Sheila Cristina Lordelo Wludarski

**Comparação dos resultados de marcadores prognósticos e preditivos
(HER2 e receptores de estrógeno e progesterona) para
carcinoma de mama entre laboratórios locais e de referência no Brasil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Wludarski, Sheila Cristina Lordelo

Comparação dos resultados de marcadores prognósticos e preditivos (HER2 e receptores de estrógeno e progesterona) para carcinoma de mama entre laboratórios locais e de referência no Brasil / Sheila Cristina Lordelo Wludarski. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Carlos Eduardo Bacchi.

Descritores: 1.Carcinoma 2.Mama 3.Receptores estrogênicos 4.Receptores de progesterona 5.Genes erbB-2 6.Imunoistoquímica 7.Laboratórios 8.Brasil

USP/FM/DBD-392/10

Oração

de Almirante Hcart

Dai-nos força, Senhor,
para aceitar com
serenidade tudo o que
não possa ser mudado.

Dai-nos coragem
para mudar o que pode
e deve ser mudado.

E dai-nos sabedoria
para distinguir
uma coisa de outra.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Stela (*in memoriam*), exemplo de vida, a minhas irmãs Andreia e Adriana, minhas eternas amigas e ao meu marido Lisandro, meu amor e companheiro. Dedico a vocês quatro, que são as pessoas que mais amo em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Esses quatro anos em que desenvolvi esta tese foram uma jornada de desafio, construção e amadurecimento. Há tantos a agradecer, por tanto se dedicarem a mim....

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos E. Bacchi, pesquisador incansável na busca do conhecimento, pela confiança e oportunidade de desenvolver uma tese sob sua orientação. As minhas conquistas profissionais foram muito ampliadas ao seu lado. Os seus ensinamentos, sempre uma referência, com certeza guardarei por toda minha vida profissional.

“Se enxerguei onde enxerguei, é porque subi em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

À Dra. Maura M. Bacchi, pela amizade, carinho, confiança e incentivo dedicados a mim.

À família Consultoria em Patologia, cujo profissionalismo e dedicação são exemplos que me incentivaram na elaboração deste trabalho. Os meus sinceros agradecimentos pelo empenho e ajuda de todos, nas diversas etapas que viabilizaram este trabalho.

À minha mãe, por sua história de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as adversidades, dedicando a vida a mim e às minhas irmãs, e cujo exemplo de amor e honestidade sempre estará presente. Mulher de extrema coragem em sua luta incansável contra o câncer de mama, ensinou-me, através de seu sofrimento, o lado do paciente e, mesmo após sua morte, a necessidade de continuar a luta.

Ao meu marido, Lisandro, pelo seu amor e companherismo, pela compreensão, amizade, conselhos e apoio dispensado nesta tese e durante esses 10 anos de convivência. É um exemplo a ser seguido por sua dedicação, responsabilidade e carinho como marido e médico.

Às minha irmãs, Andreia e Adriana, fonte do meu orgulho. O carinho, amor e amizade que nos une é eterno.

À minha família, que, nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação ao presente. Obrigada pelo apoio e carinho.

Aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), pela oportunidade do aprendizado.

Aos professores que, gentilmente, aceitaram participar da Banca Examinadora deste trabalho.

A todos os meus amigos, os quais terão meu eterno agradecimento, pelo apoio e carinho durante a jornada.

Por fim, Àquele que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, e não somente nestes 4 anos: meu DEUS, obrigada! Mestre maior que me ilumina, ampara e nutre todos os dias, dá-me meios de capacitar-me para que meu caminho seja aberto a novas conquistas.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Carcinoma de mama: definição, aspectos históricos e situação atual no mundo e Brasil.....	1
1.2 Fatores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama.....	4
1.2.1 Avaliação do gene <i>HER2</i> e da proteína HER2.....	4
1.2.2 Avaliação de receptores hormonais.....	11
1.3 Laboratórios de Patologia e testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona.....	17
2 OBJETIVOS.....	24
3 MÉTODOS.....	25
3.1 Aprovação institucional da pesquisa	25
3.2 Laboratório referência.....	25
3.3 Revalidação dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência.....	26
3.3.1 Revalidação do teste de HER2 pelo laboratório referência.....	26
3.3.2 Revalidação do teste de receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência.....	32
3.4 Escolha dos laboratórios locais.....	38
3.5 Seleção dos casos.....	39
3.6 Avaliação morfológica.....	39
3.7 Levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais.....	40
3.8 Comparação dos resultados dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e referência.....	40
4 RESULTADOS.....	43

4.1 Revalidação dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência.....	43
4.1.1 Revalidação do teste de HER2 pelo laboratório referência.....	43
4.1.2 Revalidação do teste de receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência.....	47
4.2 Avaliação morfológica dos casos incluídos no estudo comparativo dos resultados dos marcadores prognósticos e preditivos para carcinoma de mama entre laboratórios locais e referência.....	49
4.3 Levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais.....	51
4.3.1 Localização dos laboratórios locais.....	51
4.3.2 Tipo de fixador e tempo de fixação utilizados nos laboratórios locais.....	52
4.3.3 Tipo de carcinoma de mama (invasivo ou “in situ”) submetido ao estudo imuno-histoquímico nos laboratórios locais.....	53
4.3.4 Uso de tecidos-controle adequados para imuno-histoquímica pelos laboratórios locais.....	54
4.3.5 Especificações dos anticorpos utilizados para os testes de HER2 e de receptores hormonais pelos laboratórios locais.....	55
4.3.6 Especificações dos métodos de recuperação antigênica utilizados pelos laboratórios locais.....	58
4.3.7 Especificações dos sistemas de detecção utilizados pelos laboratórios locais.....	60
4.4 Comparação dos resultados dos testes imuno-histoquímicos para proteína HER2 e receptores hormonais entre laboratórios locais e referência.....	61
4.4.1 Comparação dos resultados do teste de HER2 entre laboratórios locais e referência.....	61
4.4.2 Comparação dos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e referência.....	66
4.5 Critérios utilizados para interpretação dos resultados dos testes de HER2 e receptores hormonais nos laboratórios locais.....	72

5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÕES.....	87
7 REFERÊNCIAS.....	91
Apêndices	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: complexo avidina-biotina

ASCO: “American Society of Clinical Oncology”

CAP: “College of American Pathologists”

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CEP17: centrômero do cromossomo 17

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

EUA: Estados Unidos da América

FDA: “Food and Drug Administration”

FISH: hibridização “in situ” fluorescente

INCA: Instituto Nacional de Câncer

LL: laboratórios locais

LR: laboratório referência

LSAB: estreptavidina-biotina marcada

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAP: peroxidase anti-peroxidase

PBS: solução salina tamponada

RE: receptor de estrógeno

RP: receptor de progesterona

SOE: sem outra especificação

TMA: “microarray” de tecido

UKNEQAS: “United Kingdom National External Quality Assessment Service”

RESUMO

Wludarski SCL. *Comparação dos resultados de marcadores prognósticos e preditivos (HER2 e receptores de estrógeno e progesterona) para carcinoma de mama entre laboratórios locais e de referência no Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 112p

O câncer de mama corresponde a aproximadamente um quarto das neoplasias malignas em mulheres. A incidência do câncer de mama no Brasil é de cerca de 50.000 novos casos por ano, sendo considerado importante problema de saúde pública. HER2 e receptores hormonais (receptores de estrógeno e progesterona) são considerados os mais importantes marcadores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama. A amplificação do gene *HER2* ou a superexpressão da proteína HER2, que ocorre em cerca de 20 por cento dos carcinomas de mama, está associada a curso clínico mais agressivo e determina elegibilidade para terapia específica anti-HER2 com trastuzumabe. A terapia hormonal reduz em mais de 50 por cento o risco relativo de recorrência da doença em pacientes com tumores sensíveis a esse tratamento. Os testes de HER2 e receptores hormonais são partes essenciais da avaliação clínica das pacientes com carcinoma de mama; resultados precisos são fundamentais na identificação de pacientes que podem ser beneficiadas por terapias específicas. O presente estudo investigou a concordância nos resultados dos testes de HER2 e receptores hormonais determinados por imuno-histoquímica em 500

carcinomas invasivos de mama entre um laboratório referência e laboratórios locais de todas as regiões geográficas do Brasil. Os resultados demonstram baixa concordância geral (171/500 casos, 34,2 por cento) em relação aos resultados do teste de HER2 entre laboratórios locais e referência, o que pode estar relacionado ao baixo volume de testes de HER2 realizados, inexperiência com o sistema de escores de HER2 e/ou questões técnicas relacionadas à imuno-histoquímica nos laboratórios locais. A concordância nos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona foi de 89,4 por cento (447/500 casos) e de 85,0 por cento (425/500 casos), respectivamente, entre laboratórios locais e referência. Padronização dos testes de HER2 e receptores hormonais com medidas de controle de qualidade rigorosas por laboratórios locais é fortemente recomendada para se evitar o tratamento inadequado de pacientes com câncer de mama.

Descritores: 1.Carcinoma 2.Mama 3.Receptores estrogênicos 4.Receptores de progesterona 5.Genes erbB-2 6.Imunoistoquímica 7.Laboratórios 8.Brasil

SUMMARY

Wludarski SCL. *Comparison of results of prognostic and predictive markers (HER2 and estrogen and progesterone receptors) for breast carcinoma between local and reference laboratories in Brazil* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 112p

Breast cancer accounts for approximately one quarter of all cancers in females. The incidence of breast cancer in Brazil is about 50,000 new cases per year, and it is considered an important public health problem. HER2 and hormone receptors (estrogen and progesterone receptors) are considered the main prognostic and predictive markers for breast carcinoma. *HER2* gene amplification or HER2 protein overexpression, detected in about 20 percent of breast carcinomas, predicts a more aggressive clinical course and determines eligibility for targeted therapy with trastuzumab. Hormonal therapy reduces the relative risk of recurrence by more than 50% in breast cancer patients with hormone-sensitive tumors. HER2 and hormone receptors testing has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate results are critical in identifying patients who may benefit from targeted therapy. The present study investigated the concordance in the results of HER2 and hormone receptors immunohistochemistry assays performed in 500 invasive breast carcinomas between a reference laboratory and local laboratories from all geographic regions of Brazil. Our results showed an overall poor concordance (171/500

cases, 34.2 percent) regarding HER2 results between local and reference laboratories, which may be related to the low-volume load of HER2 assays, inexperience with HER2 scoring system, and/or technical issues related to immunohistochemistry in local laboratories. The concordance of estrogen and progesterone receptors results was 89.4 percent (447/500 cases) and 85.0 percent (425/500 cases), respectively, between local and reference laboratories. Standardization of HER2 and hormone receptors testing with rigorous quality control measures by local laboratories is highly recommended in order to avoid erroneous treatment of breast cancer patients.

Descriptors: 1.Carcinoma 2.Breast 3.Estrogen receptors 4.Progesterone receptors 5. erbB-2 genes 6.Immunohistochemistry 7.Laboratories 8.Brazil

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de mama: definição, aspectos históricos e situação atual no mundo e Brasil

O carcinoma invasivo de mama é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como neoplasia epitelial maligna caracterizada pela invasão de tecidos adjacentes e pela tendência de metastatizar à distância. A maioria origina-se do epitélio do parênquima mamário, predominantemente das células da unidade ducto-lobular terminal. A etiologia do carcinoma de mama é multifatorial e resulta da interação de fatores genéticos com estilo de vida, dieta, hábitos reprodutivos e o meio ambiente. Acredita-se que 90-95% dos carcinomas são esporádicos (não-familiares) e 5-10%, hereditários (Tavassoli e Devilee, 2003).

Os carcinomas de mama demonstram grande variedade de tipos histológicos, os quais apresentam características clínicas e prognósticas específicas. A OMS subdivide-os em ductal, lobular, tubular, cribriforme, medular, mucinoso, neuroendócrino, papilífero, micropapilífero, apócrino, metaplásico, rico em lipídeos, secretor, oncocítico, adenoide cístico, de células acinares, de células claras ricas em glicogênio, sebáceo e inflamatório. O carcinoma ductal invasivo é o mais comumente diagnosticado, representando cerca de 79% dos casos de carcinoma de mama (Figura 1A). O segundo tipo histológico mais frequente é o carcinoma lobular invasivo, que tende a ser multicêntrico e bilateral (Figura 1B).

Figura 1. Tipos histológicos mais frequentes do carcinoma invasivo de mama. A: Carcinoma ductal invasivo (hematoxilina-eosina, X400). B: Carcinoma lobular invasivo (hematoxilina-eosina, X400)

O câncer de mama tem sido descrito há séculos. É quase impossível determinar o primeiro caso de câncer de mama diagnosticado historicamente. Entretanto, acredita-se que os primeiros casos registrados da doença datam de 3000-2500 a.C., descritos em um papiro médico-cirúrgico do Egito antigo denominado Edwin Smith. O tratamento, na época, era limitado à cauterização da lesão com brocas de fogo. Leonides, um médico grego do século I d.C., foi, provavelmente, o primeiro a realizar uma remoção cirúrgica da mama, em Alexandria. Embora os médicos pudessem remover esses tumores em alguns casos, eram, geralmente, incapazes de interromper o curso natural e devastador da doença. Esses eram os conhecimentos predominantes em relação ao câncer de mama, na época. Quase dois milênios se passaram antes que qualquer inovação se desenvolvesse na luta contra o câncer de mama. Em 1800, Dr. William Halsted descreveu a mastectomia radical, que seria realizada nos quase 100

anos subsequentes. Apesar de essa cirurgia ser destrutiva e desfigurante e apresentar elevado risco pós-operatório, as taxas de sobrevida melhoraram cerca de 40%. No final século XIX, duas descobertas tiveram enormes implicações no futuro manejo do câncer da mama. A primeira foi a descoberta dos raios-X, que levaria, posteriormente, ao desenvolvimento da mamografia e ao tratamento do carcinoma de mama por radioterapia; a segunda foi a revelação de que o câncer de mama era hormônio-dependente. Ainda no século XIX, David Patey descreveu técnica modificada da mastectomia radical padrão mas que preservava os músculos peitorais, evitando, assim, o tratamento mutilante. Em meados dos anos 50 e 60, a quimioterapia adjuvante para o câncer de mama tornou-se amplamente aceita, assim como a eficiência da radioterapia, o que melhorou drasticamente a sobrevida de pacientes com câncer de mama (Donegan e Spratt, 2002).

Atualmente, a descoberta de exames cada vez mais sofisticados para a detecção precoce do câncer de mama, associada à melhoria das técnicas cirúrgicas, à utilização otimizada da quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia e, mais recentemente, ao emprego do anticorpo monoclonal anti-HER2 trastuzumabe (Herceptin®, Genentech, São Francisco, Estados Unidos da América), melhoraram efetivamente o diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer de mama. Atualmente, a OMS estima que ocorram mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo, por ano, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA),

cerca de 49 mil novos casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres, por ano. Além disso, o câncer de mama constitui a primeira causa de morte por câncer entre mulheres no mundo. Semelhantemente ao observado na população mundial, o câncer de mama também é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres brasileiras, com 11.735 mortes registradas em 2008. Para 2010, a estimativa é de 49.240 novos casos de carcinoma de mama (Instituto Nacional de Câncer, 2010).

1.2 Fatores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama

Fatores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama podem ser classificados como clínicos (idade e “status” hormonal), anatomopatológicos (tipo histológico, grau histológico e “status” linfonodal) e biológicos. Destacam-se entre os fatores biológicos o gene *HER2* e sua proteína homônima, além dos receptores de estrógeno e progesterona. O câncer de mama é potencialmente curável, sendo a avaliação precisa desses fatores prognósticos e preditivos essencial no sucesso do tratamento.

1.2.1 Avaliação do gene *HER2* e da proteína HER2

O gene *HER2* e sua proteína homônima constituem fator prognóstico e preditivo de suma importância em carcinoma de mama, sendo

considerado um “divisor de águas” no manejo clínico da doença. O *HER2* é oncogene mapeado no cromossomo 17q21, que codifica proteína receptora de fator de crescimento transmembrana denominada receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (também referido como HER2 ou ERBB2 ou c-erbB2). Essa proteína apresenta atividade tirosino-quinase e está envolvida em processos de sinalização intracelular que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular (Yarden, 2001; Yarden e Sliwkowski, 2001). O gene *HER2* foi descrito pela primeira vez na literatura em 1984 (Schechter et al., 1984). Em 1987, Dr. Dennis Slamon, chefe da divisão de Hematologia e Oncologia da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA), Estados Unidos da América (EUA), demonstrou que 30% de 189 pacientes portadoras de câncer de mama estudadas apresentavam amplificação do gene *HER2* e curso clínico mais agressivo, com pior resposta à terapia hormonal (Slamon et al., 1987). Esses resultados contribuíram para que Slamon identificasse importante subgrupo de pacientes com câncer de mama com características clínicas e prognósticas peculiares. Slamon e a empresa de biotecnologia americana Genentech desenvolveram, em conjunto, anticorpo monoclonal anti-HER2, na tentativa de bloquear os sinais intracelulares relacionados ao crescimento e desenvolvimento celulares. Posteriormente, esse anticorpo foi humanizado, criando-se o anticorpo monoclonal trastuzumabe, o qual se ligava à proteína HER2 na superfície das células neoplásicas do carcinoma de mama. Trabalhos posteriores realizados em laboratório demonstraram que, embora as células normais também tivessem grau menor de expressão de HER2, o

anticorpo só era efetivo em células de carcinoma de mama que apresentavam aumento expressivo da proteína HER2. Slamon conduziu, posteriormente, estudo clínico com pacientes HER2-positivas que apresentavam metástases de carcinoma de mama, comparando o uso de quimioterapia associada ao trastuzumabe com tratamento quimioterápico convencional exclusivo. Os resultados demonstraram resposta efetiva e mais duradoura no grupo de pacientes que receberam tratamento quimioterápico associado ao uso do novo anticorpo anti-HER2 (Slamon et al., 2001). Esse estudo clínico permitiu que a agência reguladora americana “Food and Drug Administration” (FDA) aprovasse, em 1998, o trastuzumabe para tratamento de mulheres cujo câncer de mama era metastático e com intensa expressão da proteína HER2. Em 2005, os resultados de ensaios clínicos em milhares de mulheres com câncer de mama em estágio precoce demonstraram que o emprego do trastuzumabe reduzia o risco de recorrência e mortalidade por carcinoma de mama em metade e em um terço dos casos, respectivamente (Romond et al., 2005; Piccart-Gebhart et al., 2005; Joensuu et al., 2006).

Em resumo, todos esses estudos contribuíram para o que sabemos hoje sobre HER2: pacientes portadoras de câncer de mama com superexpressão da proteína HER2 ou amplificação do gene *HER2* apresentam curso clínico mais agressivo, com pior resposta à terapia hormonal (resistência relativa) e maior sensibilidade a regimes quimioterápicos baseados em antraciclinas; são também elegíveis para tratamento alvo-específico anti-HER2 com trastuzumabe (Slamon et al.,

1987; Tandon et al., 1989; Paik et al., 1990; Wright et al., 1992; Muss et al., 1994; Ross e Fletcher, 1999; Cobleigh et al., 1999; Fornier et al., 2000; Slamon et al., 2001; Vogel et al., 2002; Tedesco et al., 2004; De Laurentiis et al., 2005). Infelizmente, o uso do trastuzumabe pode trazer efeitos colaterais; entre eles, o mais preocupante, embora não tão frequente, é a toxicidade cardíaca, que ocorre em cerca de 1,4% dos pacientes (Vogel et al., 2002; Baselga et al., 2005), que se eleva para níveis inaceitáveis quando o anticorpo é combinado com outras drogas cardiotóxicas, como paclitaxel e antraciclinas (Leyland-Jones et al., 2003; Ross et al., 2009). Além disso, o custo do tratamento com trastuzumabe é bastante elevado (Cox et al., 2004; Elkin et al., 2004). Essas considerações reforçam a importância da precisão nos resultados do teste de HER2 em carcinoma de mama para caracterizar com precisão quais as pacientes que realmente se beneficiariam com o tratamento imunoterápico.

Atualmente, o teste de HER2 pode ser realizado através, principalmente, de dois métodos laboratoriais, a partir de blocos de parafina com carcinoma de mama: hibridização “in situ” fluorescente (FISH), que avalia a amplificação (número de cópias) do gene *HER2* (Persons et al., 2006; Dal Lago et al., 2006), e estudo imuno-histoquímico, que identifica a presença ou não da superexpressão da proteína HER2. Ambos os métodos são aprovados pela FDA (Birner et al., 2001; Wolff et al., 2007) e apresentam vantagens e desvantagens (Schnitt e Jacobs, 2001; Hammock et al., 2003; Press et al., 1994; Press et al., 2002a; Powell et al., 2007; Wludarski e Bacchi, 2008; Sauter et al., 2009).

O mais recente consenso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP) recomenda, para a realização do teste de HER2, uma série de diretrizes, que podem ser divididas em fatores pré-analíticos, fatores analíticos e pós-analíticos (Wolff et al., 2007). Entre os fatores pré-analíticos, destacam-se o tipo do fixador utilizado e o tempo de fixação do espécime. O consenso recomenda que o tecido seja fixado o mais precocemente possível com formalina neutra e tamponada por período mínimo de 6 horas e máximo de 48 horas. Quanto aos fatores analíticos, o consenso destaca a utilização de anticorpos antiproteína HER2 e metodologia padronizados e validados, uso de controles adequados nas reações imuno-histoquímicas, participação de profissionais técnicos especializados e material laboratorial adequadamente calibrado. Entre os fatores pós-analíticos, encontram-se os critérios utilizados pelo médico patologista para interpretação dos resultados. Para a interpretação do teste de HER2 por imuno-histoquímica, o consenso da ASCO/CAP recomenda sistema semiquantitativo de escores (escores 0, 1+, 2+ e 3+) com resultados negativo, duvidoso e positivo (Figura 2). O resultado do teste imuno-histoquímico de HER2 é considerado negativo se o escore for 0 (ausência de imunocoloração de membrana celular) ou 1+ (imunocoloração fraca e incompleta em parte da membrana celular em qualquer porcentagem de células neoplásicas); o resultado é considerado positivo se o escore for 3+ (imunocoloração de forte intensidade e uniforme em toda a membrana celular em mais de 30% das células neoplásicas); o resultado é considerado duvidoso se o escore for 2+ (imunocoloração de

forte intensidade e uniforme em toda a membrana celular em menos de 30% das células tumorais ou imunocoloração fraca e uniforme em toda a membrana celular em pelo menos 10% das células neoplásicas). Os resultados duvidosos (escore 2+) devem ser submetidos à pesquisa da amplificação do gene *HER2* através do teste de FISH.

