

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA A DEFINIÇÃO DO
STATUS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE HER2 EM
NEOPLASIAS DA MAMA**

BEATRIZ NUNES SCHIAVON

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Schiavon, Beatriz Nunes

Avaliação de diferentes métodos de hibridização *in situ* para a definição do *status* de amplificação do gene HER2 em neoplasias da mama / Beatriz Nunes Schiavon – São Paulo, 2013.

57p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA MAMA. 2. GENES HER-2. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE. 5. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein)

APOIO FINANCEIRO: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lilian Nunes Schiavon
e José Sidney Garcia Schiavon

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rafael Malagoli Rocha, idealizador deste trabalho, pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência e incentivo e pelo exemplo profissional.

À minha família, especialmente à minha mãe Lilian Nunes Schiavon e ao meu pai José Sidney Garcia Schiavon pelo apoio, incentivo, dedicação, ensinamentos e contribuição para minha educação.

Ao Ivan Neves do Laboratório de Rotina do Hospital A. C. Camargo pela paciência, suporte e auxílio nas técnicas realizadas sempre que necessário.

À equipe dos laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pelo apoio e colaboração nos procedimentos realizados.

Aos colegas e amigos do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) do Hospital A.C. Camargo pela amizade, convivência, auxílio, incentivo, conversas e conselhos, tanto nos momentos de alegria e descontração, quanto nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas, Fernanda e Mayara, por estarem sempre presentes e compartilharem do meu crescimento pessoal e profissional. E sei que sempre posso contar com vocês.

À equipe da Pós-Graduação e à Biblioteca pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores do meu *paper*, publicado durante o ano de 2012, especialmente o Prof. Dr. José Vassallo e o Prof. Dr. Bharat Jasani pela contribuição e dedicação.

Às empresas FAPESP, CAPES e Fundação Antônio Prudente - Hospital A.C. Camargo pelo auxílio financeiro e de infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização, desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

RESUMO

Schiavon BN. **Avaliação de diferentes métodos de hibridização *in situ* para a definição do status de amplificação do gene HER2 em neoplasias da mama.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), amplamente validado na literatura, representa o padrão de ouro para a avaliação do status de amplificação do HER2 no câncer de mama. Novos métodos baseados em microscopia de campo claro de hibridização *in situ* de dupla marcação (BDISHs – do inglês *Brightfield Dual-probe in situ Hybridization*) foram desenvolvidos como alternativas para o FISH. O objetivo do presente estudo foi avaliar a aplicabilidade dos métodos de BDISH para a análise do status de HER2 como linha de frente em amostras de câncer de mama. **Material e Métodos:** 320 amostras de carcinoma ductal invasivo da mama (IDC) que passaram por condições não controladas de fixação e processamento histológico, foram selecionadas dos arquivos de duas instituições diferentes do Brasil. Todos os casos selecionados foram utilizados para a construção de um TMA. O anticorpo 4B5 (Ventana) foi utilizado para a realização da imunohistoquímica (IIQ). FISH (Vysis) foi utilizado como padrão ouro de análise, enquanto as técnicas DuoCISH (DAKO), ZytoDot CISH (ZytoVision) e SISH (Ventana) foram comparadas. **Resultados:** A maior concordância observada foi entre SISH e FISH. Essa técnica mostrou alta sensibilidade (100%) e alta especificidade (100%) com relação ao FISH, sem ocorrência de casos falso positivos e falso negativos. Além disso, o SISH foi mais facilmente avaliável em casos de baixa amplificação e *borderline* quando comparado com os outros métodos cromogênicos, devido à nitidez da sua marcação. Essa técnica mostrou também alta sensibilidade (100%) e alta especificidade (100%). O DuoCISH produziu resultados falso-positivos (11,2%), associados à marcação mais

intensa e mal definida dos pontos, dificultando a distinção entre baixa amplificação e *borderline*. O ZytoDot CISH apresentou menor sensibilidade (93,6%), com aumento da incidência de resultados falso-positivos (12,7%).

Conclusão: SISH é o mais confiável dos métodos de BDISH, com sensibilidade e especificidade altamente comparável ao FISH. Também é o mais reprodutível entre os métodos de BDISH, produzindo sinais mais distintos e, portanto, mais facilmente analisável, mesmo em tecido mal conservado.

