShane, S. Paik, M.D. Pegram, E.A. Perez, M.F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S.E. Taube, R. Tubbs, G.H. Vance, M. van de Vijver, T.M. Wheeler, D.F. Hayes; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists, 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* 25 (2007) 118-145.
43. A.C. Wolff, M.E. Hammond, D.G. Hicks, M. Dowsett, L.M. McShane, K.H. Allison, D.C. Allred, J.M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R.B. Jenkins, P.B. Mangu, S. Paik, E.A. Perez, M.F. Press, P.A. Spears, G.H. Vance, G. Viale, D.F. Hayes. 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*. 2013 Oct 7. [Epub ahead of print] doi: 10.5858/arpa.2013-0953-SA.

Table 1 – Histologic type, histologic grade and PT stage of the 200 breast cancers included in the study

Histologic type	N (%)	Histologic grade	N (%)	PT stage	N (%)
Invasive ductal carcinoma	188 (94%)	I	22 (11%)	T1	51 (25.5%)
Invasive lobular carcinoma	5 (2.5%)	II	98 (49%)	T2	120 (50%)
Tubular carcinoma	3 (1.5%)	III	80 (40%)	T3	20 (10%)
Mucinous carcinoma	2 (1%)			T4	9 (4.5%)
Carcinoma with apocrine differentiation	2 (1%)				

N indicates number of cases, PT indicates pathologic tumour stage

Table 2- Anti-HER2 antibody clones, sources, detection systems, antigen retrieval methods and dilutions used in the IHC assays

Clone	Source	Detection system	Antigen retrieval	Dilution
HercepTest™	Dako, USA	Polymer Visualization Reagent, Dako	Epitope retrieval solution, DAKO	Prediluted
CB11	Novocastra, UK	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500
SP3	Lab Vision, USA	UltraView Universal DAB Detecton Kit, Ventana	CC1, Ventana	1:500

IHC=immunohistochemistry; CC1=cell conditioning solution (pH 8.5)

Table 3 – Number and proportion of HER2 immunoexpression using optical microscopy and whole slide image evaluations in 185 invasive breast cancer

HER2 antibodies and evaluations						
	SP3		CB11		HercepTest™	
IHC score	OM	WSI	OM	WSI	OM	WSI
	100	74	107	86	102	76
0/1+	(54.1%)	(40%)	(57.8%)	(46.5%)	(55.1%)	(41.1%)
	15	32	17	25	12	30
2+	(8.1%)	(17.3%)	(9.2%)	(13.5%)	(6.5%)	(16.2%)
	70	79	61	74	71	79
3+	(37.8%)	(42.7%)	(33%)	(40%)	(8.4%)	(42.7%)

IHC, immunohistochemistry; OM, optical microscopy evaluation; WSI, whole slide image evaluation

Table 4 - Semiquantitative IHC scores using optical microscopy and whole slide image evaluations against amplification of *HER2* gene by DDISH

IHC							
Ab clones		OM evaluation			WSI evaluation		
DDISH	SP3	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+
NA		99	13	3	74	30	11
A		1	2	67	0	2	68
Total		100	15	70	74	32	79
DDISH	CB11	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+
NA		102	10	3	84	21	10
A		5	7	58	2	4	64
Total		107	17	61	86	25	74
DDISH	HercepTest™	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+
NA		100	10	5	76	27	12
A		2	2	66	0	3	67
Total		102	12	71	76	30	79

IHC, immunohistochemistry; DDISH, dual colour *in situ* hybridisation; NA, no amplification; A, amplification, discordant cases are highlighted in bold red colour; OM, optical microscopy evaluation; WSI, whole slide image evaluation.

Table 5 – Sensitivity and specificity of three anti-HER2 antibodies using optical microscopy and whole slide image evaluations compared to DDISH

Antibodies	Sensitivity (95% CI)		Specificity (95% CI)	
	OM	WSI	OM	WSI
SP3	98 (91-99.9)	100 (93.3-100)	97.1 (91.0-99.2)	87 (77.6-93)
CB11	92.1 (81.7-97)	97 (88.5-99.5)	97.1 (91.3-99.2)	89.4 (80.9-94.5)
HercepTest™	97 (88.8-99.5)	100 (93.2-100)	95.2 (88.6-98.2)	86.4 (77-92.4)

CI, confidence interval; DDISH, dual-colour in situ hybridisation; OM, optical microscopy evaluation; WSI, whole slide image evaluation (p=1.0).

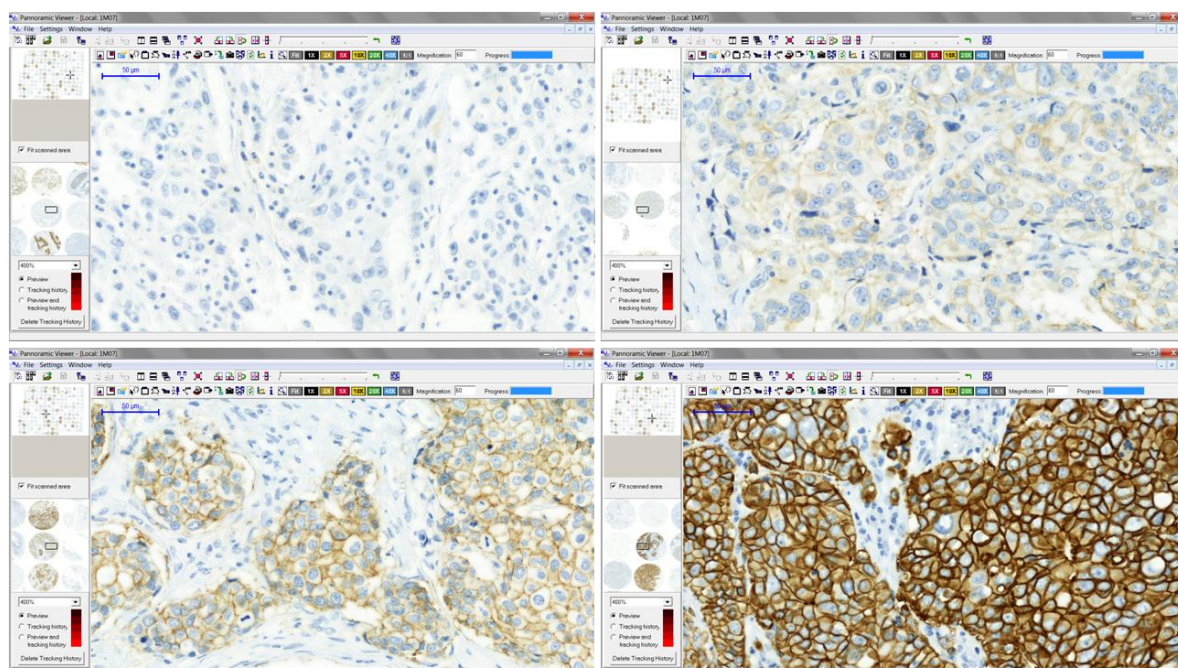


Figure 1 - Whole Slide Images of *TMA* cores displaying 0, 1+, 2+ and 3+ HER2 scores following new 2013 ASCO/CAP recommendations (SP3 antibody, 60X) [43].