Figura 2. Teste de HER2 por imuno-histoquímica em carcinoma invasivo de mama (coloração imuno-histoquímica, contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400). A: Escore 0 (resultado negativo). B: Escore 1+ (resultado negativo). C: Escore 2+ (resultado duvidoso). D: Escore 3+ (resultado positivo)

Para o teste de HER2 por FISH, o mais recente consenso da ASCO/CAP recomenda que os resultados sejam definidos como amplificado, duvidoso ou não amplificado (Figura 3). Os critérios para a determinação da presença ou ausência da amplificação do gene *HER2* por FISH são sumarizados a seguir: amplificação gênica é definida pela presença de mais de 6 cópias do gene *HER2* por núcleo ou pela razão *HER2*/centrômero do cromossomo 17 (CEP17) maior que 2,2; a ausência de amplificação é definida pela presença de menos de 4 cópias do gene *HER2* por núcleo ou pela razão *HER2*/CEP 17 menor que 1,8; o resultado é considerado duvidoso por FISH quando da presença de 4-6 cópias do gene *HER2* por núcleo ou pela razão *HER2*/CEP17 variando entre 1,8 e 2,2.

Figura 3. Fotomicrografias do teste de HER2 por FISH em carcinoma de mama. A: carcinoma invasivo de mama com ausência de amplificação do gene *HER2* (razão *HER2*/CEP17=1). B: carcinoma invasivo de mama com amplificação do gene *HER2* (razão *HER2*/CEP17=5)

Esse consenso também recomenda que o teste de HER2 seja revalidado periodicamente pelos laboratórios que o realizam, sendo aconselhável que participem de programas de controle de qualidade externos (Wolff et al., 2007). A finalidade principal dessas medidas seria assegurar resultados fidedignos para o tratamento adequado de pacientes com carcinoma de mama.

Diversos trabalhos na literatura compararam os resultados do teste de HER2 através de imuno-histoquímica e FISH, havendo boa concordância entre os dois métodos (Jacobs et al., 1999; Gancberg et al., 2000; Ridolfi et al., 2000; Pauletti et al., 2000; Perez et al., 2002; Press et al., 2002a; Bilous et al., 2003; Zarbo e Hammond, 2003; Hammock et al., 2003; Dowsett et al., 2003; Owens et al., 2004; Yaziji et al., 2004; Isola et al., 2004; Vera-Román e Rubio-Martinez, 2004; Ainsworth et al., 2005; Kulka et al., 2006; Rossi et al., 2006; Powell et al., 2007; Gown et al., 2008; Van der Vegt et al., 2009). Alguns autores recomendam a adequada padronização do teste de HER2, com a finalidade de se evitar discordância de resultados entre os métodos (Ellis et al., 2004; Hanna et al., 2007).

1.2.2 Avaliação de receptores hormonais

A maioria dos carcinomas de mama é hormônio-dependente. Os hormônios naturais que influenciam o câncer de mama são o estrógeno e a progesterona. O estrógeno é produzido por dois diferentes órgãos nos

seres humanos. Nas mulheres pré-menopausadas, a maior parte do estrógeno é produzida pelos ovários em resposta a estímulo pituitário a partir dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante. Nas mulheres pós-menopausadas, os ovários praticamente não produzem estrógeno. Nessas mulheres, o estrógeno é produzido a partir de seus precursores (testosterona e androstenediona), produzidos pela glândula adrenal e convertidos no tecido adiposo periférico em estradiol e estrona através da via de aromatização.

A primeira evidência clínica da importância dos receptores hormonais em câncer de mama foi reportada, em 1896, pelo cirurgião escocês Beatson, que observou melhora clínica em algumas pacientes jovens com câncer de mama avançado submetidas à ooforectomia. Beatson presumiu que a interrupção da conexão entre os ovários e a mama reduzia a disponibilidade de estrógeno para o tumor (Beatson, 1896). Contudo, a proteína relacionada aos receptores de estrógeno só foi caracterizada no final da década de 60. Inicialmente, a proteína receptora de estrógeno era quantificada utilizando-se metodologia bioquímica que dependia da homogeneização do tecido tumoral fresco congelado, seguida de centrifugação para obtenção de citosol puro. Parcelas desse citosol eram incubadas com grandes quantidades de estradiol-17 β radioativo juntamente com competidor mimetizador do estrógeno não radioativo (Jensen et al., 1967). Em 1977, Knight et al. demonstraram, em estudo envolvendo 145 pacientes com carcinoma de mama, que os tumores sem expressão de receptor de estrógeno estavam associados à recorrência precoce,

independentemente de outros fatores prognósticos, entre os quais o “status” dos linfonodos axilares e o tamanho do tumor (Knight et al., 1977). A disponibilidade de anticorpo monoclonal para pesquisa da proteína receptora de estrógeno só ocorreria na década de 80. Paralelamente ao desenvolvimento de novas técnicas para avaliação da expressão de receptores de estrógeno em câncer de mama, muitos estudos clínicos passaram a demonstrar que os tratamentos endócrinos anti-hormonais, utilizados em pacientes com câncer de mama que expressavam receptores de estrógeno, eram altamente eficazes, reduzindo os índices de morbidade e mortalidade pela doença, apresentando-se como excelente estratégia no tratamento da neoplasia (Fisher et al., 1981; Fisher et al., 1983; Ellis et al., 2004; EBCTCG, 2005; Gown, 2008; Hammond et al., 2010). A partir da década de 90, o desenvolvimento de novos métodos de recuperação antigênica e sistemas de detecção tornou viável a pesquisa de receptores de estrógeno em tecidos incluídos em parafina. Trabalhos posteriores compararam os métodos bioquímico e imuno-histoquímico para a pesquisa de receptores de estrógeno e demonstraram a superioridade do último, universalizando a pesquisa desses receptores em câncer de mama (McCarty et al., 1985; DeSombre et al., 1986; Cowen et al., 1990; Barnes et al., 1996; Harvey et al., 1999; Elledge et al., 2000).

Sabe-se que cerca de 60-70% dos carcinomas de mama apresentam expressão de receptor de estrógeno (Nadji et al., 2005). A análise da expressão de receptor de progesterona é geralmente realizada em conjunto com o teste de receptor de estrógeno. Os receptores de

progesterona também foram inicialmente quantificados por método bioquímico para posterior avaliação imuno-histoquímica. Demonstrou-se que a expressão de receptores de progesterona estava associada a melhores taxas de sobrevida e menores taxas de recorrência (Mohsin et al., 2004). Atualmente, sabe-se que pacientes com carcinoma de mama positivo para receptores hormonais têm melhor prognóstico do que aquelas com tumores positivos apenas para receptor de estrógeno, que, por sua vez, têm prognóstico melhor que os negativos para receptores hormonais (Bardou et al., 2003).

Atualmente, a imuno-histoquímica é o método mais comumente utilizado para a avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona. O baixo custo, segurança e a elevada aplicabilidade em diversos tipos de materiais (blocos de parafina, material citológico e tecido congelado) são suas grandes vantagens. O teste imuno-histoquímico para receptores hormonais pode ser realizado com a utilização de diferentes anticorpos, métodos de recuperação antigênica e sistemas de detecção (Barnes et al., 1996; Harvey et al., 1999; Press et al., 2002b; Cheang et al., 2006).

O último consenso da ASCO/CAP (Hammond et al., 2010) adota várias recomendações relacionadas ao teste de receptores de estrógeno e progesterona: fixação adequada do tumor (fixação precoce em formalina neutra e tamponada por período de 6 a 72 horas), utilização de anticorpos e metodologia padronizados e validados, uso de controles adequados nas reações imuno-histoquímicas, participação de profissionais

técnicos especializados, material laboratorial adequadamente calibrado e participação em programas externos de controle de qualidade. Para interpretação dos resultados do teste imuno-histoquímico de receptores de estrógeno e progesterona (Figura 4), os critérios propostos por esse consenso são: considera-se o resultado positivo se a imunocoloração for observada em pelo menos 1% dos núcleos das células neoplásicas; considera-se o resultado negativo se a imunocoloração for observada em menos de 1% dos núcleos das células neoplásicas.

Figura 4. Carcinoma invasivo de mama positivo para receptores hormonais (coloração imuno-histoquímica, contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400). A: Imunocoloração nuclear para receptor de estrógeno. B: Imunocoloração nuclear para receptor de progesterona

Estudos revelaram que a expressão nuclear de receptores hormonais em pelo menos 1% das células neoplásicas está associada à resposta clínica significativa ao tamoxifeno e outros tratamentos hormonais (Harvey et al., 1999; Yamashita et al., 2006). Por esse motivo, todos os

carcinomas de mama devem ser testados para receptores de estrógeno e progesterona.

O tamoxifeno, principal droga utilizada no tratamento hormonal do carcinoma de mama, foi descoberto num programa de seleção de agentes anticoncepcionais conduzido por Harper e Walpole em 1967, no Reino Unido. De 1971 a 1976, foram estudadas e demonstradas as potentes propriedades biológicas do 4-hidroxitamoxifeno contra o câncer da mama. O tamoxifeno foi, finalmente, aprovado para uso em pacientes com carcinoma de mama pela agência reguladora americana FDA em 30 de dezembro de 1977. O tamoxifeno é definido como modulador seletivo de receptores de estrógeno. Apresenta complexo espectro de efeitos farmacológicos, tanto antagonistas quanto agonistas do estrógeno, induz dimerização e translocação nuclear, além de mediar diferentes ligações de coativadores e correpresores dos receptores de estrógeno. Em geral, o tratamento com tamoxifeno é realizado pelo período de 5 anos e está associado à redução de recorrência local e na mama contralateral e redução da mortalidade por carcinoma de mama (Jordan, 2002; EBCTCG, 2005). Outro grupo de drogas utilizadas atualmente no tratamento hormonal do carcinoma de mama é o dos inibidores de aromatase. Essa classe de agentes bloqueia a conversão dos precursores de estrógeno produzidos pela adrenal no tecido adiposo periférico e nos carcinomas de mama. Estudos recentes demonstraram que os inibidores de aromatase são ligeiramente mais eficazes que o tamoxifeno tanto no tratamento adjuvante do carcinoma de mama como no tratamento de doença metastática (Mauri et al., 2006; Burstein et al., 2010).

A terapia hormonal pode ser utilizada isoladamente ou associada à quimioterapia em pacientes com carcinoma de mama. Efeitos colaterais, incluindo eventos tromboembólicos e o desenvolvimento de carcinoma de endométrio, podem estar associados ao uso de tamoxifeno (Deligdisch et al., 2000; Hernandez et al., 2009). Além disso, há considerável custo associado à hormonioterapia em câncer de mama devido à prolongada duração do tratamento (Hind et al., 2007). Essas considerações salientam a necessidade de precisão nos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona (Allred, 2008b).

1.3 Laboratórios de Patologia e testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona

Existem diferentes tipos de atuação dos laboratórios de Patologia na comunidade médica. Os laboratórios de Patologia podem ser classificados como laboratórios locais, que avaliam casos da comunidade onde estão inseridos e realizam pequeno número de testes diagnósticos (menos de 100 testes/mês), laboratórios centrais, que avaliam casos apenas da região geográfica onde estão inseridos e realizam número intermediário de testes diagnósticos, ou laboratórios-referência, que avaliam casos das várias regiões geográficas de um país e realizam grande número de testes diagnósticos (Paik et al., 2002; Reddy et al., 2006).

Qualquer laboratório, independentemente do tipo de atuação, pode realizar os testes de HER2 e de receptores de estrógeno e

progesterona. A precisão nos resultados desses testes é, contudo, passo fundamental na definição da estratégia terapêutica em câncer de mama.

Infelizmente, há vários relatos na literatura sobre discrepâncias nos resultados do teste de HER2 (Paik et al., 2002; Roche et al., 2002; Press et al., 2005; Perez et al., 2006; Reddy et al., 2006; Papadopoulos et al., 2007; O'Malley et al., 2008; Umemura et al., 2008) e receptores hormonais (Allred et al., 1998; Rhodes et al., 2000a,b,c; Layfield et al., 2000; Rhodes et al., 2001; Regitnig et al., 2002; Parker et al., 2002; Layfield et al., 2003; Wells et al., 2004; Diaz et al., 2005; Phillips et al., 2007; Francis et al., 2007; Viale et al., 2007; Allred, 2008a,b; Badve et al., 2008; Hede, 2008; Mathews, 2008; Cameron, 2009; Gelber et al., 2009) entre diferentes laboratórios de diversos países. As explicações para as discordâncias nos resultados entre os laboratórios estariam relacionadas à fixação inadequada do espécime (demora para início da fixação, uso de fixador inadequado e tempo de fixação reduzido ou prolongado demais), metodologia não validada com estudo clínico ou laboratórios acreditados, uso de controles inadequados ou mesmo ausência deles, participação de profissionais técnicos não especializados e/ou não treinados, maquinário laboratorial inadequadamente calibrado ou conservado e utilização de critérios diversos para interpretação dos resultados.

Em relação ao teste de HER2, Paik et al., em 2002, reviram 104 casos considerados HER2-positivos em laboratórios locais e confirmaram que cerca de 79% deles eram realmente HER2-positivos através de HercepTestTM e FISH (Paik et al., 2002). No mesmo ano, Roche

et al. compararam os resultados de 119 casos HER2-positivos (somente escore 3+) avaliados em 65 diferentes laboratórios locais dos Estados Unidos com os resultados obtidos em laboratório central americano, havendo concordância de 74% entre eles (Roche et al., 2002). Press et al., em estudo conjunto entre os Estados Unidos e Suíça, retestaram 1291 casos de carcinoma de mama que apresentavam teste de HER2 por imuno-histoquímica prévio em laboratórios locais. Os autores encontraram 96,1% de concordância entre os resultados dos casos HER2-negativos (escores 0 e 1+) e 51,7% entre casos que foram classificados com escores 2+ e 3+ (Press et al., 2005). Perez et al., em 2006, relataram que, dependendo do método imuno-histoquímico utilizado, entre 18,4% e 25,0% dos casos considerados HER2-positivos pelos laboratórios locais eram, de fato, HER2-negativos em laboratório central (Perez et al., 2006). No mesmo ano, Reddy et al. estudaram 973 casos de carcinoma de mama que apresentavam teste prévio de HER2 em laboratórios locais, incluindo casos HER2-negativos e HER2-positivos. A concordância entre os resultados obtidos nos laboratórios locais e em laboratório referência para os escores 0, 1+, 2+ e 3+ foi de 34%, 54%, 26% e 77%, respectivamente. Esse estudo demonstrou taxas de resultados falso-positivos e falso-negativos de 14% e 18%, respectivamente, nos laboratórios americanos classificados como locais (Reddy et al., 2006). Em 2007, Papadopoulos et al. compararam os resultados do teste imuno-histoquímico de HER2 entre laboratórios locais e centrais na Grécia. Esses autores demonstraram 85% de concordância entre os resultados para os casos negativos (escores 0 e 1+), 80% para os casos duvidosos (escore 2+)

e 63% de concordância para os casos positivos (escore 3+) (Papadopoulos et al., 2007). O'Malley et al., em 2008, demonstraram concordância variando de 79,3% a 89,6% em 505 casos HER2-positivos testados e de 94,8% a 100% em 205 casos HER2-negativos entre laboratórios locais e centrais no Canadá, dependendo do método imuno-histoquímico utilizado (O'Malley et al., 2008).

Em relação ao teste de receptores de estrógeno de progesterona, estudos na literatura também demonstraram discordâncias nos resultados entre diferentes laboratórios. Em 2000, Rhodes et al. apresentaram considerável discordância interlaboratorial (200 laboratórios de 26 países) nos resultados do teste de receptor de estrógeno, especialmente nos casos de carcinoma de mama com baixa expressão desse receptor, com taxa de falso-negativo variando de 30% a 60%. De acordo com esses autores, essa discordância estava, provavelmente, relacionada às diferentes metodologias imuno-histoquímicas utilizadas (Rhodes et al., 2000c). Em 2001, os mesmos autores, em estudo realizado entre agosto de 1996 e setembro de 1998 envolvendo laboratórios que participavam de programa de qualidade externa, afirmaram que apenas 24 (36%) dos 66 laboratórios avaliados (92% deles europeus) apresentavam testes de receptores hormonais confiáveis. Eles demonstraram que fatores técnicos relacionados à recuperação antigênica foram decisivos na determinação dessas divergências interlaboratoriais. Testes confiáveis foram encontrados na maioria dos centros que sabidamente ofereciam testes validados através de estudos clínicos. A sensibilidade inadequada dos

testes, com consequente imunocoloração de baixa intensidade, foi a principal causa da divergência nos resultados entre os diferentes laboratórios que utilizavam micro-ondas para recuperação antigênica: o tempo de aquecimento demasiadamente curto foi identificado como o principal fator contributivo. Esses autores também demonstraram que a participação contínua em programas externos de controle de qualidade era forma eficaz para identificar e melhorar as variáveis que influenciavam a confiabilidade dos testes de receptores de estrógeno e progesterona, pois permitiam a validação e padronização das técnicas imuno-histoquímicas (Rhodes et al., 2001). Regitnig et al. investigaram a variabilidade nos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona entre diferentes laboratórios da Áustria e detectaram que a variabilidade nos resultados era mais elevada quando os laboratórios usavam seu próprio protocolo imuno-histoquímico (Regitnig et al., 2002). Em 2007, Viale et al. avaliaram os resultados obtidos no teste de receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e centrais de 25 países, em número significativo de pacientes com carcinoma de mama. A concordância geral entre laboratórios locais e centrais foi de 97,6% para o teste de receptor de estrógeno e de 80,2% para o teste de receptor de progesterona. Dos 105 tumores considerados negativos para receptor de estrógeno em laboratórios locais, 81 (77,1%) demonstraram pelo menos 1% de células positivas nos laboratórios centrais. Ainda nesse estudo, dos 6.100 tumores positivos para receptor de estrógeno nos laboratórios locais, 66 (1,1%) foram considerados negativos em laboratórios centrais. A discordância foi mais acentuada para o

teste de receptor de progesterona: de 1.223 tumores considerados negativos para receptor de progesterona em laboratórios locais, 852 (69,7%) demonstraram pelo menos 1% de células positivas nos laboratórios centrais; de 4.014 tumores positivos para receptor de progesterona nos laboratórios locais, 183 (4,6%) foram considerados negativos em laboratórios centrais. Devido a esses resultados, esses autores recomendaram a revisão dos testes de receptores hormonais em laboratórios centrais sempre que possível (Viale et al., 2007). Badve et al. demonstraram taxa da concordância de 90,2% para o teste de receptor de estrógeno entre laboratórios locais e centrais, com taxas de falso-negativo e falso-positivo de 8% e 11%, respectivamente. Para o teste de receptor de progesterona, a concordância entre laboratórios locais e centrais foi de 84,4%, com taxas de falso-negativo e falso-positivo de 20% e 11%, respectivamente (Badve et al., 2008). Em 2005, uma mulher diagnosticada com carcinoma lobular da mama recebeu resultado negativo no teste de receptores hormonais em laboratório central de província canadense. Como esse tipo de carcinoma usualmente apresenta expressão de receptores de estrógeno e progesterona, seu oncologista solicitou a repetição do teste em laboratório referência e o resultado, dessa vez, revelou-se positivo. Essa discrepância de resultados, embora em caso individual, alertou as autoridades de saúde canadenses a investigar a acurácia desse teste em província do Canadá (Allred, 2008a). Estudo realizado com essa finalidade revelou que aproximadamente um terço de 1.023 testes de receptor de estrógeno realizados em laboratórios locais apresentava resultados falso-negativos quando reexaminados em

laboratório central. As possíveis causas para essa discrepância foram relacionadas à falta de treinamento específico dos patologistas e técnicos de laboratório, à utilização de métodos imuno-histoquímicos não validados e a políticas e práticas inadequadas de controle de qualidade. Os resultados falso-negativos dos testes de receptores hormonais estavam relacionados à fixação inadequada do tecido, com controles internos negativos e/ou controles internos ausentes (Cameron, 2009). Em 2009, resultados de outro estudo revelaram que 4,3% dos carcinomas positivos para receptor de estrógeno em laboratórios locais eram, de fato, negativos (resultados falso-positivos) quando reexaminados em laboratório central/referência; além disso, cerca de 20% dos tumores negativos para receptor de estrógeno em laboratórios locais exibiram pelo menos alguma expressão desse receptor (resultados falso-negativos) no laboratório central/referência (Gelber et al., 2009).

Até o presente momento, a credibilidade dos resultados dos testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona para carcinoma de mama realizados em laboratórios do Brasil é desconhecida.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é comparar os resultados dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona em 500 casos de carcinoma de mama entre laboratórios locais e laboratório referência no Brasil. Para se atingir esse objetivo, pretende-se:

1. Revalidar os testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona no laboratório referência;
2. Caracterizar o tipo histológico dos carcinomas de mama incluídos no estudo;
3. Determinar, através do levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais, a região geográfica onde os laboratórios locais estão localizados, o tipo de fixador e tempo de fixação utilizados, o tipo de carcinoma de mama (invasivo ou “in situ”) submetido ao estudo imuno-histoquímico, o uso ou não de tecidos-controle adequados, as especificações dos anticorpos, dos métodos de recuperação antigênica e dos sistemas de detecção utilizados no teste imuno-histoquímico, os resultados obtidos para proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona e os critérios utilizados para interpretação desses resultados;
4. Realizar os testes imuno-histoquímicos no laboratório referência para proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona e comparar os resultados obtidos com os definidos pelos laboratórios locais.

3 MÉTODOS

3.1 Aprovação institucional da pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Científico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo/SP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo/SP), sob o Protocolo de Pesquisa número 1238/09 (vide Apêndices).

3.2 Laboratório referência

De acordo com dados da literatura atual, laboratório referência pode ser definido como laboratório de grande porte que recebe casos das várias regiões geográficas de um país e realiza grande número de determinado teste. Em relação ao teste de HER2, por exemplo, o “United Kingdom National External Quality Assessment Service” (UKNEQAS) enfatiza a necessidade da realização anual de pelo menos 250 testes de HER2 por imuno-histoquímica e de pelo menos 100 testes de HER2 por FISH, além da utilização de testes validados e da participação em programas de controle de qualidade, para que o laboratório esteja apto a oferecer o teste (Ellis et al., 2004). O laboratório escolhido como referência no presente estudo foi a Consultoria em Patologia, localizado na cidade de

Botucatu, Estado de São Paulo, com mais de 13 anos de experiência em testes imuno-histoquímicos e moleculares; recebe casos oriundos de todas as regiões do país e até mesmo de outros países. A Consultoria em Patologia realiza anualmente cerca de 9.000 testes de HER2 por imuno-histoquímica, 1.500 testes de FISH para pesquisa de amplificação do gene *HER2* e 7.000 testes imuno-histoquímicos de receptores de estrógeno e progesterona. O elevado número de testes realizados por esse laboratório, muito superior ao mínimo preconizado na literatura, demonstra sua vasta capacitação e experiência na determinação dos resultados desses marcadores prognósticos e preditivos para carcinoma de mama. Além disso, esse laboratório participa de dois programas internacionais de controle de qualidade: o já mencionado UKNEQAS, do Reino Unido, além do programa desenvolvido pelo CAP.

