

Estudo comparativo entre os métodos LSAB[®] + e Herceptest[®] para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama

Primeira submissão em 02/09/03
Última submissão em 29/10/03
Aceito para publicação em 02/01/04
Publicado em 20/08/04

A comparative study between LSAB[®] + and Herceptest[®] in the detection of HER-2/neu in breast carcinoma

Alexandre de Oliveira Sales¹; Sarah Jane de Paiva Rodrigues²; Carlos E. Bacchi³

unitermos	resumo
Carcinoma	<p>Introdução: A hiperexpressão de human epidermal growth factor receptor (HER-2/neu) e a amplificação do seu gene são indicadores de formas mais agressivas do câncer de mama. A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o teste denominado HercepTest[®] com a finalidade de selecionar pacientes com indicação para o uso de um anticorpo humanizado anti-HER-2/neu (trastuzumab), com efeito terapêutico comprovado. Objetivos: O presente trabalho tem como objetivo comparar os resultados obtidos pelos métodos imuno-histoquímicos LSAB[®]+ com a utilização de anticorpo A0485 e HercepTest[®]. Material e métodos: Foram utilizados 50 casos de carcinoma de mama nos quais a pesquisa da hiperexpressão de HER-2 pelo método LSAB[®]+ já havia sido realizada. Foi repetida a pesquisa da hiperexpressão de HER-2/neu nos mesmos casos, utilizando-se o método do HercepTest[®]. Resultados: 34 casos foram considerados negativos pelos dois métodos, com escore 0 pelo método HercepTest[®]. Destes, 12 obtiveram escore 1+ e 22 obtiveram escore 0 pelo método LSAB[®]+. Em oito casos, o escore foi 2+ pelos dois métodos. Escore 3+ foi encontrado também em oito casos pelos dois métodos. Discussão: O método mais prático utilizado em laboratório de rotina diagnóstica para investigar a hiperexpressão de HER-2/neu é o estudo imuno-histoquímico. Em função de muitas variáveis, como tempo de fixação, tipo de fixador, duração da fixação, método de recuperação antigênica e tipo de anticorpo utilizado, pode haver divergência de resultados. Conclusão: O presente estudo concluiu que o método HercepTest[®] demonstrou resultados equivalentes aos resultados obtidos pelo método LSAB[®]+ em carcinoma de mama.</p>
Mama	
C-erbB-2	
HER-2/neu	
Hiperexpressão	
Imuno-histoquímica	

abstract

Introduction: The overexpression of human epidermal growth factor receptor (HER-2/neu) protein and the amplification of its gene are indicators of more aggressive behavior in breast cancer. The Food and Drug Administration (FDA) has approved HercepTest[®] with the goal of selecting patients to be eligible for treatment with the humanized murine monoclonal antibody anti-HER-2/neu (trastuzumab). Aims: The aim of the present study was to compare the results of HER-2/neu expression using routine immunohistochemistry method LSAB[®]+ (Dakocytomation polyclonal antibody A0485) and HercepTest[®]. Material and methods: 50 cases of breast carcinoma previously evaluated for HER-2/neu expression by routine immunohistochemistry using the LSAB+ method were included. These cases were also evaluated for HER-2/neu expression using HercepTest[®] for comparison. Results: 34 cases of breast carcinoma were negative for HER-2/neu expression by the two methods, with score 0 by HercepTest[®]. In 12 and 22 cases, respectively, score 1+ and 0 were observed by the LSAB[®]+ method. In eight cases, score 2+ was present by both methods. Score 3+ was found in eight cases also by both methods. Discussion: The most common method used in routine clinical practice to determine HER-2/neu status is immunohistochemistry. Variability of HER-2/neu results can be caused by a number of variables including time of fixation, methods of epitope retrieval and type of primary antibodies used. Conclusion: The conclusion of the present study was that LSAB[®]+ and HercepTest[®] revealed equivalent results for HER-2/neu expression in breast carcinoma.