6. CONCLUSÕES FINAIS

1- Houve uma concordância muito boa entre os cinco anticorpos anti-HER2 testados. CB11 foi o anticorpo mais específico, mas mostrou mais casos falso negativos, enquanto A0485, SP3, 4B5 e HercepTestTM foram altamente sensíveis e específicos, mas mostraram mais casos falso positivos, quando comparados ao DDISH.

2- Existe influência na avaliação do HER2 e variação na sensibilidade e especificidade dos anticorpos quando utilizamos materiais com e sem controle da fase pré-analítica, sendo melhor naqueles casos com controle da fase pré-analítica.

3- A concordância entre os métodos manual e automatizado foi boa a muito boa. Não houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade e especificidade dos anticorpos ao se empregar ambos os métodos, indicando segurança no uso do método manual quando adequadamente padronizado.

4- Houve uma concordância boa a muito boa entre as avaliações visuais da lâmina no microscópio óptico e da imagem digitalizada no computador, quando avaliados três diferentes anticorpos anti-HER2. Todos os anticorpos foram altamente sensíveis e específicos nas duas avaliações. A avaliação da imagem digitalizada pode ser considerada uma ferramenta útil na detecção imuno-histoquímica do câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-REHIM, D.M., *et al.* High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*, v.116,n.3. p.340-50, Sep2005.
- AL. Y-AIE: in press. American Journal of Clinical Pathology, 2013
- ALBANELL, J. *et al.* Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol*, v.1, n.6, p.363-75, Jun 2009.
- ALI, A.M. *et al.* Comparison of methods for handling missing data on immunohistochemical markers in survival analysis of breast cancer. *Br J Cancer*, v.104, n.4, p.693-9, Feb 2011.
- AL-JANABI, S. *et al.* Digital slide images for primary diagnostics in breast pathology: a feasibility study. *Hum Pathol*, v.43, n.12, p.2318-25, Dec 2012a.
- AL-JANABI, S.; HUISMAN, A.; VAN DIEST, P.J. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*, v.61, n.1, p.1-9, Jul 2012b.
- 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.
- 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.
- ARNOULD, L. *et al.* Agreement between chomogenic in situ hybridization (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer*, v.88, n.10, p.1587-91, 2003.
- 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.
- BÁNKFALVI, A.; BOECKER, W.; REINER, A. Comparison of automated and manual determination of HER2 status in breast cancer for diagnostic use: a comparative methodological study using the Ventana BenchMark automated staining system and manual tests. *Int J Oncol*, v.25, n.4, p.929-35, Oct 2004.

BARTLETT, J.M. *et al.* Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. *Am J Clin Pathol*, v.132, n.4, p.514-20, 2009.

BARTLETT, J.M. *et al.* HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods. *J Clin Pathol*, v.64, p.649-53, 2011.

BATTIFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*, v.55, n.2, p.244-8, Aug. 1986.

BENOHR, P. *et al.* Her-2/neu expression in breast cancer--A comparison of different diagnostic methods. *Anticancer Res*, v.25, n.3B, p.1895-900, May-Jun. 2005.

BHARGAVA, R.; LAL, P.; CHEN, B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am J Clin Pathol*, v.123, n.2, p.237-43, 2005.

BILOUS, M. *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*, v.16, n.2, p.173-82, Feb 2003.

BUBENDORF, L. *et al.* Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, v.195, p.72-79, 2001.

CAMP, R.L.; CHARAETTE, L.A.; RIMM, D.L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, v.80, p.1943-49, 2000.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. v.490, n.7418, p.61-70, Oct 2012.

CHEN, Y. *et al.* Review of advanced imaging techniques. *J Pathol Inform*.v.3,p.22. 2012. Epub May 28, 2012.

CHO, H.S. *et al.*, Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, v.421, n.6924, p.756-60, 2003.

DE MARZO, A. & FEDOR, H. Molecular Analysis of Tissues Using Expression Microarrays and Tissue Micromicroarrays Section The Principles, Uses and Construction of Tissue Micromicroarrays in Pathology Research II. United States and Canadian Academy of Pathology 2004, 93rd Annual Meeting, Short Course #47.

DIETEL, M. *et al.* Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch*, v.451, n.1, p.19-25, Epub Jun 12, 2007.

DOLLED-FILHART, M.P.; GUSTAVSON, M.D. Tissue microarrays and quantitative tissue-based image evaluation as a tool for oncology biomarker and diagnostic development. *Expert Opin Med Diagn*, v.6, n.6, p.569-83. Nov 2012.

DOWSETT, M. *et al.* Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centers. *J Pathol*, v.199, n.4, p.418-23, 2003.

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.

DOWSETT, M *et al.* Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol*, v.20, n.5, p.584-91, May 2007.

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.

ELLIS, I.O. *et al.* Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*,v.57, n.3, p.233-7, Mar 2004.

ELLIS, C.M. *et al.* HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J Clin Pathol*, v.58, n.7, p.710-714, 2005.

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.

FOEKENS, J.A. *et al.* Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*, v.24, n.11, p.1665-71, Apr 2006.

FRANCIS, G.D. *et al.* Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome *Diagn Mol Pathol*, v.18, n.2, p.88-95, 2009.

- 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.
- GAVRIELIDES, M.A. *et al.* Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy. *Arch Pathol Lab Med*, v.135, n.2, p.233-42, Feb 2011.
- GOBBI, H. *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumor grade in human breast in situ and invasive carcinomas. *Histopathology*, v.36, n.2, p.168-77, 2000.
- 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.
- GOUVÊA, A.P. *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.14, n.1, p.103-8, Mar 2006.
- 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.
- GRADISHAR, W.J. HER2 therapy--an abundance of riches. *N Engl J Med*, v.366, n.2, p.176-8, 2012.
- GRIMM, E.E. *et al.* Achieving 95% cross-methodological concordance in HER2 testing: causes and implications of discordant cases. *Am J Clin Pathol*, v.134, n.2, p.284-92, Aug 2010.
- GRUVER, A.M.; PEERWANI, Z.; TUBBS R.R. Out of the darkness and into the light: bright field in situ hybridisation for delineation of ERBB2 (HER2) status in breast carcinoma *J Clin Pathol*, v.63, n.3, p.210-9, 2010.
- GUSTAVSON, M.D. *et al.* Standardization of HER2 immunohistochemistry in breast cancer by automated quantitative evaluation. *Arch Pathol Lab Med*, v.133, n.9, p.1413-1419, Sep 2009.
- 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, 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.
- HANNA, W. *et al.* Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol*, v.14, n.4, p.149-53, Aug 2007.

HANNA, W.M. *et al.* HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol*, Jun 2013 [Epub ahead of print] doi: 10.1038/modpathol.2013.103.

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.

HEDVAT, C.V. Digital microscopy: past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med*, v.134, n.11, p.1666-70, Nov 2010.