SUMMARY

Schiavon BN. [Evaluation of different methods of in situ hybridization to determine the status of HER2 gene amplification in breast neoplasms]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The fluorescent in situ hybridization (FISH) method, widely validated in the literature, is the gold standard for assessment of HER2 amplification status in breast cancer. New methods brightfield microscopy-based dual *in situ* hybridization (BDISH) have been developed as alternatives to FISH. The aim of this study was to evaluate the applicability of BDISH methods for analysis of HER2 status as the front line in breast cancer samples. **Material and Methods:** 320 samples of breast invasive ductal carcinoma (IDC) that passed through uncontrolled conditions of fixation and histological processing were selected from the files of two different institutions in Brazil. All selected cases were used for the construction of a TMA. The antibody 4B5 (Ventana) was used to perform immunohistochemistry (IHC). FISH (Vysis) was used as the gold standard of analysis, while DuoCISH (DAKO), ZytoDot CISH (ZytoVision) and SISH (Ventana) techniques were compared. **Results:** The highest agreement was observed between SISH and FISH. This technique showed high sensitivity (100%) and high specificity (100%) compared to FISH, without occurrence of false positives and false negatives. Furthermore, SISH was easily assessable in borderline and low amplified cases when compared with other chromogenic methods due to the sharpness of their marking. DuoCISH produced false-positive results (11,2%) associated with more intense staining and ill-defined spots, making it difficult to distinguish between low amplification and borderline. ZytoDot CISH showed lower sensitivity (93,6%), with increased incidence of false-positive results (12,7%). **Conclusion:** SISH is the most reliable BDISH methods, with sensitivity and specificity highly comparable with FISH. It is also the most reproducible between the BDISH methods, producing signals more distinct and therefore more readily analyzable even in poorly preserved tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das técnicas realizadas com casos não amplificados e amplificados.....	11
Figura 2	Algoritmo da análise Imunoistoquímica.....	12
Figura 3	Representação de resultados de amostras mal preservadas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre a detecção da proteína HER2 na IIQ com o FISH e os métodos de BDISHs.....	33
Tabela 2	Comparação entre os resultados de FISH e BDISH para avaliação de HER2.....	34
Tabela 3	Parâmetros de concordância com o FISH: comparação da IIQ e BDISH.....	35
Tabela 4	Comparação do efeito deletério relativo dos diferentes procedimentos de marcação em tecidos mal conservados em termos de % de spots do TMA que não foram interpretáveis ou não apresentavam tumor, que não apresentaram nenhum sinal, ou foram perdidos durante o processo de coloração.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-DIG	Anti-Digoxigenina
Anti-DNP	Anti-Dinitrofenol
AP	Fosfatase Alcalina
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BDISH	<i>Brightfield Dual-Probe in situ Hybridization</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CEN17	Centrômero do cromossomo 17
CISH	Hibridização <i>in situ</i> Cromogênica
DAB	3,3' – diaminobenzidina tetrahidrocloreto
DAPI	4',6-diaminido-2-fenilindoleidrocloreto
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
HCl	Hidróxido de Cloro
H&E	Hematoxilina e Eosina
HER	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HER1	Receptor 1 do Fator de Crescimento Epidérmico
HER2 (C-erbB-2 / HER2/neu)	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico
HER2/CEP17	Razão entre o gene HER2 e a região centromérica do cromossomo 17
HER3	Receptor 3 do Fator de Crescimento Epidérmico
HER4	Receptor 4 do Fator de Crescimento Epidérmico
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDC	Carcinoma Ductal Invasivo da Mama
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IIQ	Imunoistoquímica

ISH	Hibridização <i>in situ</i>
Ki-67	Antígeno nuclear marcador da proliferação celular
MMabs	Anticorpos monoclonais de camundongo
NBF	Formol Buffer Tamponado
RabMabs	Anticorpos monoclonais de coelho
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SISH	Hibridização <i>in situ</i> pela Prata
SSC	Citrato de Sódio Salino
TBS	Tris-buffer salino

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer de Mama	1
1.2	Fatores Prognósticos e Preditivos	3
1.3	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico tipo 1-HER2	4
1.4	Imunoistoquímica e HER2	13
1.5	Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) e HER2	16
1.6	Hibridização <i>In Situ</i> Cromogênica (CISH), Hibridização <i>In Situ</i> pela prata (SISH) e HER2	17
1.7	Fase Pré-Analítica	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Seleção de Casos	23
3.2	Construção do Microarranjo de Tecido.....	24
3.3	Procedimentos de IIQ e FISH.....	24
3.4	Procedimentos de CISH (DAKO), CISH (Zytovision) e SISH	26
3.4.1	DAKO DuoCISH	26
3.4.2	ZytoVision ZytoDot CISH.....	27
3.4.3	Ventana SISH.....	28
3.5	Análises de IIQ, FISH, CISH E SISH.....	30
3.6	Análise Estatística	31
4	RESULTADOS.....	32
5	DISCUSSÃO	37

6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

ANEXO

Anexo 1 Artigo publicado na **Am J Surg Pathol** 2012; 36:1489-96

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e é a segunda causa principal de morte nos países em desenvolvimento. A incidência de câncer está aumentando nos países economicamente em desenvolvimento, como resultado de envelhecimento da população e do crescimento, bem como, cada vez mais, da escolha de um estilo de vida associado ao desenvolvimento do câncer, incluindo tabagismo, sedentarismo e dietas ocidentalizadas (JEMAL et al. 2011).

1.1 O CÂNCER DE MAMA

O carcinoma da mama é um tumor maligno que compõe um grupo de doenças heterogêneas, podendo ser analisado a nível clínico, molecular e histopatológico. A heterogeneidade a nível molecular tem sido demonstrada a partir de diferenças em frequência e magnitude das aberrações genômicas e por diferentes expressões gênicas, mesmo com histologia semelhante (SUBIK et al. 2010).

O câncer de mama é considerado o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, sendo o mais frequente entre as mulheres. Ao contrário do câncer de colo de útero, esta doença encontra-se relacionada ao processo de industrialização, com risco de adoecimento associado a elevado status socioeconômico, além de outros fatores de risco clássicos descritos, como baixa paridade, idade precoce da menarca e tardia da menopausa,

obesidade e consumo de álcool e tabaco. Um estudo conduzido no estado de São Paulo identificou o câncer de mama como a principal causa de mortalidade por neoplasias em mulheres na faixa etária de 30 a 49 anos (JOENSUU et al. 2006). É relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência aumenta rápida e progressivamente (Ministério da Saúde 2011).

O histórico familiar é um importante fator de risco para o câncer de mama e corresponde a 10% do total de casos da doença, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau foram acometidas antes dos 50 anos de idade. A idade é outro importante fator de risco, tendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade (ALBERTSON 2006).

A *American Cancer Society* (ACS 2012) estimou que, aproximadamente 230.480 novos casos de carcinoma de mama seriam diagnosticados em 2012 nos Estados Unidos, resultando em 39.510 mortes. Cerca de metade dos casos de câncer de mama e 60% das mortes estimadas ocorrem em países economicamente em desenvolvimento (JEMAL et al. 2011).