key words

Carcinoma
Breast
C-erbB-2
HER-2/neu
Overexpression
Immunohistochemistry

1. Médico patologista do Laboratório Médico de Patologia; médico patologista do Hospital Universitário Onofre Lopes.

2. Professora-assistente-mestre do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

3. Professor-adjunto-doutor do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP)/campus de Botucatu.

Serviços: Laboratório Médico de Patologia, Natal/RN; Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

Trabalho baseado na dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Trabalho apresentado na sessão de pôsteres do Congresso Brasileiro de Patologia, Salvador/BA, 2001.

Introdução

Tem havido grande interesse pelo uso de marcadores biológicos associados ao carcinoma de mama que apresentem valor prognóstico. Muitos desses marcadores, inicialmente detectados apenas bioquimicamente, podem agora ser pesquisados em tecidos fixados em formalina pelo uso da imuno-histoquímica (IHQ) ou da hibridação *in situ*. Nesta categoria ampla, estão inseridas proteínas e enzimas, algumas associadas com oncogenes e com o potencial de mensurar a atividade proliferativa no tumor⁽²⁵⁾.

A expressão anômala ou exagerada de algumas dessas substâncias biológicas pode estar presente em neoplasias malignas da mama, apresentando relevância do ponto de vista prognóstico. Os fatores biológicos mais implicados com o prognóstico em câncer de mama são os receptores hormonais de estrogênio e progesterona, a expressão da proteína anômala p53 e a hiperexpressão de *human epidermal growth factor receptor* (HER-2/neu)^(5, 25, 34).

O HER-2/neu, também denominado *c-erbB-2* ou HER-2, é considerado um protooncogene humano, localizado no cromossomo 17q, responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana que atua como receptor de fator de crescimento (RFC) e apresenta atividade de tirosina quinase específica^(11, 31, 32).

Slamon et al.⁽³²⁾ foram os pioneiros a relacionar a amplificação do gene HER-2/neu com o prognóstico em pacientes com câncer invasivo de mama. A amplificação da ordem de duas a 20 vezes foi encontrada em 30% dos tumores estudados, em 189 pacientes. Os autores demonstraram o valor da amplificação de HER-2/neu como fator preditivo significativo de tempo livre de doença e de sobrevida geral em pacientes axila-positiva com câncer de mama. Vários autores confirmaram esta associação^(8, 20, 28, 35, 37).

O valor da amplificação de HER-2/neu se mostrou independente quando comparado a outros fatores prognósticos importantes, como estado dos linfonodos, tamanho do tumor e presença ou ausência de receptores hormonais. Esse valor foi superior aos outros fatores comparados e comumente utilizados (tamanho do tumor, estado dos receptores hormonais e idade no momento do diagnóstico), sendo considerado semelhante e independente em relação ao melhor fator prognosticador, que é o número de linfonodos axilares comprometidos⁽³²⁾.

O desenvolvimento de um anticorpo humanizado anti-HER-2/neu (trastuzumab)⁽⁴⁾ e o seu efeito terapêutico comprovado aumentaram o interesse pela procura de um método ideal para a pesquisa desta proteína. Uma relação

direta entre o grau de resposta terapêutica ao uso do trastuzumab e a intensidade da hiperexpressão da oncoproteína HER-2/neu foi evidenciada^(1, 27).

Há vários métodos para pesquisar a hiperexpressão, como IHQ, *Western blot* e imunoenaios enzimáticos, ou a amplificação de HER-2/neu, como *Southern blot*, *slot blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* com reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)^(13, 18).