HENNESSY, B.T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, v.69, p.4116-24, 2009.

HERSCHKOWITZ, J.I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*; v.8, p.R76, 2007.

HESS, K.R. *et al.* Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*, v.24, n.26, p.4236-44, Sep 2006.

HO, J. *et al.* Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: Design and pilot validation studies. *Hum Pathol*, v.37, p.322-31, 2006.

HOFMANN, M. *et al.* Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab(Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol*, v.61, n.1, p.89-94, Jan 2008.

HWANG, CC *et al.* Dual-colour chromogenic in-situ hybridization is a potential alternative to fluorescence in-situ hybridization in HER2 testing. *Histopathology*, v.59, n.5, p.984-92, Nov 2011.

INCA. Base de dados. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>> acessado em 17 Dez.2013.

JACOBS, T.W. *et al.* Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol*, v.17, n.7, p.1983-87, Jul. 1999.

JARA-LAZARO, A.R. *et al.* Digital pathology: exploring its applications in diagnostic surgical pathology practice. *Pathology*, v.42, n.6, p.512-8, 2010.

JENNINGS, L.; VAN DEERLIN, V.M.; GULLEY, M.L. College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med*, v.133, n.5, p.743-55 May 2009.

- JOSHI, A.S. *et al.* Semi-automated imaging system to quantitate Her-2/neu membrane receptor immunoreactivity in human breast cancer. *Cytometry A*, v.71, p. 273-85, 2007.
- KATO, N. *et al.* Evaluation of HER2 gene amplification in invasive breast cancer using a dual-color chromogenic in situ hybridization (dual CISH). *Pathol Int*, v.60, n.7, p.510-5, Jul 2010.
- KEAY T, *et al.* Reproducibility in the automated quantitative assessment of HER2/neu for breast cancer. *J Pathol Inform*, v.4, p.19, 2013.
- 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.
- KOH, Y.W. *et al.* Dual-colour silver-enhanced in situ hybridization for assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*, v.24, n.6, p.794-800, Jun 2011.
- KONDO, Y.; IJIMA, T.; NOGUCHI, M. Evaluation of immunohistochemical staining using whole-slide imaging for HER2 scoring of breast cancer in comparison with real glass slides. *Pathol Int*, v.62, n.9, p.592-9, Sep 2012.
- KONG, S.Y. *et al.* Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer. *J Clin Pathol*, v.59, n.4, p.373-6, Apr 2006.
- KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, v.4, n.7, p.844-7, Jul. 1998.
- KRENACS, T. *et al.* The potential of digital microscopy in breast pathology. *Pathol Oncol Res*, v.15, n.1, p.55-8. Mar. 2009.
- LAKHANI, S.R. *et al* (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors of the Breast. IARC: Lyon, 2012. 240p.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33[1]: 159-74, 1977. *Biometrics*, v.33, n.1, p.159-74, 1977
- LAURINAVICIENE, A. *et al.* Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol*, v.23, n.6, p.87, Sep 2011.
- LEE, J.A. *et al.* Clinical and health economic outcomes of alternative HER2 test strategies for guiding adjuvant trastuzumab therapy. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, v.11, n.3, p.325-41, Jun 2011.
- LEONG, T. Y-M *et al.* Immunohistology—Past, Present, and Future. *Adv Anat Pathol*, v.17, p.404–18, 2010.

LÓPEZ, A.M. *et al.* Virtual slide telepathology enables an innovative telehealth rapid breast care clinic. *Hum Pathol*, v.40, n.8, p.1082-91, Aug 2009.

MA, X.J. *et al.* Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.10, p.5974-9, May 2003.

MASMOUDI, H. *et al.* Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. *IEEE Trans Med Imaging*, v.28, n.6, p.916-25, Jun 2009.

MILANES-YEARSLEY, M. *et al.* Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, v.15, n.12, p.1366-1373, 2002.

MILES, D.W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy – Herceptin on the clinical setting. *Breast Cancer Res*, v.3, p.380-4, 2001.

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.

MOELANS, C.B. *et al.* Validation of a fully automated HER2 staining kit in breast cancer. *Cell Oncol*, v.32, n.1-2, p.149-55, 2010.

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.

MULKAHY, N. *FDA Approves New Treatment for Metastatic HER2 Breast Cancer.* Medscape. Feb 22, 2013.

NISTOR, A. *et al.* Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol*, v.6, n.1 18, p.2, Jan 2006.

NITTA, H. *et al.* Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*, v.22, n.3, p.41, Oct 2008.

NUNES, C.B. *et al.* Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em arrays de carcinomas mamários *J Bras Patol Med Lab*, v.43, n.5, p.357-363, 2007.

NUNES, C. B. *et al.* Comparative evaluation of six different antibodies against Her2 including the novel rabbit monoclonal antibody (SP3) and chromogenic in situ hybridisation in breast carcinomas. *J Clin Pathol*, v.61, p.934-938, 2008.

- O'GRADY, A. *et al.* An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization-based comparison between the Oracle HER2 Bond Immunohistochemical System, Dako HercepTest, and Vysis PathVysion HER2 FISH using both commercially validated and modified ASCO/CAP and United Kingdom HER2 IHC scoring guidelines. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.18, n.6, p.489-93, Dec 2010.
- 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.
- PANTANOWITZ, L. *et al.* Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *J Pathol Inform*, v.2, p.36, 2011.
- PANTANOWITZ, L. *et al.* Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med*, May 2013 [Epub ahead of print].
- PAPOUCHADO, B.G. *et al.* Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *Am J Surg Pathol*, v.34, n.6, p.767-76, 2010.
- PARK, S.; PANTANOWITZ, L. PARWANI, A.V. Digital imaging in pathology. *Clin Lab Med*, v.32, n.4, p.557-84, Dec 2012.
- 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.* Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*, v.132, n.4, p.539-48, 2009.
- PEROU, C.M. *et al.* Clinical Implementation of the intrinsic subtypes of breast cancer. *Lancet Oncol*, v.11, p.718-9; author reply 20-1, 2010.
- PEROU, C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v. 406, p.747-52, 2000.
- 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
- POTTI, A. *et al.* Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med*, v.12, n.11, p.1294-300, Nov 2006.
- POWELL, W.C. *et al.* A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.15, n.1, p.94-102, Mar. 2007.
- RAKHA, E.A *et al.* Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. v.42, n.18, p.3149-53, Dec 2006.

RAKHA, E.A.; ELLIS, I.O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv Anat Pathol*, v.18, n.4, p.255-67, Jul 2011.

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.

RHODES, A. *et al.* Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin fixed and paraffin processed cell lines and breast tumours: A comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol*, v.118, p.408-417, 2002.

RICARDO, S.A. *et al.* HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol*, v.60, n.9, p.1001-5, Sep 2007.

ROCHA, R.M. *et al.* A comparison between the novel rabbit monoclonal antibodies (SP1 and B644) and mouse antibodies for evaluating estrogen receptor in breast tumors. *J Bras Patol Med Lab*. v.43, n.6, p.435-40, Dez 2007.

