

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

**BRUNO RIBEIRO BATISTA**

**RESULTADOS FALSO-NEGATIVOS DE HIPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR HER2 EM  
CÂNCER DE MAMA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUS**

**CURITIBA**

**2021**

**BRUNO RIBEIRO BATISTA**

**RESULTADOS FALSO-NEGATIVOS DE HIPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR HER2 EM  
CÂNCER DE MAMA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Linha de Pesquisa: Avaliação de Tecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii

**CURITIBA**

**2021**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk

Batista, Bruno Ribeiro

B333r      Resultados falso-negativos de hiperexpressão do receptor HER2 em câncer  
2021      de mama em um hospital terciário do SUS / Bruno Ribeiro Batista ; orientador:  
                 Sergio Ossamu Ioshii. – 2021;  
                 76 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2021  
Bibliografia: f. 64-71

1. Mama – Câncer. 2. Biomarcadores. 3. Receptor erbB-2. 4. Gene HER-2.  
5. Proteína HER-2. I. Ioshii, Sergio Ossamu. II. Pontifícia Universidade  
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.  
III. Título.

CDD 20. ed. – 616.99449



ESCOLA  
**POLITÉCNICA**

**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde**

### **TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 293**

A Dissertação de Mestrado intitulada “**RESULTADOS FALSO-NEGATIVOS DE HIPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR HER2 EM CÂNCER DE MAMA EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUS**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Bruno Ribeiro Batista**, no dia **28 de maio de 2021**, foi julgada para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia em Saúde, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii – (PUCPR)

Prof. Dr. Newton Sergio de Carvalho – (UFPR)

Prof. Dr. Audrey Tiekko Tsunoda – (PPGTS)

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 28 de junho de 2021

Prof. Dr. Percy Nohama  
**Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde  
PUCPR**

*Aos meus pais Eliana e Eden, por  
sempre acreditarem em mim; à  
minha esposa Caroline razão e  
felicidade do meu ser; à minha  
irmã Camila e todos os amigos:  
obrigado por fazerem parte da  
minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Buscar a verdade e trilhar o caminho da ciência é acima de tudo uma atividade espiritual. Enxergar o que ninguém viu anteriormente é desvendar a obra de Deus e, por conseguinte, se aproximar mais Dele. Assim, a maior gratidão que posso expressar é para com Deus, que me permitiu viver a missão de tratar pacientes oncológicos e buscar a verdade por meio da ciência.

Em segundo lugar, agradeço a meus pais Eden e Eliana, por me darem essa vida e acima de tudo, me conduzirem para o caminho do bem, sempre no sentido de dar o melhor de mim. Nesse Universo nada acontece por acaso e grande parte de qualquer sucesso que eu possa ter advém do empenho e dos ensinamentos de vocês.

“Não é bom que o homem esteja só”. Sem dúvida a execução deste trabalho depende muito de minha esposa Caroline e por isso palavras de gratidão pouco podem expressar o sentimento que tenho dentro do meu coração. Sua paciência e motivação inabaláveis foram a força motriz que tornou possível a execução deste mestrado.

A vivência acadêmica é como uma escada em caracol. Sabemos que estamos sempre subindo, mas por vezes nos perguntamos para onde estamos indo, já que não vemos até onde esses degraus vão. Assim, sem a ajuda de pessoas experientes e de bem eu não teria passado do início dessa jornada. Devo meus sinceros agradecimentos ao prof. Dr Sérgio O. Ioshii por ter acreditado desde o começo que tudo isso teria valor. Mas mais que isso, sou muito grato pelo sr. ter acreditado em mim como pesquisador e visto potencialidades que ainda não divisava. Carrego dentro de mim o bem que o sr. fez e torço para que um dia eu possa fazer pelo menos o mesmo para outra pessoa.

Ainda dentro da jornada acadêmica, cabe citar, e não menos importante, o prof. dr. Sérgio L. Padilha. Dr. Sérgio, seus ensinamentos até hoje norteiam muito do oncologista que sou. Por seu exemplo aprendi a enxergar a pessoa que está na minha frente e não apenas uma doença, buscar sempre o melhor para o paciente no dia-a-dia da assistência médica e sempre manter o bom humor. Compreendo hoje que foram essas características que fizeram o sr. questionar resultados dos testes laboratoriais se estavam corretos ou não. Meu muito obrigado.

Na infância da vida acadêmica cruzei com pessoas que me direcionaram corretamente para um caminho virtuoso. Fico feliz por ter tido a oportunidade de ser

aluno de iniciação científica do prof. Dr. Percy Nohama e por fazer parte desse grupo de pesquisa. Nesse grupo pude conviver e conhecer melhor o prof. Dr. Guilherme Nogueira Neto, na ocasião aluno de doutorado, que serviu de exemplo de pessoa e caminho a ser trilhado na academia. Outras pessoas da comunidade da PUC-PR se fizeram presentes na minha jornada, alunos e professores, sou grato a vocês também.

Muito obrigado a todos que trouxeram a força de trabalho para a execução em si de pesquisa. Duas pessoas foram parte ativa e merecem todo o agradecimento: Jacqueline Nabhen, acadêmica da UFPR, e Tayza Ostroski à época residente de patologia. Ambas são exemplo de como pessoas de bem e competentes aparecem para nos ajudar nas horas em que mais precisamos. Agradeço também ao Dr Eduardo Caetano e os técnicos do Hospital do Amor de Barretos pelo auxílio na coloração das lâminas de hibridização *in-situ*.

E a todos que depositaram sua confiança em mim, garanto que não será em vão.

*Um é tudo e tudo é um.*

*Há muito tempo esse local estava dentro do mar. Em dezenas de milhões de anos aqui pode ser o topo de uma montanha. Todos estamos conectados em um grande fluxo invisível. Dentro dessa imensidão somos como formigas, uma ínfima parte dentro do fluxo. Mas se colocarmos todos os pequenos 'Uns' juntos, isso permitirá que o 'Tudo' exista.*

*Hiromu Arakawa*

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de mama (CM) é a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo. Um dos grandes avanços no manejo do CM foi sua classificação molecular, principalmente no que diz respeito ao Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Os tumores HER2 positivos apresentam maior risco de metástase visceral e estão associados a piores taxas de sobrevida. Assim, o uso de medicamentos específicos direcionados para essa via é essencial e os falsos negativos têm alto impacto no atendimento ao paciente. O status de HER2 é preferencialmente acessado usando imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização in situ (ISH), mas resultados falso-negativos podem ocorrer. **Objetivo:** determinar se existe variabilidade entre as taxas de positividade entre laboratórios que realizaram a ISH, conforme a IHQ, e avaliar se existem casos falso-negativos e possível impacto prognóstico. **Métodos:** estudo retrospectivo, observacional, em um hospital público da cidade de Curitiba (Brasil), seguido de análise transversal de amostras levantadas. Foram incluídos todos os casos de CM que foram submetidos a avaliação de HER2 por IHC e ISH entre janeiro de 2008 e dezembro de 2018. Excluídas os participantes classificados como HER2 negativos pela IHQ e os pacientes cujos prontuários não estavam disponíveis. Foi realizada nova análise de todas as lâminas de IHQ e dos casos com ISH negativa. **Resultados:** 205 pessoas foram selecionadas com média de idade de 53,52 ( $\pm$  11,89) anos. A maioria dos casos foi classificada como estágio clínico I e II (68,3%), e as características histológicas mais prevalentes foram Carcinoma Ductal Invasivo (82,4%) e subtipo molecular luminal (49,8%). O teste de ISH inicial foi realizado por quatro laboratórios. Houve uma diferença significativa nas taxas de positividade de HER2 entre esses laboratórios, mesmo após reanálise individual de todas as lâminas de IHC. Dos 114 casos de ISH negativo, foi possível obter material histológico em 82 deles para realização de nova ISH padronizada. A taxa de falso-negativo para HER2 nesses 82 casos foi de 41,5%, sendo 10 casos de 24 para IHQ positiva (3+) e 22 de 58 para IHQ duvidosa (2+). Nesse trabalho, os resultados falso-negativos não impactaram em sobrevida, provavelmente por diferenças entre os grupos. **Conclusão:** esse trabalho mostrou diferentes taxas de positividade para HER2 entre laboratórios que realizaram teste confirmatório com ISH. A realização de segunda ISH padronizada comprovou que a diferença entre os laboratórios ocorreu por resultados falso-negativos. Para essa amostra não houve diferença de recidiva e sobrevida câncer-específica.

**Palavras chave:** Câncer de mama. Biomarcadores. Avaliação de tecnologia de saúde. Receptor HER2.

## ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer (BC) is the second leading cause of cancer death in women worldwide. One of the major advances in BC management was its molecular classification, especially regarding the Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2). HER2 positive tumors are at greater risk of visceral metastasis and are associated with worse survival rates. Thus, the use of specific drugs to target this pathway is essential and false-negative have a high impact on patient care. HER2 status is usually accessed using immunohistochemistry (IHC), but false-negatives results occur. When IHC results are inconclusive, in-situ hybridization (ISH) testing is necessary. **Objective:** to determine if there is variability between the positivity rates between laboratories that performed the ISH, according to the IHQ, and to evaluate if there are false-negative results and possible prognostic impact. **Methods:** retrospective, observational study in a public hospital in the city of Curitiba (Brazil), followed by cross-sectional analysis of histological samples. All cases of BC that underwent HER2 assessment by IHC and ISH between January 2008 and December 2018 were included. Participants classified as HER2 negative by IHC and patients whose medical records were not available were excluded. A new analysis of all IHC slides and of cases with negative ISH was performed. **Results:** We identified 205 people with an average age of 53.52 ( $\pm$  11.89) years. Most cases were classified as clinical stage I and II (68.3%), and the most prevalent histological features were Invasive Ductal Carcinoma (82.4%) and luminal molecular subtype (49.8%). Initial ISH testing was performed by four laboratories. There was a significant difference in HER2 positivity rates between these laboratories, even after individual reanalysis of all IHC slides. Of the 114 cases with negative ISH, it was possible to obtain histological material in 82 of them to perform a new standardized ISH. The false-negative rate for HER2 in this 82 patients was 41.46%, with 10 cases out of 24 for positive IHC (3+) and 22 out of 58 for inconclusive IHC (2+). In this paper, false-negative results did not impact in survival, most likely to differences between groups. **Conclusion:** our work showed different rates of positivity for HER2 among laboratories that performed confirmatory test with ISH. The performance of a second standardized ISH proved that the difference between the laboratories was due to false-negative results. There was no difference in recurrence and cancer-specific survival in this false-negative sample.

**Keywords:** breast cancer. Biomarkers. Health technology assessment. HER2 receptor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Incidência ajustada por idade para câncer de mama .....	24
Figura 2. Mortalidade ajustada por idade para câncer de mama .....	24
Figura 3. Incidência estimada de câncer no Brasil para 2020 .....	25
Figura 4. Mortalidade por câncer de mama entre 2010 e 2019.....	26
Figura 5. Algoritmo de leitura de IHQ para HER2. ....	30
Figura 6. IHQ para HER 2. ....	30
Figura 7. Algoritmo para avaliação de HER2 por ISH. ....	31
Figura 8. FISH para HER2. Em “a” um caso não amplificado; em “b” amplificado....	31
Figura 9. A proteína HER2 e locais de ligação de moléculas.....	35
Figura 10. Fluxograma das etapas operacionais do estudo .....	39
Figura 11. Caso de SISH positivo a esquerda e IHQ correspondente a direita.....	51

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Incidência e mortalidade por 100.000 habitantes para CM.....	23
Gráfico 2. Agrupamento de IHQ 2+ conforme resultado de ISH .....	49
Gráfico 3. Agrupamento de IHQ 3+ conforme resultado de ISH .....	50
Gráfico 4. Kaplan-Meyer de sobrevida livre de recidiva / progressão. ....	54
Gráfico 5. Kaplan-Meyer para sobrevida global. ....	55
Gráfico 6. Análise multivariada para sobrevida livre de recidiva / progressão. ....	56
Gráfico 7. Análise multivariada para sobrevida global.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação patológica.....	45
Tabela 2. Características clínicas.....	46
Tabela 3. IHQ e resultados de ISH conforme diferentes laboratórios. ....	47
Tabela 4. Resultados de releitura de HER2 e resultado de ISH.....	48
Tabela 5. Comparação entre dos grupos HER2 FN e Verd-HER2.....	52
Tabela 6. Comparação entre falso-negativos e verdadeiro-positivos entre os laboratórios.....	53
Tabela 7. Resumo de eventos conforme classificação molecular. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC-UFPR	Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CM	Câncer de Mama
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HER2 FN	Falso-negativo HER2
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISH	Hibridização <i>in-situ</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPGTS	Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SUS	Sistema Único de Saúde
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
Verd-HER2	Verdadeiro HER2

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS .....	19
1.1.1	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>19</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>20</b>
1.1.3	<b>Hipótese a ser testada.....</b>	<b>20</b>
1.2	CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA E SOCIAL.....	20
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
2.1	O CÂNCER DE MAMA .....	21
2.2	PANORAMA .....	22
2.2.1	<b>Panorama do câncer de mama no mundo.....</b>	<b>22</b>
2.2.2	<b>Panorama do câncer de mama no Brasil.....</b>	<b>25</b>
2.3	FISIOPATOLOGIA.....	26
2.3.1	<b>Mecanismos de carcinogênese .....</b>	<b>26</b>
2.3.2	<b>A via de sinalização HER2 .....</b>	<b>27</b>
2.4	DIAGNÓSTICO.....	28
2.4.1	<b>Anatomia patológica .....</b>	<b>28</b>
2.4.2	<b>Diagnóstico molecular .....</b>	<b>28</b>
2.4.3	<b>Correlação entre IHQ e ISH .....</b>	<b>32</b>
2.5	INTERPRETAÇÃO CRÍTICA DOS TESTES .....	32
2.6	TRATAMENTO .....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
3.1	CENÁRIO DE PESQUISA .....	36
3.2	TIPO DE PESQUISA .....	36
3.3	POPULAÇÃO DA PESQUISA .....	37
3.4	FONTE DE DADOS E PADRONIZAÇÃO.....	37
3.5	ETAPAS DA PESQUISA .....	38
3.5.1	<b>Etapa 1 .....</b>	<b>39</b>
3.5.2	<b>Etapa 2.....</b>	<b>39</b>
3.5.3	<b>Etapa 3.....</b>	<b>39</b>
3.5.4	<b>Etapa 4.....</b>	<b>40</b>
3.5.5	<b>Etapa 5.....</b>	<b>40</b>
3.5.6	<b>Etapa 6.....</b>	<b>40</b>

3.6	VARIÁVEIS ANALISADAS .....	41
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
3.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
4.1	A POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	44
4.2	COMPARAÇÃO INICIAL DE IHQ E ISH.....	47
4.3	REANÁLISE DE IHQ .....	48
4.4	REANÁLISE DE ISH.....	50
4.5	OS CASOS FALSO-NEGATIVOS DE HER2.....	51
4.6	ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	53
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1	LIMITAÇÕES DO TRABALHO .....	61
5.2	TRABALHOS FUTUROS.....	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é um problema de saúde pública global, pois trata-se da neoplasia mais frequente nas mulheres. As estimativas globais indicam cerca de 2,2 milhões de casos novos em 2020, com 684.996 óbitos diretamente relacionados a essa condição (SUNG *et al.*, 2021).

Nos Estados Unidos o CM é a neoplasia com maior incidência, quando comparado por sítio inicial, totalizando 284.200 casos novos na estimativa de 2021. Trata-se da segunda causa de mortalidade por câncer com cerca de 44.130 mortes (SIEGEL *et al.*, 2021). Comparativamente ao câncer de pulmão, o CM tem menor letalidade, isso se deve às características intrínsecas de cada doença, acesso a várias linhas de tratamento e programas de rastreamento (AUTIER *et al.*, 2011; GOLDSTRAW *et al.*, 2016).

No Brasil em 2020, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados 66.280 casos novos de CM, ou 29,7% de todas as neoplasias em mulheres, excetuando-se pele não melanoma. A mortalidade em 2017 para essa doença foi estimada em 16.724 (16,1% do total de mortes relacionadas ao câncer) (DE OLIVEIRA SANTOS, 2020).

O consórcio internacional CONCORD (ALLEMANI *et al.*, 2018) publicou em 2018 os dados de mais de 37 milhões de pacientes com câncer no mundo, de 2005 a 2014. No período analisado, houve diminuição da mortalidade para CM nos países desenvolvidos. Entretanto, no Brasil não houve diminuição, com sobrevida mediana em 5 anos de 76,9% entre 2005 e 2009 e 75,2% entre 2010 e 2014. Os principais fatores relacionados, segundo fontes do ministério da saúde (INCA, 2019), são a dificuldade de diagnóstico em momento oportuno, acesso ao tratamento adequado e desconhecimento da doença.

Para que o diagnóstico seja efetivo é necessário equipe multiprofissional, incluindo médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, técnicos de radiologia, entre outros (INCA, 2019).

Estratégias de detecção precoce, como a mamografia, comprovaram-se eficazes em diminuir a mortalidade do CM em coortes na Europa (ANDERSSON *et al.*, 1988) e nos EUA (WELCH *et al.*, 2016). Essas medidas, além de serem realizadas como política de saúde, visam diagnosticar a doença em estádios precoces,

diminuindo o porte da cirurgia e minimizando a chance da doença já ter desenvolvido metástases a distância (AMIN *et al.*, 2017).

Após o diagnóstico, é fundamental classifica-la em grupos que determinem prognóstico. Em 2017 foi publicado a 8ª edição da classificação de tumores (AMIN *et al.*, 2017), a qual define a extensão anatômica da doença, agrupando conforme o tamanho do tumor na mama, número de linfonodos loco regionais e metástases a distância. Esses estádios clínicos variam de zero a quatro, sendo zero para classificação *in-situ* (não invasivo), I para inicial e IV metastático.

Além disso, outro fator que contribuiu para a diminuição da mortalidade nessa população foi o melhor entendimento dos subtipos moleculares para melhor classificação da doença. Em 2015 vários especialistas em CM se reuniram no consenso de *St Gallen* (COATES *et al.*, 2015) e concordaram que a melhor estratégia seria adaptar o tratamento para cada paciente, levando em conta fatores anatômicos e moleculares, tanto para cirurgia, quimioterapia ou radioterapia.

Por esse motivo, a classificação da 8ª edição do estadiamento oncológico do Comitê Americano de Estadiamento de câncer (TNM) incluiu marcadores moleculares (biomarcadores) no estadiamento para estimativa de prognóstico, uma vez que os subtipos moleculares estão relacionados com o grau de agressividade local e chance de metástase a distância (SLAMON, Dennis J *et al.*, 1987).

Os fatores prognósticos derivados de marcadores moleculares mais comumente usados são: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2) e Ki67 (CUZICK *et al.*, 2011). A expressão dessas proteínas está relacionada com presença de determinados genes silenciados ou ativados os quais são promotores do processo carcinogênico (CUZICK *et al.*, 2011; PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001).