Recentemente, a Food and Drug Administration (FDA), nos EUA, aprovou o uso do teste imuno-histoquímico denominado Herceptest[®] com a finalidade de selecionar pacientes com indicação para o uso do trastuzumab, produzido sob o nome de Herceptin[®]^(14, 15). Entre os métodos imuno-histoquímicos rotineiramente utilizados em laboratórios de patologia para avaliar a imunoexpressão do HER-2/neu, encontra-se o *labeled streptavidin biotin* (LSAB). O LSAB, cuja sensibilidade é semelhante ao *avidin biotin complex* (ABC), é método de detecção com grande popularidade entre os laboratórios de patologia.

Até o presente momento, não há um consenso sobre o método a ser usado rotineiramente para a pesquisa da hiperexpressão de HER-2/neu. É importante ressaltar que nenhum dos testes foi aprovado nos EUA pela FDA para todas as finalidades, ou seja, para ser aplicado como fator prognóstico e como fator preditivo visando o tratamento quimioterápico convencional ou a indicação do tratamento com Herceptin[®]⁽²⁷⁾.

Objetivo

Comparar os resultados dos métodos imuno-histoquímicos da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB[®]+) usando o anticorpo A0485 e do Herceptest[®], utilizados para a detecção da hiperexpressão do produto do oncogene HER-2/neu em casos de carcinoma de mama.

Material e método

Foram selecionados, no período de janeiro de 1998 a julho de 2000, 50 casos de carcinoma de mama, diagnosticados no Laboratório Médico de Patologia (LMP), Natal (RN), nos quais a pesquisa da hiperexpressão de HER-2/neu pelo método LSAB[®]+ já havia sido realizada previamente e cujos resultados mostraram escore 0 (22 casos), escore 1+ (12 casos), escore 2+ (8 casos) e escore 3+ (8 casos). *Vide Tabela 1* para critérios de avaliação do escore.

A seguir, a pesquisa da hiperexpressão de HER-2/neu foi repetida nos mesmos 50 blocos dos 50 casos, utilizando-se o método do HercepTest[®]. Os tecidos desses blocos haviam sido fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina.

Foram revisados os diagnósticos histológicos originais segundo os critérios clássicos^(5,34) e a graduação histológica através do sistema de graduação de Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis⁽⁶⁾.

Para os casos de carcinoma ductal *in situ* foi aplicado o sistema de classificação de Holland⁽⁹⁾.

Os diagnósticos foram de carcinoma ductal invasivo (42 casos), carcinoma lobular invasivo (dois casos), carcinoma apócrino com áreas de carcinoma mucinoso (um caso), carcinoma misto, ductal e lobular, (dois casos) e carcinoma *in situ* (três casos).

Técnica de imuno-histoquímica

Método LSAB[®]+

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados com 5µm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA). Utilizou-se o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB[®]+) modificado⁽¹⁰⁾. O LSAB[®]+ (LSAB[®]+ KIT, K0690, Dako Corporation, Carpinteria, Califórnia, EUA) corresponde a uma técnica de avidina-biotina em que o anticorpo secundário biotilado reage com várias moléculas de estreptavidina conjugada a peroxidase. A recuperação antigênica foi feita pelo calor úmido, com a utilização de panela de pressão, como descrito abaixo:

- desparafinação em xilol por cinco minutos (três banhos);
- hidratação em álcool etílico absoluto (quatro banhos) e lavagem com solução salina tamponada (SST) em pH 7,4 por cinco minutos;
- tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, diluído em SST por cinco minutos, para bloqueio da peroxidase endógena;
- recuperação de epitopos pelo calor úmido (SST de citrato em pH 6,4 por três minutos em panela de pressão segundo modificação⁽¹⁹⁾);
- incubação com anticorpo policlonal anti-humano produzido em coelho contra a oncoproteína HER-2/neu (Dako, código A0485), na diluição de 1:50, em média por três horas;

- incubação por 15 minutos com complexo ligação – imunoglobulinas biotiladas anticoelho, anticamundongo e anticarneiro pré-diluídas em SST;
- incubação por 15 minutos com complexo estreptavidina-peroxidase;
- tratamento dos cortes para visualização da reação com solução de 3,3-tetraidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) na concentração de 1mg/ml de solução tampão de Tris e solução de H₂O₂, por cinco minutos. Os cortes foram então contrainformados com hematoxilina de Harris por 20 segundos;
- desidratação em banhos de álcool etílico absoluto (cinco banhos) e xilol (três banhos);
- montagem das lâminas com bálsamo e lamínula.