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.

ROCHA, R.M. *et al.* Rabbit antibodies for hormone receptors and HER2 evaluation in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*, v.55, n.2, p.163-168, 2009a.

ROCHA, R.M. *et al.* Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. *J Clin Pathol*, v.62, n.8, p.699-704, Aug 2009b.

ROCHA, R.M. *et al.* The Use of the Immunohistochemical Biotin-Free Visualization Systems for Estrogen Receptor Evaluation of Breast Cancer. *Applied Cancer Research*, v.29, n.3, p.111-116, 2009c.

ROCHA, R. *et al.* Digital slides: present status of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. *Pathol Res Pract*, v.205, n.11, p.735-41, 2009d.

ROCHE, P.C.; INGLE, J.N. Increased HER2 with U.S. Food and drug administration-approved antibody. *J Clin Oncol*, vol.17, n1, p434, 1999.

ROEPMAN, P. *et al.* Microarray-based determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 receptor status in breast cancer. *Clin Cancer Res*, v.15, n.22, p.7003-11, Nov. 2009.

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.
- SAUTER, G; MIRLACHER, M. Tissue micromicroarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol*, v.55, n.8, p.575-576, 2002.
- SAUTER, G. *et al.* Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*, v.27, n.8, p.1323-33, Mar. 2009.
- SCHIAVON, B.N. *et al.* Evaluation of Reliability of FISH Versus Brightfield Dual-probe In Situ Hybridization [BDISH] for Frontline Assessment of HER2 Status in Breast Cancer Samples in a Community Setting. Influence of Poor Tissue Preservation. *Am J Surg Pathol*, v.36, p.1489–1496, 2012.
- SCHUETZ, C.S. *et al.* Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res*, v.66, n.10, p.5278-86, May 2006.
- SEIDAL, T. *et al.* Interpretation and Quantification of Immunostains. *Am J Surg Pathol*, v.25, p.1204-1207, 2001.
- SELVARAJAN, S. *et al.* The HercepTest and routine C-erbB2 immunohistochemistry in breast cancer: any difference? *Ann Acad Med Singapore*, v.33, n.4, p.473-6, Jul. 2004.
- SELVARAJAN, S. *et al.* c-erbB-2 (HER-2/neu) immunohistochemistry in invasive breast cancer: is there concordance between standard sections and tissue microarrays? *Pathology*, v.38, n.4, p.316-20, 2006.
- SETH, D. *et al.* Gene expression profiling of alcoholic liver disease in the baboon (*Papio hamadryas*) and human liver. *Am J Pathol*, v.163, n.6, p.2303-17, Dec 2003.
- SHAH, S.; CHEN, B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog Res Int*, v.6; 2011:903202 Dec 2010.
- SKALAND, L. *et al.* Comparing subjective digital image analysis HER2/neu expression scores with conventional and modified FISH scores in breast cancer. *J Clin Pathol*, v.61, n.1, p.68-71, 2008.
- 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.
- SŁODKOWSKA, J. *et al.* Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images evaluation systems: ACIS III [Dako] and ScanScope [Aperio]. *Folia Histochem Cytobiol*, v.48, n.1, p.19-25, Jan 2010.
- SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Nati Acad Sci*, v.98, p.10869-74, 2001.

SOTIRIOU, C. *et al.* Gene expression profiling in breast cancer: *Natl Cancer Inst*, v.98, p.262-72, 2006.

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.

TURASHVILI, G. *et al.* Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer*, v.27, n.7, p.55, Mar 2007.

TURASHVILI, G *et al.* Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assesment and concordance with fluorescent in situ hybridisation (FISH): pathologist assesment compared to quantitative image analysis. *BMC Cancer*, v.9, p.165, 2009.

VAN DE VIJVER, M.J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, v.347, n.25, p.1999-2009, Dec. 2002.

VAN DE VIJVER, M. *et al.* Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res*, v.9, n.5, p.R68, 2007.

VAN DE RIJN, M. *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. v.161, n.6, p.1991-6, De. 2002.

VAN DER VEG, T. B. *et al.* Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining Her2/neu status in breast cancer. *Mod Pathol*, v.22, p.879-86, 2009.

VASSARSTATS. Disponível em: <<http://www.vassarstats.net>> acessado em 08 e 14 Jan. 2013.

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

WANG, Y. *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*, v.365, n.9460, p.671-9, Feb 2005.

WANG, Y. *et al.* SurfaceSlide: a multitouch digital pathology platform. *PLoS One*, v.7, n.1, e30783. 2012

WICK, M.R.; SWANSON, P.E. Editorial: Targeted controls in clinical immunohistochemistry; a useful approach to quality assurance. *Am J Clin Pathol*, v.117, p.7, 2002.

WILLIAMS, C. *et al.* Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technol Assess*, v.10, n.34, p.iii-iv, ix-xi, 1-204. Sep 2006.

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. [Epub ahead of print] doi: 10.5858/arpa.2013-0953-SA.

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.

ZHANG, D. *et al.* Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue micromicroarrays. *Human Pathol*, v.34, n.4, p.362-8, 2003.

ZHAO, J. *et al.* Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol*, v.15, n.6, p.657-65, 2002.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM A TESE/DOCTORADO

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY

NUNES CB, ROCHA RM, BUZELIN MA, BALABRAM D, DE SOUZA FOUREAUX F, PORTO SS, GOBBI H. **False positivity in HER2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma.** J Clin Pathol. 2013 Nov;66(11):946-50. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201647. Epub 2013 Jul 18. PubMed PMID: 23867547

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO PATHOLOGY - RESEARCH AND PRACTICE EM OUTUBRO DE 2013

NUNES C, ROCHA R, BUZELIN M, BALABRAM D, FOUREAUX F, PORTO S, GOBBI H. **High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer.**

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS:

Resumo aceito para apresentação em forma de poster no United States & Canadian Academy of Pathology's 103rd Annual Meeting, 1-7 de Março, 2014, San Diego, CA.

NUNES CB, ROCHA RM, BUZELIN MA, BALABRAM D, DE SOUZA FOUREAUX F, PORTO SS, GOBBI H. **High Agreement between Whole Slide Imaging and Optical Microscopy for Assessment of HER2 Expression in Breast Cancer.** Abstract confirmation #2856, accepted for presentation.