Tumores com expressão de RE são classificados como luminais, pois apresentam similaridade genética com o epitélio do lúmen mamário. Em estudos de IHQ coram para citoqueratinas 8 e 18. Trata-se do subtipo mais comum, correspondendo a cerca de 60% de todos os casos de CM (SØRLIE *et al.*, 2001).

Os tumores luminais são ainda divididos em A e B, conforme o marcador Ki67, que representa a proliferação celular. Assim, células com elevada expressão desse marcador terão maior agressividade patológica (WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005). O valor de corte pode variar conforme a referência em questão, sendo maior que 14% um valor aceito para categorização como luminal B. Outro fator levado em

conta é o RP, que quando negativo ou fracamente presente, também se traduz como luminal B (COATES *et al.*, 2015).

O HER2 pertence à família de receptores de crescimento epidérmico. É uma proteína transmembrana que codifica um receptor tirosina quinase o qual ativa sinais e vias intracelulares aumentando a proliferação e diminuindo a apoptose (HYNES *et al.*, 2001). Tem atividade aumentada em cerca de 15 a 20% dos casos de CM (SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989). atuando como mecanismo promotor do câncer. O mecanismo usual para aumento na expressão dessa proteína é a amplificação das cópias do gene que a codifica, e menos comumente a mutação desse receptor (HADI YAZIJI *et al.*, 2004).

Os biomarcadores em questão podem ter sobreposição, ou seja, tumores que expressam tanto RE quanto HER2 (lumino-HER). Esse estrato de tumores tem melhor prognóstico quando comparado com o HER2 puro (SØRLIE *et al.*, 2001).

A pesquisa desses biomarcadores é feita, em geral, utilizando técnica de imuno-histoquímica (IHQ), por meio de coloração especial com cromógenos, seguida de nova avaliação por patologista. Caso todos os marcadores sejam negativos, tem-se um caso de tumor triplo negativo (negativo para RE, RP e HER2) (COCILOVO, 2018). Tumores triplo negativos são mais agressivos, geralmente tem Ki67 elevado, com alta taxa de recidiva da doença (ABDULKARIM *et al.*, 2011).

A divisão em subgrupos conforme biomarcadores possibilitou selecionar quais pacientes poderiam se beneficiar de determinados tratamentos, como bloqueio estrogênico para tumores luminais. O entendimento molecular e genético dessas alterações, como também observado para HER2, possibilitou a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos que visam bloquear uma via oncogênica (COATES *et al.*, 2015).

O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia a via do HER2, diminuindo a multiplicação celular, favorecendo a apoptose e atraindo células imunes para o tecido (ARBOLEDA *et al.*, 2003). O uso dessa classe de medicação se comprovou benéfico em vários cenários, tanto para metastático quanto para adjuvante, com ganho expressivo de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva (PICCART-GEBHART *et al.*, 2005; SEIDMAN *et al.*, 2001; SLAMON, Dennis J.; *et al.*, 2001).

Entretanto, o funcionamento do trastuzumabe sabidamente está relacionado com a positividade desse biomarcador (MITRI; CONSTANTINE; O'REGAN, 2012;

ROSS; FLETCHER, 1998), não sendo ativo fora do contexto de amplificação HER2. Assim sendo, um dos principais desafios é o diagnóstico correto dessa alteração.

A IHQ é uma avaliação qualitativa da coloração na lâmina de anatomia patológica, com graduação entre 0, 1, 2 e 3 cruces. Conseqüentemente, está sujeita à problemas de fixação, execução e interpretação (ROSS; FLETCHER, 1998). Atualmente existem consensos padronizados para auxiliar o diagnóstico correto da expressão desse biomarcador (COATES *et al.*, 2015; WOLFF *et al.*, 2018). A categoria 2 cruces (2+) é considerada como sendo duvidosa e demanda outro teste.

O método padrão-ouro (por especificidade do método) para análise do gene que codifica o HER2 é a Hibridização *in-situ* (ISH). A ISH avalia diretamente o número de cópias no DNA por impregnação com prata ou fluorescência (FISH do inglês: *fluorescence in situ hybridization*; SISH: *silver in situ hybridization*). Por questões de especificidade do método, caso um teste de ISH de sonda dupla seja negativo, o indivíduo será categorizado como HER2 negativo, não sendo indicado medicação que iniba essa via (WOLFF *et al.*, 2018).

Estudos de análises retrospectivas com um grande número de pacientes demonstraram aproximadamente 91% de concordância entre os métodos de análise (IHQ e ISH), quando ambos positivos (OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004). Esse valor é encontrado em condições ideais de preparo do material e leitura e execução correta dos exames. Entretanto, a avaliação tecidual do HER2 pode ser prejudicada por vários fatores, dentre eles a fixação do material em formalina, tempo de isquemia, transporte, critérios patológicos para análise, entre outros (SAPINO *et al.*, 2013).

Diante do exposto, é notável a necessidade da correta avaliação e categorização de cada caso de CM, conforme biomarcadores. Os testes para diagnóstico de HER2 podem apresentar resultados incorretos e casos falso-negativos não permitem o tratamento que seria o correto.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Determinar resultados falso-negativos de expressão de *HER2/neu* de pacientes com câncer de mama.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- a) Verificar se existe diferença de performance na positividade dos testes de ISH pelos laboratórios que realizam esse teste;
- b) Avaliar dados clínicos e de anatomia patológica dessa coorte;
- c) Avaliar indicadores de prognóstico como sobrevida mediana e taxa de recidiva, frente aos resultados obtidos;

### **1.1.3 Hipótese a ser testada**

Existência de resultados falso-negativos de ISH que impossibilitaram o uso de medicação alvo (trastuzumabe) em atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

## **1.2 CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA E SOCIAL**

Apesar da correlação já conhecida entre os métodos de IHQ e ISH para pesquisa da amplificação de HER2, a literatura científica traz poucos dados no que tange aos casos falso-negativos para ISH. Assim, essa pesquisa irá auxiliar na identificação dessa população.

Este estudo contribui ainda socialmente para demonstrar potenciais falhas em diagnósticos moleculares de pacientes com CM, no contexto do SUS que, ao serem explicitadas contribuirão para melhoria da assistência a portadora do câncer de mama.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção, serão apresentadas as referências bibliográficas que apoiarão a discussão e interpretação dos dados. A pesquisa foi realizada no mês de janeiro de 2020 e atualizada em março de 2021, nas bases *PubMed*, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e *Springer Link*, com a utilização dos descritores: “*HER2*” AND “*immunohistochemistry*” AND “*In situ hybridization*”. Pesquisadores na área de CM HER2 positivo foram questionados sobre artigos relevantes. Além disso, foi realizada pesquisa de encadeamento reverso nas referências dos principais trabalhos para tratamento dessa doença e do tema do trabalho.

Optou-se por não estabelecer data de publicação como critério de inclusão, como intuito de revisar os aspectos históricos. Apenas publicações em português, inglês ou espanhol foram selecionadas.

Os dados aqui apresentados somarão aqueles que foram expostos na seção 1 desse trabalho. Serão ainda abordados os dados epidemiológicos do CM no Brasil e no mundo para contextualização do problema. A seguir, serão demonstrados os dados sobre os mecanismos fisiopatológicos do CM positivo para HER2 e na sequência, o diagnóstico molecular dessa condição, com métodos de execução, vantagens e desvantagens de cada um.

Foram buscados estudos os quais levantam evidências robustas sobre qual é a positividade esperada para a comparação que será feita neste trabalho. Dentro da premissa inicial, também será abordado estudos que apontaram as dificuldades e possíveis erros de análise.

Após, será demonstrado o ganho de sobrevida com o tratamento dirigido para a alteração HER2, que norteia os profissionais da assistência para buscar o correto diagnóstico da condição.

### 2.1 O CÂNCER DE MAMA

O termo câncer vem do grego *karkinos*, que significa caranguejo. Historicamente a primeira neoplasia descrita foi o CM. No I século a.C. o médico Leônidas de Alexandria descreveu que era possível curar uma mulher afetada pelo CM removendo todo o tumor com margens. Existem outros documentos antigos, como

o papiro de Edwin Smith que relatou com certa precisão um caso altamente sugestivo (LAKHTAKIA, 2014).

A mama é uma glândula encontrada em mamíferos e tem como função a produção de leite, nos lóbulos mamários, com finalidade de alimentar a prole. Possui origem embriológica na ectoderme e se forma durante a 6ª e 9ª semana de vida fetal, completando-se por volta da 24ª semana. O CM pode se originar de qualquer um dos tecidos mamários, tanto do epitélio glandular (ductos e lóbulos) quanto de células estromais (FARHADIEH; BULSTRODE; CUGNO, 2015).

Nos seres humanos as mamas tem inquestionável valor estético, com representação artística de longa data. Todavia mais que estética, a mama tem profundo valor sentimental e psicológico para a mulher, fato que por vezes torna o tratamento do CM peculiar e individualizado (FARHADIEH; BULSTRODE; CUGNO, 2015; LAKHTAKIA, 2014).

Alguns fatores podem aumentar o risco de desenvolvimento dessa doença (CHEN, 2019; CLEMONS; GOSS, 2001). Desses fatores o que mais se destaca é a idade avançada, alterações genéticas, como a mutação BRCA e exposição prolongada a estímulos carcinogênicos, como o estrogênio (CHEN, 2019).

## 2.2 PANORAMA

Nesta seção, será apresentado o panorama do CM em âmbito mundial e nacional.

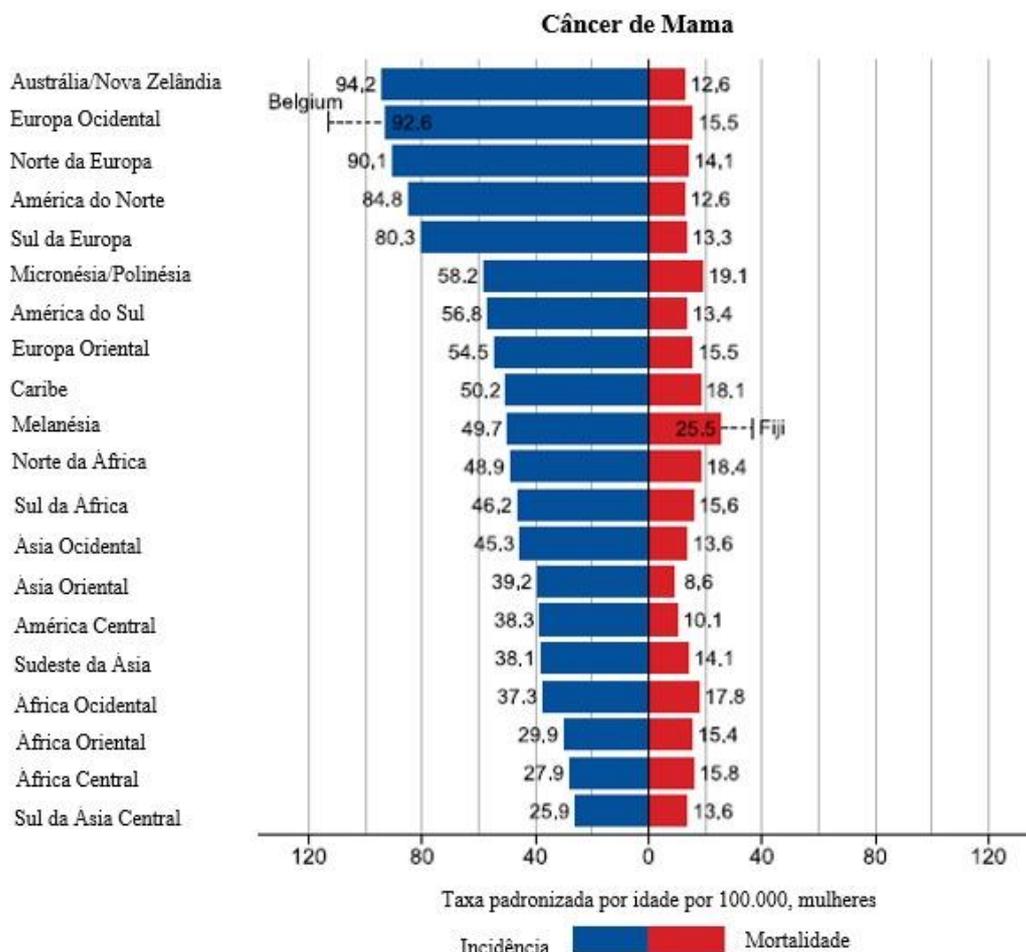
### 2.2.1 Panorama do câncer de mama no mundo

Mundialmente em 2018 foram estimados cerca de 2,1 milhões de casos de CM, sendo que 1 em cada 8 mulheres terão CM. As taxas de casos por 100.000 habitantes variam consideravelmente em diferentes países pelo mundo, desde 94,2 na Austrália, até 25,9 na região central da Ásia (Gráfico 1). Nesse mesmo gráfico observa-se mortalidade em vermelho, com destaque para os países desenvolvidos que tem alta incidência, mas mesma mortalidade que países subdesenvolvidos (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018).

Componentes não hereditários são os principais fatores de risco (aproximadamente 90%) relacionados ao desenvolvimento do CM, conforme estudos populacionais. Países em desenvolvimento, os quais aumentaram a renda per-capita,

demonstram aumento na incidência de CM, como na África do Sul, China e América do Sul (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004). Provavelmente essa variação na incidência reflete uma combinação que incorpora envelhecimento populacional, alteração do padrão alimentar, diminuição do número de filhos, obesidade, sedentarismo e aumento do conhecimento e detecção do CM (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; TERRY *et al.*, 2018).

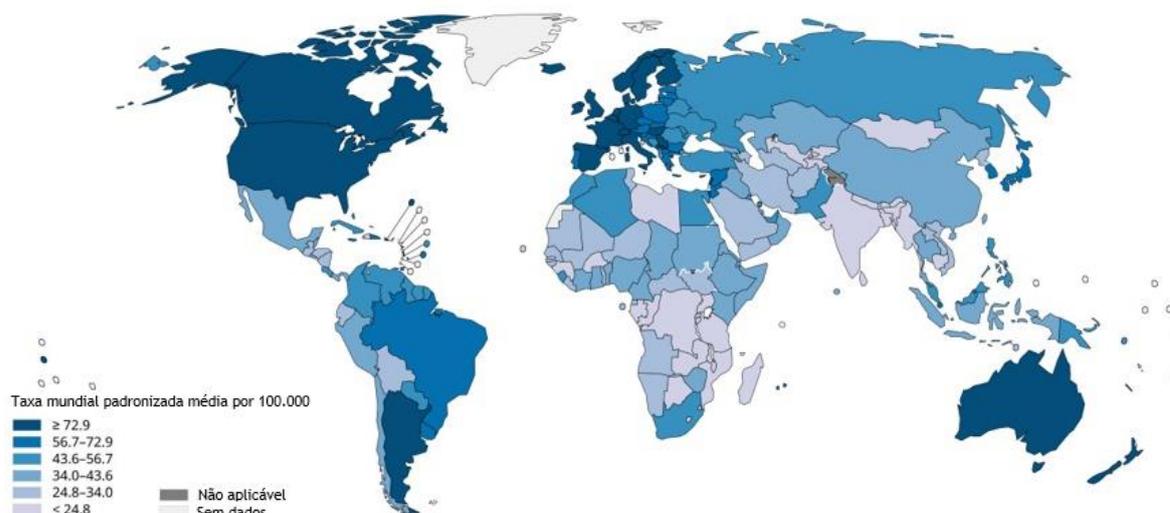
Gráfico 1. Incidência e mortalidade por 100.000 habitantes para CM



FONTE: (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018).

A figura 1 demonstra a incidência conforme diferentes países em 2018. Os dados estão ajustados para idade e expectativa de vida.

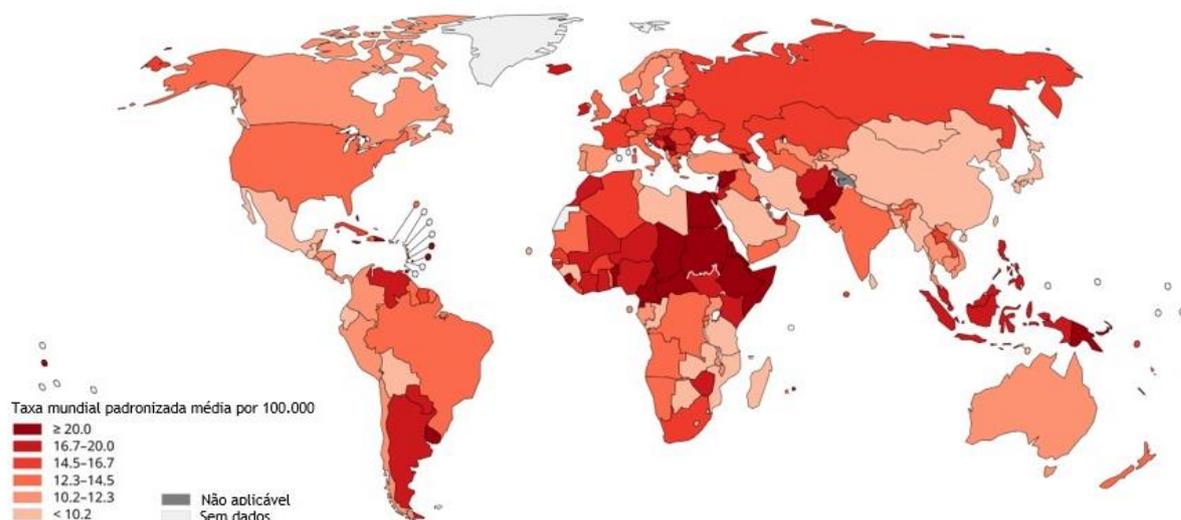
Figura 1. Incidência ajustada por idade para câncer de mama



Fonte: (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018)

A figura 2 mostra a mortalidade ajustada por idade. Essa estimativa foi feita conforme a expectativa de vida e o número de anos de vida perdidos. Aqui é demonstrado que o diagnóstico e tratamento do CM feito de maneira eficiente pode diminuir a mortalidade.

Figura 2. Mortalidade ajustada por idade para câncer de mama



Fonte: (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018)

A Sociedade Americana do Câncer estima que em 2021, nos EUA, sejam detectados 281.550 casos novos, representando o câncer mais diagnosticado (exceto pele não melanoma), independente do sexo, mais comum que próstata (248.530) e pulmão (235.760). Além disso, é uma doença com elevada mortalidade, sendo a

segunda em número de óbitos, com 43.600 casos, atrás apenas de pulmão, com 131.880 (SIEGEL *et al.*, 2021).

### 2.2.2 Panorama do câncer de mama no Brasil

O INCA estimou que haveria 66.280 casos de CM em 2020 no Brasil (figura 3), com risco estimado de 56,33 casos para cada 100.000 mulheres. É o câncer mais frequente no Brasil para essa estimativa, rivalizando com próstata com 65.840 (DE OLIVEIRA SANTOS, 2020).