As taxas de morte por câncer de mama têm diminuído desde o início de 1990 para todas as mulheres, exceto entre os Índios Americanos / Nativos do Alasca, entre os quais as taxas permaneceram estáveis (DESANTIS et al. 2011). Em lugares como a América do Norte, Europa Ocidental e a Austrália, a mortalidade por câncer de mama está diminuindo, provavelmente devido à associação de diagnóstico precoce e terapias adjuvantes mais eficazes (JATOI e MILLER 2003; VERONESI et al. 2005).

1.2 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

Fatores prognósticos são achados clínicos, patológicos e biológicos do paciente e do tumor que são utilizados para predizer o comportamento clínico do paciente, como a possibilidade de recorrência da doença ou a sobrevida do paciente se este não for tratado (PICCART-GEBHART et al. 2005). Dentre os principais fatores prognósticos destacam-se: tamanho do tumor, tipo e grau histológico, número de mitoses e metástase, comprometimento linfonodal.

Os fatores preditivos compreendem achados clínicos, patológicos e biológicos usados para estimar a resposta do paciente a um tipo específico de terapia adjuvante, como por exemplo, a pesquisa de receptores de estrógeno para determinar a terapêutica hormonal adjuvante (ALLRED et al. 1998). O grau histológico também pode ser classificado como fator preditivo quando relacionado à resposta à quimioterapia (NUNES et al. 2007).

Os principais marcadores imunoistoquímicos utilizados na rotina diagnóstica e com importância preditiva e prognóstica são: receptores hormonais (receptor de estrógeno – RE – e receptor de progesterona – RP), Ki67 e HER2 (ROMOND et al. 2005). Nos últimos anos, o HER2 vem ganhando importância progressiva como fator preditivo de resposta à terapia hormonal (Trastuzumab). No entanto, a avaliação desse marcador através da IIQ ainda apresenta controvérsias (NUNES et al. 2007).

Estes fatores são avaliados por patologistas, que fornecem os valores preditivos e prognósticos juntamente com as características morfológicas do câncer de mama, enquanto oncologistas utilizam estas interpretações

associadas com outros dados clínicos para compor a decisão terapêutica (ROCHA et al. 2008).

1.3 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMICO HUMANO TIPO 2 – HER2

O receptor do fator de crescimento epidérmico do tipo 2, conhecido como *HER2/c-erbB-2/HER2-neu*, é o proto-oncogene análogo humano do gene *neu* identificado em neuroblastomas / glioblastomas de ratos, no início da década de 1980. Está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21) e codifica uma glicoproteína transmembrana de 185kD (p185). Esta proteína possui uma sequência de aminoácidos com atividade tirosina-quinase no domínio intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico (EGFR) e atua na membrana celular como um receptor de fatores de crescimento (BRAND et al. 2006; NUNES et al. 2007). É um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), que compreende os receptores (EGFR/HER1), HER2, HER3 e HER4 (SCHNITT 2001; BRAND et al. 2006), que medeiam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celular (PICCART-GEBHART et al. 2005). O HER2 não contém um ectodomínio onde o ligante pode se ligar, mas é capaz de atuar como um co-receptor com alta afinidade para os receptores da mesma família, formando heterodímeros (BARROS et al. 2010). O domínio extracelular permite a ligação do ligante e a dimerização do receptor, enquanto que o domínio intracelular possui atividade de tirosina-quinase (fosforilação / desfosforilação de proteínas transmembrana)

necessária para a transdução de sinais intracelulares (BRAND et al. 2006). A ligação do fator de crescimento a um dos receptores da família HER resulta na formação de dímeros (heterodímeros ou homodímeros). Múltiplas vias são acionadas como consequência dessa dimerização das moléculas da família HER, incluindo Ras / MAPK, C γ fosfolipase, transdutor de sinal e ativação de transcrição e PI3K (BARROS et al. 2010). A dimerização é seguida de fosforilação do domínio intracelular do receptor, desencadeando uma cascata de transdução de sinais intracelulares e consequente ativação do gene *HER2*, o qual tem importante função no crescimento celular e manutenção do estado de transformação das células (GOBBI et al. 2000). A transdução do sinal só é possível através de ligação do ligante e da dimerização, quer com o mesmo receptor (HER2-HER2: homodímeros) ou com outro receptor da mesma família (HER2-HER1, HER2-HER3, HER2-HER4: heterodímeros) (BRAND et al. 2006). Além disso, o HER2 está envolvido na diferenciação, adesão e motilidade celular, tendo sido demonstrada correlação entre a amplificação do *HER2* e a agressividade biológica nos carcinomas mamários, principalmente em carcinomas mamários linfonodo-positivos (GOBBI et al. 2000).

Embora a proteína HER2 forme heterodímeros com outros membros da família após a ligação dos mesmos aos fatores de crescimento, não existe nenhum ligante conhecido para o HER2, que é considerado um receptor órfão (SCHNITT 2001). Uma mutação no códon de aminoácido 655 do gene *HER2* modifica a estrutura do domínio transmembrana do receptor, resultando em uma forma ativa, promovendo o desenvolvimento espontâneo de homodímeros de HER2. As células que possuem a mutação ou

superexpressam a proteína HER2 têm uma elevada possibilidade de apresentar homodimerização de HER2 iniciando também a cascata de sinalização, resultando em um crescimento descontrolado contínuo, divisão celular, e inibição da apoptose. Esta mutação genética está associada com um maior risco de carcinoma da mama (BARROS et al. 2010).