Dois resumos apresentados em forma de pôster em 13-16 novembro de 2013 no XXIX Congresso Brasileiro de Patologia, Florianópolis

NUNES C, ROCHA R, BUZELIN M, BALABRAM D, FOUREAUX F, PORTO S, GOBBI H. **Análise comparativa da expressão proteica de anticorpos anti-HER2 em câncer de mama através da imagem da lâmina escaneada no computador e da microscopia de luz usual**

NUNES C, ROCHA R, BUZELIN M, BALABRAM D, FOUREAUX F, PORTO S, GOBBI H. **High sensitivity and specificity of five different antibodies to detect HER2 amplification as defined by the new dual colour brightfield in situ hybridisation in breast carcinomas**

Dois resumos apresentados em forma de pôster no V Encontro Internacional de Patologia Investigativa e XIV Jornada de Patologia do Hospital AC Camargo, 2012:

NUNES, C B, FOUREAUX, F.S., ROCHA, R M, BUZELIN, MA, GOBBI, H. **HER2 immunohistochemical and DDISH analysis in breast cancer: a comparative study of five different antibodies using automated and manual staining systems** In: V Encontro Internacional de Patologia Investigativa e XV Jornada de Patologia do Hospital AC Camargo, 2012, São Paulo. Applied Cancer Research (Impresso). São Paulo: Centro Internacional de Pesquisa e Ensino – CIPE, 2012. v.32. p.56 – 57

NUNES, C B, FOUREAUX, F.S., ROCHA, R M, BUZELIN, MA, GOBBI, H. **Intraobserver agreement in scoring visual and image scanned slides of HER2 immunohistochemical overexpression detected by five different antibodies using manual and automated staining systems** In: V Encontro Internacional de Patologia Investigativa e XV Jornada de Patologia do Hospital AC Camargo, 2012, São Paulo. Applied Cancer Research (Impresso). São Paulo: Centro Internacional de Pesquisa e Ensino – CIPE, 2012. v.32. p.56 – 56.

Dois resumos apresentados em forma de pôster no IV Encontro Internacional de Patologia Investigativa e XIV Jornada de Patologia do Hospital AC Camargo, 2011:

NUNES CB, ROCHA RM, REIS-FILHO, JS, LAMBROS, MB, SANCHES, FSFS, GOBBI H. **Comparação dos sistemas de escores do Herceptest e do Guia da ASCO/CAP na detecção do HER2 através da avaliação da sensibilidade e especificidade de seis anticorpos anti-HER2 comparados ao CISH.**

NUNES CB, ROCHA RM, GOUVÊA AP, TAFURI, LSA, MARINHO, VFZ, SOUSA, DSC, FOUREAUX, FS, GOBBI H. **Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do HER2 detectada por três diferentes anticorpos, utilizando dois sistemas de escore distintos.**

Três resumos apresentados em forma de pôster no XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia/XXVIII Congresso de la Sociedad Latinoamericana de Patologia, 2011:

NUNES, C B, ROCHA, RM, REIS- FILHO, J. S., LAMBROS, M.B., SANCHES, FSF, GOBBI, H. **Avaliação imuno-histoquímica do HER2 em câncer de mama empregando os escores do Herceptest versus ASCO/CAP.** In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e XXVIII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología, 2011, Maceió - AL. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** São Paulo: 2011. v.47. p.394

NUNES, CB, ROCHA, RM, GOUVÊA, AGOSTINHO PINTO, TAFURI, L. S. A., MARINHO, V. F. Z., FOUREAUX, F.S., GOBBI, H. **Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do HER2 em câncer de mama detectada por três diferentes anticorpos, utilizando dois sistemas de escore** In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e XXVIII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología, 2011, Maceió - AL. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** São Paulo: 2011. v.47. p.392

Trabalho laureado com o **Prêmio Prof. Dr. Osvaldo Giannotti Filho - Menção Honrosa**, concedida pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

NUNES, CB, FOUREAUX, F.S., ROCHA, RM, GOBBI, H. **Concordância na avaliação imuno-histoquímica da superexpressão da proteína HER2 entre amostras de cortes histológicos inteiros e cilindros de microarranjos de tecido de carcinomas mamários invasivos.** In: XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia e XXVIII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología, 2011, Maceió - AL. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** São Paulo: 2011. v.47. p.441

8.2. ANEXO B – ALGORITMOS DAS RECOMENDAÇÕES DA ASCO/CAP 2013 PARA AVALIAÇÃO DO HER2 EM CÂNCER DE MAMA



HER2 Testing Algorithms

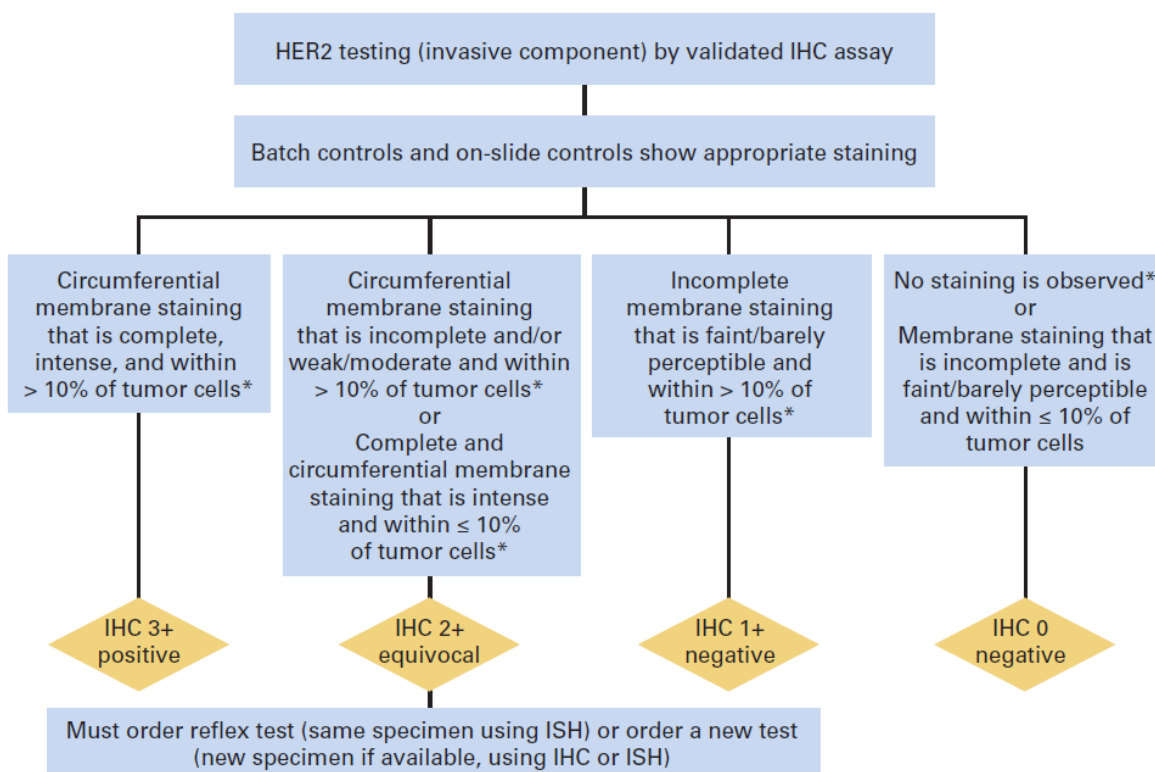


Fig 1. Algorithm for evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) protein expression by immunohistochemistry (IHC) assay of the invasive component of a breast cancer specimen. Although categories of HER2 status by IHC can be created that are not covered by these definitions, in practice they are rare and if encountered should be considered IHC 2_ equivocal. ISH in situ hybridization. NOTE: the final reported results assume that there is no apparent histopathologic discordance observed by the pathologist. (*) Readily appreciated using a low-power objective and observed within a homogeneous and contiguous invasive cell population.