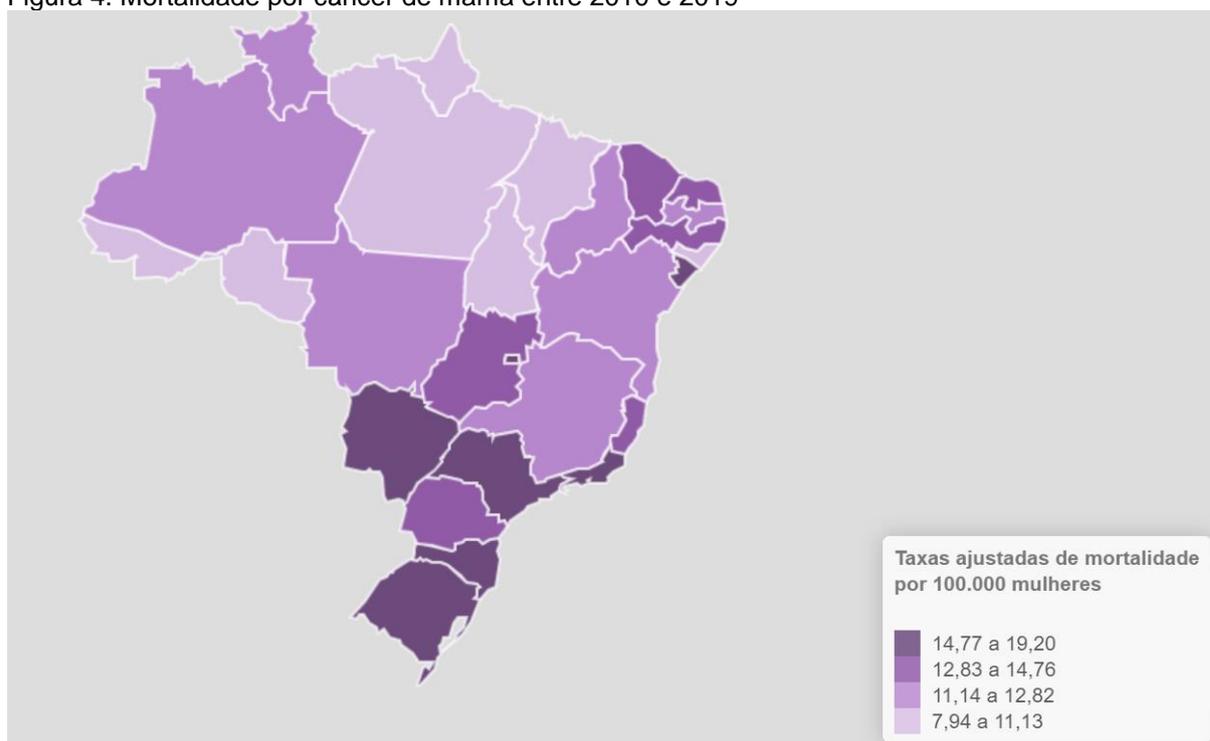
Figura 3. Incidência estimada de câncer no Brasil para 2020

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Fonte: INCA, 2020 (DE OLIVEIRA SANTOS, 2020)

O CM é a causa mais comum de morte por neoplasia em mulheres. Em números relativos tem maior letalidade que a média de todas as neoplasias quando agrupadas. A Figura 4 demonstra a diferença de mortalidade conforme as diferentes regiões do Brasil (INCA, 2021). Esses dados são condizentes com coortes internacionais, em que a maior incidência e mortalidade por CM ocorrem em regiões com maior expectativa de vida e programas de rastreio (ALLEMANI *et al.*, 2018).

Figura 4. Mortalidade por câncer de mama entre 2010 e 2019



FONTE: INCA, 2021

## 2.3 FISIOPATOLOGIA

Apesar da etiologia do CM ser multifatorial, pode-se dizer que é essencialmente uma doença genética. Isso se deve a alterações de certos segmentos de DNA das células que compõe o tecido mamário. Os primeiros relatos substanciais da associação de alterações genéticas e câncer foram feitos na década de 80. Foi observado que alterações em certos genes de interesse eram mais frequentes em alguns tumores, como neoplasias de mama, pulmão e hematológicas, quando era comparado com tecidos normais. Além disso, nessa mesma época, foram identificados que alguns vírus poderiam ser indutores de neoplasia por alteração do DNA (BISHOP, 1983; SCHWAB *et al.*, 1985; SLAMON, D. J *et al.*, 1984).

### 2.3.1 Mecanismos de carcinogênese

Dois tipos de genes são considerados como chave para desenvolvimento de câncer: proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes são segmentos de DNA que quando alterados desencadeiam aumento da multiplicação, invasão tecidual, diminuição de apoptose, entre outros. Já os genes supressores

tumorais são setores do código genético que codificam proteínas responsáveis por desencadear morte celular caso uma via esteja desregulada (SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989; SLAMON, Dennis J *et al.*, 1987).

Existem várias vias relacionadas ao desenvolvimento de CM. As mais estudadas são a via do HER2 e dos receptores hormonais, como estrogênio e progesterona (SØRLIE *et al.*, 2001).

Os tumores secundários à ganho de função na via do HER2 tem como alteração mais comum a amplificação do número de cópias desse gene. Dessa forma, haverá aumento na quantidade dessa proteína na superfície celular, causando o efeito oncogênico (SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989).

### **2.3.2 A via de sinalização HER2**

Constitucionalmente as células do corpo humano expressam proteínas relacionadas à proliferação como mecanismo fisiológico de reparo tecidual e homeostase tecidual (RIESE; STERN, 1998).

Os fatores de crescimento epiteliais são responsáveis por multiplicação celular e diferenciação em vários tecidos. A desregulação dessa via é responsável por tumores de cérebro, pulmão, mama, ovário, pâncreas e próstata (RIESE; STERN, 1998).

O HER2 faz parte dessa família de receptores de membrana de crescimento epitelial (HER 1 a 4), que induz proliferação celular após ligação com o fator de crescimento epitelial. O gene que o codifica está localizado na banda 21 do braço longo do cromossomo 17. Para que o fator de crescimento epitelial se ligue no receptor é necessário dimerização de 2 proteínas HER (autodimerização) (SLAMON, Dennis J *et al.*, 1987). Estudos da década de 80 relacionaram o aumento do número de cópias desse gene com o desenvolvimento de CM. O efeito carcinogênico se deve principalmente por atividade do domínio intracelular dessa proteína que possui atividade de tirosina quinase (COUSSENS *et al.*, 1985), adicionando radicais fosfato em elementos-chave no processo de regulação celular, como a via de fosfatidil inositol e AKT, que ocasionará ativação do fator nuclear kB (PIANETTI *et al.*, 2001).

Essa alteração está presente em cerca de 20% de todos os tumores de mama, podendo ter variações conforme a idade e outros fatores de risco, como a presença de mutação BRCA (SLAMON, Dennis J *et al.*, 1987).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

A evolução científica que resultou no melhor entendimento das neoplasias, em específico para CM, mudou paradigmas históricos, possibilitando aumento na taxa de cura. Entretanto, é digno de nota que o método para diagnóstico é a anatomia patológica, por meio de análise tecidual. Mesmo que os sinais clínicos sejam altamente sugestivos de CM, o tratamento só poderá ser instituído após essa confirmação (INCA, 2019).

O CM é uma doença heterogênea, com subdivisões histológicas e moleculares, que alteram o tratamento e o prognóstico (LI; URIBE; DALING, 2005). Assim, o tratamento mais adequado só poderá ser instituído após o correto diagnóstico (COATES *et al.*, 2015).

### 2.4.1 Anatomia patológica

O CM é dividido em subtipos histológicos, que por vezes são fatores prognósticos, por indicarem características como poder de invasão, proliferação, resposta ao tratamento, entre outros.

A classificação morfológica segue aspectos e características teciduais que indicam a origem das células. O carcinoma ductal invasor é o mais comum, com séries demonstrando 76% de prevalência; seguido de lobular (11%); misto (ductolobular – 4,5%); cribriforme (3,3%), mucinoso (1,9%); tubular (1,1%); além de outros mais raros como papilar, micropapilar, apócrino, metaplásico, medular, adenoide cístico, entre outros (COLLEONI *et al.*, 2012).

A microscopia ótica e as técnicas de patologia morfológica não conseguem detectar a superexpressão HER2. Portanto, é necessário lançar mão de técnicas moleculares para detecção dessa alteração (SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989; WOLFF *et al.*, 2013).

### 2.4.2 Diagnóstico molecular

Biomarcadores, moléculas com significado ou função biológica, são fundamentais para determinação do prognóstico e escolha de tratamento oncológico (COUTURIER *et al.*, 2000). Na década de 80, a presença de HER2 amplificado em um caso de CM era considerado fator de pior prognóstico, por maior agressividade e

maior chance de metástase linfonodal e à distância (QUENEL *et al.*, 1995; SLAMON, Dennis J *et al.*, 1987). Por esse motivo, a terapia alvo-dirigida com trastuzumabe é um dos pilares para tratamento desse subtipo de CM (VALABREGA; MONTEMURRO; AGLIETTA, 2007), revelando a alta relevância de testes capazes de encontrar esse biomarcador (WOLFF *et al.*, 2007).

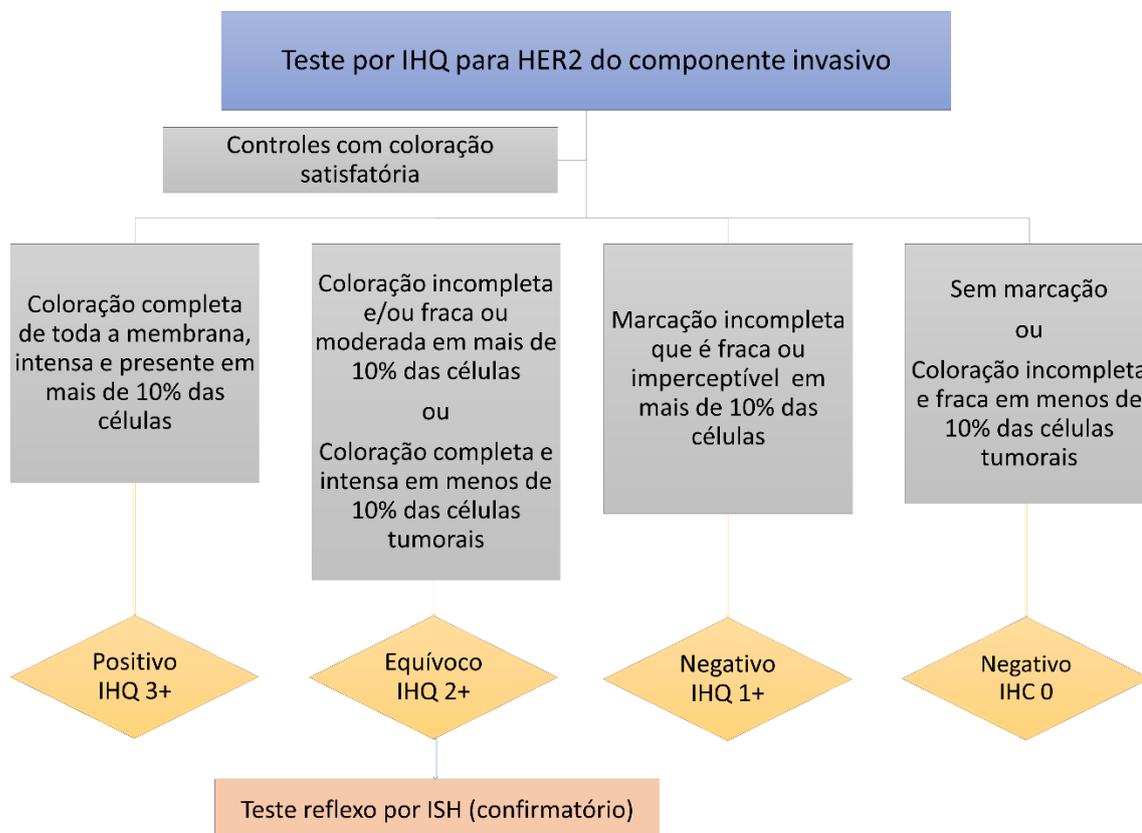
Os métodos para diagnóstico molecular são agrupados conforme o alvo buscado, podendo ser a proteína HER2 em si, ou o gene que a codifica (WOLFF *et al.*, 2007).

Vários estudos da década de 80 avaliaram o método mais prático para análise. A expressão proteica verificada por meio da IHQ se consagrou como tal. Trata-se de uma técnica que utiliza anticorpos contra segmentos do domínio extracelular do HER2 em tecidos previamente fixados por formalina (WOLFF *et al.*, 2007).

Existem diferentes testes de IHQ, dentre eles HercepTest (SIMON *et al.*, 2001) e c-erb-2 policlonal (Dako) (QUENEL *et al.*, 1995). A execução depende do fabricante, mas em geral os passos são: desparafinização dos cortes histológicos; descanso em temperatura ambiente com o anticorpo diluído; aplicação de corantes derivados de polímeros, tempo de processamento; leitura por patologista.

A emissão de laudo de IHQ segue recomendações internacionais para diminuir a variabilidade entre patologistas (WOLFF *et al.*, 2013). Sabe-se que a implementação de protocolos nos serviços de patologia diminui o número de casos inconclusivos, sendo altamente recomendada (MIDDLETON *et al.*, 2009). Uma lâmina corada de IHQ de HER2 será dita positiva (3 cruces) quando houver mais de 10% das células tumorais com forte coloração na circunferência da membrana (WOLFF *et al.*, 2013). O algoritmo de avaliação, da associação americana de patologia e sociedade americana de oncologia clínica, é representado na figura 5.

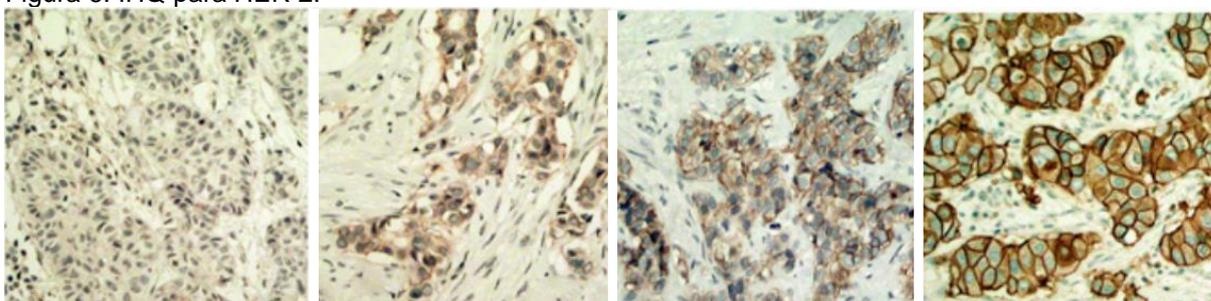
Figura 5. Algoritmo de leitura de IHQ para HER2.



FONTE: WOLFF *et al.*, 2013 IHQ: Imuno-histoquímica, ISH Hibridização *in situ*.

Como exposto acima na figura 5, caso a avaliação pelo patologista seja categorizada como duvidosa, ou 2 cruces, será necessário lançar mão de teste por outra metodologia. A figura 6 retrata as lâminas de IHQ em diferentes graus de marcação.

Figura 6. IHQ para HER 2.

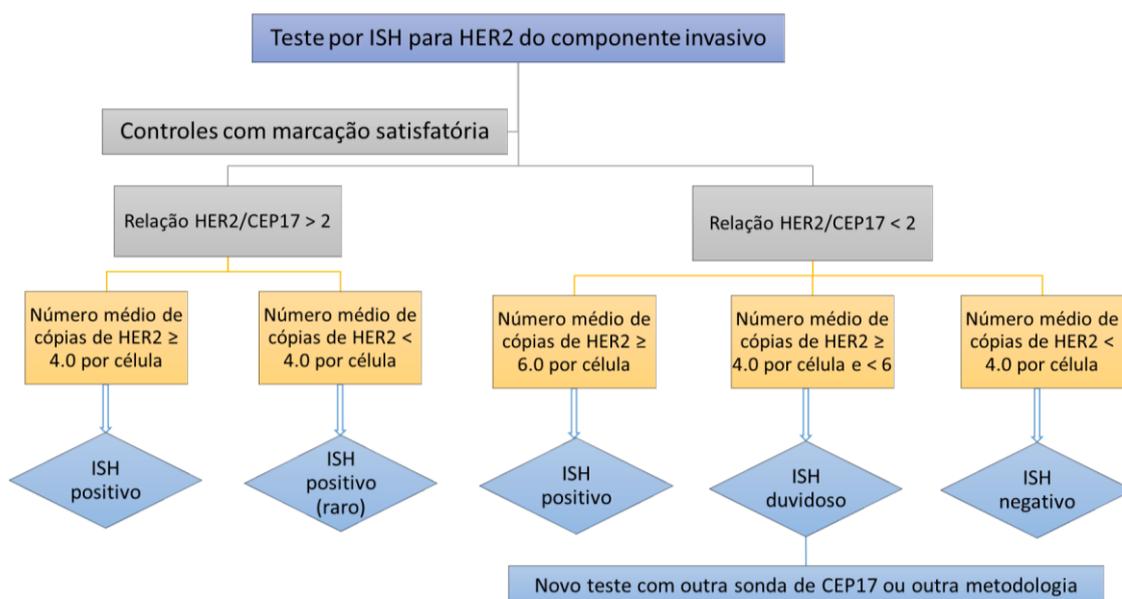


Fonte: (CIFTLIK; LEHR; GIJS, 2013). Da esquerda para a direita: sem coloração, 1+, 2+ e 3+

A metodologia empregada para os casos duvidosos é a ISH. Trata-se de um método que utiliza sondas de bases nitrogenadas para formar moléculas híbridas com o DNA intacto das células estudadas (GALL; PARDUE, 1969). Esse método consegue

observar diretamente a amplificação do número de cópias do gene que codifica o HER2. Para tanto, são utilizados meios para “marcar” os segmentos de DNA desejados, sendo a prata (SISH) e substâncias fluorescentes (FISH) os mais comuns. É feita a contagem do número de cópias marcadas, além de fração entre o número de marcações e a porção centromérica do cromossomo 17 (onde se localizada o gene testado) (WOLFF *et al.*, 2007). A figura 7 traz o algoritmo para avaliação da ISH.

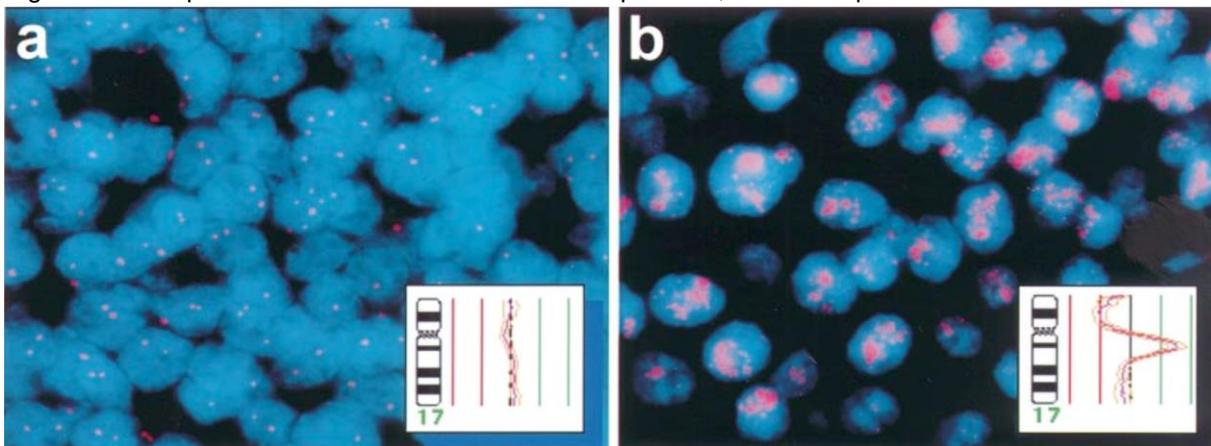
Figura 7. Algoritmo para avaliação de HER2 por ISH.