Todos os passos da reação de IHQ foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da etapa da recuperação antigênica, realizada na panela de pressão. Entre cada passo da reação, antes do uso de DAB, as lâminas foram lavadas várias vezes com SST (pH 7,4), e após o uso de DAB as lavagens foram feitas com água comum.

Método do HercepTest[®]

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados com 5µm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA) para evitar o descolamento dos tecidos durante a imunocoloração. Utilizou-se o método do HercepTest[®], segundo orientação do fabricante, detalhado abaixo:

- desparafinação à temperatura ambiente (dois banhos em xilol de cinco minutos cada; dois banhos em álcool a 95% de três minutos cada; dois banhos em álcool a 70% de três minutos cada; um banho em água destilada por 30 segundos);
- recuperação antigênica com incubação das lâminas na solução de recuperação antigênica por 40 minutos, mantendo a temperatura entre 96 a 99 graus centígrados em banho-maria com água destilada; resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos;
- lavagem das lâminas em SST diluída em água destilada na proporção de 1:10.
Bloqueio da peroxidase endógena:
- secagem cuidadosa em torno do tecido e incubação em câmara úmida por cinco minutos com a solução de bloqueio da peroxidase;

- lavagem das lâminas em tampão diluído ou água destilada ou deionizada.

Anticorpo primário ou controle negativo:

- aplicação do anticorpo primário anti-HER-2/neu;
- incubação das lâminas em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em SST.

Revelação:

- incubação à temperatura ambiente e em câmara úmida, por cinco a dez minutos, com solução substrato diluída;
- lavagem em água destilada por dois minutos.

Contracoloração e montagem:

- incubação em hematoxilina de Harris durante dois a cinco minutos;
- lavagem em água destilada por cinco minutos;
- desidratação em banhos de álcool etílico absoluto (cinco banhos) e xilol (três banhos);
- montagem das lâminas com bálsamo e lamínula.

Os critérios aplicados para a interpretação dos resultados das imunocorocações pelos métodos LSAB[®]+ e HercepTest[®] foram os descritos nas instruções do HercepTest[®] (Tabela 1).

Resultados

A positividade ou a negatividade das reações foi evidenciada pela presença ou não de coloração marrom escura com padrão de membrana citoplasmática, delineando toda a circunferência dos limites celulares (Figuras 1 e 2).

A idade das pacientes variou de 32 a 91 anos com idade média de 54 anos. A idade foi desconhecida em seis pacientes.

Os resultados (Tabela 2) demonstraram concordância de 100% entre os dois métodos comparados.

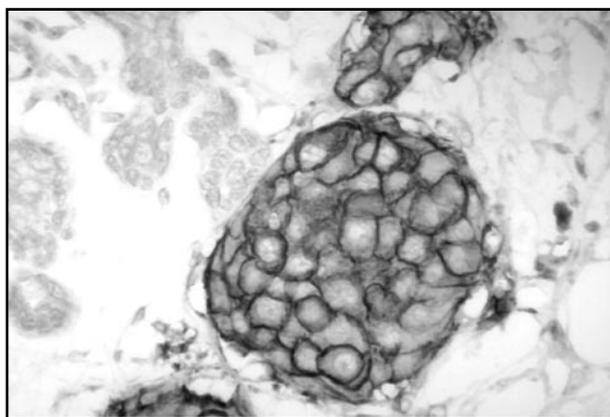


Figura 1 – LSAB/HER2 (escore 3+): forte imunocoloração em toda a circunferência da membrana citoplasmática, observada em todas as células tumorais; coloração citoplasmática inespecífica nas células neoplásicas e nos ductos normais à direita (caso 48 – 400x)