O HER2 é utilizado para monitorar o tratamento, quimioterapia ou hormonioterapia, e a resposta do paciente com câncer de mama a progressão da doença. Evidências de estudos randomizados demonstram que o Trastuzumab, um anticorpo monoclonal terapêutico que tem o HER2 como alvo, diminui o risco de recidiva e mortalidade quando adicionado a protocolos de quimioterapia adjuvante para o câncer de mama HER2 positivo que foi ressecionado. Em pacientes com carcinoma de mama metastático HER2-positivo, o Trastuzumab sozinho ou associado à quimioterapia aumenta o tempo para a progressão da doença e melhora a sobrevida. A amplificação do gene e/ou a superexpressão da proteína HER2 pode estar associada com o aumento da agressividade do tumor e um pior prognóstico. Essa amplificação do gene *HER2* pode prever melhor o prognóstico, e conseqüentemente a agressividade do tumor, enquanto a densidade da membrana da proteína HER2 pode melhor predizer a ligação do Trastuzumab as células do tumor e assim, a resposta clínica (SEIDENFELD et al. 2008). O status do HER2 pode ser associado a outros fatores prognósticos para decidir a terapia administrada (CARLSON et al. 2006; WOLFF et al. 2007).

A avaliação do status do HER2 tornou-se um elemento crítico e de grande importância para determinar o prognóstico, tratamento e manejo do

câncer de mama. A *American Society of Clinical Pathology* (ASCO) recomendou a avaliação de HER2 em todos os tumores de mama, quer no momento do diagnóstico ou na recorrência (BAST et al. 2001; HICKS e TUBBS 2005). A superexpressão da proteína na análise imunoistoquímica e/ou a amplificação do gene por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) passaram a ser utilizados como fator prognóstico e preditivo em pacientes com câncer de mama, e os resultados positivos selecionam pacientes para o tratamento com a imunoterapia com Trastuzumab (Herceptin), que tem sido utilizado para inibir a proliferação de células humanas do câncer de mama (BRUNELLI et al. 2008). Pacientes HER2-negativo com doença avançada ou metastática não são beneficiados por tratamentos direcionados para HER2, como o Trastuzumab (Herceptin®) (SEIDENFELD et al. 2008).

A superexpressão da proteína HER2 está associada à amplificação gênica em 90% dos casos (BÁNKFALVI et al. 2000; SCHNITT 2001), e a amplificação do gene *HER2*, ou os dois eventos ocorrem em aproximadamente 15 a 25% dos cânceres de mama e estão associados com o comportamento agressivo do tumor (PICCART-GEBHART et al. 2005). A amplificação do gene *HER2* leva a expressão da proteína. O aumento resultante do número de receptores na superfície da célula tumoral (como 2 milhões de moléculas de HER2 por célula em vez de 20.000 por célula) promove a ativação do receptor, levando a sinalização, divisão celular excessiva e formação de tumores. Portanto, a superexpressão do receptor tem um papel direto na mediação do comportamento biológico e clínico de células tumorais HER2-positivas conduzindo a sua proliferação e sobrevivência (HICKS e TUBBS 2005).

A avaliação da amplificação do gene *HER2* e da expressão da proteína tem se tornado um dos pontos centrais na discussão sobre o diagnóstico e a biologia do câncer de mama (BARTLETT et al. 2009). A detecção do HER2 se tornou ainda mais importante após a aprovação do Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Corporation, EUA) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (PRITCHARD et al. 2006). Triagens clínicas têm demonstrado que o Trastuzumab® associado ou após a quimioterapia adjuvante, pode diminuir a progressão tumoral do carcinoma mamário invasor e aumenta significativamente a sobrevida livre de doença entre mulheres com câncer de mama HER2-positivo (BARTLETT et al. 2009). O Trastuzumab (Herceptin) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que se liga ao domínio extracelular do HER2. Tem sido utilizado para exercer efeitos anti-tumorais em modelos de câncer e em pacientes com *HER2* amplificado no câncer de mama, mas não é utilizado em tumores com expressão de *HER2* normal. Essa terapia melhora a sobrevida global quando administrado em combinação com a quimioterapia para a doença metastática e reduz o risco de recorrência da doença e de morte, quando administrado no tratamento adjuvante, sendo uma droga base para a terapia sistêmica de tumores com superexpressão de HER2 (GAJRIA e CHANDARLAPATY 2011).

A FDA aprovou a imunoterapia com Trastuzumab somente para pacientes que apresentarem células do câncer de mama com forte marcação imunoistoquímica (3+), definida como marcação uniforme e intensa da membrana em mais de 30% das células tumorais invasivas, e para casos com marcação 2+ (marcação fraca à moderada da membrana

completa em mais de 10% das células invasivas do tumor), com amplificação do gene pelo FISH, expressando uma razão maior ou igual a 2.2 quando calculada a relação entre o número de sinais do gene *HER2* e o número dos sinais fluorescentes do cromossomo 17 (BRUNELLI et al. 2008) (Figura 1). Os casos considerados com número de cópias do gene *HER2* entre 4.0 e 6.0 ou razão *HER2/CEP17* entre 1.8 e 2.2 como resultado equívoco de ISH, recomenda-se uma nova contagem de células ou novo teste de IIQ para classificar o caso como equívoco. O maior número de cópias do gene *HER2* ou a maior relação *HER2/CEP17* mostrados no FISH são associados a um maior benefício relativo de Trastuzumab (SEIDENFELD et al. 2008) (Figura 2).