FONTE: (WOLFF *et al.*, 2013).

A figura 8 demonstra um exemplo de teste para HER2 avaliado pela metodologia FISH.

Figura 8. FISH para HER2. Em “a” um caso não amplificado; em “b” amplificado.



Fonte: (BÁNKFALVI *et al.*, 2000)

### 2.4.3 Correlação entre IHQ e ISH

Existe correlação entre os métodos para pesquisa de HER2, pois comumente a amplificação gênica observada pelo método de ISH se traduz com aumento da expressão da proteína que é vista pela IHQ (WOLFF *et al.*, 2007).

A ISH é considerada o padrão-ouro para diagnóstico de amplificação de HER2 por se tratar de um método que correlaciona diretamente o aumento do número de cópias desse gene no cromossomo, além da literatura apontar menor variabilidade inter-observador (CIANCIULLI *et al.*, 2002).

Vários estudos correlacionaram esses dois métodos e é esperado que casos com IHQ de 2 cruzes apresentem positividade na ISH em cerca de 17 a 24% (OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004; SHAH *et al.*, 2016). Já para os casos de 3 cruzes é esperado que a ISH também seja positiva em aproximadamente 90% (HADI YAZIJI *et al.*, 2004; HANNA *et al.*, 2017; OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004).

A ISH é uma técnica de maior custo quando comparada com a IHQ. Além disso, tem maior tempo para preparação (cerca de 36 horas) e maior tempo de leitura de cada exame (7 minutos). A IHQ, por outro lado, demora 4 horas para ser preparada e 45 segundos para ser lida. Por questões de custo benefício, a técnica preferencial para primeira avaliação de HER2 é a IHQ (HADI YAZIJI *et al.*, 2004; PAULETTI *et al.*, 2000).

## 2.5 INTERPRETAÇÃO CRÍTICA DOS TESTES

Os dados científicos de vários estudos apontam valores de concordância entre ISH e IHQ próximos (HADI YAZIJI *et al.*, 2004; HANNA *et al.*, 2017; OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004). Entretanto, os mesmos artigos apontam que as análises em questão podem ter falhas.

Em geral, os fatores pré-analíticos são os principais causadores de falso-negativos para análise de HER2. Grande parte dos problemas encontrados estão relacionados com fatores técnicos para realização da IHQ, como tempo de isquemia fria, tipo e quantidade de formol, tempo e local de fixação. A etapa crítica que prejudica a realização da IHQ é a degradação e desnaturação das proteínas de superfície do tecido (WOLFF *et al.*, 2007, 2013).

Podem existir ainda outras falhas para o método de IHQ como anticorpos com sensibilidade menor (qualidade prejudicada), reação cruzada com HER4, tipo de clone usado, entre outros (SAPINO *et al.*, 2013).

Dentre as dificuldades para análise por ISH estão: heterogeneidade tumoral, qualidade dos reagentes, variação da porção centromérica do cromossomo 17 (CEP 17 – usada para calcular a proporção da amplificação de HER2), desnaturação do tecido com perda de DNA viável (SAPINO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2016).

Alguns pesquisadores se demonstraram preocupados pelos resultados negativos de testes, os quais estavam fora do contexto clínico e técnicos relatados (TUMA, 2007). Mesmo em cenários ideais de pesquisa clínica, já foi observado inconsistência entre laboratórios *in loco* e com o laboratório central (ROCHE *et al.*, 2002).

Nos últimos 20 anos, houve alterações no protocolo de leitura de ISH pelo colégio americano de patologistas, com mudanças nos pontos de corte. Essa mudança ocorreu de 2007 (WOLFF *et al.*, 2007) para 2013 (WOLFF *et al.*, 2013), sendo observado aumento da positividade de HER2 em cerca de 12,5% (SHAH *et al.*, 2016),

Assim, a análise crítica dos resultados de testes desse biomarcador é fundamental, pois podem existir variações do processamento de amostras, da metodologia, da maneira de avaliação e da configuração de protocolos.

## 2.6 TRATAMENTO

A tratamento com medicamentos que visam bloqueio de vias oncogênicas ativadas é conhecido como terapia-alvo. Em geral são empregados anticorpos para domínios extracelulares ou pequenas moléculas para domínios intracelulares (HAYES, 2019). Mais comumente são usados anticorpos monoclonais (Figura 9) para bloqueio HER2 (SLAMON, Dennis J.; *et al.*, 2001). Anteriormente ao desenvolvimento desses medicamentos, a presença desse biomarcador estava diretamente relacionada a piores desfechos clínicos, como maior taxa de recidiva e baixa sobrevida global, incluindo casos não metastáticos (SLAMON, D. J *et al.*, 1984; SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989).

Hoje, pode-se dizer que a imensa maioria das pacientes com CM HER2 positivo receberão tratamento com bloqueio dessa via, para doença localizada ou mesmo metastática (HAYES, 2019).

O trastuzumabe é o protótipo de medicação para bloqueio dessa via. Trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia o sítio de ligação do fator de crescimento epidérmico. Esse bloqueio irá diminuir a proliferação celular e favorecer apoptose, além de atrair células e marcadores imunes para o tecido tumoral (ARBOLEDA *et al.*, 2003). Na década de 90 ocorreu o desenvolvimento dessa medicação, e a partir dos anos 2000 têm-se usado de forma rotineira, com desfechos surpreendentes, melhorando sobrevida global, sobrevida livre de progressão, mesmo em diferentes cenários, como metastático, adjuvante e neoadjuvante (PICCART-GEBHART *et al.*, 2005; SEIDMAN *et al.*, 2001; SLAMON, Dennis J.; *et al.*, 2001).

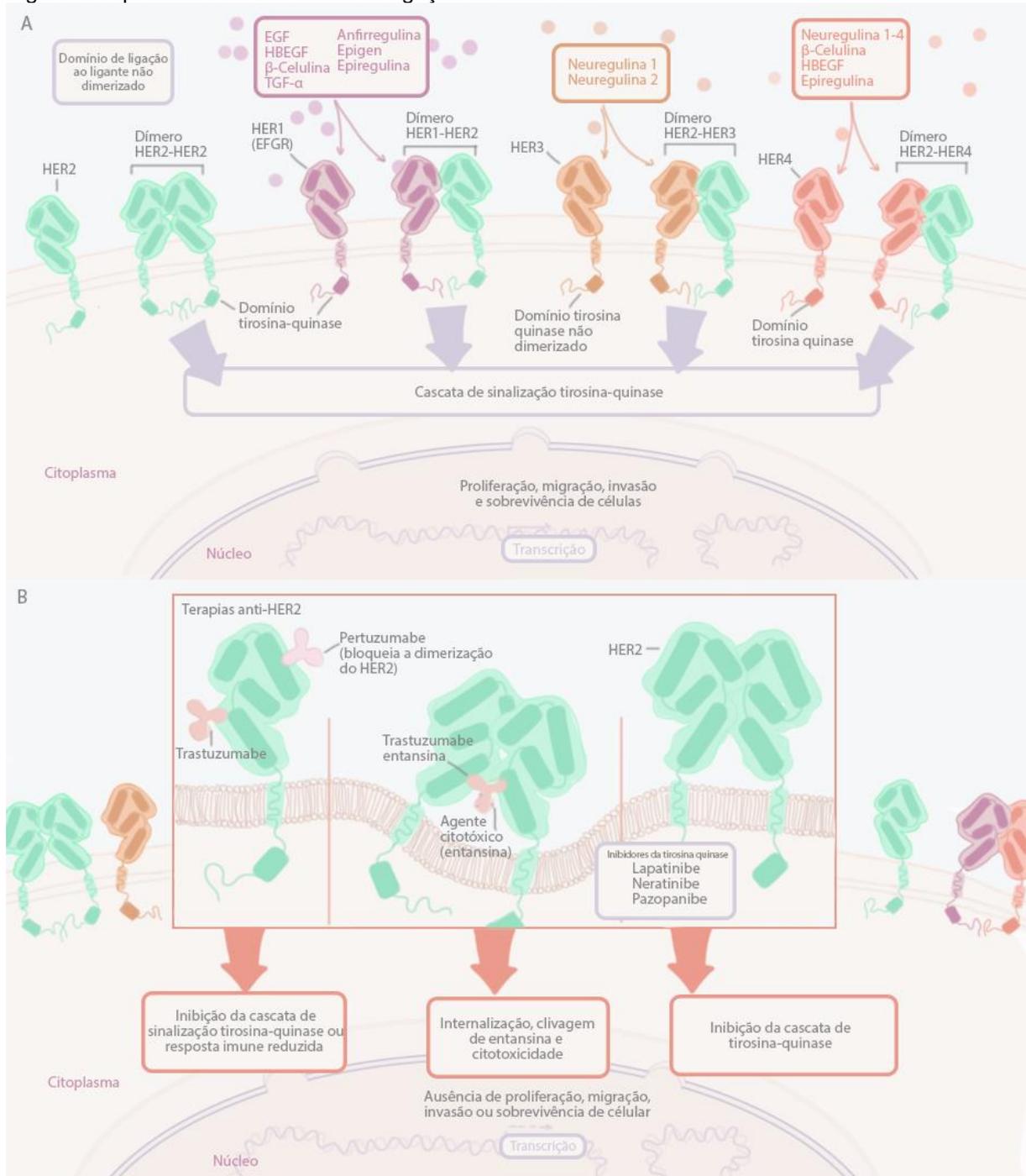
Atualmente as medicações disponíveis para uso rotineiro são (HAYES, 2019):

- a) Trastuzumabe: anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular do HER2;
- b) Pertuzumabe: anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular de dimerização do HER2 e previne a ligação entre esses sítios ou outros membros da família EGFR, administrado junto ao trastuzumabe, nunca como agente isolado;
- c) Trastuzumabe entansina (T-DM1): conjugado anticorpo-droga de trastuzumabe, composto ligante, e agente citotóxico antimicrotúbulo entansina (DM1). Não pode ser feito em conjunto com quimioterapia, pois utiliza agente citotóxico em sua composição;
- d) Lapatinibe: inibidor de tirosina quinase contra o domínio intracelular do receptor HER2.

Outros agentes estão em fase de estudos e tem potencial para aprovação e uso na prática diária futura: Trastuzumabe deruxtecan, tucatinibe, neratinibe, margetuximabe, entre outros (TARANTINO; MORGANTI; CURIGLIANO, 2021).

Os efeitos colaterais mais comuns pelo uso dessas medicações são a toxicidade cardíaca e intestinal (BARCENAS *et al.*, 2020; PICCART-GEBHART *et al.*, 2005).

Figura 9. A proteína HER2 e locais de ligação de moléculas



Fonte: adaptado de Hayes, 2019(HAYES, 2019)(HAYES, 2019). HER: Human Epidermal Growth Fator Receptor (1 a 4)

### 3 METODOLOGIA

Nesta seção serão demonstrados os procedimentos metodológicos deste trabalho.

#### 3.1 CENÁRIO DE PESQUISA

O contexto analisado foi o atendimento de pessoas com CM no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR). Trata-se de um hospital de nível terciário, que atende principalmente a população do estado do Paraná, além de outros estados da Federação. Tem atendimento exclusivamente pelo SUS, com aproximadamente 650 leitos, em várias especialidades, dentre elas oncologia clínica.

Este trabalho foi desenvolvido a partir de um problema de vida real. A liberação do tratamento com trastuzumabe no SUS ocorria apenas com teste de ISH positivo de casos com IHQ 2 ou 3 cruces (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A realização dos testes de ISH foi patrocinada pela indústria farmacêutica Roche® do Brasil, que também era responsável pelo convênio com laboratório externo para execução do teste.

Durante atendimento no ambulatório de oncologia clínica foi observado que havia muitos casos de IHQ 3 cruces com ISH negativa para HER2. Essa taxa de negatividade era diferente do esperado pela literatura. Assim, os médicos oncologistas clínicos se questionaram sobre a qualidade e confiabilidade da ISH. A questão de casos com ISH negativa é crítica, pois a negatividade desse teste impedia o uso de medicação anti-HER2, a qual melhora em muito os desfechos clínicos.

#### 3.2 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um trabalho de natureza aplicada, que avaliou atendimento de indivíduos com CM dentro do SUS.

Este estudo foi dividido em duas partes. A primeira parte teve um desenho retrospectivo e observacional, utilizando o cadastro do material de biópsias de pessoas que já tinham diagnóstico de CM, entre janeiro de 2008 a dezembro de 2018. A data de 2008 foi escolhida por ser o cadastro mais antigo de biópsia com teste simultâneo de ISH e IHQ e a de 2018 como uma data suficiente para se ter 3 anos de

seguimento mínimo de cada participante para avaliação de sobrevida e recidiva. A segunda parte foi um estudo transversal com objetivo de realizar nova checagem do material da lista de casos levantados na primeira para realização de nova ISH.

### 3.3 POPULAÇÃO DA PESQUISA

O público-alvo da pesquisa foi composto por indivíduos atendidos no ambulatório de oncologia clínica do CHC-UFPR, diagnosticados com CM e que foram avaliadas por IHQ e ISH para diagnóstico de HER2. A lista de pacientes advém do banco de dados de todas as pacientes que realizaram ISH, pois esse exame era realizado em instituições externas e era necessário controle desses casos para envio de material.

Para inclusão no estudo era necessário que todos os seguintes critérios fossem atendidos:

- a) Indivíduo com CM que tenha realizado tanto IHQ quanto ISH para pesquisa de HER2;
- b) Disponibilidade e viabilidade de material no serviço de patologia, incluindo lâminas e blocos de parafina;
- c) Resultado inicial de IHQ de peça de biópsia ou cirurgia com positividade de HER2 em IHQ 2 ou 3 cruces;
- d) Dados de prontuário disponível para consulta

### 3.4 FONTE DE DADOS E PADRONIZAÇÃO

Foram consultados os dados contidos no sistema eletrônico do Hospital de Clínicas e no setor de Anatomia Patológica do CHC-UFPR. O estadiamento, progressão e recidiva foram obtidos a partir do prontuário digital e físico de cada paciente.

No período analisado, não houve modificações estruturais e técnicas no serviço de anatomia patológica para confecção de lâminas de IHQ, que eventualmente poderiam interferir nos resultados de HER2. Os reagentes de IHQ variaram no tempo analisado, mas todas as lâminas de IHQ são preparadas com controle positivo para evitar erro de interpretações.

Os clones usados para confecção das lâminas de patologia foram: c-erbB-2, Policlonal/Spring, Policlonal/Dako, SP3/CellMarque, SP3/Spring e EP3/ Biocare.

Além disso, a equipe de radiologia intervencionista que realizou as biópsias por punção manteve-se com a mesma equipe médica e técnicas de procedimentos.

O serviço de mastologia, de maneira similar, manteve-se com os mesmos médicos e as mesmas condutas para cirurgias, cuidado e atenção com amostras.

Os laudos de ISH estão no prontuário físico e também no banco de dados do convênio com a Roche® Brasil, patrocinadora do teste de ISH.

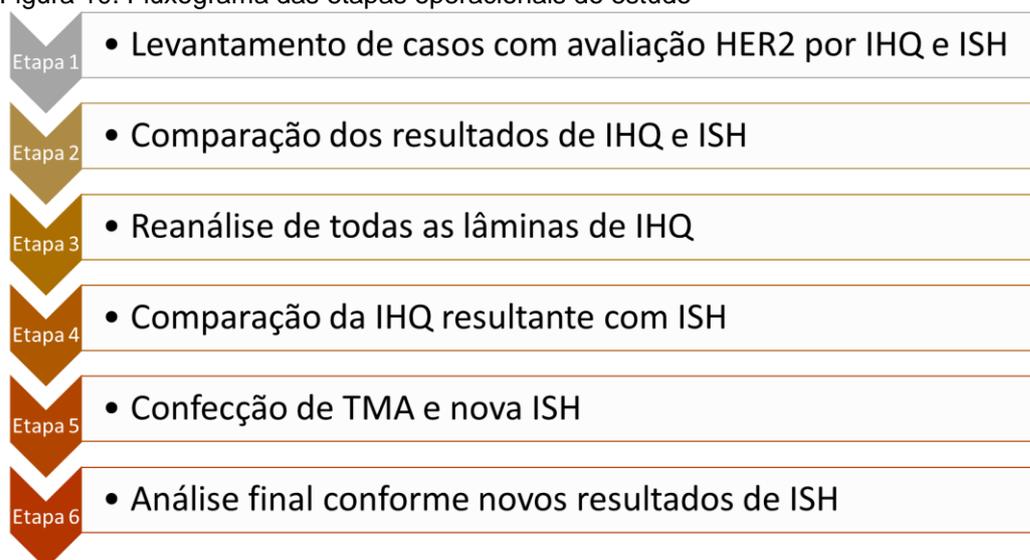
Nos casos em que houve mais de uma biópsia para a mesma paciente, foi levado em conta apenas o material que foi analisado por ISH e guiou o tratamento clínico.

A nova análise de ISH foi realizada por processo automatizado (aparelho Benchmark Ultra) com o kit *VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail*, podendo ser usado para diagnóstico em câncer de mama e estômago. É composto de uma mistura de sondas que visam especificamente o gene HER2 localizado no cromossomo 17 (17q12) humano e na região centromérica de Chr17 que serve como referência para aneuploidia. A leitura desse teste é padronizada e disponível pelo fabricante, sendo necessária contagem de 20 células para emissão de laudo (F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD, 2021).

### 3.5 ETAPAS DA PESQUISA

A coleta de dados foi organizada em etapas, as quais são descritas na Figura 11 e detalhadas na sequência.

Figura 10. Fluxograma das etapas operacionais do estudo



FONTE: o autor 2021. Legenda TMA: *Tissue Microarray*.

### 3.5.1 Etapa 1

Essa etapa focou na análise de participantes. Foram coletados dados epidemiológicos, resultados de biópsia de mama, resultados de IHQ, laudos de ISH e qual laboratório externo a realizou, datas de recidiva e falecimento, tipos de tratamento utilizados.

### 3.5.2 Etapa 2

A partir dos dados levantados de prontuário foram comparados os resultados de HER2 pela IHQ institucional com ISH externo. A análise foi estratificada conforme positividade da IHQ, em 2 ou 3 cruzes. Nesta segunda etapa, foram avaliados testes e não pessoas.