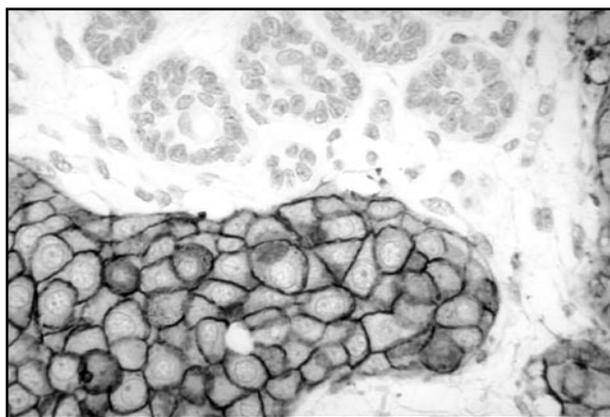


Figura 2 – HercepTest (escore 3+): forte imunocoloração em toda a circunferência da membrana citoplasmática, observada em todas as células tumorais; ductos normais negativos no terço inferior da microfotografia; ausência de coloração de fundo (caso 48 – 400x)

Tabela 1 Critérios para a interpretação dos resultados

Padrão de coloração	Escore	Hiperexpressão de HER-2/neu
Ausência de coloração ou coloração de membrana citoplasmática em menos de 10% das células tumorais	0	Negativo
Coloração fraca, quase imperceptível, em mais de 10% das células tumorais. As células são coradas em parte da membrana	1+	Negativo
Coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana, observada em mais de 10% das células tumorais	2+	Positivo fraco
Coloração intensa em toda a membrana, observada em mais de 10% das células tumorais	3+	Positivo forte

Tabela 2 Resultado da pesquisa da hiperexpressão de HER-2/neu por grupo

Casos	HER-2/neu	HER-2/neu	Resultados	Concordância
Número de casos	LSAB [®] + Escore	Herceptest [®] Escore		%
22	0	0	Negativo	100
12	1+	0	Negativo	100
8	2+	2+	Positivo fraco	100
8	3+	3+	Positivo forte	100

Discussão e conclusões

O Colégio Americano de Patologistas recentemente publicou uma série de recomendações sobre os métodos de avaliação de hiperexpressão ou amplificação do HER-2/neu, refletindo a falta de consenso atual⁽²⁷⁾.

Há uma variedade de métodos disponíveis para a avaliação do estado de HER-2/neu. Podem ser divididos em métodos que pesquisam a amplificação do gene e em métodos que investigam a hiperexpressão da proteína HER-2/neu. Como exemplos dos primeiros, podem ser citados: *Southern blot*, *slot blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* com PCR e FISH. Entre os métodos do segundo grupo, são exemplos: os *Western blot*, os imunoenaios enzimáticos realizados em extratos de tumores solubilizados e os métodos imuno-histoquímicos realizados em tecido a fresco ou em material fixado em formalina e emblocados em parafina^(13, 18).

Os métodos imunoenzimáticos e o *Western blot* são aqueles que mostram maior discrepância em relação aos outros em virtude do efeito de diluição ocorrido pela contaminação da amostra tumoral pelas proteínas do tecido conectivo da matriz extracelular, influenciando a concentração da oncoproteína HER-2 e não alterando significativamente os conteúdos de DNA e RNA. O método de *Northern blot* tem sido usado para medir os níveis de RNA mensageiro específico⁽¹⁸⁾.

Muitos desses testes não estão disponíveis na grande maioria dos laboratórios de patologia, por razões técnicas ou pelo alto custo. Ainda mais, muitos deles requerem material a fresco para análise, não sendo aplicáveis a tecidos arquivados em blocos de parafina. Dessa forma, os dois métodos mais práticos para serem utilizados em laboratório de rotina diagnóstica são: IHQ, para investigar a hiperexpressão de HER-2/neu, e FISH, para pesquisar a amplificação do gene^(13, 27).