Atualmente, existe uma crescente demanda clínica para a detecção precisa do status do *HER2* em carcinomas mamários invasivos. Apesar de existirem diferentes métodos para detectar o status do *HER2*, os testes mais utilizados na prática de rotina são a imunohistoquímica (IIQ) para detecção da superexpressão proteica e a hibridização *in situ* (ISH) para detecção da amplificação gênica, que consiste no aumento no número de cópias gênicas por segmento de um braço do cromossomo (ROSS e FLETCHER 1999; ALBERTSON 2006; MYLLYKAMGAS e KNUUTILA 2006). Dentre os métodos de ISH, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é amplamente reconhecida como “padrão ouro” de análise do status do gene *HER2*. Recentemente, métodos cromogênicos foram lançados no mercado (hibridização *in situ* cromogênica – CISH, e hibridização *in situ* pela prata – SISH) na tentativa de superar algumas dificuldades técnicas apresentadas pelo FISH, que serão discutidas posteriormente neste trabalho.

A escolha entre os métodos de avaliação da superexpressão proteica de HER2 e a amplificação do gene continua a ser um dilema para ensaios em que a proteína alvo é o que leva a decisão clínica de tratar ou não tratar o paciente com o anticorpo humanizado anti-HER2 (Trastuzumab). O ideal seria quantificar os níveis de expressão do gene e da proteína. Uma nova abordagem pode ser realizada com técnicas de hibridização *in situ* de campo claro (BDISH do inglês brightfield dual-probe *in situ* hybridization) em todos os ensaios ou subconjuntos de amostras de pacientes selecionadas para IIQ. BDISH é uma alternativa ao FISH, usando a combinação de uma metodologia *in situ* e um substrato cromogênico (hibridização *in situ* cromogênica – CISH) ou sistema de sinal realçado pela prata (hibridização *in situ* pela prata – SISH). Os dois métodos permitem a visualização e quantificação do número de cópias do gene *HER2* e do centrômero do cromossomo 17 (CEN17) em um microscópio de campo claro (BRÜGMANN et al. 2011).

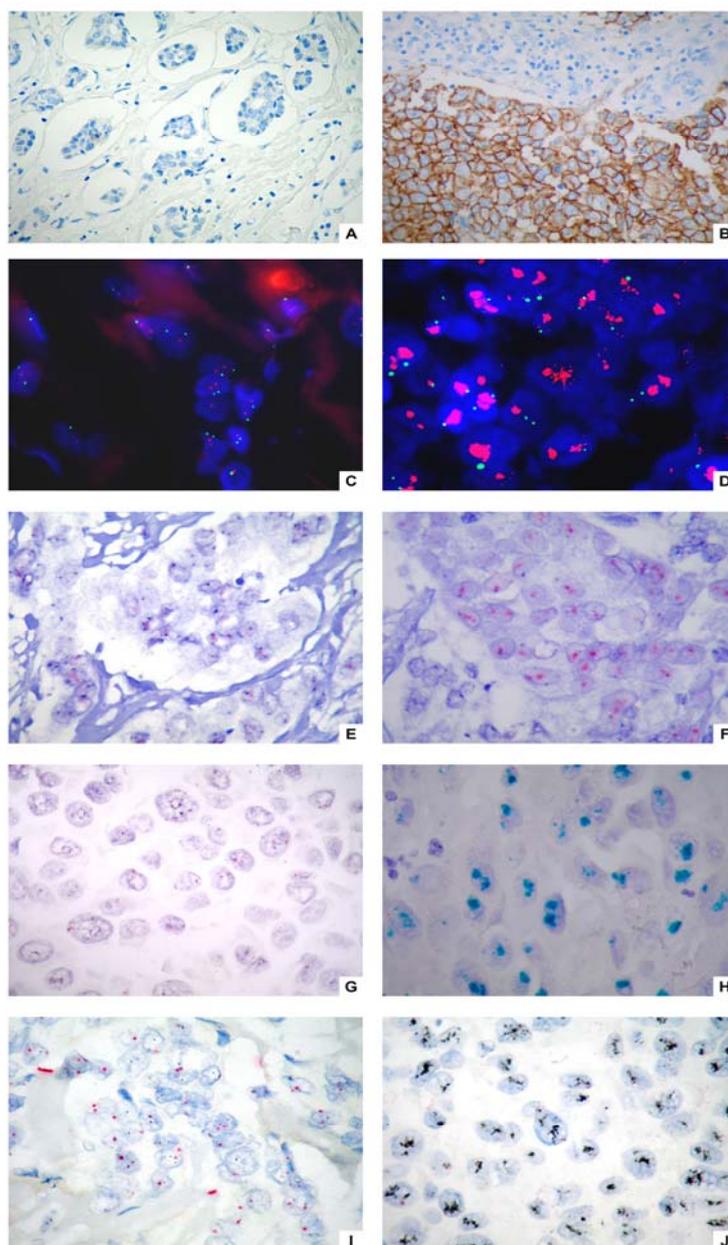
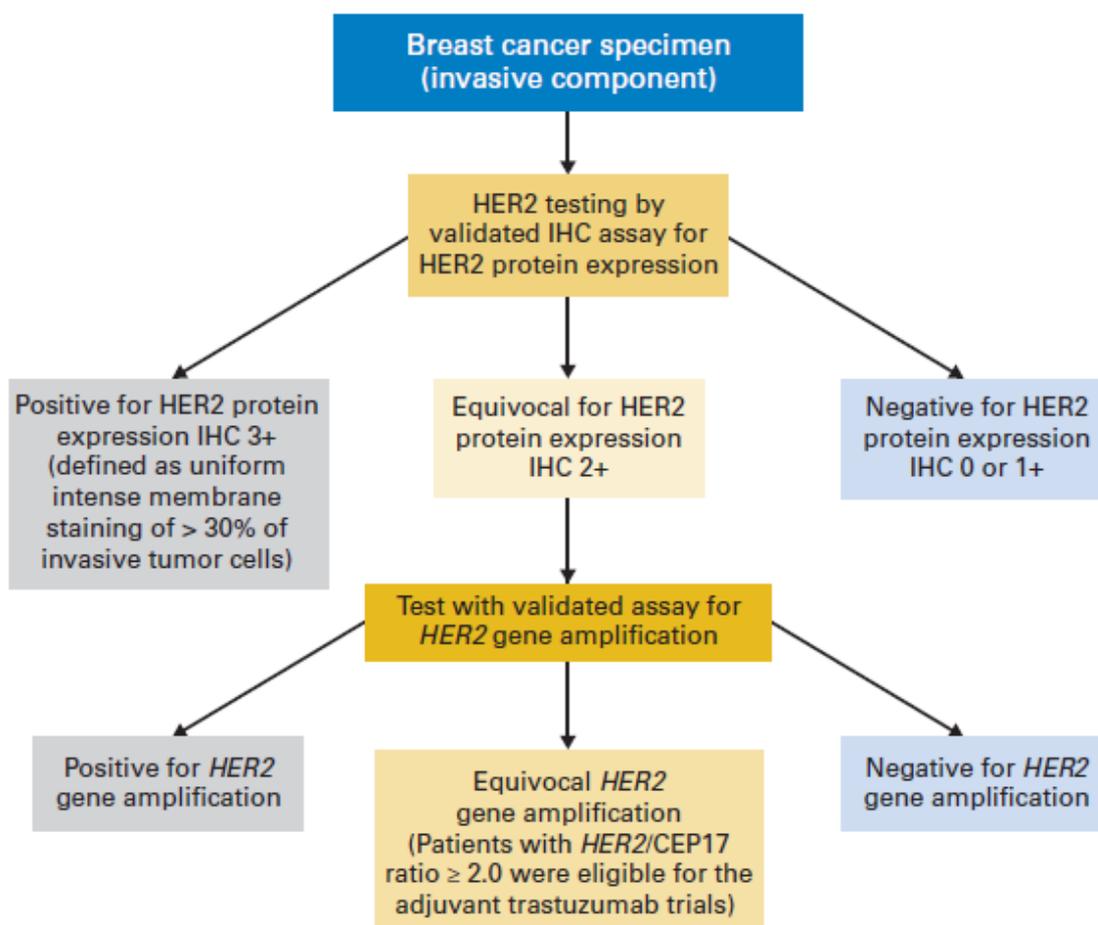