Com intuito de explorar a taxa de positividade entre laboratórios, conforme a IHQ, foram retirados dessa análise os testes de ISH inconclusivos. Os resultados inconclusivos estão relacionados à problemas de amostra, como exiguidade, desgaste ou deterioração do material.

### 3.5.3 Etapa 3

A expressão de HER2 pela IHQ foi reclassificada de maneira independente e cegada por 2 patologistas experientes na área. O objetivo dessa estratégia é, além de

padronização, mitigar laudos com viés relacionado a alterações de protocolos dentro do período analisado. A IHQ resultante foi o valor mais comum entre as 3 avaliações (inicial e 2 reanálises). A etapa 3 também estudou testes.

#### **3.5.4 Etapa 4**

Após a reclassificação da IHQ pelos 2 patologistas, foi comparado mais uma vez a taxa de positividade dos resultados de laboratórios que realizaram ISH.

A etapa 4 irá responder um dos objetivos do trabalho sobre a variabilidade na classificação da IHQ.

Nessa etapa também foi realizado separação dos blocos de parafina para serem incluídos na etapa 5.

#### **3.5.5 Etapa 5**

Para casos com 2 ou 3 cruces na IHQ, mas negativos na análise por ISH, foi realizado novo teste de ISH. Para acomodar o material histológico dos blocos de parafina foi utilizado a técnica do TMA manual (*tissue microarray*), com punches de 2 mm selecionados de amostras representativas de células neoplásicas do tumor. Cada bloco de parafina de TMA acomodou até 60 filamentos.

Os cortes histológicos de 4 µm dos blocos de TMA foram acomodados em lâminas histologicamente carregadas e submetidas a hibridação in situ cromogênica por prata (SISH), utilizando-se patologia digital e morfometria.

Um patologista experiente na área classificou todas as amostras teciduais de SISH e documentou os resultados em planilha correspondente do TMA.

#### **3.5.6 Etapa 6**

Após o término da etapa 5 foram identificados quais participantes foram erroneamente categorizados como HER2 negativo durante primeira avaliação e se tratavam de casos falso-negativos de ISH. A partir da identificação desse grupo foi comparado a sobrevida livre de recidiva entre esse estrato com os que tinham resultados positivos inicialmente (verdadeiro-positivos) para HER2 por ISH.

### 3.6 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis que apoiaram a análise estatística foram o número de cruces de positividade de IHQ institucional e reanálise pelos dois médicos patologistas e resultados (positivos ou negativos) de ISH conforme diferentes laboratórios. Na coorte aqui estudada 4 laboratórios distintos fizeram a primeira análise de ISH.

Foram coletados dados clínicos como idade, estadiamento clínico e patológico, perfil de receptores hormonais, Ki67, subtipo histológico do CM, grau tumoral, tipo de cirurgia realizada, modalidade e tipo de tratamento sistêmico instituído, datas de recidiva e óbito.

A sobrevida global foi calculada a partir do tempo do diagnóstico até o momento do falecimento. Foi avaliado um desfecho composto de sobrevida livre de recidiva ou progressão, o qual consistiu no tempo desde o diagnóstico até a recidiva ou primeira progressão, para englobar pacientes com doença local e metastáticos *de novo*.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram tabuladas em planilha de Excel<sup>®</sup>. O programa para análise estatística foi o JAMOV versão 1.6.7 que é baseado na linguagem R com adição de seus respectivos pacotes (PROJECT, 2020). Os resultados estão expressos por médias, medianas, e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas).

O teste exato de Fisher foi empregado para comparar os resultados de positividade para análise de HER2 entre laboratórios que realizaram a ISH inicial (variáveis não-paramétricas e nominais), pois algumas das amostras eram menores que 10. Esse teste também foi usado para comparar os dados da segunda análise de ISH.

O teste de Wilcoxon (postos ranqueados) foi usado para comparar a análise inicial e resultante da IHQ.

Para as variáveis quantitativas de resposta foi verificada a distribuição de normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e os resultados foram reportados utilizando de média ( $\pm$  desvio padrão) caso a distribuição fosse normal ou mediana (mínimo – máximo) caso ela fosse não normal. Já para as variáveis qualitativas os

valores de cada grupo foram expressos através de número absoluto (% porcentagem do total).

Para verificar a significância estatísticas das conclusões, diferentes testes foram aplicados dependendo da natureza da variável. Para a diferença estatística entre uma variável quantitativa e uma categórica foi aplicado o teste paramétrico ANOVA se a distribuição da variável quantitativa fosse normal, e o teste não paramétrico de Mann-Whitney caso não fosse. O tamanho de efeito foi calculado usando a técnica de eta-squared ou Cohen's d. Para verificar associação entre duas variáveis qualitativas em nosso estudo, foi aplicado a metodologia do teste do qui-quadrado. O tamanho de efeito para o teste do qui-quadrado foi calculado usando a metodologia de Cramer's V. Para todos os testes, valores de  $p < 0.05$  foram considerados suficientes para rejeitar a hipótese nula e considerar o resultado significativo estatisticamente (HARRISON, 2019).

Para as variáveis potencialmente preditoras para os desfechos de interesse – óbito e recidiva, foi aplicado o gráfico descritivo de sobrevida de Kaplan-Meier e regressão de cox. Foi verificada a proporção entre os riscos dos grupos de estudo usando o gráfico de Kaplan-Meier. Caso não fosse proporcional, uma cox tempo-dependente poderia ser usada. Foram testados os preditores por sua influência uni variada e após modelos multivariados para análise de sobrevida. Os preditores incluídos no modelo foram: Ki67 acima de 14%, RE, RP, estadiamento IA a IIA *versus* IIB a IV e grau 1 *versus* 2 e 3. Essas covariáveis foram escolhidas por serem fatores de piora prognóstico (COATES *et al.*, 2015). Curvas de sobrevida considerando as covariáveis foram criados para representar o desfecho com a maior precisão clínica e estatística (KASSAMBARA, ALBOUKADEL; KOSINSKI, MARCIN; BIECEK, 2019).

A amostra deste trabalho consistiu em todos dos casos com execução de IHQ e ISH (amostra de conveniência). Assim, foi realizado calculo amostral *a posteriori*, com intuito de avaliar o poder do teste que esse número amostral representa, usando da ferramenta GPower versão 3.1 (FAUL *et al.*, 2009). Para tal cálculo foi necessário fixar o nível de confiança em 95% e a margem de erro em 5%, e eventuais tamanhos de efeito para cada teste. Foi calculado igualmente para as variáveis quantitativas e qualitativas.

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Essa pesquisa foi submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com documento de aprovação no Anexo A (CAAE 23325419.1.0000.0096). O uso dos dados provenientes dos prontuários individuais será mantido em sigilo.

É digno de nota que os blocos de parafina não foram danificados e não houve prejuízo do material que está armazenado no serviço de patologia do CHC-UFPR. Assim, não foi necessário coleta de termo de consentimento individual de cada paciente, apenas assinatura de comprometimento de guarda e cuidado de material biológico pelos pesquisadores.

Após o término do trabalho, os resultados falso-negativos de HER2 foram enviados para o serviço de oncologia clínica do CHC-UFPR.

## 4 RESULTADOS

Nesta seção serão demonstrados os resultados de todas as etapas da pesquisa.

### 4.1 A POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram identificadas 205 pacientes, sendo 204 mulheres, atendidos pelo serviço de oncologia clínica que apresentavam avaliação de HER2 por IHQ e ISH, com disponibilidade de material no serviço de patologia. É importante salientar que os dados aqui demonstrados refletem apenas a coorte em questão, não sendo representativa do CM em geral. Portanto, já é esperado que a prevalência da amplificação desse receptor seja maior do que o esperado na população geral.

A idade média foi de 53,52 anos ( $\pm$  11,89). A tabela 2 demonstra as características da população conforme aspectos patológicos. As características histológicas mais prevalentes foram carcinoma ductal invasivo (82,4%), subtipo molecular luminal (49,8%), grau 2 e 3 (86,8%) e Ki67 maior que 14% (74,1%).

Na tabela 3, a qual traz as características clínicas e os tratamentos instituídos, pode-se observar que a maioria dos pacientes foi diagnosticada no estadiamento clínico I e II (68,3%). Quanto às modalidades de tratamento a que os pacientes foram submetidos, a maior parte fez quimioterapia (86,3%) e hormonioterapia (73,6%), e apenas um terço dos pacientes fez terapia anti-HER2 para doença local (33,6%). Incluindo os casos metastáticos, 78 participantes (38%) utilizaram bloqueio HER2.

Tabela 1. Avaliação patológica

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>n (%)</b>
<b>Tipo Histológico</b>	
Carcinoma Ductal Invasor (CDI)	169 (82,4)
Carcinoma Lobular Invasor (CLI)	9 (4,4)
Carcinoma Pouco Diferenciado	10 (4,9)
Carcinoma Ducto-lobular	6 (3,0)
Carcinoma Mucinoso	4 (1,9)
Carcinoma Micropapilar	3 (1,4)
Carcinoma Tubular	2 (1,0)
Carcinoma Medular	1 (0,5)
Carcinoma Células Gigantes Osteoclásticas	1 (0,5)
<b>Carcinoma In-Situ</b>	
Ausente	102 (49,7)
Presente	103 (50,3)
<b>Perfil molecular pela IHQ</b>	
Luminal	102 (49,8)
HER2 Puro	34 (16,6)
Triplo Negativo	24 (11,7)
Lumino-HER	45 (21,9)
<b>Ki67</b>	
Menor que 14%	41 (20,0)
Maior que 14%	152 (74,1)
Desconhecido	12 (5,9)
<b>Receptores Progesterona</b>	
Negativo	80 (39,0)
Positivo	125 (61,0)
<b>Grau diferenciação histológica</b>	
1	19 (9,3)
2	116 (56,6)
3	62 (30,2)
Desconhecido	8 (3,9)
<b>Total</b>	<b>205 (100,0)</b>

FONTE: o autor, 2021.

Tabela 2. Características clínicas

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>n (%)</b>
<b>Estadiamento clínico ao diagnóstico</b>	
IA	48 (23,4)
IIA	41 (20,0)
IIB	51 (24,9)
IIIA	23 (11,2)
IIIB	31 (15,1)
IIIC	1 (0,5)
IV	10 (4,9)
<b>Cirurgia na mama</b>	
Conservadora	107 (52,2)
Adenomastectomia	11 (5,4)
Mastectomia Radical Modificada	68 (33,2)
Não realizou	19 (9,2)
<b>Cirurgia na Axila</b>	
Linfonodo Sentinela	104 (50,7)
Esvaziamento Axilar	80 (39,0)
Não realizou	21 (10,3)
<b>Quimioterapia para doença local</b>	
Sim	177 (86,3)
Não	28 (13,7)
<b>Trastuzumabe para doença local</b>	
Sim	69 (33,6)
Não	136 (66,4)
<b>Menopausa ao diagnóstico</b>	
Sim	105 (51,2)
Não	96 (46,8)
Desconhecido	4 (2,0)
<b>Hormonioterapia</b>	
Sim	151 (73,6)
Não	54 (26,4)
<b>Primeiro tratamento sistêmico</b>	
Quimioterapia Neoadjuvante	125 (61,0)
Quimioterapia Adjuvante	38 (18,5)
Hormonioterapia Adjuvante	21 (10,2)
Quimioterapia Paliativa	10 (4,9)
Hormonioterapia Paliativa	4 (2,0)
Pré + Pós-operatório	4 (2,0)
Não realizou	3 (1,4)
<b>Total</b>	<b>205 (100,0)</b>

FONTE: o autor, 2021.

## 4.2 COMPARAÇÃO INICIAL DE IHQ E ISH

A partir do total de 205 indivíduos, foram incluídos 3 casos em que houve repetição de biópsia e nova IHQ e ISH. Assim, a primeira análise reuniu 208 resultados de testes possíveis para comparação entre IHQ institucional e ISH externa.

A coorte foi dividida conforme positividade da IHQ, um grupo 2 cruces e outro 3 cruces. Os 4 laboratórios que realizaram os testes de ISH variaram conforme a época e seus nomes foram codificados por letras do alfabeto. O laboratório A ficou a cargo dos exames entre 2011 até meados de 2015. O laboratório B avaliou amostras entre 2012 e 2016, e de 2016 a 2018 os testes foram analisados pelo C.

Os laboratórios A e B utilizaram a técnica de *SISH Dual ISH DNA probe cocktail (Ventana Medical System)*. O laboratório C informou usar a mesma técnica apenas nos laudos a partir de 2018 (sem informações anteriormente). O laboratório D realizou apenas 2 testes na coorte, sendo ambos por FISH (*PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, Abbott Molecular*).

A Tabela 4 demonstra dados da IHQ e resultados de diferentes laboratórios que realizaram ISH. Para IHQ 2 cruces (118 testes), os laboratórios A e B apresentaram mais testes ISH negativos com 93,3% e 84,4% respectivamente. Já para IHQ 3 cruces (90 testes), todos os laboratórios apresentam maior prevalência de ISH positivos, com destaque especial para a positividade elevada de C, e menor em A e B.

Tabela 3. IHQ e resultados de ISH conforme diferentes laboratórios.

HER2 1ª LEITURA	RESULTADOS ISH			
	Positivo	Negativo	Inconclusivo	Total
<b>IHQ 2+</b>				
A	3 (6,7)	42 (93,3)	0	45 (100)
B	5 (10,9)	39 (84,8)	2 (4,3)	46 (100)
C	12 (46,2)	9 (34,6)	5 (19,2)	26 (100)
D	0	1 (100)	0	1 (100)
<b>IHQ 3+</b>				
A	21 (60,0)	14 (40,0)	0	35 (100)
B	15 (65,2)	7 (30,4)	1 (4,4)	23 (100)
C	27 (87,0)	2 (6,5)	2 (6,5)	31 (100)
D	1 (100)	0	0	1 (100)

FONTE: o autor, 2021.

Excetuando-se os casos inconclusivos, foi verificada diferença importante entre o índice de positividade entre laboratórios que realizaram a ISH. Para o estrato 2 cruzes foi observado que houve diferença significativa entre A *versus* C ( $p < 0,001$ ), B *versus* C ( $p < 0,001$ ), mas não para A *versus* B, que foi semelhante ( $p = 0,485$ ). Essa diferença na positividade entre laboratórios também foi encontrada no estrato 3 cruzes: A *versus* C ( $p = 0,003$ ) e B *versus* C ( $p = 0,029$ ); A *versus* B não diferiram estatisticamente ( $p = 0,584$ ). O laboratório D não foi comparado por ter apenas um caso em cada grupo.

#### 4.3 REANÁLISE DE IHQ

Foi verificado que existia diferença na taxa de performance para positividade da ISH entre os laboratórios analisados.

Da comparação inicial de IHQ e ISH, com 208 casos, em apenas 8 deles não foi possível localizar as lâminas de IHQ. Das 200 lâminas disponíveis, em 28 delas houve reclassificação (14%). Em 23 (11,5%) o ranqueamento final aumentou de 2 para 3 cruzes e em 5 (2,5%) houve diminuição do valor de 3 para 2. Não houve diminuição de 2 ou 3 cruzes para casos negativos.

Tabela 4. Resultados de releitura de HER2 e resultado de ISH

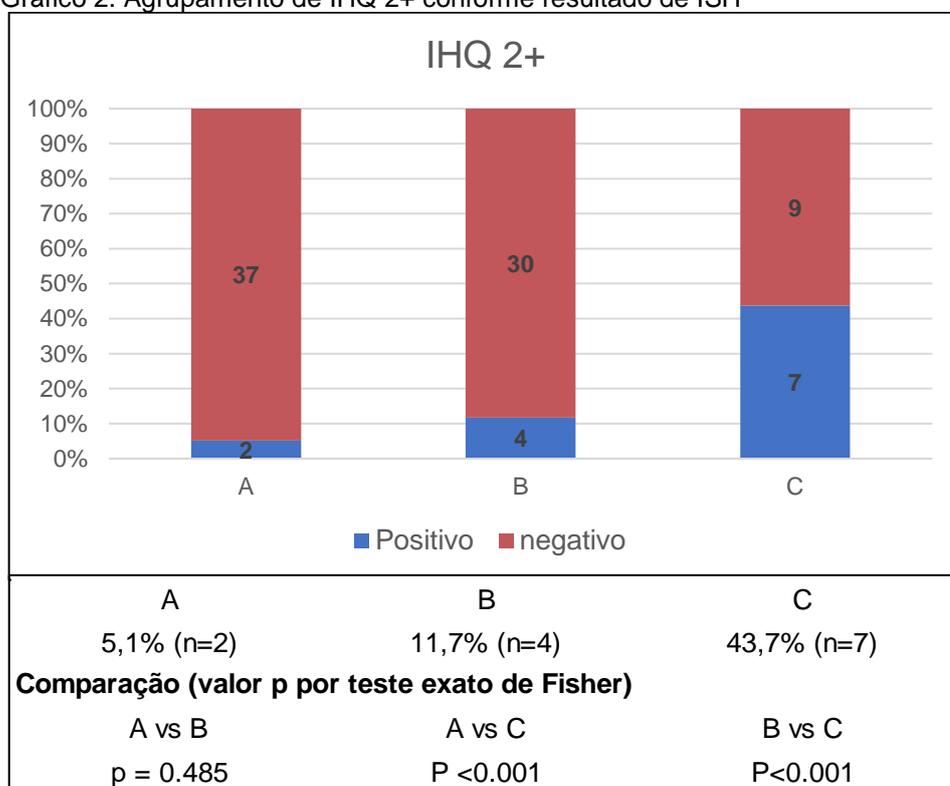
HER2 RESULTANTE	RESULTADOS ISH			
	Positivo	Negativo	Inconclusivo	Total
<b>IHQ 2+</b>				
A	2 (5,1)	37 (94,9)	0	39 (100)
B	4 (11,1)	30 (83,3)	2 (5,6)	36 (100)
C	7 (35)	9 (45)	4 (20)	20 (100)
<b>IHQ 3+</b>				
A	21 (52,5)	19 (47,5)	0	40 (100)
B	16 (57,1)	11 (39,3)	1 (3,6)	28 (100)
C	30 (85,7)	2 (5,7)	3 (8,6)	35 (100)
D	1 (50)	1 (50)	0	2 (100)

FONTE: o autor, 2021.

A mediana da IHQ era 2 cruces inicialmente, mas após a reanálise pelos 2 patologistas a mediana foi 3 ( $p < 0,001$  para essa diferença). Assim, existia subestimação da classificação por IHQ. A tabela 5 demonstra as frequências para positividade da ISH conforme a nova graduação da IHQ.