3.3 Revalidação dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência

Os últimos consensos da literatura recomendam a validação dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores hormonais oferecidos pelo laboratório, ou seja, a fidelidade dos resultados obtidos nesses testes deve estar comprovada.

3.3.1 Revalidação do teste de HER2 pelo laboratório referência

O mais recente consenso definido pelo CAP e pela ASCO (Wolff et al., 2007) relata várias formas de se validar o teste imuno-histoquímico para proteína HER2, entre elas a comparação do teste imuno-histoquímico com o teste de FISH, que pesquisa a amplificação do gene *HER2*, com a necessidade de concordância de 90% para os escores 0 e 3+ e de 95% para o escore 1+. Para revalidação do teste imuno-histoquímico de HER2 no laboratório referência, foi realizado estudo comparativo dos resultados obtidos através do estudo imuno-histoquímico com os resultados obtidos através do teste de FISH, em 2000 casos consecutivos de carcinoma invasivo de mama recebidos pelo laboratório referência no período de 2008 e 2009, avaliando-se a concordância com o teste de FISH, além da sensibilidade e especificidade do teste.

O estudo imuno-histoquímico da proteína HER2 foi realizado utilizando-se o anticorpo SP3 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, EUA, código RM-9103-S), anticorpo monoclonal de coelho que reconhece a porção extracelular do receptor HER2. Cortes histológicos seriados com espessura de 3 mm foram obtidos com micrótomo histológico de cada um dos 2000 blocos de parafina. Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA, código P7886) e mantidos a 60°C em estufa, por 4 horas. A seguir, foi realizada a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS), com bloqueio da atividade da peroxidase endógena com

solução de H_2O_2 3%. O método de recuperação antigênica empregado foi o de calor em panela de pressão com solução de ácido cítrico a 0,21%, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário SP3 por pelo menos 12 horas no período noturno, a 4°C na diluição de 1:300 e, após nova lavagem em PBS, incubadas por 60 minutos com o respectivo anticorpo secundário, seguindo-se a utilização do sistema de detecção Novolink Polímero (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Reino Unido, código 7161), conforme instruções do fabricante, e finalização com tratamento por solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, código D5637, 1 mg/mL + Tris-HCl 1M pH 7,4) acrescida de H_2O_2 (concentração final 0,2%), contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA, código SP15-500). Os resultados foram avaliados em microscópio óptico comum, de acordo com os critérios definidos pelo último consenso da ASCO e CAP (Wolff et al., 2007): escore 0 (resultado negativo): ausência de imunocoloração; escore 1+ (resultado negativo): imunocoloração fraca e incompleta de membrana nas células neoplásicas; escore 2+ (resultado duvidoso): imunocoloração completa de membrana, porém fraca ou não uniforme em pelo menos 10% das células neoplásicas ou intensa e completa em menos de 30% das células neoplásicas; escore 3+ (resultado positivo): imunocoloração forte e completa/circunferencial de membrana em mais de 30% das células neoplásicas.

A técnica de FISH foi utilizada para se quantificar o número de cópias do gene *HER2*, empregando-se a sonda “PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit” (Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA, código 30-161060). Cortes de 3 mm de espessura obtidos por micrótomo histológico foram dispostos em lâminas de vidro e submetidos, nessa ordem, à desparafinação em xilol, hidratação em álcool etílico absoluto, tratamento ácido em 0,2 N HCl, lavagem em água, pré-tratamento com tiocianato de sódio 8,1%, lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3), digestão enzimática em pepsina 0,8% e lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3). As lâminas foram submetidas ao processo de desnaturação e hibridização pelo calor após a incubação com a sonda, no período noturno, cobrindo-se toda a superfície do corte histológico representado na lâmina, com colocação posterior de lamínula. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3) e as lamínulas retiradas. A seguir, as lâminas foram lavadas em solução pós-hibridização pré-aquecida, constituída por cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M pH 5,3 e NP-40 0,3% (Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA, código 30-804820), contracoradas com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em “Fluorguard Antifade” (Insitus, Albuquerque, EUA, códigos F201/F202 e F001) e montadas com lamínula.

A contagem de sinais fluorescentes laranjas, referentes ao número de cópias do gene *HER2*, e de sinais fluorescentes verdes, referentes ao centrômero do cromossomo 17, foi realizada em sala escura,

com o auxílio de um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) com filtros apropriados para o espectro dos sinais a serem observados (Chroma Technology GmbH, Alemanha), acoplado a um computador PC (Dell Optiplex, EUA) com o “software” analisador de imagem Metafer 4 (Metasystems, Altlussheim, Alemanha), conforme demonstrado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5. Fotografia do sistema Zeiss-Metasystems utilizado para quantificação do número de cópias do gene *HER2* por FISH

Figura 6. Fotografia da tela do “software” Metafer 4, utilizado para quantificação dos sinais fluorescentes na técnica de FISH

Os resultados do teste de FISH para *HER2* foram interpretados segundo o mais recente consenso da ASCO e CAP (Wolff et al., 2007): *HER2* amplificado, *HER2* duvidoso e *HER2* não amplificado. Os critérios para a determinação da presença ou ausência da amplificação pelo FISH são sumarizados a seguir: amplificação do gene *HER2* é definida pela presença de 6 ou mais cópias do gene *HER2* por núcleo ou pela razão *HER2*/CEP17 maior que 2,2; ausência de amplificação é definida pela presença de 4 ou menos cópias do gene *HER2* por núcleo ou pela razão *HER2*/CEP17 menor que 1,8; resultado duvidoso deve ser considerado

quando a razão *HER2/CEP17* estiver entre 1,8 e 2,2. Os resultados do teste de FISH foram interpretados por dois patologistas, sem conhecimento prévio do resultado imuno-histoquímico.

Os resultados do teste imuno-histoquímico de HER2 e do teste de FISH foram comparados com ajuda estatística, excluindo-se os casos com resultado duvidoso (escore 2+). A concordância entre os resultados foi avaliada considerando-se o qui-quadrado de Pearson (χ^2). A estatística Kappa foi calculada e sua significância testada. Foram calculadas as medidas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, precisão geral e índice de Youden para o teste imuno-histoquímico de HER2 realizado no laboratório referência, considerando o teste de FISH como padrão-ouro. Intervalos de confiança para essas medidas foram calculados com coeficientes de confiança de 95%. O nível de significância dos testes foi fixado em 5% (Hilden & Glasziou, 1996; Youden, 1950; Goldman, 1994; Young & Lewis, 1997).

3.3.2 Revalidação do teste de receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência

A validação para qualquer teste clínico requer que os resultados obtidos sejam comparados com resultado considerado padrão. Para o teste dos receptores de estrógeno e progesterona, a validação recomendada é baseada na comparação dos resultados obtidos num determinado laboratório com os resultados obtidos por outro laboratório que

utilize método que tenha sido previamente validado por estudo clínico ou que tenha sido validado por demonstrar consenso de resultado de múltiplos laboratórios (o que deve incluir laboratórios com testes validados). Os testes imuno-histoquímicos dos receptores hormonais que não forem validados diretamente por estudo clínico devem ser validados através da demonstração de concordância de pelo menos 90% para os resultados positivos e de pelo menos 95% para os resultados negativos (com mínimo de 20 casos positivos e 20 negativos) com laboratório que apresente atestado que confirme que seus testes estão de acordo com os requerimentos da ASCO e CAP (Fitzgibbons et al., 2010).

Para revalidação do teste imuno-histoquímico de receptores de estrógeno e progesterona no laboratório referência, foi realizado estudo comparativo dos resultados obtidos no laboratório referência (Consultoria em Patologia) com os resultados definidos por laboratório referência acreditado pelo CAP nos Estados Unidos e que é referência nos Estados Unidos e Canadá para avaliação de receptores hormonais em câncer de mama (PhenoPath Laboratories, Seattle, EUA). Foram levantados dos arquivos da Consultoria em Patologia 255 casos consecutivos de carcinoma invasivo de mama e, a partir deles, foram construídos 9 blocos de parafina do tipo “microarray” de tecido (TMA), utilizando-se um “arrayer” de tecido biológico produzido pela Beecher Instruments, Sun Prairie, EUA (Figura 7).

Figura 7. Fotografia do “array” de tecido utilizado na construção dos blocos de TMA

Essa técnica permite inclusão de grande número de casos em um mesmo bloco de parafina, que ficam representados por cilindros de tecido cujo diâmetro pode variar de 0,6 a 2,0 mm, espaçados entre si a uma distância de 1,0 mm, tanto na horizontal quanto na vertical. Cada caso foi representado por 1 cilindro de tecido obtido a partir dos blocos de parafina “doadores” (blocos originais contendo carcinoma invasivo de mama), com diâmetro de 2,0 mm. A retirada dos cilindros do bloco de parafina “doador” e sua inclusão no bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA) foi realizada com ajuda de agulhas especiais. Os cilindros de todos os casos foram

distribuídos num total de 9 blocos receptores (Figura 8), numerados de 1 a 9, obedecendo-se ao mapa de TMA (Figura 9). Esse mapa registra a disposição dos casos nos blocos, permitindo a identificação deles para a interpretação dos resultados.

Figura 8. Exemplo de bloco de TMA

Mapa para Tissue microarray (TMA)

Responsável: _____										Técnico: _____										Data: 23/mar/2008 (sex)									
Descrição: _____																													
Densidade: ☐ amostras repetidas ☐ vezes (total de # cilindros) Diâmetro dos cilindros: ☐ 0,6mm ☐ 1,0mm ☐ 1,5mm ☐ 2,0mm Espaçamentos: x = 1,00mm; y = 1,00mm																													

Linha (y) ▶	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
▼ Coluna (x)	(1,00)	(2,00)	(3,00)	(4,00)	(5,00)	(6,00)	(7,00)	(8,00)	(9,00)	(10,00)	(11,00)	(12,00)	(13,00)	(14,00)	(15,00)	(16,00)	(17,00)	(18,00)	(19,00)	(20,00)
01 (1,00)																				
02 (2,00)																				
03 (3,00)																				
04 (4,00)																				
05 (5,00)																				
06 (6,00)																				
07 (7,00)																				
08 (8,00)																				
09 (9,00)																				
10 (10,00)																				
11 (11,00)																				
12 (12,00)																				
13 (13,00)																				
14 (14,00)																				
15 (15,00)																				
16 (16,00)																				
17 (17,00)																				
18 (18,00)																				
19 (19,00)																				
20 (20,00)																				

Figura 9. Mapa de TMA. Exemplo de mapa utilizado para a orientação da inclusão dos casos nos blocos de TMA e, posteriormente, para a identificação dos casos e interpretação dos resultados obtidos

Para a realização dos testes de receptores de estrógeno e progesterona, tanto no laboratório referência do Brasil como no laboratório referência dos Estados Unidos, foram obtidos cortes histológicos seriados com espessura de 3 μ m de cada um dos blocos de TMA, com a utilização de micrótomo histológico. Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA, código P7886) e mantidos a 60°C em estufa, por 4 horas.

No laboratório referência do Brasil, foi realizada a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS), com bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de H_2O_2 3%. O método de recuperação antigênica empregado foi o do calor em panela de pressão (com as lâminas incubadas em solução de ácido cítrico 0,21%, pH 6,0). Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, durante o período noturno, a 4°C. O anticorpo monoclonal de coelho SP1 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, EUA, código RM-9101-S) foi utilizado para o teste de receptor de estrógeno na diluição de 1:1000. O anticorpo monoclonal de camundongo PgR 636 (Dako, Carpinteria, EUA, código M3569) foi utilizado para o teste de receptor de progesterona na diluição de 1:1600. Após nova lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com os respectivos anticorpos secundários e o sistema de detecção Novolink Polímero (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Reino Unido, código 7161), conforme instruções do fabricante e finalização com tratamento por solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, código D5637 1 mg/mL + Tris-HCl 1M pH 7,4) acrescida de H_2O_2 (concentração final 0,2%), contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA, código SP15-500).

Os mesmos anticorpos (SP1 para receptor de estrógeno e PgR 636 para receptor de progesterona) foram utilizados pelo laboratório

referência dos Estados Unidos, de acordo com protocolos metodológicos próprios plenamente validados.

Os resultados foram avaliados em microscópio óptico comum. A imunocoloração para os receptores de estrógeno e progesterona foi interpretada como positiva ou negativa, tanto no laboratório referência do Brasil como no laboratório referência dos Estados Unidos, de acordo com os critérios definidos pelo mais recente consenso da ASCO e CAP (Hammond et al., 2010): considera-se o resultado positivo se houver imunocoloração nuclear em pelo menos 1% das células neoplásicas, independente da intensidade da imunocoloração; considera-se o resultado negativo se houver imunocoloração nuclear em menos de 1% das células neoplásicas. A avaliação no laboratório referência americano foi feita pelo Dr. Allen M. Gown e, no laboratório referência brasileiro, pela Dra. Sheila L. Wludarski.

Os resultados dos testes de receptores de estrógeno e progesterona foram comparados entre o laboratório referência do Brasil e o laboratório referência dos Estados Unidos para fins de revalidação, avaliando-se a concordância geral dos testes e a concordância para os testes positivos e negativos, de acordo com o preconizado na literatura (Fitzgibbons et al., 2010), assumindo-se os resultados obtidos no laboratório referência dos Estados Unidos como padrão-ouro.

3.4 Escolha dos laboratórios locais

Foram selecionados como laboratórios locais aqueles de pequeno porte que recebem somente casos da comunidade em que estão inseridos e que realizam pequeno número de testes imuno-histoquímicos para HER2 e receptores de estrógeno e progesterona.

3.5 Seleção dos casos

O estudo comparativo dos resultados dos marcadores prognósticos e preditivos para carcinoma de mama entre laboratórios locais e o laboratório referência envolveu dois grupos distintos de casos:

1) Grupo do teste de HER2: foram incluídos 500 casos consecutivos de carcinoma invasivo de mama diagnosticados no laboratório referência, no período de 2008 a 2010, que obrigatoriamente apresentavam exame imuno-histoquímico prévio para a proteína HER2 realizado em laboratório considerado local;

2) Grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona: foram incluídos 500 casos consecutivos de carcinoma invasivo de mama diagnosticados no laboratório referência, no período de 2008 a 2010, que obrigatoriamente apresentavam exame imuno-histoquímico prévio para receptores de estrógeno e progesterona realizado em laboratório considerado local.

3.6 Avaliação morfológica

Todos os casos de carcinoma de mama incluídos no estudo, tanto do grupo do teste de HER2, quanto do grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona, foram classificados morfológicamente (tipo histológico) de acordo com os critérios definidos pela OMS, em 2003, mediante revisão histológica.

3.7 Levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais

Foram avaliadas diversas informações dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais, incluindo a região geográfica onde os laboratórios locais estão localizados, o tipo de fixador e tempo de fixação utilizados, o tipo de carcinoma de mama (invasivo ou “in situ”) submetido ao estudo imuno-histoquímico, o uso ou não de tecidos-controle adequados, as especificações dos anticorpos, dos métodos de recuperação antigênica e dos sistemas de detecção utilizados no teste imuno-histoquímico, os resultados obtidos para proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona e os critérios utilizados para interpretação desses resultados.

3.8 Comparação dos resultados dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e referência

Cortes histológicos seriados dos blocos de parafina (espessura de 3 μm) foram obtidos com micrótomo histológico de cada caso de carcinoma invasivo de mama incluído no estudo. Ressalta-se que foram utilizados exatamente os mesmos blocos de parafina utilizados pelos laboratórios locais em seus testes imuno-histoquímicos. A expressão imuno-histoquímica da proteína HER2 e dos receptores de estrógeno e progesterona foi investigada no laboratório referência, empregando-se os mesmos anticorpos e metodologia utilizados para revalidação dos testes, resumidamente apresentados na Tabela 1. Esses anticorpos foram escolhidos por terem sido validados na literatura (Press et al., 2002b; Cheang et al., 2006; Wludarski e Bacchi, 2008).

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos empregados no estudo imuno-histoquímico

Antígeno	Anticorpo	Diluição	Fabricante
Proteína HER2	SP3	1:300	Thermo
Receptor de estrógeno	SP1	1:1000	Thermo
Receptor de Progesterona	PgR 636	1:1600	Dako

Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, EUA); Dako (Carpinteria, CA, EUA)

Os resultados dos testes de HER2 e de receptores de estrógeno e progesterona do laboratório referência foram avaliados em microscópio óptico comum, de acordo com os critérios definidos pelos mais recentes consensos da ASCO e CAP e descritos anteriormente (Wolff et al.,

2007; Hammond et al., 2010), e comparados com os resultados informados nos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais. Para o teste de HER2, a concordância dos resultados entre os laboratórios foi medida através da estatística Kappa. Para o teste de receptores de estrógeno e progesterona, a associação entre os resultados dos laboratórios foi testada com base na estatística qui-quadrado de Pearson (χ^2). A estatística Kappa foi empregada como medida de concordância. Considerando como padrão-ouro os resultados do laboratório referência, foram calculadas as medidas de sensibilidade, especificidade, taxa de falso negativo, taxa de falso positivo, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, precisão geral e o índice de Youden. O nível de significância adotado foi de 5% (McCall, 1970; Cohen, 1960; Hilden & Glasziou, 1996; Youden, 1950).

4 RESULTADOS

4.1 Revalidação dos testes imuno-histoquímicos da proteína HER2 e receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência

4.1.1 Revalidação do teste de HER2 pelo laboratório referência

Como previamente apresentado, foram incluídos 2000 casos de carcinoma de mama para revalidação do teste de HER2, os quais foram submetidos à imuno-histoquímica e FISH. Em relação à imuno-histoquímica, 350 casos revelaram escore 0, 252 escore 1+, 893 escore 2+ e 505 apresentaram escore 3+. Por FISH, 1115 casos obtiveram resultado conclusivo, sendo 465 casos positivos para amplificação do gene *HER2* e 650 negativos para amplificação. Os casos de carcinoma de mama exibindo polissomia do cromossomo 17 (667 casos) e os casos com resultado inconclusivo (218 casos) não foram considerados para análise estatística. Na maioria dos casos com resultado inconclusivo por FISH, o tecido tumoral não apresentava fixação adequada. As frequências dos resultados do teste de HER2 por imuno-histoquímica e FISH são apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente.

Figura 10. Frequência dos resultados do teste de HER2 por imunohistoquímica em 2000 casos de carcinoma invasivo de mama

Figura 11. Frequência dos resultados do teste de HER2 por FISH em 2000 casos de carcinoma invasivo de mama

Dos 1115 casos com resultado conclusivo por FISH, foram excluídos também 421 casos que revelaram, concomitantemente, resultado duvidoso (escore 2+) pelo exame imuno-histoquímico, visto que esses casos podem apresentar resultado amplificado ou não por FISH. Assim, 694 casos de carcinoma de mama com resultados conclusivos para os dois tipos de teste (imuno-histoquímica e FISH) foram utilizados para revalidação (Figura 12).

Figura 12. Fluxograma da seleção de casos para revalidação do teste de HER2 por imuno-histoquímica

Considerando os 209 casos classificados como escore 0 pela imuno-histoquímica, somente 2 casos foram amplificados por FISH (1,0%). Dos 148 casos classificados como escore 1+ pela imuno-histoquímica, 4 (2,7%) foram amplificados por FISH. Cinco (1,5%) dos 337 casos classificados como escore 3+ pela imuno-histoquímica não foram amplificados por FISH. A correlação entre os resultados do teste imuno-histoquímico e do teste de FISH é demonstrada na tabela 2. O teste de associação entre os resultados da imuno-histoquímica e FISH apresentou estatística $\chi^2=650,7$ ($P<0,001$), apontando forte associação entre eles. Kappa foi igual a $\kappa=0,968$ ($P<0,001$), indicando concordância significativa e quase perfeita entre os resultados dos testes. Considerando-se o teste de FISH como padrão-ouro, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, precisão geral e o índice de Youden do teste imuno-histoquímico de HER2 utilizando o anticorpo SP3 foram de 98,0%, 99,0%, 99,0%, 98,0%, 98,0% e 97,0%, respectivamente. Na tabela 3, são apresentadas as medidas de performance para o teste imuno-histoquímico de HER2, considerando como referência o teste de FISH. A concordância geral entre o teste de HER2 por imuno-histoquímica e o teste de FISH foi de 98,4%. A concordância entre os testes para o escore 0 foi de 99,0%, com 97,3% para o escore 1+ e 98,5% para o escore 3+. De acordo o recente consenso da ASCO/CAP para avaliação do teste de HER2 (Wolff et al., 2007), há necessidade de concordância de pelo menos 90% para os escores 0 e 3+ e de pelo menos 95% para o escore 1+. Os resultados

obtidos revalidaram completamente o teste de HER2 por imuno-histoquímica no laboratório referência.

Tabela 2 – Correlação entre os resultados do teste de HER2 por imuno-histoquímica (IHQ) e FISH (hibridização “in situ” fluorescente)

IHQ	FISH não amplificado (%)	FISH amplificado (%)	Total
0	207 (99,0%)	2 (1,0%)	209 (30,1%)
1+	144 (97,3%)	4 (2,7%)	148 (21,3%)
3+	5 (1,5%)	332 (98,5%)	337 (48,6%)
Total	356 (51,3%)	338 (48,7%)	694 (100,0%)

Tabela 3 – Medidas de performance do teste de HER2 por imuno-histoquímica em relação ao teste de FISH (padrão-ouro) no laboratório referência

Estatística (n=694)	Resultado (%)	Intervalo de Confiança 95%
Sensibilidade	98,0	[92,0 ----- 99,0]
Especificidade	99,0	[93,0 ----- 100,0]
Valor preditivo positivo	99,0	[93,0 ----- 100,0]
Valor preditivo negativo	98,0	[92,0 ----- 99,0]
Precisão geral	98,0	[92,0 ----- 99,0]
Índice de Youden	97,0	[93,0 ----- 100,0]

4.1.2 Revalidação do teste de receptores de estrógeno e progesterona pelo laboratório referência

Como previamente descrito, 255 carcinomas invasivos de mama foram considerados para revalidação do teste de receptores de estrógeno e progesterona. No laboratório americano acreditado pelo CAP (PhenoPath Laboratories, Seattle, EUA), 172 casos foram positivos e 83 negativos para os receptores de estrógeno; 164 casos foram positivos e 91 negativos para os receptores de progesterona. A correlação entre os resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona entre o laboratório referência americano e o laboratório referência brasileiro é apresentada nas tabelas 4 e 5. A concordância geral entre os resultados dos laboratórios referência foi de 98,8% (252/255 casos) para os receptores de estrógeno e de 98,4% (251/255 casos) para os receptores de progesterona. Para os resultados positivos, a concordância foi de 100,0%, tanto para os receptores de estrógeno (172/172 casos) como para os receptores de progesterona (164/164 casos). Para os resultados negativos, a concordância foi de 96,4% (80/83 casos) para os receptores de estrógeno e de 95,6% (87/91 casos) para os receptores de progesterona. De acordo com as recentes recomendações para validação dos testes de receptores hormonais através da imuno-histoquímica (Fitzgibbons et al., 2010), há necessidade de demonstração de concordância de pelo menos 90% para os resultados positivos e de pelo menos 95% para os resultados negativos (mínimo de 20 casos positivos e 20 negativos) com os resultados de laboratório com testes de receptores hormonais validados. Portanto, esses resultados revalidam

plenamente o teste de receptores de estrógeno e progesterona no laboratório referência brasileiro.