Embora existam vários anticorpos anti-HER-2/neu, os mais utilizados são o CB11 (anticorpo monoclonal) e o A0485 (anticorpo policlonal), que pode ser usado isola-

damente ou fazendo parte do Herceptest[®]. Estudos que compararam esses dois anticorpos, quanto a especificidade e sensibilidade, encontraram resultados divergentes⁽²⁾. Pesquisando a hiperexpressão de HER-2/neu em 80 pacientes com axila positiva, utilizando o Herceptest[®] e o anticorpo CB11, Roche e Ingle⁽²⁴⁾ encontraram 60% de concordância entre os resultados, considerando baixo índice.

Jacobs *et al.*⁽¹³⁾ compararam os métodos de IHQ e FISH e verificaram alto índice de concordância (91%), resultado semelhante a trabalhos anteriores^(16, 21, 31). Os níveis de amplificação gênica encontrados foram de 26% e a hiperexpressão foi de 23%⁽¹³⁾.

O grau de concordância entre IHQ e FISH é excelente nos casos em que os resultados são totalmente negativos ou fortemente positivos pelo método de IHQ. Nos casos em que a positividade é fraca por IHQ, apenas 10% a 30% revelam amplificação gênica pelo FISH⁽²⁷⁾.

Os resultados do presente estudo, em que houve concordância de 100% entre as pesquisas da oncoproteína HER-2/neu pelos métodos do LSAB[®]+ e pelo Herceptest[®], revelaram aspectos interessantes e divergentes quando comparados aos dados da literatura.

Jacobs *et al.*⁽¹⁵⁾, estudando 48 casos cuja pesquisa de HER-2/neu foi considerada negativa pelos métodos FISH e IHQ (ABC e LSAB[®]+), surpreendentemente encontraram positividade pelo Herceptest[®] em 58,4%, sendo positivo fraco (2+) em 43,8% e positivo forte (3+) em 14,6%. Os autores concluíram que a utilização do Herceptest[®], de acordo com os parâmetros de escore do fabricante, resulta em um grande número de casos considerados falso-positivos, indicando baixa especificidade do método.

Resultados semelhantes foram obtidos por Roche e Ingle⁽²⁴⁾, que reportaram uma hiperexpressão em 54% de um total de 59 pacientes que não apresentaram hiperexpressão de HER-2/neu através da utilização de dois outros métodos de IHQ.

A análise das imunocolorações no presente estudo não revelou positividade no epitélio não-neoplásico em nenhum dos 50 casos examinados. No mesmo trabalho de Jacobs et al.⁽¹⁵⁾, a análise do epitélio normal exibiu ausência de coloração em cinco casos (11,4%), positividade 1+ em 15 casos (34,1%), positividade 2+ em 21 casos (47,7%) e positividade 3+ em três casos (6,8%) do total de 48 pacientes. Quando o escore dado ao componente não-neoplásico foi subtraído do escore atribuído ao tumor, a especificidade do método se elevou de 41,6% para 93,2%.