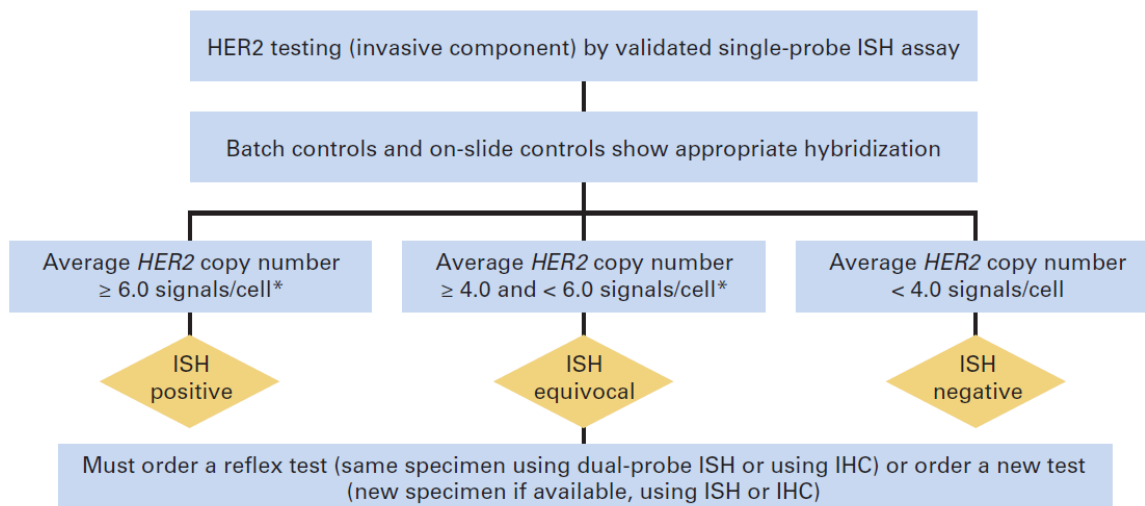


Fig 2. Algorithm for evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene amplification by in situ hybridization (ISH) assay of the invasive component of a breast cancer specimen using a single-signal (*HER2* gene) assay (single-probe ISH). Amplification in a single-probe ISH assay is defined by examining the average *HER2* copy number. If there is a second contiguous population of cells with increased *HER2* signals per cell, and this cell population consists of more than 10% of tumor cells on the slide (defined by image analysis or visual estimation of the ISH or immunohistochemistry [IHC] slide), a separate counting of at least 20 nonoverlapping cells must also be performed within this cell population and also reported. Although categories of *HER2* status by ISH can be created that are not covered by these definitions, in practice they are rare and if encountered should be considered ISH equivocal (see Data Supplement 2E). NOTE: the final reported results assume that there is no apparent histopathologic discordance observed by the pathologist. (*) Observed in a homogeneous and contiguous population.

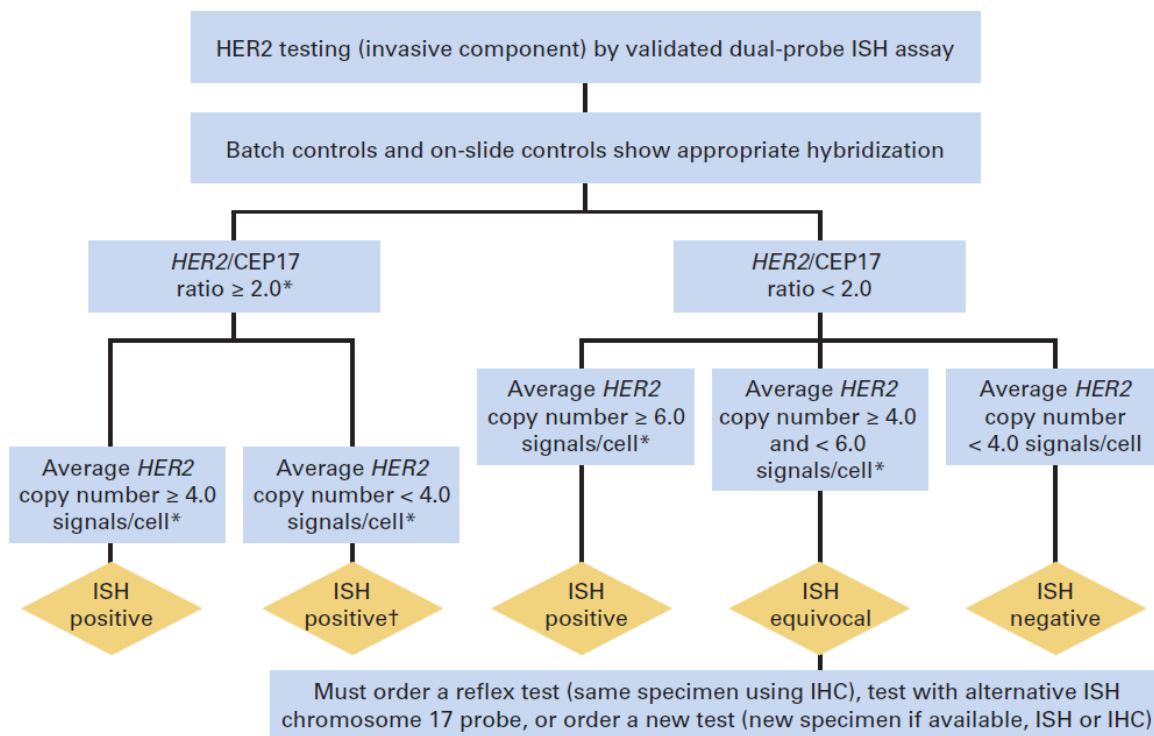


Fig 3. Algorithm for evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene amplification by in situ hybridization (ISH) assay of the invasive component of a breast cancer specimen using a dual-signal (*HER2* gene) assay (dual-probe ISH). Amplification in a dual-probe ISH assay is defined by examining first the *HER2/CEP17* ratio followed by the average *HER2* copy number (see Data Supplement 2E for more details). If there is a second contiguous population of cells with increased *HER2* signals per cell, and this cell population consists of more than 10% of tumor cells on the slide (defined by image analysis or visual estimation of the ISH or immunohistochemistry [IHC] slide), a separate counting of at least 20 nonoverlapping cells must also be performed within this cell population and also reported. Although categories of *HER2* status by ISH can be created that are not covered by these definitions, in practice they are rare and if encountered should be considered ISH equivocal (see Data Supplement 2E). NOTE. The final reported results assume that there is no apparent histopathologic discordance observed by the pathologist. (*) Observed in a homogeneous and contiguous population. (†) See Data Supplement 2E for more information on these rare scenarios.