Tabela 4 – Correlação entre os resultados do teste de receptores de estrógeno (RE) entre os laboratórios referência

Laboratório brasileiro	Laboratório americano		Total
	RE+	RE-	
RE+	172 (100,0%)	3 (3,6%)	175 (68,6%)
RE-	0	80 (96,4%)	80 (31,4%)
Total	172 (67,4%)	83 (32,6%)	255 (100,0%)

Tabela 5 – Correlação entre os resultados do teste de receptores de progesterona (RP) entre os laboratórios referência

Laboratório brasileiro	Laboratório americano		Total
	RP+	RP-	
RP+	164 (100,0%)	4 (4,4%)	168 (65,9%)
RP-	0	87 (95,6%)	87 (34,1%)
Total	164 (64,3%)	91 (35,7%)	255 (100,0%)

4.2 Avaliação morfológica dos casos incluídos no estudo comparativo dos resultados dos marcadores prognósticos e preditivos para carcinoma de mama entre laboratórios locais e referência

Em relação à avaliação morfológica dos 500 casos de carcinoma invasivo de mama incluídos no estudo, tanto no grupo do teste de HER2 como no grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona, houve predomínio do tipo ductal, seguido pelo lobular. Foram observados ainda, em menor frequência, carcinomas invasivos dos tipos tubular, papilífero, mucinoso, apócrino, metaplásico e micropapilífero. Na tabela 6, é apresentada a distribuição dos tipos histológicos de carcinoma invasivo de mama em ambos os grupos estudados.

Tabela 6 – Avaliação morfológica dos casos de carcinoma invasivo de mama incluídos no estudo, separados por grupo (grupo do teste de HER2 e grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona)

Tipo histológico	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Carcinoma ductal, SOE	472 (94,4%)	469 (93,8%)
Carcinoma lobular	20 (4,0%)	13 (2,6%)
Carcinoma mucinoso	3 (0,6%)	1 (0,2%)
Carcinoma papilífero	2 (0,4%)	3 (0,6%)
Carcinoma tubular	1 (0,2%)	4 (0,8%)
Carcinoma apócrino	1 (0,2%)	4 (0,8%)
Carcinoma metaplásico	1 (0,2%)	1 (0,2%)
Carcinoma micropapilífero	0	5 (1,0%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, SOE: sem outra especificação

4.3 Levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais

4.3.1 Localização dos laboratórios locais

Casos provenientes de todas as regiões geográficas do país foram representados, tanto no grupo do teste de HER2 como no grupo do teste de receptores hormonais. Os 500 casos do grupo do teste de HER2 foram avaliados comparativamente com 149 laboratórios locais diferentes. O número de casos por laboratório local variou de 1 a 31. Os 500 casos do grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona foram avaliados em 146 laboratórios locais diferentes entre si. O número de casos variou de 1 a 41 por laboratório. A maioria dos casos nos dois grupos estudados foi testada em laboratórios da região sudeste, seguida pelas regiões sul, nordeste, centro-oeste e norte. A tabela 7 apresenta a distribuição dos casos pelas regiões geográficas do Brasil em ambos os grupos estudados.

Tabela 7 – Distribuição dos casos testados pelos laboratórios locais por região geográfica do Brasil

Região geográfica	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Sudeste	343 (68,6%)	350 (70,0%)
Sul	65 (13,0%)	64 (12,8%)
Nordeste	52 (10,4%)	40 (8,0%)
Centro-oeste	30 (6,0%)	33 (6,6%)
Norte	10 (2,0%)	13 (2,6%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona

4.3.2 Tipo de fixador e tempo de fixação utilizados nos laboratórios locais

Na maioria dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais, tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona, não havia informação sobre o fixador utilizado. O único tipo de fixador citado foi formalina. A tabela 8 apresenta os resultados obtidos sobre o tipo de fixador utilizado pelos laboratórios locais. Nenhum dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais informava o tempo de fixação empregado.

Tabela 8 – Tipo de fixador informado nos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais

Tipo de fixador	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Não informado	313 (62,6%)	468 (93,6%)
Formalina	187 (37,4%)	32 (6,4%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona

4.3.3 Tipo de carcinoma de mama (invasivo ou “in situ”)

submetido ao estudo imuno-histoquímico nos laboratórios locais

Não havia qualquer informação quanto ao quesito invasão nos casos de carcinoma de mama submetidos ao estudo imuno-histoquímico na maioria dos relatórios emitidos pelos laboratórios locais, tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos sobre a presença ou não de componente invasivo nos laboratórios locais.

Tabela 9 – Especificação quanto à presença ou não de invasão em casos de carcinoma de mama testados nos laboratórios locais

Invasão estromal	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Sem especificação	352 (70,4%)	338 (67,6%)
Carcinoma invasivo	148 (29,6%)	162 (32,4%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona

4.3.4 Uso de tecidos-controle para imuno-histoquímica pelos laboratórios locais

Não havia qualquer referência sobre o uso de tecidos-controle para a realização do estudo imuno-histoquímico na maioria dos relatórios emitidos pelos laboratórios locais, tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores hormonais. A tabela 10 apresenta os resultados obtidos sobre o uso de tecidos-controle adequados pelos laboratórios locais.

Tabela 10 – Uso de tecidos-controle adequados no estudo imuno-histoquímico realizado pelos laboratórios locais

Uso de tecidos-controle	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Sem especificação	309 (61,8%)	291 (58,2%)
Sim	191 (38,2%)	209 (41,8%)
Não	0	0
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona

4.3.5 Especificações dos anticorpos utilizados para os testes de HER2 e de receptores hormonais pelos laboratórios locais

Diferentes anticorpos foram utilizados para o teste de HER2 nos laboratórios locais. Não havia qualquer referência ao tipo de anticorpo utilizado na maioria dos relatórios (55,8%). Nos relatórios em que o anticorpo anti-proteína HER2 era citado, o CB11 (16,4%) foi o mais frequentemente utilizado. A tabela 11 apresenta os anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de HER2.

Tabela 11 – Anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de HER2

Anticorpo – teste de HER2	Frequência
Sem especificação	279 (55,8%)
CB11	82 (16,4%)
“Policlonal - Dako”	32 (6,4%)
5A2	30 (6,0%)
HercepTest™	19 (3,8%)
A0485	18 (3,6%)
“Policlonal”	14 (2,8%)
SP3	12 (2,4%)
TAB250	7 (1,4%)
EP1045Y	3 (0,6%)
HER-24	2 (0,4%)
CBE1	1 (0,2%)
10A7	1 (0,2%)
Total	500 (100,0%)

Diversos anticorpos também foram utilizados para os testes de receptores hormonais nos laboratórios locais. Em relação ao teste de receptor de estrógeno, não havia qualquer especificação sobre o tipo de anticorpo utilizado em 33,8% dos relatórios. Dos relatórios que citavam o anticorpo empregado, o mais frequentemente utilizado foi o 1D5 (35,6%). A

tabela 12 apresenta os anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de receptor de estrógeno.

Tabela 12 – Anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de receptor de estrógeno

Anticorpo – teste de RE	Frequência
Sem especificação	169 (33,8%)
1D5	178 (35,6%)
6F11	80 (16,0%)
SP1	44 (8,8%)
CC4-5	16 (3,2%)
SP4	7 (1,4%)
RBT11	4 (0,8%)
LH2	2 (0,4%)
Total	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno

Em relação ao teste de receptor de progesterona, não havia qualquer especificação sobre o tipo de anticorpo utilizado em 38,8% dos relatórios. Dos relatórios que citavam o anticorpo empregado, o mais frequentemente utilizado foi o PgR 636 (22,2%). A tabela 13 apresenta os anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de receptor de progesterona.

Tabela 13 – Anticorpos utilizados pelos laboratórios locais para o teste de receptor de progesterona

Anticorpo – teste de RP	Frequência
Sem especificação	194 (38,8%)
PgR 636	111 (22,2%)
1A6	89 (17,8%)
16	42 (8,4%)
312	32 (6,4%)
NCL	7 (1,4%)
PR-2C5	5 (1,0%)
SP2	5 (1,0%)
1A7	3 (0,6%)
RBT22	3 (0,6%)
sp21	3 (0,6%)
Y85	3 (0,6%)
M3569	2 (0,4%)
PGR-NCL	1 (0,2%)
Total	500 (100,0%)

RP: receptor de progesterona

4.3.6 Especificações dos métodos de recuperação antigênica utilizados pelos laboratórios locais

Em relação aos métodos de recuperação antigênica utilizados pelos laboratórios locais, tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores hormonais, observou-se predomínio da recuperação antigênica induzida pelo calor. A tabela 14 apresenta os métodos de recuperação antigênica utilizados pelos laboratórios locais.

Tabela 14 – Métodos de recuperação antigênica (RA) utilizados pelos laboratórios locais

Métodos de RA	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Sem especificação	245 (49,0%)	198 (39,6%)
Calor, SOE	73 (14,6%)	160 (32,0%)
Calor úmido	60 (12,0%)	58 (11,6%)
“Steamer”/vapor	35 (7,0%)	25 (5,0%)
Enzimático	32 (6,4%)	7 (1,4%)
Micro-ondas	21 (4,2%)	17 (3,4%)
Banho-maria	16 (3,2%)	13 (2,6%)
Câmara Pascal	13 (2,6%)	17 (3,4%)
Panela de pressão	3 (0,6%)	5 (1,0%)
Nenhum	2 (0,4%)	0
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, SOE: sem outra especificação

4.3.7 Especificações dos sistemas de detecção utilizados pelos laboratórios locais

Em relação aos sistemas de detecção utilizados pelos laboratórios locais, tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores hormonais, observou-se predomínio do sistema LSAB (estreptavidina-biotina marcada). Foram utilizados menos frequentemente os sistemas ABC (complexo avidina-biotina), polímero e EnVision™, entre outros. A tabela 15 apresenta os sistemas de detecção utilizados pelos laboratórios locais.

Tabela 15 – Sistemas de detecção utilizados pelos laboratórios locais

Sistemas de detecção	Grupo HER2	Grupo RE/RP
Sem especificação	135 (27,0%)	128 (25,6%)
LSAB	242 (48,4%)	225 (45,0%)
ABC	62 (12,4%)	57 (11,4%)
Polímero	52 (10,4%)	57 (11,4%)
EnVision™	9 (1,8%)	22 (4,4%)
Advance™ HRP	0	9 (1,8%)
PAP	0	2 (0,4%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

ABC: complexo avidina-biotina; LSAB: estreptavidina-biotina marcada; PAP: peroxidase anti-peroxidase; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona

4.4 Comparação dos resultados dos testes imuno-histoquímicos para proteína HER2 e receptores hormonais entre laboratórios locais e referência

4.4.1 Comparação dos resultados do teste de HER2 entre laboratórios locais e referência

A comparação dos resultados do teste de HER2 entre os laboratórios locais e o laboratório referência é apresentada na tabela 16.

Tabela 16 – Distribuição dos resultados do teste de HER2 entre laboratórios locais e referência

			Resultados – laboratório referência				
			0	1+	2+	3+	Total
Resultados – laboratórios locais		n	10	4	1	1	16
	0	%	6,2	4,7	1,1	0,6	3,2
		n	21	12	2	3	38
	1+	%	13,0	14,0	2,2	1,9	7,6
		n	110	63	79	86	338
	2+	%	68,3	73,3	84,9	53,8	67,6
		n	20	7	11	70	108
	3+	%	12,4	8,1	11,8	43,8	21,6
	n	161	86	93	160	500	
Total	%	32,2	17,2	18,6	32,0	100,0	

Considerando os casos classificados como escore 0 pelo laboratório referência (n=161), somente 10 (6,2%) apresentaram o mesmo resultado nos laboratório locais. O laboratório referência classificou 86 casos como escore 1+, mas somente 12 deles (14,0%) concordaram com esse resultado nos laboratório locais. Os escores 2+ e 3+ foram concordantes em 79/93 (84,9%) e 70/160 (43,8%) casos, respectivamente. Como

demonstrado na tabela 16, 247 casos foram considerados HER2-negativos (escores 0 e 1+) no laboratório referência, entretanto 27 (10,9%) casos tiveram resultado HER2-positivo (escore 3+) e 173 (70,0%) casos foram considerados HER2-duvidosos (escore 2+) nos laboratórios locais. Em relação aos 160 casos considerados HER2-positivos (escore 3+) no laboratório referência, 4 (2,5%) obtiveram resultado HER2-negativo (escores 0 ou 1+) e 86 (53,8%) deles foram considerados HER2-duvidosos (escore 2+) nos laboratórios locais. Resultados duvidosos (escore 2+) foram relatados em 338 (67,6%) casos testados em laboratórios locais; por outro lado, somente 93 (18,6%) casos foram classificados como escore 2+ no laboratório referência. A figura 13 apresenta a distribuição dos resultados do teste de HER2 por escore entre os laboratórios.

Figura 13 – Distribuição dos resultados do teste de HER2 por escore entre os laboratórios

A análise estatística dos resultados do teste de HER2 revelou coeficiente de concordância Kappa muito baixo ($\kappa=0,158$) entre os laboratórios locais e referência, com $P<0,001$. A concordância geral entre resultados do teste de HER2 foi baixa (34,2%). Considerando-se os resultados obtidos pelo laboratório referência como padrão-ouro, as taxas de resultados falso-positivos e falso-negativos nos laboratórios locais foram de 10,9% e 2,5%, respectivamente.

Se considerarmos que o paciente não deverá ser candidato a receber tratamento específico anti-HER2 com resultado negativo (escores 0 ou 1+) e que o paciente poderá ser elegível a tratamento específico anti-HER2 com resultado positivo (escore 3+) no teste de HER2, foi realizada uma comparação dos resultados conclusivos negativos (escores 0 e 1+) e positivos (escore 3+) para se saber com precisão o número de pacientes que poderiam receber tratamento inadequado com base exclusivamente nos resultados dos laboratórios locais. Todos os casos com resultado duvidoso (escore 2+) foram excluídos. Assim, a tabela 17 apresenta os resultados para indicação de tratamento pelos laboratórios referência e locais em 148 casos com resultados conclusivos.

Tabela 17 – Eventual indicação de tratamento anti-HER2 pelos laboratórios referência e locais

Indicação de tratamento - LL	Indicação de tratamento - LR		
	Não	Sim	Total
Não	47 (31,8%)	4 (2,7%)	51 (34,5%)
Sim	27 (18,2%)	70 (47,3%)	97 (65,5%)
Total	74 (50,0%)	74 (50,0%)	148 (100,0%)

LL: laboratórios locais, LR: laboratório referência

De acordo com essa tabela e considerando os resultados do laboratório referência como padrão-ouro, 74 pacientes não teriam indicação de tratamento e 74 teriam indicação de tratamento. Contudo, observou-se que 27/74 (36,5%) pacientes poderiam receber tratamento mesmo não sendo elegíveis e 4/74 (5,4%) não receberiam tratamento mesmo sendo elegíveis, considerando-se os resultados dos laboratórios locais. A tabela 18 apresenta as medidas de performance dos resultados dos laboratórios locais, considerando esse tipo de análise relacionada à eventual indicação de tratamento. A medida de concordância Kappa foi igual a $\kappa=0,581$ ($P<0,001$).

Tabela 18 – Medidas de performance dos resultados do teste de HER2 dos laboratórios locais em relação ao resultados do laboratório referência (padrão-ouro) para indicação de tratamento

Estatística (n=148)	Resultado (%)
Sensibilidade	94,6
Especificidade	63,5
Taxa de falso negativo	5,4
Taxa de falso positivo	36,5
Valor preditivo positivo	72,1
Valor preditivo negativo	92,1
Precisão geral	79,0
Índice de Youden	58,1

4.4.2 Comparação dos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e referência

A tabela 19 apresenta a comparação dos resultados do teste de receptor de estrógeno entre laboratórios locais e referência.

Tabela 19 – Distribuição dos resultados do teste de receptor de estrógeno (RE) entre laboratórios locais e referência

			Resultado RE – laboratório referência		
			Negativo	Positivo	Total
Resultado RE – laboratórios locais		n	120	31	151
	Negativo	%	84,5	8,7	30,2
		n	22	327	349
	Positivo	%	15,5	91,3	69,8
		n	142	358	500
	Total	%	28,4	71,6	100,0

No laboratório referência, 358 (71,6%) casos foram considerados positivos e 142 (28,4%) negativos no teste de receptor de estrógeno. Nos laboratórios locais, 349 (69,8%) foram considerados positivos e 151 (30,2%) negativos. Usando Kappa como medida de concordância ($\kappa=0,744$; $P<0,001$; intervalo de confiança 95% 0,679–0,809), a concordância geral entre os resultados do teste de receptor de estrógeno entre os laboratórios locais e o referência foi de 89,4% (447/500 casos). A concordância entre os resultados positivos e negativos foi de 91,3% (327/358) e de 84,5% (120/142), respectivamente. A estatística qui-quadrado de Pearson revelou $\chi^2=273,889$ ($P<0,0001$), o que indica uma associação significativa entre os resultados. As medidas de performance do teste de receptor de estrógeno nos laboratórios locais são apresentadas na

tabela 20, considerando-se o teste de receptor de estrógeno no laboratório referência como padrão-ouro.

Tabela 20 – Medidas de performance do teste de receptor de estrógeno nos laboratórios locais em relação ao laboratório referência (padrão-ouro)

Estatística (n=500)	Resultado (%)	Intervalo de Confiança 95%
Sensibilidade	91,3	[88,4 ----- 94,3]
Especificidade	84,5	[78,6 ----- 90,5]
Taxa de falso negativo	8,7	[5,7 ----- 11,6]
Taxa de falso positivo	15,5	[9,5 ----- 21,4]
Valor preditivo positivo	93,7	[91,1 ----- 96,2]
Valor preditivo negativo	79,5	[73,0 ----- 85,9]
Precisão geral	89,4	[86,7 ----- 92,1]
Índice de Youden	75,8	[75,6 ----- 76,1]

A tabela 21 apresenta a comparação dos resultados do teste de receptor de progesterona entre laboratórios locais e referência.

Tabela 21 – Distribuição dos resultados do teste de receptor de progesterona (RP) entre laboratórios locais e referência

			Resultado RP – laboratório referência		
					Total
			Negativo	Positivo	
Resultado RP – laboratórios locais		n	163	44	207
	Negativo	%	84,0	14,4	41,4
		n	31	262	293
	Positivo	%	16,0	85,6	58,6
		n	194	306	500
	Total	%	38,8	61,2	100,0

No laboratório referência, 306 (61,2%) casos foram considerados positivos e 194 (38,8%) negativos no teste de receptor de progesterona. Nos laboratórios locais, 293 (58,6%) foram considerados positivos e 207 (41,4%) negativos. Usando Kappa como medida de concordância ($\kappa=0,688$; $P<0,001$; intervalo de confiança 95% 0,623–0,753), a concordância geral entre os resultados do teste de receptor de progesterona entre os laboratórios locais e o referência foi de 85,0% (425/500 casos). A concordância entre os resultados positivos e negativos foi de 85,6% (262/306) e de 84,0% (163/194), respectivamente. A estatística qui-quadrado de Pearson revelou $\chi^2=234,490$ ($P<0,0001$), o que indica uma associação significativa entre os resultados. As medidas de performance do teste de receptor de progesterona nos laboratórios locais são apresentadas

na tabela 22, considerando-se o teste de receptor de progesterona no laboratório referência como padrão-ouro.

Tabela 22 – Medidas de performance do teste de receptor de progesterona nos laboratórios locais em relação ao laboratório referência (padrão-ouro)

Estatística (n=500)	Resultado (%)	Intervalo de Confiança 95%
Sensibilidade	85,6	[81,7 ----- 89,6]
Especificidade	84,0	[78,9 ----- 89,2]
Taxa de falso negativo	14,4	[10,4 ----- 18,3]
Taxa de falso positivo	16,0	[10,8 ----- 21,1]
Valor preditivo positivo	89,4	[85,9 ----- 92,9]
Valor preditivo negativo	78,7	[73,2 ----- 84,3]
Precisão geral	85,0	[81,9 ----- 88,1]
Índice de Youden	69,6	[69,4 ----- 69,9]

Se considerarmos que o paciente poderá receber tratamento hormonal específico se apresentar resultado positivo para receptor de estrógeno e/ou receptor de progesterona, foi realizada a comparação dos resultados dos dois receptores hormonais em conjunto, para se saber com precisão o número de pacientes que eventualmente receberiam tratamento inadequado com base exclusivamente nos resultados dos laboratórios locais. Assim, a tabela 23 apresenta os resultados para eventual indicação de tratamento pelos laboratórios referência e locais nos 500 casos de carcinoma invasivo de mama incluídos no estudo.

Tabela 23 – Eventual indicação de tratamento hormonal pelos laboratórios referência e locais

Indicação de tratamento - LL	Indicação de tratamento - LR		
	Não	Sim	Total
Não	111 (83,5%)	34 (9,3%)	145 (29,0%)
Sim	22 (16,5%)	333 (90,7%)	355 (71,0%)
Total	133 (26,6%)	367 (73,4%)	500 (100,0%)

LL: laboratórios locais, LR: laboratório referência

De acordo com esses resultados, 133 pacientes não teriam indicação de tratamento e 367 teriam indicação de tratamento, considerando os resultados do laboratório referência (padrão-ouro). Contudo, observou-se que 22/133 (16,5%) pacientes poderiam receber tratamento mesmo não sendo elegíveis e 34/367 (9,3%) não receberiam tratamento mesmo sendo elegíveis, considerando-se os resultados dos laboratórios locais. A tabela 24 apresenta as medidas de performance dos resultados dos laboratórios locais, considerando esse tipo de análise relacionada à eventual indicação de tratamento. A medida de concordância Kappa foi igual a $\kappa=0,721$ ($P<0,001$).