Há, na literatura, trabalhos sugerindo que o método IHQ em tecido fixado com formalina e incluído em parafina apresenta baixas sensibilidade e especificidade, com considerável variação de resultado interobservadores^(3, 17, 22, 26). Um desses estudos comparou a sensibilidade e especificidade de 28 anticorpos distintos com os resultados previamente conhecidos pelos métodos *Southern blot*, *Nothern blot*, *Western blot* e IHQ em tecido congelado. A sensibilidade dos anticorpos variou de 6% a 82%⁽²²⁾. Jacobs et al.⁽¹³⁾ levantaram uma série de questionamentos com relação aos resultados desse trabalho. Inicialmente, técnica de recuperação antigênica não foi realizada em 27 dos 28 anticorpos investigados. Atualmente, está comprovado que os métodos de recuperação antigênica são importantes para a obtenção de qualidade ótima das imunorreações, pelo menos para alguns anticorpos anti-HER-2/neu disponíveis comercialmente. O método de detecção escolhido foi o da peroxidase-anti-peroxidase, que apresenta sensibilidade muito inferior aos métodos de detecção mais modernos, como os de avidina-biotina-peroxidase (ABC) ou estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB[®]+). Por último, os autores utilizaram amostras de tecido muito pequenas, usando a técnica de bloco em *tabuleiro de xadrez*. Assim, alguns casos poderiam corresponder a resultados falso-negativos, representando áreas negativas dentro de um tumor com hiperexpressão de HER-2/neu. Os autores concluíram ser difícil comparar esses resultados com a metodologia atual e com os novos reagentes disponíveis.

Os métodos IHQ também variam entre si no que diz respeito aos sistemas de detecção utilizados, bem como

com relação ao anticorpo primário empregado e às diluições estabelecidas. Essa falta de padronização tem sido tema de preocupação entre os patologistas⁽²⁷⁾.

As principais vantagens dos métodos convencionais de IHQ podem ser resumidas como sendo: 1) possibilidade de ser realizado na maioria dos laboratórios; 2) rapidez; 3) necessidade apenas de microscópio óptico comum para visualização e interpretação dos resultados; 4) associação com evolução clínica.

As principais desvantagens são: 1) grande número de diferentes anticorpos disponíveis no mercado e com graus de antigenidades distintas; 2) variedade do tipo de sistema de detecção utilizado; 3) falta de padronização do método escolhido para recuperação antigênica; 2) ausência de limites padronizados para definição de negatividade e positividade e distinção entre os diversos graus de positividade; 3) falta de um padrão de escore definido.

A alternativa do Herceptest[®] oferece algumas vantagens sobre o método convencional: 1) valor preditivo para o uso da droga trastuzumab em pacientes com carcinoma de mama com metástases, comprovado pelo estudo comparativo realizado com os grupos de pacientes pertencentes aos protocolos para validação do uso da droga; 2) método padronizado em todas as etapas com reagentes pré-diluídos; 3) avaliação subjetiva semiquantitativa mais precisa e mais fácil de se obter reprodutibilidade, baseada em critérios bem definidos, inclusive com lâminas-padrão contendo células de cultura com escore 0, 1+ e 3+.

A única desvantagem do método Herceptest[®] sobre os convencionais, como o LSAB[®]+, é o maior custo por exame.

Saliente-se que o presente estudo não comparou resultados da hiperexpressão do HER-2/neu entre diferentes laboratórios. O aspecto mais vantajoso do uso do Herceptest[®] para avaliação do HER-2/neu em tecido é a sistematização e a padronização entre os diferentes laboratórios.

O presente estudo concluiu que o método Herceptest[®] demonstrou resultados equivalentes aos resultados obtidos pelo método LSAB[®]+

Referências

1. BASELGA, J. et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185^{HER2} monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, v. 14, p. 737-44, 1996.
2. BILOUS, M. Current perspectives on HER2 testing: a review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol*, v. 16, p. 173-82, 2003.
3. BUSMANIS, I. et al. Analysis of cerbB2 expression using a panel of six commercially available antibodies. *Pathology*, v. 26, p. 261-7, 1994.
4. CARTER, P. Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89: 4285-9, 1992.
5. ELSTON, C.W.; ELLIS, I. O. *The breast*. London: Curchill Livingstone, 1998.