Figura 1 - Imunoistoquímica negativa e positiva e diferentes métodos de hibridização *in situ* observados em 400X. Imunoistoquímica negativa (A) e positiva (B) em material com morfologia danificada devido a problemas pré-analíticos. Hibridização *in situ* fluorescente não amplificada (C) e amplificada (D). DuoCISH DAKO não amplificado (E) e amplificado (F). CISH ZytoVision não amplificado (G) e amplificado (H). SISH Ventana não amplificado (I) e amplificado (J), mostrando melhores condições de avaliação morfológica e maior nitidez para a contagem de pontos quando comparado aos outros métodos de ISH cromogênicos.



Fonte: WOLFF et al. (2007).

Figura 2 - Algoritmo da análise Imunoistoquímica

A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) surgiu como uma alternativa potencial ao FISH (GONG et al. 2005). É um método relativamente novo (HANNA et al. 2007) que permite a detecção de cópias do gene *HER2* utilizando uma reação de peroxidase, comparada a imunoistoquímica (MAYR et al. 2009). O FISH utiliza fluororógenos para a identificação de sinais, enquanto o CISH utiliza cromógeno (LAMBROS et al. 2007). A conversão do sinal do FISH para o sinal do CISH é atingida utilizando anticorpo com fluorocromo ou haptenos-específicos como uma

extensão das sondas de FISH. Estes anticorpos são conjugados com um marcador enzimático como a horseradish peroxidase (HRP) ou a fosfatase alcalina (AP). Estas enzimas são visualizadas pela adição de um substrato adequado e o sinal cromogênico pode ser quantificado utilizando um microscópio de campo claro (GARCÍA-CABALLERO et al. 2010). Mais especificamente, o método de CISH da DAKO requer essa conversão do sinal de fluorescente para cromogênico.

Recentemente, um novo método de hibridização, a hibridização *in situ* pela prata (SISH), está disponível comercialmente e vem sendo introduzida na rotina laboratorial por ser uma técnica capaz de combinar a acurácia do FISH com a luz opaca da prata ao invés de utilizar sinais fluorescentes, permitindo o uso de microscopia de luz comum presente em laboratórios de histopatologia. O método é totalmente automatizado, o que garante a consistência da metodologia e dos resultados (SHOUSA et al. 2009).

Para garantir a qualidade da realização destas técnicas de patologia molecular, a viabilidade das amostras e resultados mais fidedignos, os materiais devem ser adequadamente fixados, sendo a fase pré-analítica um importante fator a ser observado nestes materiais parafinados.

1.4 IMUNOISTOQUÍMICA E HER2

A reação de IIQ continua sendo o teste de rotina mais atrativo para a avaliação do HER2, devido ao menor custo, facilidade técnica e relevância biológica. A IIQ detecta a superexpressão proteica do HER2 localizado na

membrana citoplasmática da célula tumoral, por isso não é completamente eficaz na determinação do status do HER2, especialmente em casos duvidosos (2+), favorecendo a variabilidade da coloração. Diferenças na sensibilidade e especificidade entre os vários anticorpos comercialmente disponíveis, variação da interpretação das reações e artefatos de técnica também são fatores que dificultam a análise dos resultados (HANNA et al. 1999; PARK et al. 2011).