Tabela 24 – Medidas de performance dos resultados do teste de receptores hormonais dos laboratórios locais em relação ao resultados do laboratório referência (padrão-ouro) para eventual indicação de tratamento

Estatística (n=500)	Resultado (%)
Sensibilidade	90,7
Especificidade	83,5
Taxa de falso negativo	9,3
Taxa de falso positivo	16,5
Valor preditivo positivo	93,8
Valor preditivo negativo	76,6
Precisão geral	88,8
Índice de Youden	74,2

4.5 Critérios utilizados para interpretação dos resultados dos testes de HER2 e receptores hormonais nos laboratórios locais

Em 82,4% dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais, não havia qualquer informação sobre os critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de HER2. Quando disponível, os critérios propostos pela ASCO/CAP foram referidos em 14,0% dos relatórios; a utilização dos critérios propostos pelo HercepTest[™] foi referida em 3,6% dos relatórios. A tabela 25 apresenta os critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de HER2 nos laboratórios locais.

Tabela 25 – Critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de HER2 nos laboratórios locais

Critérios de interpretação	Frequência
Sem especificação	412 (82,4%)
ASCO/CAP (2007)	70 (14,0%)
HercepTest™	18 (3,6%)
Total	500 (100,0%)

Além disso, em apenas 127 (25,4%) relatórios dos laboratórios locais havia explicação sobre o significado dos escores relacionados ao teste de HER2. Em 228 (67,4%) dos 338 relatórios com resultado escore 2+ e em 17 (44,7%) dos 38 com resultado escore 1+, o resultado do teste de HER2 foi relatado como positivo ao invés de duvidoso e negativo, respectivamente. A indicação da necessidade do teste de FISH para os carcinomas com escore 2+ foi encontrada em somente 93 (27,5%) relatórios. Interpretação equivocada da imunocoloração no teste de HER2 foi encontrada em 1,0% dos relatórios dos laboratórios locais, que referiam expressão nuclear ou citoplasmática da proteína HER2 ao invés da expressão na membrana celular.

Em relação aos critérios utilizados pelos laboratórios locais para interpretação dos resultados do teste de receptores de estrógeno e progesterona, não havia qualquer informação sobre a metodologia empregada em 31,0% (receptor de estrógeno) e 32,4% (receptor de progesterona) dos relatórios. Tanto para os receptores de estrógeno quanto

para os receptores de progesterona, o critério mais utilizado foi o da quantificação de células neoplásicas positivas. Nenhum relatório dos laboratórios locais, entretanto, referia a porcentagem mínima de células imunocoradas necessária para definir o teste como positivo. A tabela 26 apresenta os critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de receptores hormonais nos laboratórios locais.

Tabela 26 – Critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) nos laboratórios locais

Critérios de interpretação	RE	RP
Sem especificação	155 (31,0%)	162 (32,4%)
Quantificação de células	206 (41,2%)	203 (40,6%)
Intensidade da imunocoloração	2 (0,4%)	1 (0,2%)
Quantificação de células e intensidade da imunocoloração	137 (27,4%)	134 (26,8%)
Total	500 (100,0%)	500 (100,0%)

5 DISCUSSÃO

O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre mulheres. A OMS estima que, anualmente, mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama são diagnosticados em todo o mundo. A incidência da neoplasia no Brasil é de aproximadamente 50.000 casos novos por ano, sendo considerado importante problema de saúde pública (Instituto Nacional de Câncer, 2010). A etiologia do carcinoma de mama é multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos com estilo de vida, dieta, hábitos reprodutivos e meio ambiente (Tavassoli e Devilee, 2003). Os primeiros relatos de câncer de mama foram registrados no Egito antigo (cerca de 3000-2500 a.C.). O precário tratamento era feito por cauterização local, sem expectativa de cura (Donegan & Spratt, 2002). Com o passar do tempo, progressivas descobertas que permitiram a detecção precoce da neoplasia, associadas à melhoria das técnicas cirúrgicas, radioterápicas e quimioterápicas, assim como o surgimento de novas formas de tratamento, melhoraram efetivamente o curso clínico da doença.

Dois fatores prognósticos e preditivos são de suma importância na avaliação de pacientes com carcinoma de mama: o gene *HER2* e sua proteína homônima e os receptores de estrógeno e progesterona. Cerca de 25% dos carcinomas de mama apresentam amplificação do gene *HER2* e superexpressão da proteína HER2, estando associados a curso clínico mais agressivo, com pior resposta à terapia hormonal (resistência relativa) e maior sensibilidade a regimes quimioterápicos baseados em antraciclinas, sendo também elegíveis para

tratamento alvo-específico anti-HER2 com trastuzumabe, responsável pela redução dos riscos de recorrência e mortalidade quando utilizado por pacientes em estágio precoce da doença (Slamon et al., 1987; Tandon et al., 1989; Paik et al., 1990; Wright et al., 1992; Muss et al., 1994; Ross e Fletcher, 1999; Cobleigh et al., 1999; Fornier et al., 2000; Slamon et al., 2001; Vogel et al., 2002; Tedesco et al., 2004; De Laurentiis et al., 2005; Romond et al., 2005; Piccart-Gebhart et al., 2005; Joensuu et al., 2006). Já os carcinomas de mama com expressão de receptores hormonais podem ser tratados com terapia hormonal, baseada principalmente no uso de tamoxifeno e inibidores de aromatase, com redução dos índices de morbidade e mortalidade pela doença (EBCTCG, 2005; Mauri et al., 2006; Burstein et al., 2010). Infelizmente, esses tratamentos estão associados a efeitos colaterais e elevados custos (Cox et al., 2004; Elkin et al., 2004; Hind et al., 2007). O tratamento com trastuzumabe, por exemplo, pode ser cardiotoxico (Vogel et al., 2002; Leyland-Jones et al., 2003; Baselga et al., 2005; Ross et al., 2009) e o hormonal, por sua vez, pode resultar em eventos tromboembólicos (Hernandez et al., 2009) e no desenvolvimento de carcinoma de endométrio (Deligdisch et al., 2000). Essas considerações salientam a necessidade de precisão nos resultados dos testes de HER2 e receptores hormonais em carcinoma de mama.

Entretanto, a literatura apresenta alguns estudos que indicam discrepâncias nos resultados dos testes de HER2 (Paik et al., 2002; Roche et al., 2002; Press et al., 2005; Perez et al., 2006; Reddy et al., 2006; Papadopoulos et al., 2007; O'Malley et al., 2008; Umemura et al., 2008) e de

receptores hormonais (Allred et al., 1998; Rhodes et al., 2000a,b,c; Layfield et al., 2000; Rhodes et al., 2001; Regitnig et al., 2002; Parker et al., 2002; Layfield et al., 2003; Wells et al., 2004; Diaz et al., 2005; Phillips et al., 2007; Francis et al., 2007; Viale et al., 2007; Allred, 2008a,b; Badve et al., 2008; Hede, 2008; Mathews, 2008; Cameron, 2009; Gelber et al., 2009) entre diferentes laboratórios, incluindo os locais (laboratórios que realizam pequeno número de testes exclusivamente na comunidade onde estão inseridos) e os centrais e referência (laboratórios que realizam grande número de testes de várias regiões geográficas de um país).

Frente a essa realidade mundial e considerando a ausência de estudos brasileiros sobre essa problemática, investigou-se, no presente trabalho, se essas discrepâncias nos resultados dos testes de HER2 e receptores hormonais entre diferentes laboratórios também aconteciam no Brasil. Foram selecionados casos de carcinoma invasivo de mama previamente testados para HER2 (500 casos) e receptores de estrógeno e progesterona (500 casos) em laboratórios locais do Brasil e retestados em laboratório referência brasileiro. Para fins de comparação dos resultados desses testes entre os laboratórios, era necessária a revalidação desses testes pelo laboratório referência. A revalidação dos testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona no laboratório referência para o referido estudo foi plenamente assegurada, utilizando-se os critérios definidos pelo último consenso da ASCO/CAP (Wolff et al., 2007; Hammond et al., 2010; Fitzgibbons et al., 2010).

A comparação do teste de HER2 entre os laboratórios locais e o referência mostrou baixa concordância geral (34,2%) entre os resultados, se considerados todos os escores (0, 1+, 2+ e 3+) em conjunto. A concordância foi muito baixa para os resultados negativos: 6,2% (escore 0) e 14,0% (escore 1+). Para os resultados positivos (escore 3+), a concordância foi de apenas 43,8%. A tabela 27 compara esses resultados com os apresentados pelos principais estudos da literatura mundial. De acordo com essa tabela, a concordância entre os laboratórios brasileiros foi inferior à observada nos Estados Unidos, Suíça, Grécia e Canadá, considerando tanto os casos HER2-negativos quanto os HER2-positivos.

Tabela 27 – Concordância nos resultados do teste de HER2 entre laboratórios locais e centrais/referência segundo a literatura e comparação com os resultados do presente estudo

Autores, países e ano	No. casos	Concordância (%)	Tipo de casos
Paik et al., EUA, 2002	104	79,0	HER2-positivo
Roche et al., EUA, 2002	119	74,0	HER2- positivo
Press et al., EUA e Suíça, 2002		96,1	Escores 0 e 1+
	1291	51,7	Escores 2+ e 3+
Perez et al., EUA, 2006	1699	75,0-81,6*	HER2-positivo
Reddy et al., EUA, 2006	973	34,0	Escore 0
		54,0	Escore 1+
		26,0	Escore 2+
		77,0	Escore 3+
Papadopoulos et al., Grécia, 2007		85,0	Escores 0 e 1+
	369	80,0	Escore 2+
		63,0	Escore 3+
O'Malley et al., Canadá, 2008	505	79,3-89,6*	HER2-positivo
	205	94,8-100,0*	HER2-negativo
Wludarski et al., Brasil, 2010		6,2	Escore 0
(presente estudo)	500	14,0	Escore 1+
		84,9	Escore 2+
		43,8	Escore 3+

*dependendo do método imuno-histoquímico utilizado

Considerando os resultados do laboratório referência como “padrão-ouro”, a taxa de resultados falso-negativos (casos com escores 0 e 1+ localmente, mas com escore 3+ no laboratório referência) foi de 2,5% nos laboratórios locais, sendo a taxa de falso-positivos (casos com escore 3+ localmente, mas com escores 0 ou 1+ no laboratório referência) de 10,9%. Esses achados demonstram que alguns pacientes eventualmente elegíveis para o tratamento com trastuzumabe não receberiam a droga e, portanto, não desfrutariam dos benefícios do tratamento anti-HER2, enquanto outros pacientes poderiam ser tratados desnecessariamente, com riscos de efeitos colaterais graves e alto custo financeiro, sem qualquer benefício terapêutico.

Outra informação relevante divulgada pelo presente estudo foi a elevada frequência (67,6%) de resultados duvidosos (escore 2+) obtidos nos laboratórios locais em relação ao teste de HER2; ao contrário, somente 93 (18,6%) casos obtiveram esse resultado no laboratório referência. Esses achados demonstram que os laboratórios locais têm tendência frequente de agrupar os carcinomas de mama como escore 2+ no teste de HER2, o que pode estar relacionado a certo desconhecimento dos critérios de interpretação dos resultados ou à maior segurança proporcionada por esse resultado, uma vez que o escore 2+ requer o teste de FISH para determinação da presença ou não de amplificação do gene *HER2* para conclusão definitiva. O fato de se classificar um caso como duvidoso (escore 2+) no teste de HER2 para que seja submetido ao teste de FISH para confirmação final pode até parecer prudente e inócuo, entretanto, essa atitude acarreta custos muito elevados devido à necessidade de teste

diagnóstico adicional. Outro dado importante a salientar é que, dos 338 casos que apresentaram resultados duvidosos (escore 2+) no teste de HER2 em laboratórios locais, 51,2% seriam classificados como HER2-negativos (escores 0 e 1+) e 25,5% seriam HER2-positivos (escore 3+) no laboratório referência. Assim, o exame de FISH só seria realmente necessário em 79 casos ao invés de 338 (259 testes de FISH desnecessários poderiam ser evitados). O correto diagnóstico de escore 2+ pelos laboratórios locais proporcionaria início de tratamento mais precoce dos pacientes e traria redução sensível dos custos com testes prognósticos/preditivos. Além disso, o presente estudo demonstrou que 10,9% (218/2000) dos testes de FISH são inconclusivos, provavelmente por artefatos relacionados à fixação do tecido. Nesse contexto, pacientes com carcinoma de mama escore 2+ no laboratório local e FISH inconclusivo poderiam enfrentar indefinição do tratamento oncológico. Essas dificuldades poderiam ser evitadas se esses pacientes tivessem recebido resultado conclusivo no teste de HER2 por imuno-histoquímica.

Considerando que o paciente não seria candidato a receber tratamento específico anti-HER2 com resultado negativo (escores 0 ou 1+) e que poderia ser elegível a tratamento específico anti-HER2 com resultado positivo (escore 3+) no teste de HER2, a comparação dos resultados conclusivos negativos (escores 0 e 1+) e positivos (escore 3+), para se saber com precisão o número de pacientes que poderiam receber tratamento inadequado com base exclusivamente nos resultados dos laboratórios locais, mostrou que 36,5% dos pacientes poderiam receber

tratamento, mesmo não sendo elegíveis, e 5,4% não receberiam tratamento, mesmo sendo elegíveis. Esses dados preocupantes poderiam ser responsáveis por decisões erradas de tratamento da doença em parte dos pacientes.

Em relação aos resultados do teste de receptores hormonais, a concordância geral entre os laboratórios locais e o referência foi elevada: 89,4% para o teste de receptor de estrógeno e 85,0% para o teste de receptor de progesterona, muito próxima à descrita nos Estados Unidos (Badve et al., 2008) e em outros países (Viale et al., 2007; Gelber et al., 2009), conforme mostra a tabela 28.

Tabela 28 – Concordância nos resultados do teste de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) entre laboratórios locais e centrais/referência segundo a literatura e comparação com os resultados do presente estudo

Autores, países e ano	Concordância RE	Concordância RP
Viale et al., 25 países, 2007	6058/6205 (97,6%)	4202/5237 (80,2%)
Badve et al., EUA, 2008	694/769 (90,2%)	649/769 (84,4%)
Gelber et al., diversos países, 2009	4323/4931 (87,6%)	-
Wludarski et al., Brasil, 2010	447/500 (89,4%)	425/500 (85,0%)
(presente estudo)		

EUA: Estados Unidos da América

Quando comparamos os resultados positivos e negativos em separado, observamos que, para os casos positivos, a concordância foi de

91,3% no teste de receptor de estrógeno e de 85,6% no teste de receptor de progesterona; para os resultados negativos, a concordância foi de 84,5% no teste de receptor de estrógeno e de 84,0% no teste de receptor de progesterona. Exceto os resultados positivos no teste de receptor de estrógeno dos laboratórios locais, os demais resultados não atingem o mínimo necessário de concordância com testes validados, que é de 90% para os resultados positivos e de 95% para os resultados negativos (Fitzgibbons et al., 2010). As taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos no teste de receptores hormonais em laboratórios locais foram de 8,7% e 15,5% para os receptores de estrógeno e de 14,4% e 16,0% para os receptores de progesterona, respectivamente, também semelhantes às descritas nos Estados Unidos (Badve et al., 2008). Assim, pacientes com carcinoma de mama equivocadamente classificado como negativo no teste de receptores hormonais deixariam de se beneficiar do tratamento hormonal, enquanto pacientes com carcinoma de mama equivocadamente classificado como positivo no teste de receptores hormonais seriam expostos desnecessariamente ao tratamento hormonal, que não é isento de riscos e está associado a elevados custos.

Considerando que o paciente poderá receber tratamento hormonal específico se apresentar resultado positivo para receptor de estrógeno e/ou receptor de progesterona, a comparação dos resultados dos dois receptores hormonais em conjunto para se saber com precisão o número de pacientes que poderiam receber tratamento inadequado com base exclusivamente nos resultados dos laboratórios locais revelou que

16,5% poderiam receber tratamento mesmo não sendo elegíveis e 9,3% não receberiam tratamento mesmo sendo elegíveis. Mais uma vez, decisões terapêuticas erradas poderiam ser tomadas em parte dos pacientes com base nos resultados do teste de receptores hormonais realizado em laboratórios locais.

Os últimos consensos da literatura (Wolff et al., 2007; Hammond et al. 2010) descrevem os principais fatores que podem interferir na fidelidade dos resultados dos testes de HER2 e de receptores hormonais. Esses fatores podem ser divididos em fatores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Entre os fatores pré-analíticos, a fixação insatisfatória do tecido é o principal a ser considerado, podendo ocorrer devido ao uso de fixadores inadequados, demora para o início da fixação do tecido e ao tempo de fixação reduzido ou muito ampliado. Quanto aos fatores analíticos, destacam-se as diferenças relacionadas ao tipo de carcinoma de mama (carcinoma “in situ” ou invasivo) avaliado no estudo imuno-histoquímico, a utilização de anticorpos não validados, o uso de métodos de recuperação antigênica e sistemas de detecção inadequados, a não utilização de tecidos-controle adequados, a participação de profissionais técnicos não especializados e o uso de materiais de laboratório inadequados ou imprecisos. Com relação aos fatores pós-analíticos, o mais importante é a não utilização de critérios validados para interpretação dos resultados dos testes. Infelizmente, os laboratórios locais frequentemente não fornecem detalhes quanto à fixação do tecido, tipo de carcinoma testado (invasivo ou não), uso de tecidos-controle adequados, especificações dos anticorpos,

métodos de recuperação antigênica e sistemas de detecção empregados e critérios utilizados para interpretação dos resultados. Muitas dessas informações, se disponíveis, poderiam contribuir para o reconhecimento dos principais fatores envolvidos nas discrepâncias de resultados entre os laboratórios brasileiros. Considerando que os testes foram realizados nos mesmos blocos de parafina tanto nos laboratórios locais quanto no laboratório referência, infere-se que é possível que os fatores analíticos e pós-analíticos sejam os mais provavelmente relacionados a essas discrepâncias.

A finalidade principal do estudo é alertar para ocorrência de discrepâncias nos resultados dos testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e referência no Brasil, à semelhança do que ocorre em outros países do mundo. Esses resultados incorretos podem levar ao tratamento errôneo de pacientes com carcinoma de mama, podendo estar associados a graves efeitos colaterais, com aumento da morbidade e mortalidade, além de elevado custo financeiro. Independentemente da escolha do tipo de anticorpo, sua diluição, método de recuperação antigênica ou sistema de detecção, é fundamental que cada laboratório tenha seus testes validados clinicamente ou mediante comparação com testes validados de outros laboratórios, antes de oferecê-los à comunidade. Outra importante medida a ser adotada pelos laboratórios locais seria a participação em programas externos de controle de qualidade. Acredita-se que a validação dos testes com medidas rigorosas de controle de qualidade e a participação constante em programas externos de controle

de qualidade sejam cruciais para que os laboratórios locais garantam a fidelidade dos resultados de seus testes de HER2 e receptores hormonais.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo levaram às seguintes conclusões:

1. Os testes imuno-histoquímicos de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona no laboratório referência estão plenamente revalidados e têm sua fidelidade comprovada com base em critérios definidos pela ASCO e CAP, o que permite a comparação dos resultados desses testes entre os laboratórios;

2. O tipo histológico mais comum dos carcinomas invasivos de mama incluídos no estudo foi o carcinoma ductal (cerca de 94% dos casos);

3. Através do levantamento de informações dos relatórios imuno-histoquímicos emitidos pelos laboratórios locais, observou-se que todas as regiões geográficas do país estavam representadas, com predomínio da região sudeste tanto no grupo do teste de HER2 quanto no grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona. Nenhum dos relatórios imuno-histoquímicos dos laboratórios locais revelava o tempo de fixação utilizado. A maioria dos relatórios (62,6% para o grupo do teste de HER2 e 93,6% para o grupo do teste de receptores de estrógeno e progesterona) não especificava o tipo de fixador utilizado. Quando informado, o único fixador utilizado foi a formalina. Não havia especificação sobre o tipo de carcinoma de mama (“in situ” ou invasivo) testado em 70,4% dos relatórios do teste de HER2 e em 67,6% dos relatórios do teste de

receptores hormonais. A ausência de informação quanto à utilização ou não de tecidos-controle adequados no estudo imuno-histoquímico foi frequente nos relatórios dos dois grupos. Diferentes anticorpos foram utilizados para o teste de HER2 nos laboratórios locais. Infelizmente, não havia qualquer referência ao tipo de anticorpo utilizado na maioria dos relatórios (55,8%). Nos relatórios em que o anticorpo anti-proteína HER2 era citado, o CB11 (16,4%) foi o mais frequentemente utilizado. Diversos anticorpos também foram utilizados para os testes de receptor de estrógeno e progesterona nos laboratórios locais. Em relação ao teste de receptor de estrógeno, não havia qualquer especificação sobre o tipo de anticorpo utilizado em 33,8% dos relatórios. Dos relatórios que citavam o anticorpo empregado, o mais frequentemente utilizado foi o 1D5 (35,6%). Em relação ao teste de receptor de progesterona, não havia qualquer especificação sobre o tipo de anticorpo utilizado em 38,8% dos relatórios. Dos relatórios que citavam o anticorpo empregado, o mais frequentemente utilizado foi o PgR 636 (22,2%). A maioria dos relatórios não especificava o tipo de recuperação antigênica utilizado. Quando informado, houve predomínio da recuperação antigênica pelo calor. Em relação aos sistemas de detecção empregados, o LSAB foi o mais utilizado tanto no grupo do teste de HER2 (48,4%) como no grupo do teste de receptores hormonais (45,0%). Os laboratórios locais não especificaram os critérios utilizados para interpretação dos resultados do teste de HER2 em 82,4% dos relatórios. Os critérios propostos pela ASCO/CAP, em 2007, foram referidos em 14,0% dos relatórios. Os laboratórios locais também não especificaram os critérios utilizados para

interpretação dos resultados do teste de receptores hormonais em 31,0% (receptor de estrógeno) e 32,4% (receptor de progesterona) dos relatórios. Quando disponível, o critério mais frequentemente utilizado foi o da quantificação de células. Nenhum relatório dos laboratórios locais, entretanto, referia a porcentagem mínima de células imunocoradas necessária para definir o teste como positivo;

4. A comparação do teste de HER2 entre os laboratórios locais e o referência mostrou baixa concordância geral (34,2%) entre os resultados, se considerados todos os escores (0, 1+, 2+ e 3+) em conjunto, sendo inferior à observada em outros países. A concordância foi muito baixa para os resultados negativos: 6,2% (escore 0) e 14,0% (escore 1+). Para os resultados positivos (escore 3+), a concordância foi de 43,8%. Considerando os resultados do laboratório referência como “padrão-ouro”, a taxa de resultados falso-negativos foi de 2,5% nos laboratórios locais, sendo a taxa de falso-positivos de 10,9%. Em relação aos resultados do teste de receptores hormonais, a concordância geral entre os laboratórios locais e o referência foi elevada: 89,4% para o teste de receptor de estrógeno e 85,0% para o teste de receptor de progesterona, semelhante à referida nos Estados Unidos e outros países. A concordância foi de 91,3% entre os resultados positivos no teste de receptor de estrógeno e de 85,6% entre os resultados positivos no teste de receptor de progesterona; entre os resultados negativos, a concordância foi de 84,5% no teste de receptor de estrógeno e de 84,0% no teste de receptor de progesterona. As taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos no teste de receptores hormonais em

laboratórios locais foram de 8,7% e 15,5% para os receptores de estrógeno e de 14,4% e 16,0% para os receptores de progesterona, respectivamente, também semelhantes às descritas nos Estados Unidos. As discrepâncias encontradas nos resultados dos testes de HER2 e receptores de estrógeno e progesterona entre laboratórios locais e o referência no Brasil estão possivelmente relacionadas a fatores analíticos e pós-analíticos.