8.3. ANEXO C – QUADRO RESUMO DOS GUIAS DE RECOMENDAÇÕES DA ASCO/CAP PARA AVALIAÇÃO DO HER2 DE 2007 E 2013



ASCO–CAP HER2 Test Guideline Recommendations

Summary of Guideline 2007 and 2013 Recommendations

Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
Specimens to be tested	All primary breast cancer specimens and metastases should have at least one HER2 test performed	All newly diagnosed patients with breast cancer must have a HER2 test performed. Patients who then develop metastatic disease must have a HER2 test performed in a metastatic site, if tissue sample is available.
Optimal algorithm for HER2 testing	Positive for HER2 is either IHC HER2 3+ (defined as uniform intense membrane staining of > 30% of invasive tumor cells) or FISH amplified (ratio of HER2 to CEP17 of > 2.2 or average HER2 gene copy number > six signals/nucleus for those test systems without an internal control probe	Must report HER2 test result as positive for HER2 if: ^{a,b} <ul style="list-style-type: none"> • IHC 3+ based on circumferential membrane staining that is complete, intense^{c,d} • ISH positive based on: <ul style="list-style-type: none"> Single-probe average HER2 copy number ≥ 6.0 signals/cell.^{e,g} Dual-probe HER2/CEP17 ratio ≥ 2.0;^{e,g} with an average HER2 copy number ≥ 4.0 signals/cell Dual-probe HER2/CEP17 ratio ≥ 2.0;^{e,g} with an average HER2 copy number < 4.0 signals/cell^h Dual-probe HER2/CEP17 ratio < 2.0;^{e,g} with an average HER2 copy number ≥ 6.0 signals/cell
	Equivocal for HER2 is defined as: IHC 2+ or FISH HER2/CEP17 ratio of 1.8-2.2 or average HER2 gene copy number 4-6 HER2 signals/nucleus for test systems without an internal control probe	Must report HER2 test result as equivocal and order reflex test (same specimen using the alternative test) or new test (new specimen, if available, using same or alternative test) if: ^{a,b} <ul style="list-style-type: none"> • IHC 2+ based on circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak/moderateⁱ and within >10% of the invasive tumor cells;^d or complete and circumferential membrane staining that is intense and within $\leq 10\%$ of the invasive tumor cells^d • ISH equivocal based on: <ul style="list-style-type: none"> Single-probe ISH average HER2 copy number ≥ 4.0 and < 6.0 signals/cell^{h,f} Dual-probe HER2/CEP17 ratio < 2.0 with an average HER2 copy number ≥ 4.0 and < 6.0 signals/cell^{h,f}

Abbreviations: HER2, human epidermal growth factor receptor; IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence in situ hybridization; ISH, in situ hybridization; QA, quality assurance; NBF, neutral buffered formalin; ASCO, American Society of Clinical Oncology; CAP, College of American Pathologists

Wolff AC, Hammond ME, 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.



Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
	<p>Negative for HER2 is defined as:</p> <ul style="list-style-type: none"> • IHC HER2 0: no staining • IHC HER2 1+: Weak incomplete membrane staining in any proportion of tumor cells or weak, complete membrane staining in <10% of cells • FISH HER2/CEP17 ratio of < 1.8 or average HER2 gene copy number of < 4 signals/nucleus for test systems without an internal control probe 	<p>Must report a HER2 test result as negative if a single test (or both tests) performed show:^{a,b}</p> <ul style="list-style-type: none"> • IHC 1+ as defined by incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within >10% of the invasive tumor cells^d • IHC 0 as defined by no staining observed^d or membrane staining that is incomplete and is faint/barely perceptible and within ≤10% of the invasive tumor cells^d • ISH negative based on: <ul style="list-style-type: none"> Single-probe average HER2 copy number <4.0 signals/cell Dual-probe HER2/CEP17 ratio <2.0 with an average HER2 copy number <4.0 signals/cell
	<p>Indeterminate for HER2</p>	<p>Must report HER2 test result as indeterminate if technical issues prevent one or both tests (IHC and ISH) from being reported as positive, negative, or equivocal.</p> <p>Conditions may include:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inadequate specimen handling • Artifacts (crush or edge artifacts) that make interpretation difficult • Analytic testing failure <p>Another specimen should be requested for testing to determine HER2 status. Reason for indeterminate testing should be noted in a comment in the report.</p>
ISH rejection criteria	<p>Test is rejected and repeated if:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controls are not as expected • Observer cannot find and count at least two areas of invasive tumor • > 25% of signals are unscorable due to weak signals • > 10% of signals occur over cytoplasm • Nuclear resolution is poor • Autofluorescence is strong 	<p>Same and report HER2 test result as indeterminate as per parameters described above.</p>



Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
ISH interpretation	Interpretation performed by counting at least 20 cells; a pathologist must confirm that counting involved invasive tumor criteria followed	The pathologist should scan the entire ISH slide prior to counting at least 20 cells or use IHC to define the areas of potential <i>HER2</i> amplification. If there is a second population of cells with increased <i>HER2</i> signals/cell and this cell population consists of more than 10% of tumor cells on the slide (defined by image analysis or visual estimation of the ISH or IHC slide), a separate counting of at least 20 nonoverlapping cells must also be performed within this cell population and reported. For brightfield ISH, counting requires comparison between patterns in normal breast and tumor cells because artifactual patterns may be seen that are difficult to interpret. If tumor cell pattern is neither normal nor clearly amplified, test should be submitted for expert opinion.
Acceptable [IHC and ISH] tests ^a		Should preferentially use an FDA-approved IHC, brightfield ISH, or FISH assay. ^{a,b}
IHC rejection criteria	Test is rejected and repeated or tested by FISH if: <ul style="list-style-type: none"> • Controls are not as expected • Artifacts involve most of sample • Sample has strong membrane staining of normal breast ducts (internal controls) 	Same
IHC interpretation criteria	Positive <i>HER2</i> result requires homogeneous, dark circumferential (chicken wire) pattern in > 30% of invasive tumor. Interpreters have method to maintain consistency and competency	Should interpret IHC test using a threshold of more than 10% of tumor cells that must show homogeneous, dark circumferential (chicken wire) pattern to call result 3+, <i>HER2</i> positive.
Reporting requirements for all assay types	Report must include guideline-detailed elements	Same except for changes to reporting requirement and algorithms defined in this table. (Data Supplements 9 and 10)
Optimal tissue handling requirements	Time from tissue acquisition to fixation should be as short as possible; samples for <i>HER2</i> testing are fixed in 10% neutral buffered formalin for 6–48 hours; cytology specimens must be fixed in formalin. Samples should be sliced at 5-mm to 10-mm intervals after appropriate gross inspection and margins designation and placed in sufficient volume of neutral buffered formalin	Duration of fixation has been changed from 6–48 hours to 6–72 hours. Any exceptions to this process must be included in report.



Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
Optimal tissue sectioning requirements	Sections should ideally not be used for HER2 testing if cut > 6 weeks earlier; this may vary with primary fixation or storage conditions	Same
Optimal internal validation procedure	Validation of test must be done before test is offered	Same Data Supplement 12 lists examples of various external quality assurance schemes.
Optimal initial test validation	Initial test validation requires 25–100 samples tested by alternative validated method in the same laboratory or by validated method in another laboratory	Laboratories performing these tests should be following all accreditation requirements, one of which is initial testing validation. The laboratory should ensure that initial validation conforms to the published 2010 ASCO/CAP Recommendations for IHC Testing of ER and PgR guideline validation requirements with 20 negative and 20 positive for FDA-approved assays and 40 negative and 40 positive for LDTs. This requirement does not apply to assays that were previously validated in conformance with the 2007 ASCO/CAP HER2 testing guideline, and who are routinely participating in external proficiency testing for HER2 tests, such as the program offered by the CAP (Data Supplement 12).
	Proof of initial testing validation in which positive and negative HER2 categories are 90% concordant with alternative validated method or same validated method for HER2	Laboratories are responsible for ensuring the reliability and accuracy of their testing results, by compliance with accreditation and proficiency testing requirements for HER2 testing assays. Specific concordance requirements are not required. (Data Supplement 11)
Optimal monitoring of test concordance between methods	Concordance testing must be done prior to initiation of testing, optimally as the form of testing validation. If concordance is below 95% for any testing category, that category of test result of either FISH or IHC must be automatically flexed to alternative method before final interpretation.	See text following under “Optimal Laboratory Accreditation”
Optimal internal QA procedures		Should review and document external and internal controls with each test and each batch of tests.
	Ongoing quality control and equipment maintenance	Same.
	Initial and ongoing laboratory personnel training and competency assessment	Same.
	Use of standardized operating procedures including routine use of control materials	Same.
	Revalidation of procedure if changed	Same.
	Ongoing competency assessment and education of pathologists	Should perform ongoing competency assessment and document the actions taken as a part of the laboratory record.



Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
Optimal external proficiency assessment	Participation in and successful completion of external proficiency testing program with at least two testing events (mailings) a year	Same.
	Satisfactory performance requires at least 90% correct responses on graded challenges for either test <ul style="list-style-type: none"> ● Unsatisfactory performance will require laboratory to respond according to accreditation agency program requirements 	Same.
Optimal laboratory accreditation	Onsite inspection every other year with annual requirement for self-inspection <ul style="list-style-type: none"> ● Reviews laboratory validation, procedures, QA results and processes, results and reports ● Unsatisfactory performance results in suspension of laboratory testing for HER2 for that method 	Same (Data Supplement 11).

Notes

- ^a If a reflex test (same specimen/same tissue) ordered after an initial equivocal HER2 test result does not render a positive or negative HER2 test result, the pathologist should review histopathologic features, confer if possible with the oncologist regarding additional HER2 testing, and document it in the pathology report. The pathologist may pursue additional HER2 testing without conferring with the oncologist. This should be accomplished using: (1) the alternative test (IHC and ISH) on the same specimen, (2) either test on another block (same specimen), or (3) either test on another specimen (eg, core biopsy, surgical resection, lymph node, and/or metastatic site). Because the decision to recommend HER2-targeted therapy requires a HER2-positive test result, additional HER2 testing should be attempted in equivocal specimens to attempt to obtain a positive or negative HER2 test result and most accurately determine the HER2 status of the tumor specimen.
- ^b See Data Supplement 2E for additional information on rare scenarios.
- ^c Observed in a homogeneous and contiguous population and within >10% of the invasive tumor cells.
- ^d Readily appreciated using a low-power objective.
- ^e By counting at least 20 cells within the area.
- ^f Observed in a homogeneous and contiguous population.
- ^g Alternatively, a laboratory accredited by the CAP or another accrediting entity may choose to use an LDT, in which case its analytical performance must be documented in the same clinical laboratory that will use the assay, and documentation of analytical validity of the assay must be available.
- ^h A list of HER2 assays approved by the FDA as in vitro companion diagnostic devices to aid in the assessment of patients for whom trastuzumab treatment is being considered can be found in the Medical Devices section of the US FDA website (http://www.access.data.fda.gov/scripts/cdrh/devicesatfda/index.cfm?start_search=1&search_term=HER2&approval_date_from=&approval_date_to=07/14/2013&sort=approvaldatedesc&pagenum=10; last checked July 14, 2013). The product package insert for trastuzumab and pertuzumab prepared by the FDA indicates that "HER2 testing should be performed using FDA-approved tests by laboratories with demonstrated proficiency".

9/2013

8.4. ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG



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

Parecer nº. ETIC 0314.0.203.000-10

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 27 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do HER2 em câncer de mama: estudo das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica das técnicas de imuno-histoquímica e hibridização in situ pela prata usando microarranjos de tecido**" 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral", is written over a horizontal line.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

8.5. ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO AO PATHOLOGY – RESEARCH AND PRACTICE

11/5/13

Gmail - Submission Confirmation



Cristiana Buzelin Nunes <cristianabnunes@gmail.com>

Submission Confirmation

1 mensagem

Bernd Wuesthoff <bernd.wuesthoff@medizin.uni-magdeburg.de>
 Para: cristianabnunes@gmail.com

1 de novembro de 2013 00:18

Dear Dr. Cristiana Buzelin Nunes,

We have received your article "High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer" for consideration for publication in Pathology - Research and Practice.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/prp/>
2. Enter these login details:
 Your username is: cristianabnunes@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PRP/automail_query.asp.

3. Click [Author Login]
 This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
 Pathology - Research and Practice

 Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

11/5/13

Gmail - Editor handles PRP-D-13-00468



Cristiana Buzelin Nunes <cristianabnunes@gmail.com>

Editor handles PRP-D-13-00468

1 mensagem

Bernd Wuesthoff <bernd.wuesthoff@medizin.uni-magdeburg.de>
Para: cristianabnunes@gmail.com

4 de novembro de 2013 12:54

Ms. Ref. No.: PRP-D-13-00468

Title: High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer

Pathology - Research and Practice

Dear Doctor Cristiana Buzelin Nunes,

Your submission "High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer" will be handled by Editor Albert Roessner.

You may check the progress of your paper by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/prpl/>.

Your username is: cristianabnunes@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PRP/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Pathology - Research and Practice

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



Cristiana Buzelin Nunes <cristianabnunes@gmail.com>

Submission Confirmation for PRP-D-13-00468R1

1 mensagem

Bernd Wuesthoff <bernd.wuesthoff@medizin.uni-magdeburg.de>
Para: cristianabnunes@gmail.com

2 de dezembro de 2013 23:45

Ms. Ref. No.: PRP-D-13-00468R1
Title: High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer
Pathology - Research and Practice

Dear Dr. Cristiana Buzelin Nunes,

This message is to acknowledge that we have received your revised manuscript for reconsideration for publication in Pathology - Research and Practice.

You may check the status of your manuscript by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/prp/>.

Thank you for submitting your work to Pathology - Research and Practice.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Pathology - Research and Practice

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.