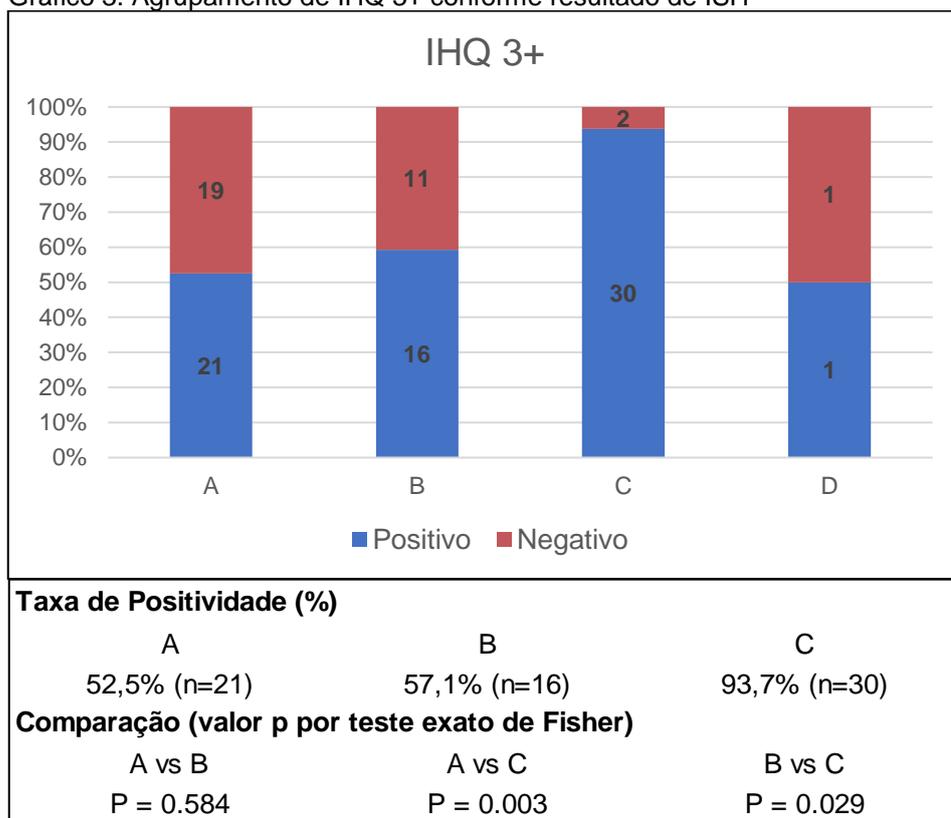
A partir dos dados finais de IHQ, foi observado que a diferença entre os laboratórios se manteve. Conforme mostram os gráficos 2 e 3, é possível verificar que a comparação, tanto para 2 quanto para 3 cruces, entre laboratórios A vs C e B vs C teve diferença com significância estatística. Os casos inconclusivos foram excluídos para cálculo dessa taxa.

Gráfico 2. Agrupamento de IHQ 2+ conforme resultado de ISH



FONTE: o autor, 2021.

Gráfico 3. Agrupamento de IHQ 3+ conforme resultado de ISH



FONTE: O autor, 2021.

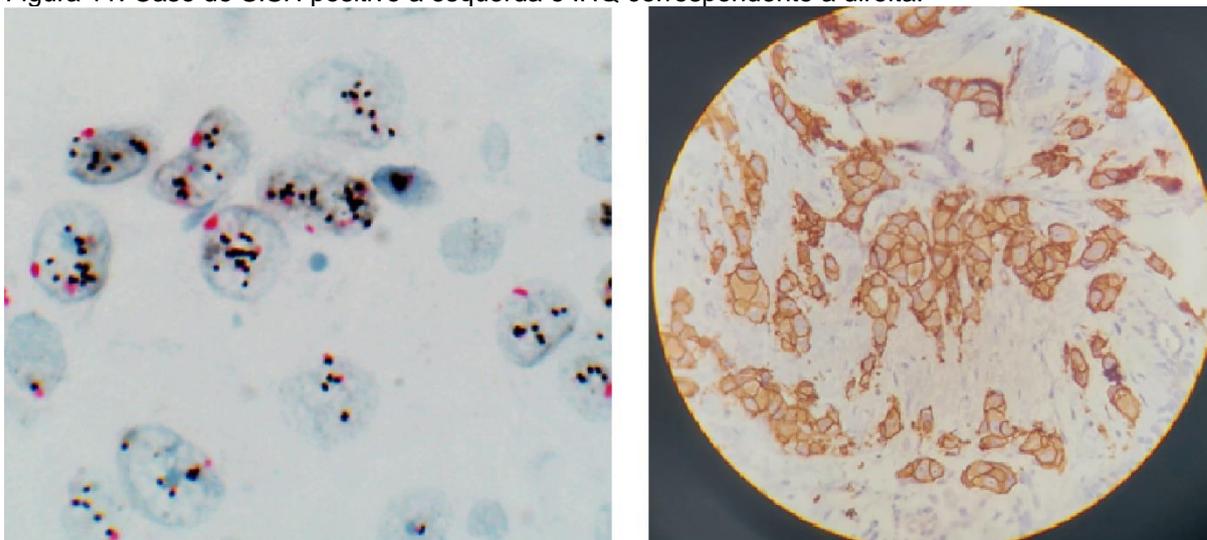
#### 4.4 REANÁLISE DE ISH

Partindo dos 205 pacientes avaliados inicialmente, foram selecionados 114 casos com ISH negativa e que tinham IHQ 2 ou 3 cruces. Desses 114, em 82 foi possível realizar nova ISH. Não foi possível obter material de 32 blocos de parafina, pois 20 não estavam disponíveis e em 12 deles não havia mais tecido para ser analisado por desgaste de avaliações anteriores.

Os 10 casos de ISH inconclusivos da avaliação inicial também foram levantados para tentativa de reanálise. Desse total, 5 deles não estavam disponíveis e 5 não tinham material suficiente.

Dos 82 novos testes de ISH foi identificado que 34 eram positivos, fazendo com que a taxa de falso-negativos na amostra fosse 41,46%. O estrato de 3 cruces de IHQ teve 10 falso-negativos, enquanto que o de 2 cruces 24. A Figura 12 exemplifica um caso falso-negativo com IHQ 3 cruces, atentar para marcação em rosa para a porção centromérica do cromossomo 17 e em preto o número de cópias do gene HER2.

Figura 11. Caso de SISH positivo a esquerda e IHQ correspondente a direita.



Fonte: o Autor, 2021.

#### 4.5 OS CASOS FALSO-NEGATIVOS DE HER2

Após a identificação do subgrupo de HER2 falso-negativo (HER2 FN) ele foi comparado com outro grupo de interesse, no caso o de HER2 positivos diagnosticados inicialmente (Verdadeiro HER2 ou Verd-HER2). A tabela 6 demonstra as características conforme fatores prognósticos e critérios de estratificação. Pode-se observar que não se tratam de grupos homogêneos, com diferença estatisticamente significativa para maior presença de RE e RP no grupo de HER2 FN e Ki67 elevado no Verd-HER2.

Tabela 5. Comparação entre dos grupos HER2 FN e Verd-HER2.

Característica	Média ( $\pm$ DP) ou Mediana (Min- Max) ou N (%)			valor p
	HER2 FN	Verd-HER2		
<b>N Total</b>	205 (100%)	34 (29.6%)	81 (70.4%)	
<b>Idade</b>	53.5 ( $\pm$ 11.9)	53.2 ( $\pm$ 12)	52.9 ( $\pm$ 11.5)	0.875*
<b>Estadiamento Avançado</b>	116 (56.6%)	18 (52.9%)	50 (61.7%)	0.382***
<b>Ki67 (%)</b>	30 (1 – 90)	20 (1 - 90)	40 (2 – 90)	<.001**
<b>Ki &gt; 14%</b>	151 (78.2%)	22 (66.7%)	65 (90.3%)	0.003***
<b>RE (+)</b>	147 (71.7%)	33 (97.1%)	44 (54.3%)	<.001***
<b>RP (+)</b>	125 (61%)	30 (88.2%)	35 (43.2%)	<.001***
<b>Grau 2/3 vs. 1</b>	177 (90.3%)	29 (87.9%)	67 (90.5%)	0.675***
<b>Tempo de Recidiva (anos)</b>	4.75 ( $\pm$ 2.32)	5.0 ( $\pm$ 1.98)	4.31 ( $\pm$ 2.44)	0.118*
<b>Tempo de Sobrevida (anos)</b>	5.37 ( $\pm$ 2.75)	5.40 ( $\pm$ 1.78)	4.97 ( $\pm$ 2.61)	0.305*
<b>Recidiva (+)</b>	55 (26.8%)	6 (17.6%)	27 (33.3%)	0.090***
<b>Óbito (+)</b>	39 (19%)	4 (11.8%)	21 (25.9%)	0.093***

FONTE: O autor, 2021. Legenda: HER2 FN: falso-negativo; Verd-HER2: verdadeiro-HER2. \*ANOVA, \*\*Kruskal-Wallis, \*\*\*qui-quadrado.

Na etapa 4 do trabalho foi levantado a hipótese de que a diferença entre a positividade entre os laboratórios poderia ser decorrente de resultados falso-negativos dos laboratórios A e B. A tabela 7 demonstra que a distribuição dos casos de HER2 FN foi desigual entre os laboratórios, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ), comprovando essa hipótese.

Tabela 6. Comparação entre falso-negativos e verdadeiro-positivos entre os laboratórios.

	Laboratórios			
	A	B	C	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>HER2 FN</b>	14 (41,2)	16 (47,1)	4 (11,8)	34 (100)
<b>Verd-HER2</b>	23 (28,7)	20 (25)	37 (46,3)	80 (100)
<b>Total</b>	37 (32,5)	36 (31,6)	41 (36)	114 (100)

Fonte: o autor, 2021

A amostra de 115 casos foi utilizada para calcular o poder do teste para detecção de resultados falso-negativos no contexto *a posteriori* (ANEXO B). O resultado aponta poder de 100% a partir do erro  $\alpha$  de 0,05, para detectar diferenças entre os laboratórios.

#### 4.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Dos 205 participantes, 46 deles perderam seguimento, sendo 30 com último atendimento no 2º semestre de 2019 e perdendo a consulta no 1º semestre de 2020. A data utilizada para cálculo do evento de sobrevida foi a última consulta médica em ambulatório especializado em tratamento de câncer.

O número absoluto de desfechos conforme a classificação molecular é exposta na Tabela 8, excetuando-se um caso do laboratório D. Dos 115 casos estudados, a taxa de eventos foi baixa, com recidiva em cerca de 26,8% e mortalidade de 19,02%. Contudo, não foi possível obter informações de desfechos das pessoas que perderam seguimento. Dos 81 casos do grupo Verd-HER2, 78 deles houve uso de trastuzumabe. No grupo FN-HER2 houve de trastuzumabe por uma participante.

Tabela 7. Resumo de eventos conforme classificação molecular.

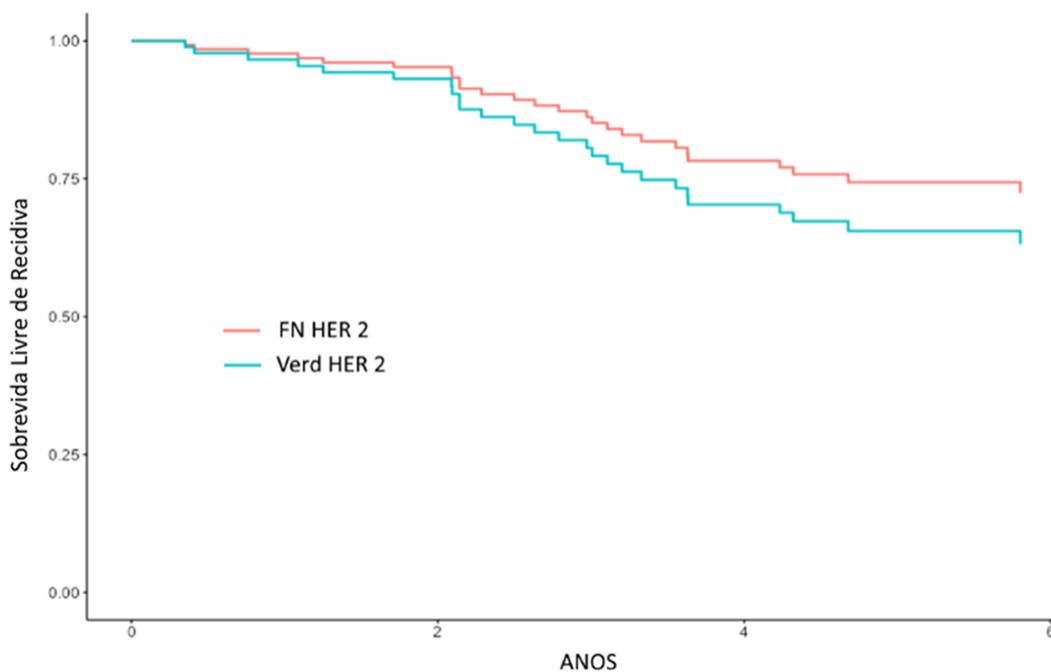
	n	Recidiva	Óbitos
<b>FN HER2</b>	34	6	4
<b>Luminal</b>	70	18	10
<b>Triplo Negativo</b>	20	4	4
<b>Verd-HER2</b>	81	27	21
<b>Total</b>	205	55	39

Fonte: o autor (2021)

A análise de sobrevida global e recidiva / progressão utilizou Ki67, RE, RP, estadiamento e grau histológico como covariáveis desses desfechos. Ao se observar a sobrevida livre de recidiva / progressão, não foi encontrado diferença estatística entre HER2 FN e Verd-HER2, com *hazard ratio* (multivariado) de 1,48 (intervalo de confiança de 95% 0,51 a 4,33), com  $p = 0,475$ . O gráfico 4 demonstra a sobrevida desses 2 grupos.

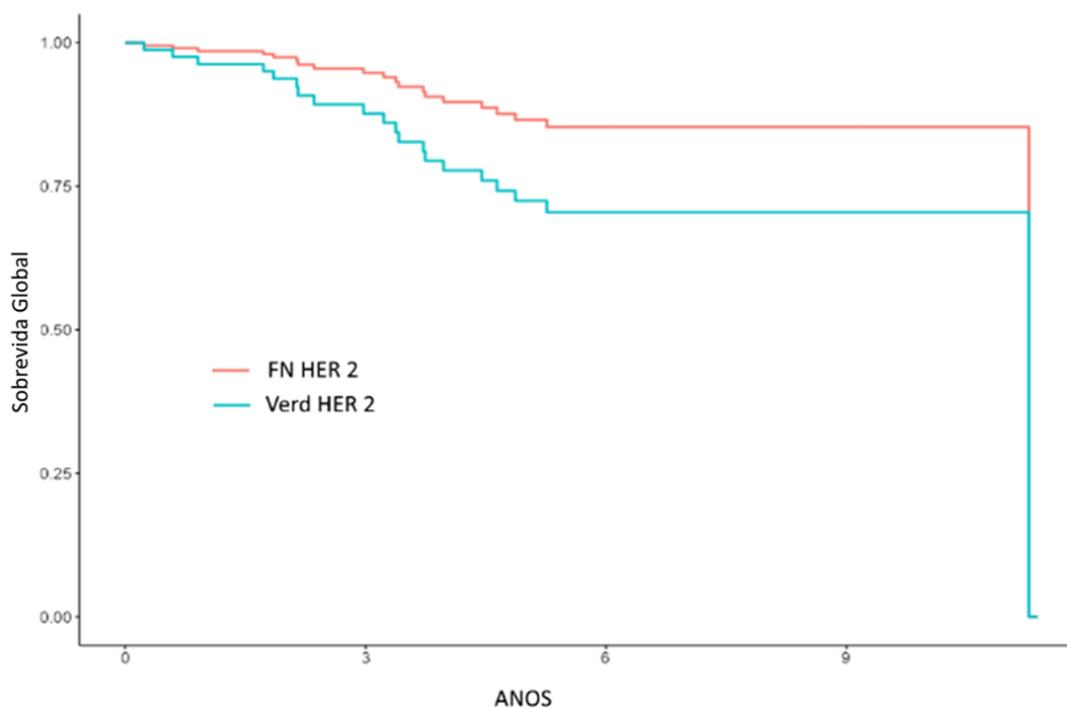
Quando observado a sobrevida global (Gráfico 5), também não houve diferença entre os grupos, com *hazard ratio* (multivariado) de 1,21 (intervalo de confiança de 95% 0,37 a 3,99), e  $p = 0,751$ .

Gráfico 4. Kaplan-Meier de sobrevida livre de recidiva / progressão.



Fonte: o autor, 2021.

Gráfico 5. Kaplan-Meier para sobrevida global.

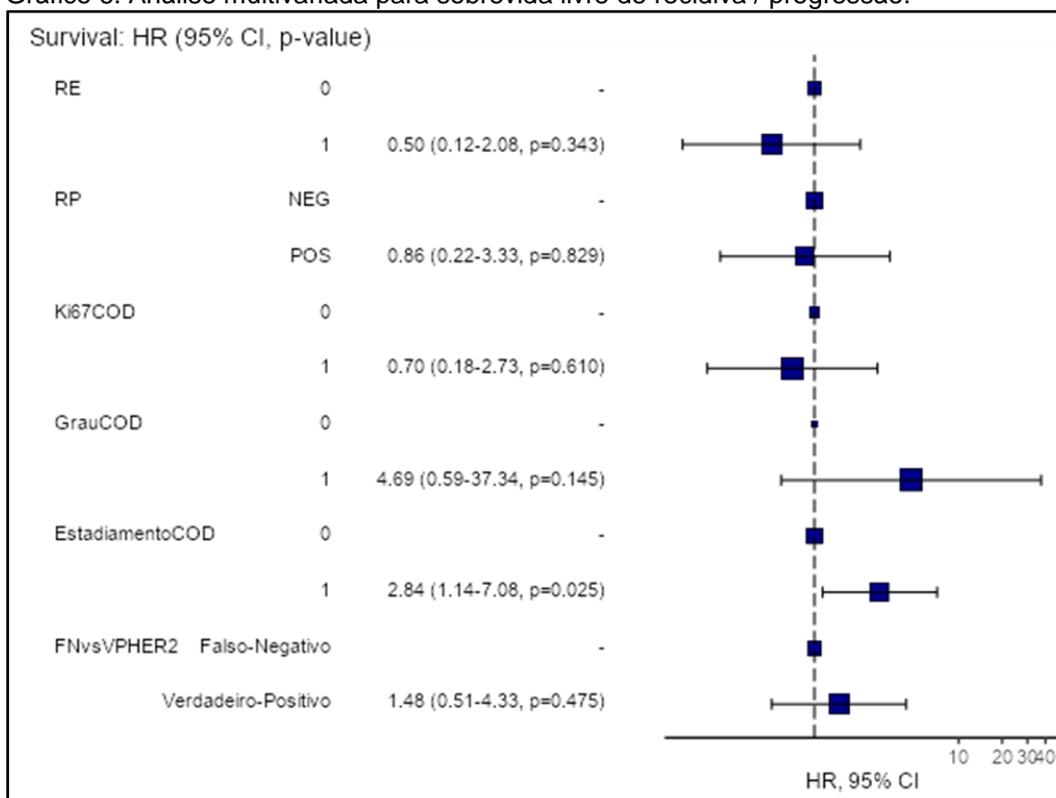


Fonte: o autor, 2021.