7 REFERÊNCIAS

Ainsworth R, Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Forsyth A, Richmond J, et al. IHC for HER2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of *HER2* gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005;58:1086-90.

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

Allred DC. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist*. 2008a;13:1134-6.

Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008b;26:2433-5.

Badve SS, Baehner FL, Gray RP, Childs BH, Maddala T, Liu ML, et al. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *J Clin Oncol*. 2008;26:2473-81.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003;21:1973-9.

Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1996;74:1445-51.

Baselga J, Carbonell X, Castañeda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005;23:2162-71.

Beatson GW. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*. 1896;148:104-7.

Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on *HER2* testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-82.

Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1669-75.

Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:3784-96.

Cameron MA. Commission of inquiry on hormone receptor testing. St. John's, Newfoundland, Canada, Government of Newfoundland and Labrador, 2009.

Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, Chia SK, et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J Clin Oncol.* 2006;24:5637-44.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have *HER2*-overexpressing metastatic

breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 1999;17:2639-48.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas*. 1960;20:37-46.

Cox MC, Figg WD, Thurman PW. No rational theory for drug pricing. *J Clin Oncol*. 2004;22:962-3.

Cowen PN, Teasdale J, Jackson P, Reid BJ. Oestrogen receptor in breast cancer: prognostic studies using a new immunohistochemical assay. *Histopathology*. 1990;17:319-25.

Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true HER2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:2572-9.

De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:4741-8.

Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. *Gynecol Oncol.* 2000;78:181-6.

DeSombre ER, Thorpe SM, Rose C, Blough RR, Andersen KW, Rasmussen BB, et al. Prognostic usefulness of estrogen receptor immunocytochemical assays for human breast cancer. *Cancer Res.* 1986;46:4256s-64s.

Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol.* 2005;12:10-9.

Donegan WL, Spratt JS. *Cancer of the breast.* St. Louis: Saunders; 2002.

Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for *HER2* in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol.* 2003;199:418-23.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365:1687-717.

Elkin EB, Weinstein MC, Winer EP, Kuntz KM, Schnitt SJ, Weeks JC. HER-2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol*. 2004;22:854-63.

Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*. 2000;89:111-7.

Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, et al. Best practice n° 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*. 2004;57:233-7.

Fisher B, Redmond C, Brown A, Wolmark N, Wittliff J, Fisher ER, et al. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med*. 1981;305:1-6.

Fisher B, Redmond C, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1983;1:227-41.

Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond ME, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:930-5.

Fornier M, Esteva FJ, Seudman AD. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol*. 2000;27:38-45; discussion 92-100.

Francis GD, Dimech M, Giles L, Hopkins A. Frequency and reliability of oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 in breast carcinoma determined by immunohistochemistry in Australasia: results of the RCPA Quality Assurance Program. *J Clin Pathol*. 2007;60:1277-83.

Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:675-82.

Gelber RD, Gelber S; International Breast Cancer Study Group; Breast International Group. Facilitating consensus by examining patterns of treatment effects. *Breast*. 2009;18 Suppl 3:S2-8.

Goldman L. Quantitative aspects of clinical reasoning. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, editores. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th ed. Copenhagen: McGraw-Hill; 1994. p.43-8.

Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, Kussick SJ, Kandalaft PL, Kim PM, et al. High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. *Mod Pathol*. 2008;21:1271-7.

Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol*. 2008;21 Suppl 2:S8-S15.

Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*. 2003;34:1043-7.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2784-95.

Hanna W, O'Malley FP, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco A, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on *HER2/neu* testing in breast cancer. *Curr Oncol*. 2007;14:149-53.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:1474-81.

Hede K. Breast cancer testing scandal shines spotlight on black box of clinical laboratory testing. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:836-7, 844.

Hernandez RK, Sørensen HT, Pedersen L, Jacobsen J, Lash TL. Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. *Cancer*. 2009;115:4442-9.

Hilden J, Glasziou P. Regret graphs, diagnostic uncertainty and Youden's Index. *Stat Med*. 1996;15:969-86.

Hind D, Ward S, De Nigris E, Simpson E, Carroll C, Wyld L. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2007;11:iii-iv, ix-xi, 1-134.

Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer – Mama [on-line]. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.

Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4793-8.

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:1974-82.

Jensen EV, Desombre ER, Hurst DJ, Kawashima T, Jungblut PW. Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*. 1967;56:547-69.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;354:809-20.

Jordan C. Historical perspective on hormonal therapy of advanced breast cancer. *Clin Ther*. 2002;24 Suppl A:A3-16.

Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res.* 1977;37:4669-71.

Kulka J, Tóké AM, Kaposi-Novák P, Udvarhelyi N, Keller A, Schaff Z. Detection of *HER2/neu* gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - a comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res.* 2006;12:197-204.

Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J.* 2000;6:189-96.

Layfield LJ, Goldstein N, Perkinson KR, Proia AD. Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogen receptor status. *Breast J.* 2003;9:257-9.

Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, Arnold A, Verma S, Dias R, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol.* 2003;21:3965-71.

Mathews AW. Bad cancer tests drawing scrutiny. *The Wall Street Journal*, New York. 2008 jan 4; B1-B2.

Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP. Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:1285-91.

McCall RB. *Fundamental Statistics for Psychology*. New York: Harcourt, Brace and World; 1970. p.246-81

McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med.* 1985;109:716-21.

Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol.* 2004;17:1545-54.

Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 1994;330:1260-6.

Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:21-7.

O'Malley FP, Thomson T, Julian J, Have C, Cosby R, Gelmon K, et al. HER2 testing in a population-based study of patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:61-5.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. *HER2* amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*. 2004;5:63-9.

Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1990;8:103-12.

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:852-4.

Papadopoulos S, Kouvatses G, Skarlos D, Malamos N, Delliou E, Saratsiotou I, et al. Comparison of HER2 detection methods between central and regional laboratories in Greece. *Clin Breast Cancer*. 2007;7:784-90.

Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW, Cupples JB, Grant DR, Akbari M, et al. Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical

determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray. *Am J Clin Pathol*. 2002;117:723-8.

Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the *HER2/neu* alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2000;18:3651-64.

Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, Reynolds CA, Halling KC, Ingle JN, et al. *HER2* testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc*. 2002;77:148-54.

Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, et al. *HER2* testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006;24:3032-8.

Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, Dewald GW, Dowling PK, Du E, et al. *HER2* fluorescence in situ hybridization: results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:325-31.

Phillips T, Murray G, Wakamiya K, Askaa J, Huang D, Welcher R, et al. Development of standard estrogen and progesterone receptor immunohistochemical assays for selection of patients for antihormonal therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15:325-31.

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

Powell WC, Hicks DG, Prescott N, Tarr SM, Laniauskas S, Williams T, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the *HER2* status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15:94-102.

Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*. 1994;54:2771-7.

Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*. 2002a;20:3095-105.

Press M, Spaulding B, Groshen S, Kaminsky D, Hagerty M, Sherman L, et al. Comparison of different antibodies for detection of progesterone receptor in breast cancer. *Steroids*. 2002b;67:799-813.

Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6598-607.

Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, Klein PM. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer*. 2006;7:153-7.

Regitnig P, Reiner A, Dinges HP, Höfler G, Müller-Holzner E, Lax SF, et al. Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories. *Virchows Arch*. 2002;441:328-34.

Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol*. 2000a;53:688-96.

Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol.* 2000b;53:292-301.

Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol.* 2000c;53:125-30.

Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Anderson E, Bobrow LG, et al. Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe. Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:44-58.

Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. *HER2/neu* testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol.* 2000;13:866-73.

Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:855-7.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1673-84.

Ross JS, Fletcher JA. *HER2/neu* (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 1999;112:S53-S67.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009;14:320-68.

Rossi E, Ubiali A, Cadei M, Balzarini P, Valagussa E, Lucini L, et al. *HER2/neu* in breast cancer: a comparative study between histology, immunohistochemistry, and molecular technique (FISH). *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:127-31.

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

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312:513-6.

Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol*. 2001;116:806-10.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2/neu* oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.

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

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. *HER-2/neu* oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1989;7:1120-8.

Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003.

Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, Shyr Y, Blum KA, Goldstein LJ, et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol*. 2004;22:1071-7.

Umemura S, Osamura RY, Akiyama F, Honma K, Kurosumi M, Sasano H, et al. What causes discrepancies in HER2 testing for breast cancer? A Japanese ring study in conjunction with the global standard. *Am J Clin Pathol*. 2008;130:883-91.

Van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2/neu status in breast cancer. *Mod Pathol*. 2009;22:879-86.

Vera-Román JM, Rubio-Martínez LA. Comparative assays for the HER2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128:627-33.

Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Rasmussen BB, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol*. 2007;25:3846-52.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of *HER2*-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-26.

Wells CA, Sloane JP, Coleman D, Munt C, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. Consistency of staining and reporting of oestrogen receptor immunocytochemistry within the European Union—an inter-laboratory study. *Virchows Arch*. 2004;445:119-28.

Wludarski SC, Bacchi CE. High concordance of SP3 rabbit monoclonal antibody with FISH to evaluate *HER2* in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16:466-70.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:118-45.

Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, et al. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1992;65:118-21.

Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2006;13:74-83.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-37.

Yarden Y. Biology of *HER2* and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001;61(suppl 2):1-13.

Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. *HER2* testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004;291:1972-7.

Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3:32-5.

Young KD, Lewis RJ. What is confidence? Part 2: detailed definition and determination of confidence intervals. *Ann Emerg Med*. 1997;30:311-8.

Zarbo RJ, Hammond ME. *HER2/neu* testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:549-53.

APÊNDICES

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1238/09** intitulado: "**COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE MARCADORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS (HER2 E RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA) PARA CARCINOMA DE MAMA ENTRE LABORATÓRIOS LOCAIS E DE REFERÊNCIA NO BRASIL**", apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. CARLOS E. BACCHI**

Pesquisador (a) Executante: **SHEILA CRISTINA LORDELO WLUDARSKI**

CAPPesq, 11 de Março de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

View Letter

Close

Date: Jul 07, 2010
To: "CARLOS BACCHI" bacchi@consultoriapatologia.com.br
From: "" AIMMJOURNAL@aol.com
Subject: AIMM Decision

Jul 07, 2010

RE: AIMM-10650R1, entitled "HER2 testing in breast carcinoma: very low concordance rate between reference and local laboratories in Brazil"

Dear Dr. BACCHI,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

<http://aimm.edmgr.com/>

Your username is: *****

Your password is: *****

With Kind Regards,

DR. CLIVE TAYLOR
Editor
Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology

Close

Editorial Manager(tm) for Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology
Manuscript Draft

Manuscript Number: AIMM-10650R1

Title: HER2 testing in breast carcinoma: very low concordance rate between reference and local laboratories in Brazil

Article Type: Research

Keywords: Brazil; HER2; immunohistochemistry; local laboratory; reference laboratory

Corresponding Author: Dr. CARLOS BACCHI, MD

Corresponding Author's Institution: Consultoria Patologia

First Author: Sheila Cristina Lordelo Wludarski, MD

Order of Authors: Sheila Cristina Lordelo Wludarski, MD; Lisandro Ferreira Lopes, MD, PhD; Tácio R. Berto e Silva, MD; Filomena M. Carvalho, MD, PhD; Lawrence M. Weiss, MD; CARLOS BACCHI, MD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Breast cancer accounts for approximately one quarter of all cancers in females. HER2 gene amplification or HER2 protein overexpression, detected in about 20 percent of breast carcinomas, predicts a more aggressive clinical course and determines eligibility for targeted therapy with trastuzumab. HER2 testing has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate HER2 results are critical in identifying patients who may benefit from targeted therapy. The present study investigated the concordance in the results of HER2 immunohistochemistry assays performed in 500 invasive breast carcinomas between a reference laboratory and 149 local laboratories from all geographic regions of Brazil. Our results showed an overall poor concordance (171/500 cases, 34.2 percent) regarding HER2 results between local and reference laboratories, which may be related to the low-volume load of HER2 assays, inexperience with HER2 scoring system, and/or technical issues related to immunohistochemistry in local laboratories. Standardization of HER2 testing with rigorous quality control measures by local laboratories is highly recommended in order to avoid erroneous treatment of breast cancer patients.

**HER2 TESTING IN BREAST CARCINOMA:
VERY LOW CONCORDANCE RATE BETWEEN
REFERENCE AND LOCAL LABORATORIES IN BRAZIL**

Sheila C. L. Wludarski, MD^{1,2}, Lisandro F. Lopes, MD, PhD¹,
Tácio R. Berto e Silva, MD¹, Filomena M. Carvalho, MD, PhD²,
Lawrence M. Weiss, MD³, and Carlos E. Bacchi, MD, PhD^{1,2}

*From ¹Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil; ²Department of Pathology,
University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, SP, Brazil, and ³Division of
Pathology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA*

Name and address for correspondence and reprint requests:

Carlos E. Bacchi, MD, PhD

Consultoria em Patologia

Rua Major Leonidas Cardoso, 739

Botucatu, SP, 18602-010, Brazil

Telephone/fax: +55 14 31125900

e-mail: bacchi@conspat.com.br

Abstract

Breast cancer accounts for approximately one quarter of all cancers in females. *HER2* gene amplification or HER2 protein overexpression, detected in about 20 percent of breast carcinomas, predicts a more aggressive clinical course and determines eligibility for targeted therapy with trastuzumab. HER2 testing has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate HER2 results are critical in identifying patients who may benefit from targeted therapy. The present study investigated the concordance in the results of HER2 immunohistochemistry assays performed in 500 invasive breast carcinomas between a reference laboratory and 149 local laboratories from all geographic regions of Brazil. Our results showed an overall poor concordance (171/500 cases, 34.2 percent) regarding HER2 results between local and reference laboratories, which may be related to the low-volume load of HER2 assays, inexperience with HER2 scoring system, and/or technical issues related to immunohistochemistry in local laboratories. Standardization of HER2 testing with rigorous quality control measures by local laboratories is highly recommended in order to avoid erroneous treatment of breast cancer patients.

Brief title: HER2 testing in Brazil

Key Words: Brazil; HER2; immunohistochemistry; local laboratory; reference laboratory

Breast cancer is one of the most common human neoplasms, accounting for one quarter of all cancers in females. The *HER2* oncogene prognostic value in breast carcinoma was first reported in 1987.^{1,2} *HER2* is mapped on chromosome 17q21 and encodes a 185 kd transmembrane growth factor receptor named human epidermal receptor protein-2, also referred to as HER2 or ERBB2. This receptor has tyrosine kinase activity and is involved in cellular signaling that regulates cell growth and development.^{3,4} *HER2* gene amplification or HER2 protein overexpression, detected in approximately 20 percent of breast carcinomas, predicts a more aggressive clinical course with a worse response to hormonal therapy and determines eligibility for targeted therapy with the anti-HER2 monoclonal antibody called trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc, South San Francisco, CA). For these reasons, the determination of HER2 status in breast cancer is very important, as it has been demonstrated that HER2 is a prognostic as well as a predictive marker. HER2 testing has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate HER2 results are critical in identifying patients who may benefit from targeted therapy.⁵⁻¹⁵

Several studies in the literature have documented a tight association between HER2 protein overexpression by immunohistochemistry (IHC) and *HER2* gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization (FISH),¹⁶⁻³⁴ which is highly dependent on the standardization of methodology and assessment of HER2 testing.³⁵⁻⁴² IHC, however, can be quite varied in its ability to identify *HER2*-amplified carcinomas.³⁴ Discordance between HER2 protein expression by IHC and *HER2* gene amplification by FISH has been detected by some authors. In general, discordance rates are higher when HER2 testing is performed in low-volume, local

(community-based) laboratories, whereas discordance is lower in high-volume, central or reference laboratories.⁴³⁻⁴⁹

Considering that the accuracy of HER2 testing in breast carcinoma is extremely important, the present study aims to investigate the concordance in the results of HER2 testing by IHC between a reference (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil) laboratory and local (or community) laboratories in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Institutional Certifications

This study was approved by the Department of Pathology Scientific Committee of the University of Sao Paulo School of Medicine, and by the Ethical Committee for Research Projects of the University of Sao Paulo School of Medicine Clinical Hospital (“Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa” – CAPPesq, protocol #1238/09).

Validation of HER2 testing by reference laboratory (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil)

The United Kingdom panel emphasizes several requirements for a laboratory to be approved for HER2 testing, such as a minimum annual case-load (250 cases of breast carcinoma for HER2 IHC and 100 cases for FISH), the use of

standardized and validated assays, and adherence to ongoing quality assurance programs. Other recommendations include the use of tissue-based controls, exclusive evaluation of the invasive component of the tumor, and strict adherence to kit assay protocols and scoring methodology.³⁵ The College of American Pathologists (CAP) issued a similar set of recommendations in the United States.^{37,39} It emphasized the need for individual laboratories to document their own concordance experience between IHC and FISH (90 percent for IHC scores 0 and 3+, and 95 percent for IHC score 1+) before limiting FISH to IHC score 2+ only. The CAP also offered recommendations on the use of a standardized report format and defined terminology.

Consultoria em Patologia, a reference laboratory located in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil, performs approximately 6,000 HER2 tests by IHC and 1,500 HER2 tests by FISH annually and participates in ongoing HER2 quality assurance programs (UKNEQAS, United Kingdom, and CAP, United States). Moreover, validation of HER2 tests performed by Consultoria em Patologia was previously demonstrated in a study that evaluated the concordance, sensitivity, and specificity of IHC using a rabbit monoclonal antibody called SP3 (NeoMarkers, Lab Vision Corp., Fremont, CA) compared to FISH in 239 cases with a significant association between the two tests.⁵⁰

In order to further validate HER2 testing by Consultoria em Patologia, we evaluated the concordance, sensitivity, and specificity of IHC using the SP3 antibody and compared these features with FISH in 2,000 cases of invasive breast carcinoma received in consultation and selected in a consecutive manner. The HER2

status was determined in all cases by IHC and FISH using paraffin-embedded breast carcinoma tissue.

The HER2 score was determined by immunohistochemistry using the rabbit monoclonal antibody SP3 (code RM-9103-S, NeoMarkers, Lab Vision Corp., Fremont, CA), which recognizes the extracellular portion of the HER2 receptor. Briefly, 3- μ m-thick unstained histologic sections of breast carcinoma tissue were obtained in all cases. The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols and phosphate-buffer saline (PBS). The sections were then submitted to antigen retrieval in a pressure pan using citric acid (0.21%, pH 6.0) for a total of eight minutes, followed by a 20-minute cool down period at room temperature. Subsequently, slides were incubated overnight with the primary rabbit monoclonal antibody SP3 in a prestandardized concentration (1:300), washed with PBS, and incubated with Novolink polymer (code 7161, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) for 30 minutes. Diaminobenzidine was used as the chromogen, and sections were counterstained with hematoxylin and coverslipped. A semiquantitative HER2 scoring system was performed on all cases. The scores 0, 1+, 2+, and 3+ were applied according to the most recent consensus of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and CAP,³⁷ which recommends the following results for HER2 protein overexpression: positive, equivocal, and negative. A HER2 IHC result is considered positive if the score is 3+ (uniform, intense membrane staining of > 30% of tumor cells). A HER2 IHC result is considered negative if the score is 0 (no staining) or 1+ (weak, incomplete membrane staining in any number of tumor cells), and a HER2 IHC result is considered equivocal if the score is 2+ (complete membrane staining that is either nonuniform or weak in intensity but with

obvious circumferential distribution in at least 10% of tumor cells). The SP3 IHC results were interpreted blindly by experienced pathologists without the knowledge of previous results either by other HER2 IHC assays or FISH.

A dual probe assay that combines a *HER2* gene probe (mapped on chromosome 17q11.2-q12-LSI HER2/neu SpectrumOrange) with a centromeric enumeration probe for chromosome 17 (mapped on chromosome 17q11.1-q11.1-CEP 17 SpectrumGreen) called PathVysion HER2 DNA Probe Kit (Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, IL) was performed for FISH. This probe kit was used in accordance with the manufacturer's instructions with a few minor modifications. Briefly, 2- μ m-thick unstained histologic sections of breast carcinoma tissue were obtained. The sections were deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol, and dried on a slide warmer at 60°C. Slides were then pretreated with 0.2N hydrochloric acid for 20 minutes, followed by washes in purified water and immersion in wash buffer. They were subsequently immersed in protease solution at 37°C for 16 minutes, washed in purified water, immersed in wash buffer, and dried on a slide warmer at 37°C for 15 minutes. The slides then were immersed in 10 percent buffered formalin at room temperature for four minutes, washed in wash buffer, and dried on a slider warmer at 37°C for 15 minutes. After that, 10 μ L of the probe was applied on the slides. The slides then were coverslipped, sealed with rubber cement, and put in a water bath at 80°C for eight minutes. Following this, the slides were placed in a prewarmed, humid incubation chamber at 37°C overnight. The coverslips were removed the next day, and the slides were immersed in a post-wash solution at room temperature for three minutes and in a prewarmed post-wash solution at 80°C for

three minutes. The slides were then air-dried, and a 4', 6-diamidino-2-phenylindole counterstain was applied. Finally, the slides were coverslipped and sealed.