6. ELSTON, C.W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer; In: The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol*, v. 19, p. 403-10, 1991.
7. EWER, M. S. et al. Cardiotoxicity in patients receiving trastuzumab (herceptin): primary toxicity, synergistic or sequential stress, or surveillance artifact? *Semin. Oncol*, v. 26, p. 96-101, 1999.
8. HARTMANN, L. C et al. Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. *Cancer*, v. 74, p. 2956-63, 1994.
9. HOLLAND, R. et al. Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol*, v. 11, p. 167-80, 1994.
10. HSU, S.; RAINE, I.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, v. 29, p. 577-80, 1981.
11. HUDZIAK, R. M.; SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. Increased expression of putative growth factor receptor p185^{HER2} causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 84, p. 7159-63, 1987.
12. HUNG, M.-C.; LAU, Y.-K. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*, v. 26, p. 51-9, 1999.
13. JACOBS, T. W. et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*, v. 17, p. 1974-82, 1999a.
14. JACOBS, T.W. et al. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry: a study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol*, v. 113, p. 251-8, 2000.
15. JACOBS, T.W. et al. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-Approved Scoring System. *J Clin Oncol*, v. 17, p. 1983-7, 1999b.
16. KALLIONIEMI, O. P. et al. ERBB2 amplification in breast cancer analysed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89, p. 5321-5, 1992.
17. KAY, E. W. et al. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J C Pathol*, v. 47: 816-22, 1994.
18. MÉNARD, S. et al. Role of the HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol*, v. 182, p. 150-62, 2000.
19. MILLER, R. T.; ESTRAN, C. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker: suggestions for optimal use. *Appl Immunohistochem*, v. 3, p. 190-3, 1995.
20. Noguchi, M. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node-positive breast cancer. *Cancer*, v. 69, p. 2953-60, 1992.
21. PERSONS, D. L.; BORELLI, K. A.; HSU, P. H. Quantitation of HER-2/neu and c-myc gene amplification in breast carcinoma using fluorescence in situ hybridization. *Modern Pathol*, v. 10, p. 720-7, 1997.
22. PRESS, M. F. et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, v. 54, p. 2771-7, 1994.
23. REESE, D. M.; SLAMON, D. J. HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells*, v. 15, p. 1-8, 1997.
24. ROCHE, P. C.; INGLE, J. N. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J Clin Oncol*, v. 17, p. 434-5, 1999.
25. ROSEN, P. P. *Rosen's breast pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
26. ROSS, J. S.; FLETCHER, A. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist*, v. 3, p. 237-52, 1998.
27. SCHNITT, S. J. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. *Mod Pathol*, v. 14, p. 213-8, 2001.
28. SESHADRI, R. et al. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J Clin Oncol*, v. 11, p. 1936-42, 1993.
29. SHAK, S. Overview of the trastuzumab (herceptin) anti-HER-2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, v. 26, p. 71-7, 1999.
30. SIDDIQUI, T. et al. The clinical pattern of HER-2/neu oncogene overexpressing breast cancer in Pakistani patients at initial presentation: an analysis of HER-2/neu positive versus negative disease: a preliminary report. *J Pak Med Assoc*, v. 49, p. 294-7, 1999.
31. SLAMON et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, v. 244, p. 707-12, 1989.
32. SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, p. 177-82, 1987.
33. SOLOMIDES, C. C.; ZIMMERMAN, R.; BIBBO, M. Semiquantitative assessment of c-erbB-2 (HER-2) status in cytology specimens and tissue sections from breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol*, v. 21, p. 121-5, 1999.
34. TAVASSOLI, F. A. *Pathology of the breast*. 2. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1999.
35. Têtu, B.; Brisson, J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer*, v. 73, p. 2359-65, 1994.
36. TIWARI, R. K. et al. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*, v. 12, p. 419-26, 1992.
37. TOIKKANEN, S. et al. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol*, v. 10, 1044-8, 1992.

Endereço para correspondência

Av. Afonso Pena 920 – Tirol
 CEP 59020-100 – Natal-RN
 Telefax.: (84) 222-4697
 e-mails: alesales@digicom.br
 alexandresales@labmedpatologia.com.br