A análise multivariada para comparação de sobrevida livre de recidiva / progressão entre HER2 FN e Verd-HER2 demonstrou que o estadiamento era o único fator de pior prognóstico de maneira independente (Gráfico 6).

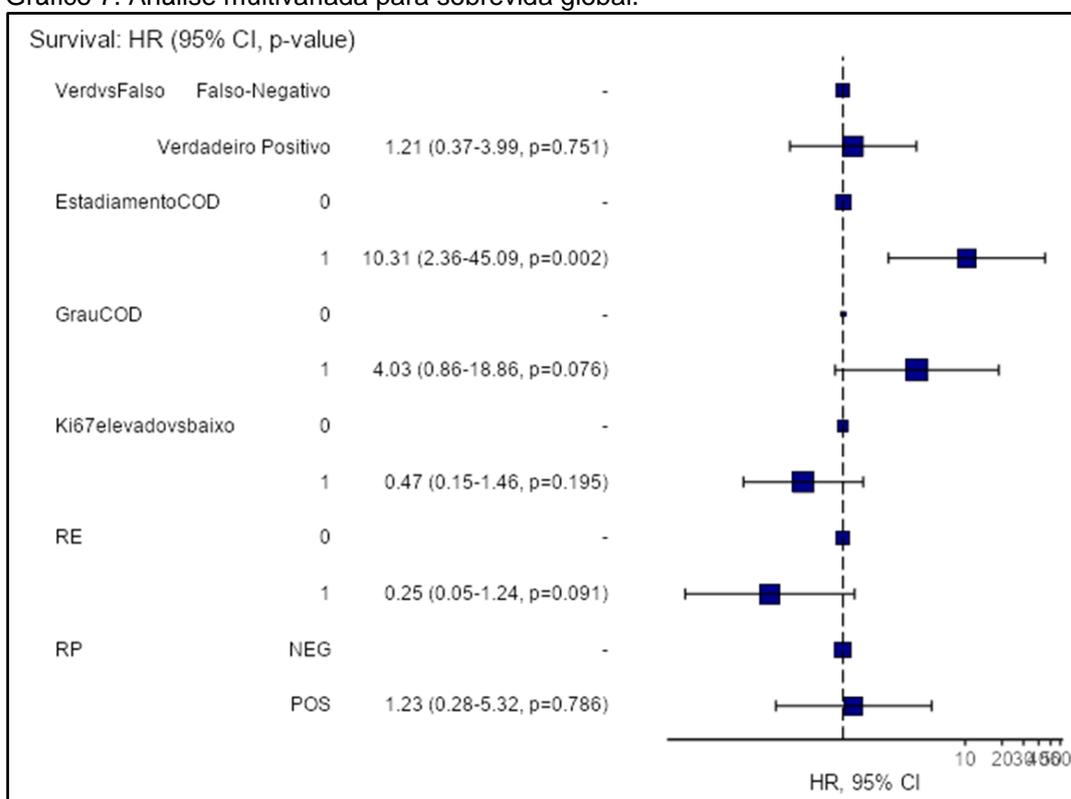
Os dados de sobrevida global (Gráfico 7), de maneira similar, também apontaram que apenas estadiamento foi um fator de risco independente para maior mortalidade. No entanto, existe tendência estatística para pior prognóstico em caso de grau 2 ou 3 ( $p = 0,076$ ) e melhor em caso de RE positivo ( $p = 0,091$ ).

Gráfico 6. Análise multivariada para sobrevida livre de recidiva / progressão.



Fonte: o autor, 2021.

Gráfico 7. Análise multivariada para sobrevida global.



Fonte: o autor, 2021.

## 5 DISCUSSÃO

A classificação molecular do CM foi um dos grandes avanços no tratamento dessa doença, em especial o HER2 (SLAMON, Dennis J.; *et al.*, 2001), pois esses tumores tem maior chance de metástase visceral e pior sobrevida (KALLIONIEMI *et al.*, 1991). Dessa forma, o uso de medicação específica para bloquear essa via é fundamental (MOLINA *et al.*, 2001; SEIDMAN *et al.*, 2001; SLAMON, Dennis J.; *et al.*, 2001) e resultados falso negativos são muito impactantes (TUMA, 2007). Esse impacto é evidenciado pela perda de 1,7 QALYs (*quality-adjusted life years*) pelo não uso de trastuzumabe (GARRISON *et al.*, 2007).

As duas técnicas usadas na prática clínica para pesquisa do HER2 são a IHQ e a ISH. Ambas permitem a avaliação *in situ* no tecido tumoral sem distorção da arquitetura tecidual (COCILOVO, 2018).

Entretanto, desde a aprovação em setembro de 1998 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) do trastuzumabe a melhor maneira para diagnóstico desse biomarcador ainda continua controversa (GINGRAS *et al.*, 2017).

Este trabalho avaliou uma situação real do dia a dia de um ambulatório de oncologia, e para tanto, utilizou dados de pessoas atendidas com CM e de testes solicitados pelo médico assistente. Assim, um teste negativo de ISH para HER2 impossibilitou o uso de medicação anti-HER2.

A seleção da população ocorreu por meio de lista de casos em que os dois testes foram executados, fazendo com que a quantidade de pessoas positivas para HER2 inicialmente (81 de 205 casos - 39,5%) fosse maior que na população em geral (15 a 20%) (COATES *et al.*, 2015).

Partindo da suspeita de que a taxa de performance era diferente entre laboratórios, foi evidenciado que havia diferença com significância estatística entre os laboratórios A, B, C e D. Espera-se que os casos de 2 cruces sejam positivos na ISH entre 17 e 24,1% (OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004; SHAH *et al.*, 2016), enquanto os de 3 cruces sejam positivos na ISH em mais de 90% (HADI YAZIJI *et al.*, 2004; HANNA *et al.*, 2017; OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004). Na comparação inicial foi encontrado que o laboratório C foi que mais se aproximou, apresentando 46,2% para 2 cruces e 87% para 3 cruces. Já os laboratórios A e B traziam taxas de positividade menores e fora do padrão esperado.

Frente a essa discrepância, foi realizado nova avaliação das lâminas de IHQ. A positividade da IHQ inicial poderia ter viés por ter sido realizada em vários períodos

de tempo, com mudanças de classificação por publicação de novas diretrizes no período (WOLFF *et al.*, 2018, 2013). Assim, o primeiro fator a ser descartado foi a variabilidade nessa leitura.

Após as duas avaliações independentes foi constatado que houve mudança na classificação na IHQ, aumentando a mediana de 2 para 3 cruces, com diferença estatística ( $p < 0,001$ ). Isso ocorreu por aumento nas graduações de 23 casos (2 para 3 cruces) e diminuição em 5 (3 para 2 cruces), sem diminuição para IHQ negativa (0 ou 1 cruz). É interessante notar que a premissa inicial era que houvesse superestimação nessa classificação, mas após reanálise foi que confirmado que na realidade esses valores estavam subestimados.

A reanálise das lâminas de IHQ e aumento na mediana de classificação acentuaram o problema encontrado entre os laboratórios. Houve afastamento maior das taxas de positividade dos laboratórios A (3 cruces com 52,7% e 2 cruces 5,1%) e B (3 cruces 57,1% e 2 cruces 11,1%) do esperado pela literatura. Mais uma vez, o laboratório C alcançou níveis plausíveis, com positividade de 93,7% para 3 cruces e 43,7% para 2 cruces. A comparação direta do laboratório C com A e B demonstrou com significância estatística. Frente a esses achados, a principal probabilidade seria a de resultados falso-negativos pelos laboratórios A e B.

Em 2012, um modelo americano estimou que a taxa de falso-negativos esperada era de 2,18% e que isso impactaria em perda de 8.400 QALYs (GARRISON *et al.*, 2015). Para a coorte analisada, mesmo levando em conta essa taxa de falso-negativos, ainda haveria diferença entre os laboratórios. Assim, foi necessário confirmação dessa hipótese com novo teste de ISH.

Com intuito de buscar os falso-negativos foram selecionados todos os 114 casos com primeira ISH negativa. Por se tratar de estudo com coleta de material armazenado e já usado anteriormente em outros cenários, pode-se obter tecido histológico em 82 deles. O arranjo de TMA é vantajoso na medida que é possível analisar vários casos simultaneamente, com padronização e diminuição de custos (MALICKA-DURCZAK; KORSKI; IBBS, 2012). A positividade encontrada para laudos que anteriormente eram negativos foi de 34 casos em 82, resultando numa taxa de falso-negativos de 41,5%.

Após a descoberta dos casos de HER2 FN, foi realizada estratificação conforme o laboratório. Verificou-se que havia diferença estatística entre eles, com maior índice de HER2 FN nos laboratórios A e B, comprovando a hipótese levantada

após a etapa 3 do trabalho. O cálculo amostral realizado pode inferir que o poder de detecção e confiabilidade desse teste para detecção de HER2 FN foi de 100% e erro  $\alpha$  de 0,05, comprovando que o número incluído era mais que suficiente para demonstrar que a diferença de falso-negativos não ocorreu ao acaso.

Considera-se que os maiores problemas para avaliação de HER2 se concentram na IHQ, principalmente para sensibilidade, a qual pode diminuir devido à perda de antígenos de superfície por problemas de fixação (PENAULT-LLORCA *et al.*, 1994; SLAMON, Dennis J. *et al.*, 1989). Outra questão que pode prejudicar a IHQ é a falta de consistência na leitura das lâminas, podendo estar sujeita a variações subjetivas na interpretação (ALLRED *et al.*, 1998). Por esse motivo, a padronização de técnicas é fundamental, bem como treinamento dos patologistas (MIDDLETON *et al.*, 2009; WOLFF *et al.*, 2018). É digno de nota que os reagentes e clones utilizados podem ser causadores de variações, além de reação cruzada com HER4 (SAPINO *et al.*, 2013).

Em geral, a literatura aponta que fatores pré-analíticos são os principais causadores de falso-negativos para análise de HER2. Grande parte dos problemas encontrados estão relacionados com a técnica de IHQ. Tempo de isquemia fria, tipo e quantidade de formol, tempo e local de fixação são as principais questões para degradar e desnaturar as proteínas do tecido (WOLFF *et al.*, 2007, 2013).

Entretanto, em nossa análise houve maior variabilidade para positividade da ISH, principalmente quando se observou a performance dos laboratórios A e B. A variabilidade na leitura de IHQ foi baixa (14%), mesmo após publicação de 2 diretrizes para leitura de lâminas de HER2 (WOLFF *et al.*, 2018, 2013). A ISH é uma técnica com maior especificidade e tem melhor correlação com a resposta ao tratamento com medicamentos anti-HER2, mas não é isenta de falhas (PAULETTI *et al.*, 2000; ROCHE *et al.*, 2002; SAPINO *et al.*, 2013). Pela elevada especificidade não foram testados os casos positivos na primeira ISH. Portanto, assume-se a que a variabilidade desse método é o elevado índice de falso-negativo encontrado.

Dentre as dificuldades para análise por ISH estão: heterogeneidade tumoral, qualidade dos reagentes, variação da porção centromérica (CEP 17 – usada para calcular a proporção da amplificação de HER2), desnaturação do tecido com perda de DNA viável (SAPINO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2016). Também é importante ressaltar que a técnica ISH pode exibir erros do ponto de vista analítico, uma vez que

é realizada de forma manual por um ser humano, com contagem de pelo menos 20 células (MALICKA-DURCZAK; KORSKI; IBBS, 2012; WOLFF *et al.*, 2013).

O impacto desses resultados falso-negativos foi avaliado por curvas de sobrevida. Inicialmente os grupos de HER2 FN e Verd-HER2 foram comparados quanto à biomarcadores e critérios prognósticos. Existiu importante diferença estatística entre esses grupos, principalmente para presença de RE (97,1%) e RP (88,2%) no grupo de HER2 FN e Ki67 elevado no Verd-HER2. É pleno o consenso na literatura que tumores luminais e com Ki67 baixo tem melhor prognóstico, com maior sobrevida global (COATES *et al.*, 2015).

Outra fato relevante na análise de sobrevida foi o baixo índice de desfechos, o que aumentou o intervalo de confiança. Houve 33 recidivas e 25 óbitos em 115 casos (HER2 FN e Verd-HER2), o que demonstra o bom prognóstico observado dentro da coorte.

Inicialmente havia tendência para maior taxa de mortalidade no grupo de Verd-HER2 quando comparado com HER2 FN (25,9% versus 11,8%), com tendência a positividade estatística ( $p = 0,093$ ). Entretanto, no domínio temporal e por análise multivariada, a qual levou em conta as diferenças das covariáveis como RE, RP e Ki67, não foi encontrado pior sobrevida para Verd-HER2 ( $p = 0,475$ ).

Similarmente, não existiu diferença na sobrevida livre de recidiva ou progressão entre os grupos comparados, com  $p = 0,751$ , mesmo que a taxa bruta fosse maior numericamente.

Portanto, o desbalanço entre HER2 FN e Verd-HER2 impediu que fosse estimado o impacto em taxa de recidiva ou progressão e sobrevida global, comprovado por diferenças entre as análises uni e multivariadas.

Sob o ponto de vista molecular, a via de sinalização HER2 é complexa e possui convergências com outras, como a endócrina. O *Cancer Genome Atlas Network* estudou as alterações genéticas do câncer de mama em 510 participantes e encontrou que apenas 50% dos tumores clinicamente positivos para HER2 tinham alterações em RNA mensageiro e proteômica compatível com amplificação desse gene. A outra metade tinha assinatura semelhante aos tumores luminais (KOBOLDT *et al.*, 2012).

Outrossim, o PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) é um segundo mensageiro da via do RE, e alterações dessa via podem estar associadas à pouca resposta ao tratamento com terapia anti-HER2 (GINGRAS *et al.*, 2017).

Dado a relevante diferença encontrada neste trabalho para presença de RE entre HER2 FN de 97,1% e Verd-HER2 de 54,3%, é plausível levantar a hipótese de que esse seja um fator associado a maiores taxas de falso-negativos de ISH, por questões moleculares ou mesmo analíticas. Assim sendo, para casos de IHQ 2 ou 3 cruzes e RE positivo com ISH negativa seria necessário maior atenção e por vezes repetir os testes. Todavia, salienta-se que essa é uma análise de subgrupo de uma amostra de conveniência e pode estar sujeita a erros de seleção.

O grupo americano CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) no estudo 40601 avaliou a heterogeneidade da resposta à terapia neoadjuvante com quimioterapia e bloqueio HER2. Houve diferença nas taxas de resposta, principalmente para alguns biomarcadores. Os autores concluíram que o tipo histológico, genes imunes, RE e vias de sinalização de HER2 estavam relacionadas à resposta completa ou doença residual. A presença de RE estava relacionada a menores taxas de resposta completa, indicando menor atividade biológica desse tratamento (CAREY *et al.*, 2016).

Assim, tumores positivos para HER2 e RE tem comportamento e resposta distintos do HER2 puro, com tumores lumino-HER se comportando mais próximos ao espectro dos luminais. Esse seria uma explicação da melhor performance do grupo HER2 FN em nossa coorte, mesmo sem uso de medicação que iniba essa via.

O impacto das covariáveis analisadas neste trabalho demonstrou que apenas o estadiamento clínico era um fator de risco independente para maior taxa de recidiva ou progressão e mortalidade. Esse resultado não difere da extensa literatura existente sobre pior prognóstico para tumores avançados (ALBAIN *et al.*, 2012; COATES *et al.*, 2015). Porém, é relevante demonstrar que a comparação entre HER2 FN e Verd-HER2 tem taxas de sobrevida e recidiva que se comportam conforme o esperado para uma coorte de câncer de mama da população em geral.

Ainda na análise multivariada, houve tendência de diferença para piores desfechos com presença de grau 2 ou 3 e ausência de RE. Não houve significância estatística, possivelmente relacionado ao tamanho da amostra e grupos heterogêneos para esse tipo de avaliação.

## 5.1 LIMITAÇÕES DO TRABALHO

Como estudo que visou buscar resultados falso-negativos dentro da cadeia de atendimento ao paciente com CM no sistema público, este trabalho cumpriu seu

objetivo, a partir amostra satisfatória (ANEXO B). Por outro lado, os desfechos clínicos como sobrevida e recidiva desses resultados falso-negativos foi prejudicada, principalmente pelo desenho retrospectivo e por grupos de comparação que não eram semelhantes entre si. Também foi observado baixo índice de desfechos, diminuindo o poder do teste para diferença de sobrevida.

Majoritariamente o manejo clínico foi feito com trastuzumabe isolado e não combinado com pertuzumabe. Assim, as taxas de sobrevida e recidiva não representam os dados esperados na literatura.

Além disso, houve uma porcentagem substancial de blocos histológicos que estavam indisponíveis ou não tinham mais material para análise. Isso ocorreu por questões relacionadas ao próprio atendimento assistencial dos pacientes com CM.

## 5.2 TRABALHOS FUTUROS

Nesse estudo foi observado que existiu diferença estatística para presença de RE e resultados falso-negativos para HER2. A associação entre essas vias intracelulares poderia explicar essa taxa. Assim, um trabalho futuro poderá realizar novos testes, dessa vez para marcadores endócrinos nessa coorte.

Apesar da técnica ISH ter boa especificidade e os resultados mostrarem casos realmente falso-negativos, o estudo dos motivos que levaram a esse cenário podem ser diversos. Novos testes moleculares como sequenciamento de DNA ou demonstração de produção proteica com RNA mensageiro poderiam ser realizados na amostra.

Existem muitos trabalhos que abordaram a variabilidade de leitura para IHQ, com realização de leituras pareadas de lâminas por vários patologistas, demonstrando a importância de treinamentos e diretrizes do tema. Entretanto, nosso trabalho mostrou que também pode haver variação na leitura da ISH. Assim, novos trabalhos podem usar a mesma metodologia de leitura pareada com objetivo de treinamento e concordância.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho encontrou resultados falso-negativos de ISH para amplificação HER2 em 34 dos 82 casos analisados (41,5%).

A partir da suspeita clínica, foi evidenciado que a taxa de positividade de ISH era diferente entre laboratórios, com performance dos laboratórios A e B aquém do esperado na literatura e estatisticamente diferente do C. Mesmo após revisão de todas as lâminas de IHQ, os laboratórios A e B ainda mantinham positividade menor do que o esperado. Os novos testes de ISH comprovaram que existiam casos de falso-negativos para avaliação de HER2, sendo os principais responsáveis os laboratórios A e B.

O grupo FN-HER2 tinha mais fatores de bom prognóstico que o Verd-HER2, como presença de RE, RP e Ki67, tornando essas amostras desiguais para análise de desfechos.

Não houve diferença estatística para sobrevida livre de recidiva / progressão e sobrevida global entre os grupos Verd-HER2 e FN-HER2, provavelmente relacionado ao baixo número de desfechos e diferenças entre os grupos.

## REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, B. S., et al. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 29, no. 21, p. 2852–2858, 2011.

ALBAIN, K. et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. **The Lancet**, vol. 379, no. 9814, p. 432–444, 2012.

ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000 – 14 (CONCORD-3 ): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. **Lancet**, vol. 14, no. 10125, p. 1023–1075, Mar. 2018.