The quantification of the *HER2* gene copy number was carried out in a dark room using a Zeiss Axio Imager M1 fluorescence microscope (Carl Zeiss AG, Germany) with appropriate filters (Chroma Technology GmbH, Fuerstenfeldbruck, Germany) and the assistance of Metafer 4 Imaging Software (Metasystems, Altussheim, Germany). The pathologist chose ten fields of the slides that contained breast carcinoma cells. The fluorescent signals for the *HER2* gene and chromosome 17 centromere were then counted by tiles according to the Metafer 4 classifier for *HER2* analysis. The most recent consensus³⁷ of ASCO and CAP recommends the following results for *HER2* gene amplification: amplified, equivocal, and nonamplified. Criteria for determining the presence or absence of *HER2* amplification by FISH are summarized as follows: amplification was defined by more than six *HER2* gene copies per nucleus or a *HER2*/CEP17 ratio (*HER2* gene signals to chromosome 17 centromere signals) of more than 2.2; *HER2* was considered nonamplified if less than four *HER2* gene copies per nucleus were seen or a *HER2*/CEP17 ratio was <1.8. Results were considered equivocal if the *HER2*/CEP17 ratio was between 1.8 and 2.2. The FISH results were interpreted blindly by two pathologists without the knowledge of previous IHC results.

Cases selection for comparison of *HER2* testing between reference and local laboratories

The study group included 500 consecutive cases of invasive breast carcinoma received in 2008 and 2009 for HER2 testing by Consultoria em Patologia that were previously tested in 149 different local laboratories from all geographic regions of Brazil. A local laboratory consisted of a community-based laboratory with a low volume of HER2 testing (up to 100 HER2 assays per month, in general).^{43,47,48}

All cases were morphologically reviewed by at least two different pathologists in order to confirm the diagnosis of invasive breast carcinoma and to classify tumors according to the World Health Organization (WHO) classification.¹

Information regarding HER2 testing performed by local laboratories was retrieved from the immunohistochemical reports, including the geographic location of the laboratory, fixation of specimen (fixative and fixation time), HER2 score, and HER2 antibody specifications, when present.

Paraffin-embedded breast carcinoma tissue from all cases was used for HER2 testing. The same paraffin blocks used by local laboratories were employed. The HER2 score was determined using the SP3 antibody as previously described.

Statistical analysis

SP3 immunostaining was compared with the FISH method for validation purposes. The proportion of conclusive results (scores different than 2+) was compared, and the significance was tested (comparison of 2 proportion tests). Several performance measures were used, including sensitivity, specificity, and the Youden index. Confidence intervals were made with $\gamma = 95\%$. Cohen κ was

calculated and tested. Tests' scores association was evaluated using χ^2 statistic. The significance level used in all tests was 5%.⁵¹⁻⁵⁴

The HER2 scores of the reference laboratory (Consultoria em Patologia) were compared with the respective score results of local laboratories. Kappa statistic was used as a performance measure. The significance level used was 5%.

RESULTS

Validation of HER2 testing by reference laboratory (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil)

Most of the 2,000 cases included were classified as ductal (95.4%) and lobular carcinoma (3.2%) with rare mucinous, papillary, and apocrine carcinomas. Due to inconclusive FISH results (n=218) and chromosome 17 polysomy (n=667), 1,115 breast carcinoma cases were considered for validation purposes. In most of the inconclusive cases, the tumor tissue in the paraffin block was not adequately preserved.

For statistical analysis, score 2+ cases (n=421) were excluded as they can be HER2 nonamplified (n=294, 69.8%) or HER2 amplified (n=127, 30.2%). The correlation between SP3 and FISH results is shown in Table 1. Considering the cases classified with a score 0 by IHC (n=209), only 2 (1.0%) cases were FISH amplified. Moreover, 148 cases were scored 1+ by IHC, and only 4 (2.7%) were FISH amplified. These 6 IHC-negative FISH-amplified cases showed low amplification by FISH. Only 5/337 (1.5%) were scored 3+ but not amplified by FISH. The association

test between both IHC and FISH results revealed $\chi^2 = 650.7$ ($P < 0.001$), which indicates a significant association between the two tests. Using FISH as the reference test, the sensitivity, specificity, and Youden index of SP3 were 98.0%, 99.0%, and 97.0%, respectively. The overall concordance between SP3 and FISH was 98.4%, with concordance k coefficient equal to 0.968 ($P < 0.001$).

Comparison of HER2 testing between reference and local laboratories

The 500 cases of invasive breast carcinoma included in the study were classified as invasive ductal carcinoma not otherwise specified (94.4%) and invasive lobular carcinoma (4.0%). Mucinous, papillary, tubular, apocrine, and metaplastic carcinomas were rarely found (1.6%), as shown in Table 2.

Cases from all geographic regions of Brazil were represented. Most cases were from the Southeast region (68.6%), followed by the South (13.0%), Northeast (10.4%), Midwest (6.0%) and North (2.0%) regions. The total number of cases from each local laboratory varied from 1 to 31 cases.

Immunohistochemical reports from local laboratories revealed the use of different antibodies against the HER2 protein. Interestingly, the antibody used for HER2 testing by local laboratories was not specified in most of the cases (55.8%). When the information regarding the antibody specification was available, CB11 (16.4%), polyclonal from DAKO (6.4%), and 5A2 antibodies were used most frequently. HercepTest[™] was employed in 19 (3.8%) cases, followed by A0485 (3.6%), “polyclonal” not otherwise specified (2.8%), SP3 (2.4%), TAB250 (1.4%), EP1045Y (0.6%), HER-24 (0.4%), CBE1 (0.2%) and 10A7 (0.2%).

The comparison of the HER2 results between reference and local laboratories is shown in Table 3. Considering the cases classified with a score 0 by the reference laboratory (n=161), only 10 (6.2%) cases from the local laboratories were concordant. The reference laboratory scored 86 cases 1+, and only 12 (14.0%) were concordant in the local laboratories. The scores 2+ and 3+ were concordant in 79/93 (84.9%) and 70/160 (43.8%) cases, respectively.

As also shown in Table 3, 247 cases were considered HER2-negative (scores 0 and 1+) by the reference laboratory, but 27 (10.9%) of those cases were scored 3+ (HER2-positive) by local laboratories. Interestingly, 173/247 HER2-negative cases (70.0%) were scored 2+ (equivocal) by local laboratories. Equivocal HER2 results (score 2+) were reported in 338 (67.6%) cases examined by local laboratories; in contrast, only 93 (18.6%) cases were scored 2+ by the reference laboratory. Figure 1 shows the distribution of the cases by scores in reference and local laboratories.

Missing, incomplete, and/or imprecise information frequently was found in the HER2 immunohistochemical reports from local laboratories. Information about the fixation of the specimens (including the fixative used and fixation time) was found in only 37.4% of the reports, and all of them reported formalin as fixative. Fixation time was not found in all reports. Most reports (70.4%) provided no information about the type of breast carcinoma (*in situ* or invasive carcinoma) tested in IHC assays. In 373 (74.6%) cases, no explanation regarding the meaning of the HER2 scores existed in the reports. The source of information for interpretation of HER2 results was not referred in 412 (82.4%) reports; 88 (17.6%) reports referred that the interpretation of HER2 results was based on CAP guidelines (70 reports) or

HercepTest data sheet (18 reports). Moreover, in 228/338 (67.4%) cases scored 2+ by local laboratories, such result was reported as HER2-positive instead of equivocal, and 17/38 (44.7%) cases were scored 1+ and referred as HER2-positive by local laboratories in their reports. Information indicating the utility of FISH for equivocal (score 2+) cases was presented in only 93 (27.5%) reports from local laboratories. Imprecise information such as cytoplasmic or nuclear immunostaining for HER2 (instead of membrane staining) was found in 1% of reports from local laboratories. Only 191 reports (38.2%) informed the use of tissue controls for IHC assays.

DISCUSSION

Brazil is the fifth largest country in the world. It has a population of approximately 190 million people.⁵⁵ The incidence of breast cancer in Brazil is about 50,000 new cases per year,⁵⁶ and it is considered an important public health problem.

HER2 testing has become an essential part of the clinical evaluation of breast carcinomas, and accurate HER2 results are critical in identifying patients who may benefit from targeted therapy with trastuzumab. Some reports in the literature, however, demonstrated discordance in HER2 results by IHC and FISH between different laboratories in developed countries. Discordance rates are generally higher when HER2 testing is performed in low-volume local laboratories whereas discordance is lower in high-volume, central, or reference laboratories.⁴³⁻⁴⁹

Most studies compared the results of HER2 immunohistochemical assays and FISH between local, central, and reference laboratories, and some of them

included HER2-positive cases only. In a central laboratory, Paik et al.⁴³ reviewed 104 cases considered HER2-positive by local laboratories, and 82 cases were confirmed to be truly HER2-positive using the HercepTest™ and FISH. Roche et al.⁴⁴ compared 119 score 3+ cases from 65 different local laboratories in the USA with the results from a central laboratory. They found a concordance of 74.0% between them. Press et al.⁴⁵ tested 1291 breast cancers from outside laboratories using IHC, and they reported 96.1% concordance between HER2-negative (0 or 1+ immunostaining) cases and 51.7% between cases that were scored 2+ and 3+. Perez et al.⁴⁶ reported that 18.4-25.0% of cases considered to be HER2-positive using IHC by local laboratories were, in fact, HER2-negative in a central laboratory. Discordant cases were retested at a reference laboratory, and a high level of agreement between central and reference laboratories was confirmed. Reddy et al.⁴⁷ demonstrated false-positive and false-negative rates of 14.0% and 18.0%, respectively, in local laboratories. O'Malley et al.⁴⁸ showed concordance in 79.3-89.6% HER2-positive cases and in 94.8-100.0% HER2-negative cases between local and central laboratories, depending on the IHC method. Papadopoulos et al.⁴⁹ compared the results of HER2 IHC between central and regional laboratories in Greece. They demonstrated 85.0% concordance in IHC-negative tumors and 63.0% in IHC-positive cases.

Consultoria em Patologia is considered a reference laboratory in Brazil due to its high volume of HER2 testing (approximately 6,000 cases for IHC and 1,500 cases for FISH a year). It also participates in ongoing HER2 quality assurance programs (UKNEQAS, United Kingdom, and CAP, United States). In the present study, we compared the results for HER2 testing in 500 invasive breast carcinomas

between a reference laboratory and 149 different local laboratories. Local, low-volume laboratories from all geographic regions of Brazil were represented.

We decided to use IHC only for HER2 testing because this technology is available widely in Brazil. HER2 expression was demonstrated using the SP3 antibody according to FDA-approved guidelines. We decided to select the SP3 antibody because Consultoria em Patologia has extensive experience using this antibody, and the present study confirms its full validation as previously demonstrated (overall concordance with the reference test FISH was 98.4%).

Our results show a poor concordance (34.2%) between the results from local laboratories and the reference laboratory if all the scores are considered together. The concordance was very low for negative results: 6.2% and 14.0% for scores 0 and 1+, respectively. Most HER2-negative cases in the reference laboratory (70.0%) were scored 2+ (HER2-equivocal) by local laboratories. Considering the reference laboratory IHC results as “gold-standard”, the false-positive rate for the local IHC test (samples that tested IHC 3+ locally but scored 0 or 1+ by the reference laboratory) was 10.9% (27/247). This fact alerts us that there are some patients that could potentially be given trastuzumab unnecessarily. For the positive results (score 3+), the concordance was 43.8%. Most HER2-positive cases in the reference laboratory (53.8%) were scored 2+ by local laboratories. Considering the reference laboratory IHC results as the “gold-standard”, the false-negative rate for the local IHC test (samples that tested IHC 0 and 1+ locally but scored 3+ by the reference laboratory) was 2.5% (4/160). This finding demonstrates that some patients may potentially not be appropriately treated with trastuzumab. The concordance was higher for score 2+ (84.9%), but this may be explained by the fact that local

laboratories have a high tendency to report score 2+. Equivocal HER2 results were reported in 338 (67.6%) cases tested by local laboratories; in contrast, only 93 (18.6%) cases were scored 2+ by the reference laboratory. Considering the 338 cases presenting equivocal HER2 results in local laboratories, 51.2% were considered HER2-negative (scores 0 and 1+) and 25.5% were HER2-positive (score 3+) by the reference laboratory, so FISH would be necessary in only 23.4% of those cases, a finding that is related to higher costs and delay in starting patients' treatment. Table 4 presents a comparison of the concordance results between laboratories reported by the literature and by the present study.

Missing, incomplete, and/or imprecise information frequently was found in the HER2 immunohistochemical reports from local laboratories. Information about the fixation of the specimens (including the fixative used and fixation time) was infrequently reported. The absence of explanation about the meaning of HER2 scores was a frequent finding. There was no information about which scoring system was used in many reports. Moreover, most cases scored 2+ or 1+ by local laboratories were reported as HER2-positive instead of equivocal or negative, respectively. Information indicating the utility of FISH for equivocal (score 2+) cases was found in only 93 (27.5%) reports from local laboratories. Imprecise information such as cytoplasmic or nuclear immunostaining for HER2 (instead of membranous staining) was also reported.

These findings show that local laboratories are probably not following the recommended guidelines for HER2 testing, and, unfortunately, imprecise results may have been presented in their reports. The overall low concordance between the reference laboratory and local laboratories may be related to their low-volume load

of HER2 assays. Technical issues related to IHC may play an important role as anomalous HER2 expression in cytoplasm or nucleus and false-negative results could occur. Moreover, imprecise HER2 results could be related to inexperience with the HER2 scoring system or ignored FDA-approved guidelines. Differences in the types of breast carcinoma (*in situ* or invasive carcinoma) tested in IHC assays and antibody issues could also be causes of discrepancies in the results between laboratories. Local laboratories used different antibodies in HER2 assays, and most of them did not provide appropriate specifications, limiting the comparison among different antibodies.

This study presents a high discordance in the results for HER2 IHC assays between local laboratories and the reference laboratory in Brazil, which may be related to technical and interpretation issues. These results are disappointing and may be associated with erroneous treatment of HER2-negative patients, which is associated with high treatment costs and potential toxicity; also, the lack of treatment of HER2-positive patients may have devastating results. We believe that standardization of HER2 testing with rigorous quality control measures by local laboratories is crucial, and reference laboratories could be helpful in the validation of local laboratories' HER2 results.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the staff from Consultoria em Patologia for excellent technical assistance, and Dr. Everardo Saad (Dendrix) and Mr. Antonio Bruni for their help with statistical procedures.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2003.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2/neu* oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
3. Yarden Y. Biology of *HER2* and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;61(suppl 2):1-13.
4. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
5. Ross JS, Fletcher JA. *HER2/neu* (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;112(1 Suppl 1):S53-S67.
6. Wright C, Nicholson S, Angus B, et al. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65:118-121.

7. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have *HER2*-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.
8. Fornier M, Esteva FJ, Seudman AD. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2000;27(6 suppl 11):38-45; discussion 92-100.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against *HER2* for metastatic breast cancer that overexpresses *HER2*. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
10. Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in *HER2* 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol* 2004;22:1071-1077.
11. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of *HER2*-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-726.
12. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The *HER2* receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-*HER2* therapy and personalized medicine.

Oncologist 2009;14:320-368.

13. Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, et al. HER2 fluorescence in situ hybridization: results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:325-331.

14. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true HER2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2572-2579.

15. Barron JJ, Cziraky MJ, Weisman T, et al. HER2 testing and subsequent trastuzumab treatment for breast cancer in a managed care environment. *Oncologist* 2009;14:760-768.

16. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1974-1982.

17. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. *HER2/neu* testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000;13:866-873.

18. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the *HER2/neu* alteration in human breast cancer: a direct comparison of

fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651-3664.

19. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al. *HER2* testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002;77:148-154.

20. Leong TY, Leong AS. Controversies in the assessment of HER-2: more questions than answers. *Adv Anat Pathol* 2006;13:263-269.

21. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105.

22. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for *HER2* in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418-423.

23. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. *HER2* amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004;5:63-69.

24. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004;291:1972-1977.
25. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000;113:675-682.
26. Vera-Román JM, Rubio-Martínez LA. Comparative assays for the HER2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:627-633.
27. Ainsworth R, Bartlett JM, Going JJ, et al. IHC for HER2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of *HER2* gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1086-1090.
28. Kulka J, Tóké AM, Kaposi-Novák P, et al. Detection of *HER2/neu* gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - a comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res* 2006;12:197-204.
29. Rossi E, Ubiali A, Cadei M, et al. *HER2/neu* in breast cancer: a comparative study between histology, immunohistochemistry, and molecular technique (FISH). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:127-131.
30. Powell WC, Hicks DG, Prescott N, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the *HER2* status in

breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:94-102.

31. Van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, et al. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2/neu status in breast cancer. *Mod Pathol* 2009;22:879-886.

32. Birner P, Oberhuber G, Stani J, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1669-1675.

33. Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, et al. High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. *Mod Pathol* 2008;21:1271-1277.

34. Press MF, Hung G, Godolphin W, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-2777.

35. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, et al. Best practice n° 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57:233-237.

36. Hanna W, O'malley FP, Barnes P, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on *HER2/neu* testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007;14:149-153.
37. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
38. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current perspectives on *HER2* testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16:173-182.
39. Zarbo RJ, Hammond ME. *HER2/neu* testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:549-553.
40. Gown AM. Current issues in ER and *HER2* testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;21 Suppl 2:S8-S15.
41. Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of *HER2* testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol* 2001;116:806-810.
42. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27:1323-1333.

43. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:852-854.

44. Roche PC, Jenkins RB, Davidson NE, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:855-857.

45. Press MF, Sauter G, Bernstein L, et al. Diagnostic evaluation of HER2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 2005;11:6598-6607.

46. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006;24:3032-3038.

47. Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, et al. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer* 2006;7:153-157.

48. O'Malley FP, Thomson T, Julian J, et al. HER2 testing in a population-based study of patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Arch Pathol*

Lab Med 2008;132:61-65.

49. Papadopoulos S, Kouvatses G, Skarlos D, et al. Comparison of HER2 detection methods between central and regional laboratories in Greece. *Clin Breast Cancer* 2007;7:784-790.

50. Wludarski SC, Bacchi CE. High concordance of SP3 rabbit monoclonal antibody with FISH to evaluate HER2 in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16:466-470.

51. Hilden J, Glasziou P. Regret graphs, diagnostic uncertainty and Youden's Index. *Stat Med* 1996;15:969-986.

52. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3:32-35.

53. Goldman L. Quantitative aspects of clinical reasoning. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th ed. Copenhagen, Denmark: McGraw-Hill, 1994:43-48.

54. Young KD, Lewis RJ. What is confidence? Part 2: detailed definition and determination of confidence intervals. *Ann Emerg Med* 1997;30:311-318.

55. [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística web site]. Available at: <http://www.ibge.gov.br/english>. Accessed February 23, 2010.

56. Estimativa 2010 – Incidência de câncer no Brasil. [Instituto Nacional de Câncer web site]. Available at:

http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5.

Accessed February 23, 2010.

Tables

Table 1 – Validation of SP3-IHC by correlation with FISH

SP3 scores	FISH not amplified (%)	FISH amplified (%)	Total
0	207 (99.0%)	2 (1.0%)	209
1+	144 (97.3%)	4 (2.7%)	148
3+	5 (1.5%)	332 (98.5%)	337
Total	356	338	694

Table 2 – Histological classification of invasive breast carcinomas according to WHO, 2003

Histological type	No. cases	%
Ductal carcinoma, NOS	472	94.4
Lobular carcinoma	20	4.0
Mucinous carcinoma	3	0.6
Papillary carcinoma	2	0.4
Tubular carcinoma	1	0.2
Apocrine carcinoma	1	0.2
Metaplastic carcinoma	1	0.2
TOTAL	500	100.0

NOS, not otherwise specified; WHO, World Health Organization

Table 3 – Distribution of HER2 results between reference and local laboratories

			Reference laboratory HER2 score				TOTAL
			0	1+	2+	3+	
			n=161	n=86	n=93	n=160	n=500
Local laboratory HER2 score	0	n	10	4	1	1	16
		%	6.2	4.7	1.1	0.6	3.2
	1+	n	21	12	2	3	38
		%	13.0	14.0	2.2	1.9	7.6
	2+	n	110	63	79	86	338
		%	68.3	73.3	84.9	53.8	67.6
	3+	n	20	7	11	70	108
		%	12.4	8.1	11.8	43.8	21.6

Table 4 – Comparison of the concordance results between reference/central and local laboratories reported by the literature and by the present study

Authors and Country	No. cases	Concordance (%)	Type of cases
Paik et al., ⁴³ USA	104	79.0	HER2-positive
Roche et al., ⁴⁴ USA	119	74.0	HER2-positive
Press et al., ⁴⁵ USA and Switzerland	1291	96.1	Scores 0 and 1+
		51.7	Scores 2+ and 3+
Perez et al., ⁴⁶ USA	1699	75.0-81.6*	HER2-positive
Reddy et al., ⁴⁷ USA	973	34.0	Score 0
		54.0	Score 1+
		26.0	Score 2+
		77.0	Score 3+
O'Malley et al., ⁴⁸ Canada	505	79.3-89.6*	HER2-positive
	205	94.8-100.0*	HER2-negative
Papadopoulos et al., ⁴⁹ Greece	369	85.0	Scores 0 and 1+
		80.0	Score 2+
		63.0	Score 3+
Wludarski et al., Brazil	500	6.2	Score 0
(present study)		14.0	Score 1+
		84.9	Score 2+
		43.8	Score 3+

*depending on immunohistochemistry method

Figure Legends

Figure 1. Frequency of cases per HER2 score by reference and local laboratories.

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Sheila Wludarski

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Pathology International*.

Manuscript ID: PIN-2010-00208

Title: Estrogen and progesterone receptors testing in breast carcinoma: concordance rate between reference and local laboratories in Brazil

Authors: Wludarski, Sheila
Lopes, Usandro
Duarte, Iverson
Carvalho, Filomena
Weiss, Lawrence
Bacchi, Carlos

Date Submitted: 26-Sep-2010

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.4.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTOR TESTING IN
BREAST CARCINOMA: CONCORDANCE RATE BETWEEN
REFERENCE AND LOCAL LABORATORIES IN BRAZIL**

Sheila C. L. Wludarski, MD^{1,2}, Lisandro F. Lopes, MD, PhD¹,

Íverson X. Duarte, MD¹, Filomena M. Carvalho, MD, PhD²,

Lawrence M. Weiss, MD³, and Carlos E. Bacchi, MD, PhD^{1,2}

*From ¹Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil; ²Department of Pathology,
University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, SP, Brazil, and ³Division of
Pathology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA*

Name and address for correspondence and reprint requests:

Carlos E. Bacchi, MD, PhD

Consultoria em Patologia

Rua Major Leonidas Cardoso, 739

Botucatu, SP, 18602-010, Brazil

Telephone/fax: +55 14 31125900

e-mail: bacchi@conspat.com.br

Abstract

Breast cancer accounts for approximately one quarter of all cancers in females. Estrogen and progesterone receptors testing has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate results are critical in identifying patients who may benefit from hormonal therapy. The present study investigated the concordance in the results of hormone receptors testing by immunohistochemistry performed in 500 invasive breast carcinomas between a reference laboratory and 146 local laboratories from all geographic regions of Brazil. There was concordance in 89.4% (447/500 cases) and 85.0% (425/500 cases) regarding estrogen and progesterone receptors results, respectively, between local and reference laboratories, similar to that described in other countries. The false negative rate for estrogen and progesterone receptors testing in local laboratories was 8.7% and 14.4%, respectively. The false positive rate for estrogen and progesterone receptors testing in local laboratories was 15.5% and 16.0%, respectively. Technical and interpretation criteria issues may play an important role in explaining most of the discordances in hormone receptors testing in local laboratories. Validation of estrogen and progesterone receptors testing with rigorous quality control measures by local laboratories is highly recommended in order to avoid erroneous treatment of breast cancer patients.