A técnica de IIQ envolve as etapas pré-analítica (preparação do tecido), analítica (fases técnicas do ensaio imunistoquímico) e pós-analítica (interpretação e quantificação dos resultados). Todas as etapas são importantes, mas o preparo adequado da amostra na fase pré-analítica é o que vai determinar a qualidade do material para os procedimentos posteriores e para o resultado final, porém problemas na fase analítica e / ou de processamento técnico são os principais responsáveis por baixas avaliações nos programas externos de controle de qualidade. Variações na padronização e nas metodologias empregadas pelos diferentes laboratórios de patologia e variação na análise interobservador também são fatores que devem ser considerados na avaliação dos resultados (RHODES et al. 2002; WICK e SWANSON 2002; HAMMOND et al. 2003). Estudos prévios sugerem que os anticorpos primários são mais sensíveis e mais específicos para a avaliação de expressão de HER2 e também de receptores hormonais em câncer de mama validados por hibridização *in situ* (NUNES et al. 2007; ROCHA et al. 2008; ROCHA et al. 2009). É importante ressaltar que a escolha de métodos e reagentes para a avaliação da superexpressão de

HER2, bem como do status de amplificação deste gene, irá influenciar resultados de ensaios clínicos para testes de medicamentos, ou influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente, individualmente.

Nos últimos trinta anos, houve um interesse crescente em anticorpos monoclonais de camundongos (MMabs) em relação aos anticorpos policlonais pelas suas propriedades de uniformidade, purificação e disponibilidade. Já os anticorpos policlonais são direcionados contra diferentes epítomos ou sequências diferentes de aminoácidos de um epítomo de um dado antígeno, levando a uma maior afinidade que os MMabs. Entre diversos animais, os coelhos são conhecidos por produzirem altos títulos de anticorpos com alta afinidade (RabMabs). Atualmente, os anticorpos mais empregados para avaliação IIQ de HER2 são os anticorpos policlonais de coelho HercepTest™ e A0485, e o anticorpo monoclonal 4B5 aprovados pela *FDA* (SAPINO et al. 2003; GOUVÊA et al. 2004; GOUVÊA et al. 2006).

A imunistoquímica não apresenta acurácia completa na determinação do status de HER2, especialmente em casos duvidosos / indeterminados; no entanto, é um método que se tornou amplamente aceito para a determinação do HER2 devido sua conveniência prática. Os resultados da IIQ são muitas vezes dificultados pela heterogeneidade metodológica assim como o armazenamento inadequado da amostra tecidual, variação no processo de fixação, diferentes anticorpos, falta de treinamento profissional e variação interobservador (PENAULT-LLORCA et al. 2009; ROSS et al. 2009; PARK et al. 2011).

1.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HER2

O FISH é considerado o padrão ouro de análise para a determinação do status do gene *HER2* em câncer de mama e tem demonstrado boa correlação com a superexpressão proteica com a técnica de IHC. No entanto, o FISH não tem sido amplamente aceito como a IHC nos laboratórios por ser uma técnica de custo elevado, apresentar um protocolo mais longo de realização e requerer equipamento especial, como microscópio de fluorescência e filtros multicolor (PARK et al. 2011).

O método de FISH é considerado mais fidedigno que a IHC como uma técnica com desempenho quantitativa e qualitativamente avaliável em amostras individuais através da análise do status de *HER2* no núcleo das células tumorais, evitando deste modo o potencial de erros de diagnóstico associados com a má preservação do tecido (DIETEL et al. 2007).

A análise da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é baseada no reconhecimento específico da sequência do DNA alvo pela sequência pareada com sondas fluorescentes após a desnaturação da dupla fita. O DNA é biologicamente mais estável que a proteína, assim é menos susceptível de ser afetado pelas condições de preservação. O FISH permite a quantificação direta do número de cópias do gene em uma lâmina e os resultados podem ser mais objetivos que a IHC (PARK et al. 2011). É, portanto, uma importante técnica utilizada para revelar alterações genéticas conhecidas relevantes para o diagnóstico de câncer, prognóstico e estratégias de tratamento correto (GARCÍA-CABALLERO et al. 2010),

porém, é um método que requer um microscópio especializado e sofre com a perda da fluorescência, que inviabiliza a estabilidade em longo prazo (DIETEL et al. 2007).

1.6 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* CROMOGÊNICA (CISH), HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PELA PRATA (SISH) E HER2

A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para o proto-oncogene *HER2* é um método de hibridização *in situ* desenvolvido recentemente e que utiliza uma *probe* com sequência única de DNA marcada com digoxigenina, e incubações sequenciais com fluoresceína antidigoxigenina, peroxidase antifluoresceína e diaminobenzidina.

O sistema de hibridização *in situ* pela prata (SISH) apresenta uma parte cromogênica, semelhante ao descrito acima, utilizada para a marcação de sonda hibridizada à região centromérica do cromossomo 17. Além disso, há a sonda ligada à prata, que hibridizará o gene *HER2*.

As técnicas de CISH e SISH apresentam as vantagens técnicas da IIQ com a reprodutibilidade do FISH, possuem alta concordância com o FISH e custo inferior. A interpretação do CISH e do SISH é feita em microscópio óptico de luz comum, é mais rápida do que no FISH e permite avaliação simultânea das cópias gênicas, do cromossomo 17, das células tumorais e da morfologia do tecido estudado na mesma lâmina, que é contracorada com hematoxilina. As lâminas coradas pelo CISH e SISH podem ainda ser arquivadas em arquivos usuais e o produto da reação é permanente

(GUPTA et al. 2003; ARNOULD et al. 2003; PENAULT-LLORCA e CAYRE 2004; BHARGAVA et al. 2005; LORING et al. 2005; BILOUS et al. 2006). Uma grande vantagem do CISH e do SISH como tecnologias *in situ* e também da IIQ, é a habilidade de combinar diagnóstico molecular com exame histológico no mesmo tecido, diferenciando carcinoma invasor de não invasor. Uma estratégia combinatória utilizando IIQ e CISH ou SISH forneceria informação compreensível e válida sobre a concentração da proteína e a amplificação do gene *HER2* para auxiliar decisões clínicas (ZHAO et al. 2002).