ALLRED, D. C.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, United States, vol. 11, no. 2, p. 155–168, Feb. 1998. .

AMIN, M. B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, United States, vol. 67, no. 2, p. 93–99, Mar. 2017.

ANDERSSON, I. et al. Mammographic screening and mortality from breast cancer: the Malmo mammographic screening trial. **BMJ (Online)**, vol. 297, no. 6654, p. 943–948, Oct. 1988.

ARBOLEDA, M. J. et al. Overexpression of AKT2/protein kinase B $\beta$  leads to up-regulation of  $\beta$ 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. **Cancer Research**, vol. 63, no. 1, p. 196–206, 2003. .

AUTIER, P.; BONIOL, M.; GAVIN, A.; VATTEN, L. J. Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: Trend analysis of WHO mortality database. **BMJ (Online)**, vol. 343, no. 7818, p. 1–10, 2011.

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**, vol. 37, no. 5, p. 411–419, 2000.

BARCENAS, C. et al. Improved tolerability of neratinib in patients with HER2-positive early-stage breast cancer: the CONTROL trial. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, England, vol. 31, no. 9, p. 1223–1230, Sep. 2020.

BISHOP, J. M. Cellular oncogenes and retroviruses. **Annual review of biochemistry**, United States, vol. 52, p. 301–354, 1983.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. , p. 394–424, 2018.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast cancer research : BCR**, England, vol. 6, no. 6, p. 229–239, 2004.

CAREY, L. A. et al. Molecular heterogeneity and response to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2 targeting in CALGB 40601, a randomized phase III trial of paclitaxel plus trastuzumab with or without lapatinib. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 34, no. 6, p. 542–549, 2016.

CHEN, W. Y. Factors that modify breast cancer risk in women. **UpToDate**. Waltham, MA: UpToDate, 2019. p. 1–26. Available at: <https://www.uptodate.com/contents/factors-that-modify-breast-cancer-risk-in-women>. Último acesso em 27/06/2021

CIANCIULLI, A. M. et al. Contribution of fluorescence in situ hybridization to immunohistochemistry for the evaluation of HER-2 in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, vol. 133, no. 1, p. 66–71, 2002.

CIFTLIK, A. T. et al. Microfluidic processor allows rapid HER2 immunohistochemistry of breast carcinomas and significantly reduces ambiguous (2+) read-outs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 110, no. 14, p. 5363–5368, Apr. 2013.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the Risk of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, vol. 344, no. 4, p. 276–285, 25 Jan. 2001.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, England, vol. 26, no. 8, p. 1533–1546, Aug. 2015.

COCILOVO, C. Breast cancer screening and diagnosis. **NCCN Guidelines**, vol. 1, 2018.

COLLEONI, M. et al. Outcome of special types of luminal breast cancer. **Annals of Oncology**, vol. 23, no. 6, p. 1428–1436, 2012.

COUSSENS, L. et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science (New York, N.Y.)**, United States, vol. 230, no. 4730, p. 1132–1139, Dec. 1985.

COUTURIER, J. et al. Strong correlation between results of fluorescent In situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. **Modern Pathology**, vol. 13, no. 11, p. 1238–1243, 2000.

CUZICK, J. et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the genomic health recurrence score in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 29, no. 32, p. 4273–4278, 2011.

DE OLIVEIRA SANTOS, M. Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 66, no. 1, 20 Mar. 2020.

F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD. VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail assay (CE IVD). 2021. Available at: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/ventana-her2-dual-ish-dna-probe-cocktail-assay.html>. Último acesso em 27/06/2021.

FARHADIEH, R. D.; BULSTRODE, N. W.; CUGNO, S. **Plastic and reconstructive surgery**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; BUCHNER, A.; LANG, A.-G. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. **Behavior Research Methods**, vol. 41, no. 4, p. 1149–1160, Nov. 2009.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 63, no. 2, p. 378–383, Jun. 1969.

GARRISON, L. P. et al. The Lifetime Economic Burden of Inaccurate HER2 Testing: Estimating the Costs of False-Positive and False-Negative HER2 Test Results in US Patients with Early-Stage Breast Cancer. **Value in Health**, vol. 18, no. 4, p. 541–546, 2015.

GARRISON, L. P. et al. Cost-effectiveness analysis of trastuzumab in the adjuvant setting for treatment of HER2-positive breast cancer. **Cancer**, vol. 110, no. 3, p. 489–498, 2007.

GINGRAS, I.; GEBHART, G.; DE AZAMBUJA, E.; PICCART-GEBHART, M. HER2-positive breast cancer is lost in translation: Time for patient-centered research. **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 14, no. 11, p. 669–681, 2017.

GOLDSTRAW, P. et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, vol. 11, no. 1, p. 39–51, 2016.

YAZIJI H. et al. HER-2 Testing in Breast Cancer Using Parallel Tissue-Based Methods. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, vol. 291, no. 16, p. 1972–1977, 2004. .

HANNA, W. M.; SLODKOWSKA, E.; LU, F. I.; NAFISI, H.; NOFECH-MOZES, S. Comparative analysis of human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer according to 2007 and 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American pathologists guideline recommendations. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 35, no. 26, p. 3039–3045, 2017.

HARRISON, E. T. D. R. O. Finalfit: Quickly Create Elegant Regression Results Tables and Plots when Modelling. [R package]. 2019. Available at: <https://cran.r-project.org/package=finalfit>.

HAYES, D. F. HER2 and Breast Cancer — A Phenomenal Success Story. **New England Journal of Medicine**, vol. 381, no. 13, p. 1284–1286, 26 Sep. 2019.

HYNES, N. E.; HORSCH, K.; OLAYIOYE, M. A.; BADACHE, A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. **Endocrine-Related Cancer**, vol. 8, no. 3, p. 151–159, 2001.

INCA. **A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas**. Rio de Janeiro 2019: Instituto Nacional do Câncer José de Alencar da Silva, 2019. Available at: [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/a\\_situacao\\_ca\\_mama\\_brasil\\_2019.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf). Último acesso em 27/06/2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Atlas Online de Mortalidade [internet]. 2021. **Brasília, DF: Ministério da Saúde**. Available at: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml>. Último acesso em 27/06/2021.

KALLIONIEMI, O. et al. Association of C-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. **International Journal of Cancer**, vol. 49, no. 5, p. 650–655, 1991.

KASSAMBARA, ALBOUKADEL; KOSINSKI, MARCIN; BIECEK, P. survminer: Drawing Survival Curves using “ggplot2”. [R package]. 2019. Available at: <https://cran.r-project.org/package=survminer>. Último acesso em 27/06/2021

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, vol. 490, no. 7418, p. 61–70, 2012.

LAKHTAKIA, R. A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, vol. 14, no. 2, p. 166–169, 2014.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types

of breast cancer. **British Journal of Cancer**, vol. 93, no. 9, p. 1046–1052, 2005.

MALICKA-DURCZAK, A.; KORSKI, K.; IBBS, M. Comparison of in situ hybridization methods for the assessment of HER-2 / neu gene amplification status in breast cancer using a tissue microarray. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, vol. 17, no. 1, p. 44–49, 2012.

MIDDLETON, L. P. et al. Implementation of american society of clinical oncology/college of american pathologists HER2 guideline recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the nu. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, vol. 133, no. 5, p. 775–780, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 19. 2012. **Diário Oficial da União**. Available at: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2012/prt0019\\_25\\_07\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2012/prt0019_25_07_2012.html). Último acesso em 27/06/2021

MITRI, Z.; CONSTANTINE, T.; O'REGAN, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. **Chemotherapy Research and Practice**, vol. 2012, p. 1–7, 2012.

MOLINA, M. A. et al. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. **Cancer Research**, vol. 61, no. 12, p. 4744–4749, 2001.

OWENS, M. A.; HORTEN, B. C.; DA SILVA, M. M. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clinical Breast Cancer**, vol. 5, no. 1, p. 63–69, 2004.

PAULETTI, B. G.; DANDEKAR, S.; RONG, H.; RAMOS, L.; PENG, H.; SESHADRI, R.; SLAMON, D. J. Assessment of Methods for Tissue-Based Detection of the HER-2/neu Alteration in Human Breast Cancer: A Direct Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 18, no. 21, p. 3651–3664, 2000. .

PENAULT-LLORCA, F. et al. OPTIMIZATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF ERBB2 IN HUMAN BREAST CANCER: IMPACT OF FIXATION. **Journal of Pathology**, vol. 173, p. 65–75, 1994.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, England, vol. 406, no. 6797, p. 747–752, Aug. 2000.

PIANETTI, S.; ARSURA, M.; ROMIEU-MOUREZ, R.; COFFEY, R. J.; SONENSHEIN, G. E. Her-2/neu overexpression induces NF- $\kappa$ B via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. **Oncogene**, vol. 20, no. 11, p. 1287–1299, 2001.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, United States, vol. 353, no. 16, p. 2481–2488, Oct. 2005.

PROJECT, T. jamovi. jamovi. 2020. Available at: <https://www.jamovi.org>. Último acesso em 27/06/2021.

QUENEL, N. et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. **Breast cancer research and treatment**, Netherlands, vol. 35, no. 3, p. 283–291, Sep. 1995.

RAYMOND, E.; THIEBLEMONT, C.; ALRAN, S.; FAIVRE, S. Impact of the COVID-19 Outbreak on the Management of Patients with Cancer. **Targeted Oncology**, vol. 15, no. 3, p. 249–259, 2020.

RIESE, D. J.; STERN, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. **BioEssays**, vol. 20, no. 1, p. 41–48, 1998.

ROCHE, P. C. et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 94, no. 11, p. 855–857, 2002.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. **Stem Cells**, vol. 16, no. 6, p. 413–428, 1998.

SAPINO, A.; GOIA, M.; RECUPERO, D.; MARCHIÒ, C. Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: State of the art and controversial issues. **Frontiers in Oncology**, vol. 3 MAY, p. 129, 2013.

SCHWAB, M. et al. Amplification of N-myc in human neuroblastomas. **Trends in Genetics**, United States, vol. 1, no. C, p. 271–275, Jun. 1985.

SEIDMAN, A. D. et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 19, no. 10, p. 2587–2595, 2001.

SHAH, M. V. et al. Change in pattern of HER2 fluorescent in situ hybridization (FISH) results in breast cancers submitted for FISH testing: Experience of a reference laboratory using US Food and Drug Administration criteria and American Society of Clinical Oncology and Coll. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 34, no. 29, p. 3502–3510, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 71, no. 1, p. 7–33, 2021.

SIMON, R. et al. Patterns of HER-2 / neu Amplification and Over- expression in Primary

and Metastatic Breast Cancer We hypothesized that a high failure rate of patients on trastuzumab could result if some of the metastases were Results: FISH and IHC analyses gave the same. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, vol. 93, no. 15, p. 1141–1146, Aug. 2001.

SLAMON, D. J. . et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, vol. 344, no. 11, p. 783–792, 15 Mar. 2001.

SLAMON, D. J.; DEKERNION, J. B.; VERMA, I. M.; CLINE, M. J. Expression of cellular oncogenes in human malignancies. **Science**, United States, vol. 224, no. 4646, p. 256–262, Apr. 1984.

SLAMON, Dennis J. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, vol. 244, no. 4905, p. 707–712, 1989.

SLAMON, D. J. et al. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene. **Science**, United States, vol. 235, no. 4785, p. 177–182, Jan. 1987.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 98, no. 19, p. 10869–10874, Sep. 2001.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, United States, Feb. 2021.

TARANTINO, P.; MORGANTI, S.; CURIGLIANO, G. Targeting HER2 in breast cancer: new drugs and paradigms on the horizon. **Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy**, , p. 1–17, 23 Mar. 2021.

TERRY, M. B.; BELLANGER, M.; ZEINOMAR, N.; TEHRANIFAR, P.; TERRY, M. B. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? **Journal of Global Oncology**, no. 4, p. 1–16, 8 Jun. 2018.

TUMA, R. S. Inconsistency of HER2 test raises questions. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 99, no. 14, p. 1064–1065, 2007.

VALABREGA, G.; MONTEMURRO, F.; AGLIETTA, M. Trastuzumab: Mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. **Annals of Oncology**, vol. 18, no. 6, p. 977–984, 2007.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: Markers and models. **Nature Reviews Cancer**, vol. 5, no. 8, p. 591–602, 2005.

WELCH, H. G.; PROROK, P. C.; O'MALLEY, A. J.; KRAMER, B. S. Breast-cancer tumor size, overdiagnosis, and mammography screening effectiveness. **New England Journal of Medicine**, vol. 375, no. 15, p. 1438–1447, 2016.

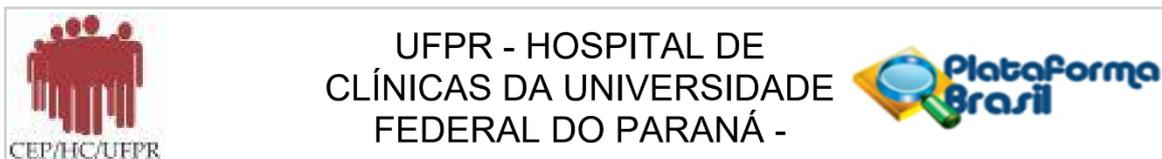
WOLFF, A. C. et al. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. **Journal of Oncology Practice**, vol. 14, no. 7, p. 437–441, 2018.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 31, no. 31, p. 3997–4013, 2013.

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. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 25, no. 1.

**ANEXO A.**

Aprovação pelo CEP do CHC/UFPR

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DOS RESULTADOS DE HIPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR HER2 EM CÂNCER DE MAMA POR IMUNOISTOQUÍMICA OU POR BIOLOGIA MOLECULAR (FISH OU SISH) EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO SUS

**Pesquisador:** SERGIO O. IOSHII

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23325419.1.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.763.458

**Apresentação do Projeto:**

Orientador: Sérgio O. Ioshii

Co-orientador: Sergio Padilha

Residente Bruno Ribeiro Batista

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo. Serão consultados os dados contidos no sistema eletrônico SIH do CHC-UFPR, bem como as lâminas armazenadas na Unidade de Anatomia Patológica do CHC-UFPR para avaliar os resultados de biópsia. Outros dados serão obtidos a partir do prontuário físico de cada paciente. Os dados serão coletados no período de seis meses (julho/2019 a janeiro/2020) e posteriormente transferidos para planilha Excel do Programa de processamento de texto com base na Web Google Docs™.

O uso de medicamentos para o tratamento de pacientes com HER2 positivo é condicionada à positividade de testes. O público a ser avaliado será composto por pacientes atendidas no CHC/UFPR com câncer de mama que foram testadas para avaliação da hiperexpressão do receptor HER2/neu por exame institucional de imunohistoquímica e da amplificação do HER2 por exame de FISH/SISH. Serão avaliados os resultados de biópsia de mama de janeiro de 2008 a junho de 2017, data de nascimento da paciente, idade da paciente ao diagnóstico, estadiamento clínico inicial, raça (auto declarada), data da IHQ e do FISH/SISH, perfil de receptor hormonal, subtipo histológico

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



UFPR - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 3.763.458

do câncer de mama, tipo de material analisado (biópsia por agulha grossa ou peça cirúrgica).

Os pesquisadores relatam como hipótese: Relacionar os métodos de pesquisa (IHQ e hibridização in situ) para amplificação de HER2/neu e demonstrar se a concordância entre esses métodos é similar a de outros países. Será investigado se existem resultados falsos negativos de FISH que impossibilitaram o uso de medicação alvo (trastuzumabe) no contexto do SUS.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Comparar os resultados para positividade de expressão HER2/neu conforme IHQ e hibridização in situ, de pacientes com câncer de mama do ambulatório de oncologia clínica do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

Objetivo Secundário:

Avaliar sobrevida conforme cada grupo identificado, bem como variáveis epidemiológicas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Uma vez que o estudo será realizado por meio de coleta de dados em prontuários, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos, sem exposição dos participantes da pesquisa a nenhum tipo de tratamento que possa trazer alguma injúria física, o único risco a que esta pesquisa será exposta é a possibilidade da divulgação indevida dos dados. Os pesquisadores comprometem-se a seguir os critérios da ética, mantendo sigilo dos dados coletados durante todas as etapas do processo.

Benefícios:

O benefício para os pacientes será melhor entendimento de perfis moleculares do câncer de mama, caso o resultado molecular do estudo seja positivo (de um teste anterior falso negativo), para que possa receber medicação anti-HER2. Para a comunidade haverá melhor entendimento do método para avaliar HER2, no intuito de diminuir casos de falso negativos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa adequada e relevante

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos presentes

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto de pesquisa aprovado

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



**UFPR - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 3.763.458

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto, conforme proposto, para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Os documentos da pesquisa devem ser mantidos arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1423208.pdf	13/10/2019 15:57:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TERMO_CONSENTIMENTO.pdf	13/10/2019 15:56:18	SERGIO O. IOSHII	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TERMO_CONSENTIMENTO.docx	13/10/2019 15:56:09	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	13/10/2019 15:55:16	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.doc	13/10/2019 15:55:08	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_ORIENTADOR_DO_PROJETO.pdf	13/10/2019 15:54:58	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_ORIENTADOR_DO_PROJETO.doc	13/10/2019 15:54:49	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UTOH_CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.pdf	13/10/2019 15:54:40	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e	UTOH_CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.doc	13/10/2019 15:54:33	SERGIO O. IOSHII	Aceito

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

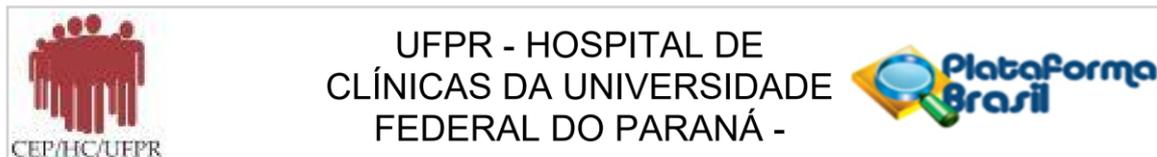
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.763.458

Infraestrutura	UTOH_CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.doc	13/10/2019 15:54:33	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Patologia_CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.pdf	13/10/2019 15:54:13	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Patologia_CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.doc	13/10/2019 15:54:03	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACOES_COMPROMISSO_EQUIPE_PESQUISA.pdf	13/10/2019 15:52:01	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACOES_COMPROMISSO_EQUIPE_PESQUISA.doc	13/10/2019 15:51:51	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoNovo.pdf	13/10/2019 15:50:34	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoNovo.doc	13/10/2019 15:50:20	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Outros	CHECKLIST_DOCUMENTAL_PROJETO_PESQUISA.pdf	13/10/2019 15:50:01	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Outros	CHECKLIST_DOCUMENTAL_PROJETO_PESQUISA.docx	13/10/2019 15:49:44	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Ausenciadecustos.pdf	06/09/2019 19:31:08	SERGIO O. IOSHII	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	06/09/2019 19:30:31	SERGIO O. IOSHII	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 12 de Dezembro de 2019

Assinado por:  
maria cristina sartor  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

**ANEXO B.**

Poder do teste para detecção de HER2 FN e Verd-HER2