Brief title: Hormone receptors testing in Brazil

Key Words: Brazil; estrogen receptor; progesterone receptor; immunohistochemistry; local laboratory; reference laboratory

Breast cancer is one of the most common human neoplasms, accounting for one quarter of all cancers in females.¹ Hormonal therapy is frequently used in breast carcinoma treatment because it reduces the relative risk of recurrence by more than 50% in patients with hormone-sensitive tumors, leading to significant improvements in survival. For these reasons, the determination of estrogen (ER) and progesterone (PgR) receptor status has become an essential part of the clinical evaluation of all breast carcinoma patients, and accurate results are critical in identifying patients who may benefit from hormone therapy.²⁻⁸

Immunohistochemistry (IHC) is currently the most common method used for the determination of ER and PgR status. Low cost and applicability to routinely processed and archival tissue samples are the main advantages of IHC. However, discordances in ER and PgR testing have been reported in the literature, and they have been mostly related to technical issues, including fixative and fixation issues, immunohistochemical methodology and diversity of interpretation of results.⁹⁻²⁹

Considering that the accuracy of ER and PgR testing in breast carcinoma is extremely important for the selection of hormonal therapy, the present study aims to investigate the concordance in the results of ER and PgR by IHC between a reference laboratory (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil) and local (or community) laboratories in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Institutional Certifications

This study was approved by the Department of Pathology Scientific Committee of the University of Sao Paulo School of Medicine, and by the Ethical Committee for Research Projects of the University of Sao Paulo School of Medicine Clinical Hospital (“Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa” – CAPPesq, protocol #1238/09).

Validation of estrogen and progesterone receptors testing by reference laboratory (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil)

The validation of any clinical assay requires that results be compared with a standard. For ER and PgR testing, the recommended approach of validation is based on the comparison of assays’ results with results obtained by another laboratory using a testing method that has been previously validated against clinical outcome or proficiency-testing material that has been validated by showing consensus results among multiple laboratories in a peer group (which must include laboratories with validated assays). ER and PgR IHC assays not subjected to direct clinical validation may be validated by showing at least 90% agreement for positive results and at least 95% agreement for negative results (a minimum of 20 positive and 20 negative specimens are required) with testing performed on the same blocks

in another laboratory that provides written attestation that it is in conformance with American Society of Clinical Oncology (ASCO) and College of American Pathologists (CAP) testing requirements and that offers fully validated ER and PgR assays.^{6,7,30}

Consultoria em Patologia, a reference laboratory located in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil, performs approximately 7,000 ER and PgR assays by IHC annually. In order to further validate ER and PgR testing by Consultoria em Patologia, we compared the results of ER and PgR IHC assays between a CAP-accredited laboratory that performs fully validated ER and PgR testing (PhenoPath Laboratories, Seattle, WA, USA) and Consultoria em Patologia.

For validation purposes, 255 invasive breast carcinomas samples (a 2-mm tissue core for each sample) were distributed over 9 tissue microarray (TMA) blocks. Unstained 3- μ m-thick histologic sections of each TMA block were obtained and used for the determination of ER and PgR status by IHC in PhenoPath Laboratories and Consultoria em Patologia. In Consultoria em Patologia, the sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols and phosphate-buffer saline (PBS). The sections were then submitted to antigen retrieval in a pressure pan using citric acid (0.21%, pH 6.0) for a total of eight minutes, followed by a 20-minute cool down period at room temperature. Subsequently, slides were incubated overnight with the primary antibody. The SP1 rabbit monoclonal antibody (code RM-9101-S, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA; dilution 1:1000) was used for ER testing. The PgR 636 mouse monoclonal antibody (code M3569, Dako, Carpinteria, CA; dilution 1:1600) was employed for PgR testing. After incubation with the primary antibody, slides were washed with PBS, and incubated with

Novolink polymer (code 7161, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) for 30 minutes. Diaminobenzidine was used as the chromogen, and sections were counterstained with hematoxylin and coverslipped. The same antibodies (SP1 for ER and PgR 636 for PgR) were also employed at PhenoPath Laboratories using fully validated technical procedures.

The results of ER and PgR assays were compared between PhenoPath Laboratories and Consultoria em Patologia according to the most recent consensus of ASCO and CAP: ER and PgR tests were considered positive if there were at least 1% positive tumor nuclei in the samples tested, irrespective of the intensity of staining.^{6,7,30}

Cases selection for comparison of estrogen and progesterone receptors results between reference and local laboratories

The study group included 500 consecutive cases of invasive breast carcinoma received in 2008 and 2009 for ER and PgR testing by Consultoria em Patologia that were previously tested in 146 different local laboratories from all geographic regions of Brazil. A local laboratory consisted of a community-based laboratory with a low volume of ER and PgR testing.

All cases were morphologically reviewed by at least two different pathologists in order to confirm the diagnosis of invasive breast carcinoma and to classify tumors according to the World Health Organization (WHO) classification.¹

Information regarding ER and PgR testing performed by local laboratories was retrieved from the immunohistochemical reports, including the

geographic location of the laboratory, details about the fixation of the specimen (fixative used and fixation time), type of breast carcinoma (*in situ* or invasive carcinoma) tested, use of tissue controls, IHC methodology (antibodies, antigen retrieval technique and detection system specifications), ER and PgR results and interpretation criteria for reporting the results.

Paraffin-embedded breast carcinoma tissue from all cases was used for ER and PgR testing in the reference laboratory. The same paraffin blocks used by local laboratories were employed. IHC was used to determine ER and PgR status as previously described. According to the most recent consensus of ASCO and CAP,^{6,7} ER and PgR results were considered positive if there were at least 1% positive tumor nuclei in the samples tested, irrespective of the intensity of staining. ER and PgR results were interpreted blindly by experienced pathologists without the knowledge of previous results defined by local laboratories.

Statistical analysis

Reference and local laboratories results for ER and PgR were compared using Pearson's chi-square (χ^2) test. Kappa statistic was used as a concordance measure. Sensitivity, specificity, false negative rate, false positive rate, positive predictive value, negative predictive value, overall accuracy, and the Youden index were calculated. The significance level used in all tests was 5%.³¹⁻³⁴

RESULTS

Validation of estrogen and progesterone receptors testing by reference laboratory (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil)

As previously presented, 255 invasive breast carcinomas samples were tested for ER and PgR for validation purposes. In the CAP-accredited laboratory (PhenoPath Laboratories), 172 samples were considered positive and 83 were negative for ER; 164 samples were considered positive and 91 were negative for PgR. The overall concordance between PhenoPath Laboratories and Consultoria em Patologia was 98.8% (252/255 samples) and 98.4% (251/255 samples) for ER and PgR, respectively. For positive results, the concordance was 100.0% for both ER and PgR. For negative results, the concordance was 96.4% for ER and 95.6% for PgR. These results fully validate ER and PgR testing in Consultoria em Patologia according to recent recommendations for validating ER and PgR IHC assays.^{6,7,30}

Comparison of estrogen and progesterone receptors testing between reference and local laboratories

The 500 cases of invasive breast carcinoma included in the study were classified as invasive ductal carcinoma not otherwise specified (93.8%) and invasive lobular carcinoma (2.6%). Micropapillary, apocrine, tubular, papillary, metaplastic and mucinous carcinomas were rarely found (3.6%), as shown in Table 1.

Cases from all geographic regions of Brazil were represented. Most cases

were from the Southeast region (70.0%), followed by the South (12.8%), Northeast (8.0%), Midwest (6.6%) and North (2.6%) regions. The total number of cases from each local laboratory varied from 1 to 41 cases.

Information about the fixation of the specimens (including the fixative used and fixation time) was found in only 32 (6.4%) reports from local laboratories, and all of them reported formalin as fixative. Fixation time was not found in all reports. Most reports (67.6%) provided no information about the type of breast carcinoma (*in situ* or invasive carcinoma) tested in IHC assays. Only 209 reports (41.8%) provided information on the use of tissue controls for IHC assays. The antibody used for ER testing by local laboratories was not specified in 169 cases (33.8%). When the information regarding ER antibody specification was available, 1D5 (53.8%), 6F11 (24.2%) and SP1 (13.3%) antibodies were used most frequently; CC4-5 was employed in 16 (4.8%) cases, followed by SP4 (2.1%), RBT11 (1.2%) and LH2 (0.6%). The antibody used PgR testing by local laboratories was not specified in 194 cases (38.8%). When the information regarding PgR antibody specification was available, PgR 636 (36.3%), 1A6 (29.1%), 16 (13.7%) and 312 (10.4%) antibodies were used most frequently; NCL was employed in 7 (2.3%) cases, followed by PR-2C5 (1.6%), SP2 (1.6%), 1A7 (1.0%), RBT22 (1.0%), sp21 (1.0%), Y85 (1.0%), M3569 (0.7%) and PGR-NCL (0.3%). The antigen retrieval method was not specified in 198 (39.6%) reports. When available, heat-induced antigen retrieval was employed. The detection system was not specified in 128 (25.6%) reports. When available, LSAB (labeled streptavidin biotin) was used most frequently (60.5%), followed by ABC (avidin biotin complex) (15.3%), “polymer” (15.3%), EnVision™ (5.9%), ADVANCE™ HRP (2.4%) and PAP (peroxidase anti-

peroxidase) (0.6%).

The comparison of ER and PgR results between reference and local laboratories is shown in Tables 2 and 3. Using kappa statistic as a concordance measure ($\kappa=0.744$; $P<0.001$; 95% confidence interval 0.679–0.809), the overall accuracy of ER testing in local laboratories was 89.4% (447/500 cases). ER positive and negative results were concordant between reference and local laboratories in 91.3% (327/358) and 84.5% of the cases (120/142), respectively. The Pearson's chi-square (χ^2) association test for ER results between reference and local laboratories revealed $\chi^2=273.889$ ($P<0.0001$), which indicates a significant association in the results. The sensitivity, specificity, false negative rate, false positive rate, positive predictive value, negative predictive value and Youden index of ER testing in local laboratories were 91.3%, 84.5%, 8.7%, 15.5%, 93.7%, 79.5% and 75.8%, respectively. Using kappa statistic as a concordance measure ($\kappa=0.688$; $P<0.001$; 95% confidence interval 0.623–0.753), the overall accuracy of PgR testing in local laboratories was 85.0% (425/500 cases). PgR positive and negative results were concordant between reference and local laboratories in 85.6% (262/306) and 84.0% of the cases (163/194), respectively. The Pearson's chi-square (χ^2) association test for PgR results between reference and local laboratories revealed $\chi^2=234.490$ ($P<0.0001$), which indicates a significant association in the results. The sensitivity, specificity, false negative rate, false positive rate, positive predictive value, negative predictive value and Youden index of PgR testing in local laboratories were 85.6%, 84.0%, 14.4%, 16.0%, 89.4%, 78.7% and 69.6%, respectively.

Unfortunately, there was no comment concerning the criteria used for the interpretation of ER and PgR results in 155 (31.0%) and 162 (32.4%) reports from

local laboratories, respectively. When such information was available, reports from local laboratories stated that the interpretation of ER results was based on quantification of cells only (59.7%), both quantification of cells and intensity of immunostaining (39.7%), or intensity of immunostaining only (0.6%). The interpretation of PgR results was based on quantification of cells only (60.0%), both quantification of cells and intensity of immunostaining (39.7%), or intensity of immunostaining only (0.3%). No specification about the minimal percentage of cells necessary to consider the test positive was found in any report from local laboratories.

DISCUSSION

Brazil is the fifth largest country in the world, with a population of approximately 190 million people.³⁵ The incidence of breast cancer in Brazil is about 50,000 new cases per year,³⁶ and it is considered an important public health problem.

Hormone receptors status should be defined in all newly diagnosed, invasive breast carcinomas as well as recurrences to determine patient eligibility for hormonal therapy, which provides substantial survival benefit in patients with hormone-positive tumors. Accurate determination of ER and PgR status is, therefore, critical to ensure patients receive appropriate therapy.^{2-8,30}

However, discordances in hormone receptors testing using IHC have been reported in different laboratories from several countries, and they are probably related to technical issues, including delayed or inadequate fixation, nonoptimized antigen retrieval, and diversity of interpretation and reporting of results.⁹⁻²⁹ In 2000,

Rhodes et al.¹⁰ demonstrated considerable interlaboratory variability (200 laboratories from 26 countries) in ER results, especially in relation to the detection of breast cancers with low ER positivity, with a false-negative rate ranging from 30% to 60%. That interlaboratory variability was probably related to differences in IHC methodology, according to those authors. In 2001, the same authors, in a study that involved 105 laboratories, showed that the efficiency of the antigen retrieval step was the single most important contributory factor influencing the overall reproducibility of the hormones assays. Reliable assays were found in the majority of centers known to have clinically validated results. Inadequate assay sensitivity, with subsequent weak staining, was the main cause of poor and variable results by laboratories using microwave antigen retrieval; too short heating time was identified as the principal contributory factor. Extension of the heating time resulted in significant improvement regardless of all other variables in the immunohistochemical protocol. They also stated that continual participation in external quality assessment programs was an effective way for identifying and ameliorating variables that influence the reliability of immunohistochemical assays for ER and PgR determination, thereby assisting in technical validation and standardization.¹⁴ Regitnig et al.¹⁵ investigated the interlaboratory variability in the results of ER and PgR testing performed by different laboratories in Austria. They found that variability in the results was higher when participants used their own IHC staining method. In 2007, Viale et al.²² evaluated locally versus centrally assessed ER and PgR status in a significant number of breast cancer patients. Of 105 tumors considered to be ER-negative in local laboratories, 81 were found to have at least 1% of positive cells in central laboratories. Of 6,100 tumors locally ER-positive, 66 were

found to have no staining centrally. Discordance was more marked for PgR than ER. Because of those results, those authors recommended review of ER and PgR status in central laboratories whenever possible. Badve et al.²³ showed a concordance rate of 90% in ER testing between local and central laboratories. For PgR, the concordance between local and central laboratories was 84%. A recent inquiry into ER testing practices in Canada revealed that approximately one third of 1,023 ER assays were scored falsely negative when retested in a central laboratory. The possible causes of such discrepancies were related to turnover and lack of relevant training of pathologists and technologists, lack of appropriate quality assurance methods, and inadequate quality controls policies and practices. The false negative ER assays were found to have poor fixation, negative internal controls, and/or absent internal controls.²⁶ In 2009, Gelber et al.²⁷ reported that 4.3% of tumors that tested ER-positive in local laboratories were found to be negative (false positive) on central review. More than 20% of tumors that tested locally as ER negative were shown to exhibit at least some expression of ER (false negative) on central reference laboratory review. Table 4 presents a comparison of the concordance results for ER and PgR between laboratories reported by the literature and by the present study.

Consultoria em Patologia is considered a reference laboratory in Brazil due to its high volume of ER and PgR testing (approximately 7,000 assays every year). In the present study, we compared the results for ER and PgR testing in 500 invasive breast carcinomas between a reference laboratory and 146 different local laboratories from Brazil. Local, low-volume laboratories from all geographic regions of Brazil were represented.

Even though the overall concordance in the results of ER and PgR assays

between reference and local laboratories was high (89.4% for ER and 85.0% for PgR) and ER positive assays were concordant in 91.3% of the cases, ER negative assays were concordant in only 84.5%, a result that is lower than the minimum recommended. The same was true for PgR positive and negative results. They were concordant in 85.6% and 84.0% of the cases, respectively. As previously stated, at least 90% and 95% agreement for positive and negative results is recommended.^{6,7,30} The false negative rate for ER and PgR testing in local laboratories was 8.7% and 14.4%, respectively. It means that patients misclassified as having ER-negative tumors are denied the potential benefit of hormonal treatment. The false positive rate for ER and PgR testing in local laboratories was 15.5% and 16.0%, respectively. It means that patients misclassified as having ER-positive tumors will be exposed unnecessarily to the risks and costs of ineffectual treatment. The risks include a decrease in bone density with an increased fracture risk, an increased risk of thromboembolic events, and an increased risk of endometrial cancer.³⁷

Fixation issues, lack of use of tissue controls, diverse immunohistochemical protocols (different antibodies and antigen retrieval methods) probably not validated as recommended by ASCO and CAP, and heterogeneity in interpretation criteria for reporting the results could explain most of the ER and PgR testing discordances between local and reference laboratories in Brazil.

This study presents a relatively high concordance in the results of ER and PgR testing between local laboratories and a reference laboratory in Brazil, similar to other countries. However, false-negative and false-positive results occur, which may be related to technical and interpretation issues. These results may be associated with erroneous treatment of breast cancer patients. We believe that validation of ER and

PgR testing and standardization in interpretation of results with rigorous quality control measures by local laboratories is crucial, and reference laboratories could be helpful in the validation of local laboratories' ER and PgR assays.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the staff from Consultoria em Patologia for excellent technical assistance, and Mr. Antonio Bruni for his help with statistical procedures.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tavassoli FA, Devilee P, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2003.
2. Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; **37**: 4669-71.
3. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; **365**: 1687-717.
4. Fisher B, Redmond C, Brown A *et al*. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med* 1981; **305**: 1-6.
5. Fisher B, Redmond C, Brown A *et al*. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1983; **1**: 227-41.
6. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M *et al*. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer

(unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010; **134**: e48-72.

7. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M *et al*. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 2784-95.

8. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; **21 Suppl 2**: S8-S15.

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

10. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000; **53**: 125-30.

11. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol* 2000; **53**: 292-301.

12. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast

carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol* 2000; **53**: 688-96.

13. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J* 2000; **6**: 189-196.

14. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ *et al*. Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe. Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. *Am J Clin Pathol* 2001; **115**: 44-58.

15. Regitnig P, Reiner A, Dinges HP *et al*. Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories. *Virchows Arch* 2002; **441**: 328-34.

16. Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW *et al*. Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray. *Am J Clin Pathol* 2002; **117**: 723-8.

17. Layfield LJ, Goldstein N, Perkinson KR, Proia AD. Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogen receptor status. *Breast J* 2003; **9**: 257-9.

18. Wells CA, Sloane JP, Coleman D *et al.* Consistency of staining and reporting of oestrogen receptor immunocytochemistry within the European Union—an inter-laboratory study. *Virchows Arch* 2004; **445**: 119-28.
19. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol* 2005; **12**: 10-9.
20. Phillips T, Murray G, Wakamiya K *et al.* Development of standard estrogen and progesterone receptor immunohistochemical assays for selection of patients for antihormonal therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; **15**: 325-31.
21. Francis GD, Dimech M, Giles L, Hopkins A. Frequency and reliability of oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 in breast carcinoma determined by immunohistochemistry in Australasia: results of the RCPA Quality Assurance Program. *J Clin Pathol* 2007; **60**: 1277-83.
22. Viale G, Regan MM, Maiorano E *et al.* Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3846-52.
23. Badve SS, Baehner FL, Gray RP *et al.* Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central

laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 2473-81.

24. Hede K. Breast cancer testing scandal shines spotlight on black box of clinical laboratory testing. *J Natl Cancer Inst* 2008; **100**: 836-7, 844.

25. Mathews AW. Bad cancer tests drawing scrutiny. The Wall Street Journal, January 4, 2008:B1-B2.

26. Cameron MA. Commission of inquiry on hormone receptor testing. St. John's, Newfoundland, Canada, Government of Newfoundland and Labrador, 2009.

27. Gelber RD, Gelber S; International Breast Cancer Study Group; Breast International Group. Facilitating consensus by examining patterns of treatment effects. *Breast* 2009; **18 Suppl 3**: S2-8.

28. Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 2433-5.

29. Allred DC. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist* 2008; **13**: 1134-6.

30. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond ME, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor

immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med* 2010; **134**: 930-5.

31. McCall RB. Fundamental Statistics for Psychology. New York: Harcourt, Brace and World, 1970; 246-81.

32. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; **20**: 37-46.

33. Hilden J, Glasziou P. Regret graphs, diagnostic uncertainty and Youden's Index. *Stat Med* 1996; **15**: 969-86.

34. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950; **3**: 32-5.

35. [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística web site]. Available at: <http://www.ibge.gov.br/english>. Accessed August 31, 2010.

36. Estimativa 2010 – Incidência de câncer no Brasil. [Instituto Nacional de Câncer web site]. Available at: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5. Accessed August 31, 2010.

37. Visvanathan K, Chlebowski RT, Hurley P *et al*. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast

cancer risk reduction. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 3235-58.

Tables

Table 1 – Histological classification of invasive breast carcinomas according to World Health Organization (WHO), 2003

Histological type	No. cases	%
Ductal carcinoma, NOS	469	93.8
Lobular carcinoma	13	2.6
Micropapillary carcinoma	5	1.0
Apocrine carcinoma	4	0.8
Tubular carcinoma	4	0.8
Papillary carcinoma	3	0.6
Metaplastic carcinoma	1	0.2
Mucinous carcinoma	1	0.2
TOTAL	500	100.0
NOS, not otherwise specified		

Table 2 – Distribution of estrogen receptor (ER) results between reference and local laboratories

			Reference laboratory ER result		
Local laboratory ER result			Negative	Positive	TOTAL
	Negative	n	120	31	151
		%	84.5	8.7	30.2
	Positive	n	22	327	349
		%	15.5	91.3	69.8
	TOTAL	n	142	358	500
		%	28.4	71.6	100.0

Table 3 – Distribution of progesterone receptor (PgR) results between reference and local laboratories

			Reference laboratory PgR result		
			Negative	Positive	TOTAL
Local laboratory PgR result	Negative	n	163	44	207
		%	84.0	14.4	41.4
	Positive	n	31	262	293
		%	16.0	85.6	58.6
	TOTAL	n	194	306	500
		%	38.8	61.2	100.0

Table 4 – Comparison of the concordance results for estrogen (ER) and progesterone (PgR) receptors between reference/central and local laboratories reported by the literature and by the present study

Authors, country and year of publication	ER concordance	PgR concordance
Viale et al., ²² 25 countries, 2007	6058/6205 (97.6%)	4202/5237 (80.2%)
Badve et al., ²³ USA, 2008	694/769 (90.2%)	649/769 (84.4%)
Gelber et al., ²⁷ several countries, 2009	4323/4931 (87.6%)	-
Wludarski et al., Brazil, 2010	447/500 (89.4%)	425/500 (85.0%)
(present study)		