Não há estudos que façam uma análise comparativa entre os métodos de CISH, SISH, FISH e IIQ, principalmente, em casos equívocos – indeterminados pela IIQ e *borderline*, cujo resultado seja entre 1.8 a 2.2, pelo FISH. Estes são, realmente, os casos em que a concordância entre todos estes métodos deve se mostrar maior (GONG et al. 2005; HANNA e KWOK 2006).

1.7 FASE PRÉ-ANALÍTICA

Espécimes de tecido fixados em formalina e colocados em blocos de parafina são amplamente utilizados na rotina laboratorial e na pesquisa para a realização de métodos de IIQ e ISH. Os blocos de parafina, quando seccionados e colocados em lâminas de vidro, são testados em ensaios com marcadores específicos, permitindo que o patologista analise histomorfologicamente as características moleculares específicas do tecido

tumoral e as células tumorais. Para isso, cuidados com as questões pré-analíticas devem ser tomados para preservar importantes características histomorfológicas e componentes subcelulares, como antígenos e ácidos nucléicos, para direcionar a marcação. Entretanto, fixadores que produzem o melhor resultado histomorfológico no tecido não são necessariamente ideais para a preservação do estado molecular das células. O equilíbrio entre essas funções na composição química dos tecidos fixados é fundamental para as práticas histomorfológicas atuais (BABIC et al. 2010).

Divergências de fatores pré-analíticos durante o processamento tecidual, como as propriedades intrínsecas da amostra da biópsia, modelo de isquemia, necrose e secagem devido a atrasos na imersão em fixador, podem influenciar significativamente a antigenicidade da amostra, comprometendo o resultado (WOLFF et al. 2007).

As etapas da fase pré-analítica como o tempo de fixação, a fixação e a duração dessa fixação são frequentemente negligenciadas (NASSIRI et al. 2008). A espessura do tecido em lâmina também é um fator importante para os resultados da marcação de ISH (BABIC et al. 2010). Outros aspectos do processamento tecidual como o tempo da ressecção à fixação, o volume de tecido e de fixador, o tipo de fixador e de fixação, o tratamento pós-fixação também são fatores que devem ser atentamente observados (WOLFF et al. 2007).

A American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists (ASCO/CAP) publicou manuais para a padronização do processamento pré-analítico de tecidos para teste de HER2 em espécimes

de câncer de mama: formol tamponado 10% (NBF) com tempo de fixação de pelo menos 6 à 48h (WOLFF et al. 2007). O tempo da fixação desempenha um papel importante na qualidade dos resultados das marcações. Com o tempo de fixação diminuído (<6h) a amostra apresenta uma aparente perda do material nuclear que poderia levar a uma marcação enfraquecida. Atrasos na fixação em formol, após a retirada da peça cirúrgica, também podem invalidar receptores hormonais e análises de HER2. Resultados inválidos de marcadores tumorais podem alterar significativamente o tipo de terapia adjuvante que o paciente receberá (KHOURY et al. 2011). Muitas vezes, essas recomendações não são seguidas em detrimento dos resultados da marcação (MIDDLETON et al. 2009).

Tendo em vista a importância clínica da avaliação mais adequada do status de HER2 em carcinoma de mama, o objetivo deste estudo foi comparar os métodos dual color FISH, CISH e SISH, e a IIQ para HER2 utilizando um TMA com 320 amostras de carcinoma mamário invasivo submetidas a condições adversas de processamento tecidual e nenhum controle de fixação. Pretendeu-se avaliar o teste de ISH mais adequado, considerando a falta de controle das condições pré-analíticas as quais o tecido foi submetido. Este assunto ainda não é abordado de forma satisfatória na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a funcionalidade e a qualidade dos novos métodos de hibridização *in situ* em material mal processado na fase pré-analítica e comparar os resultados obtidos a partir de dois diferentes métodos de hibridização *in situ* de dupla marcação, os cromogênicos (DuoCISH e ZytoDot CISH) e o pela prata (SISH), e correlacionar estas análises com os resultados obtidos pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em 320 carcinomas invasivos da mama previamente avaliados pela imunistoquímica (IIQ).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a qualidade e a eficiência dos métodos de hibridização *in situ* em materiais com processamento pré-analítico comprometido;
2. Avaliar a expressão proteica de HER2 por painel imunistoquímico;
3. Avaliar alterações do gene *HER2* por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) de dupla marcação;
4. Avaliar alterações do gene *HER2* por Hibridização *in situ* Cromogênica (CISH) e Hibridização *in situ* pela prata (SISH) de dupla marcação;

5. Comparar as técnicas de hibridização de campo claro com a técnica de FISH, considerada padrão ouro de análise;
6. Correlacionar os achados imunoistoquímicos com os achados de status gênico obtidos pelo FISH, CISH e SISH por meio de análise visual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE CASOS

Trezentos e vinte casos de carcinoma invasivo da mama, diagnosticados entre 1990 e 2005, foram selecionados dos arquivos de 2 instituições diferentes do Brasil.

Para confirmar o diagnóstico e selecionar os tumores que apresentavam condições não controladas de fixação, as lâminas de H&E foram revisadas e os tumores com evidências de morfologia pobre indicada por danos nucleares associados à autólise e deficiência dos componentes subcelulares, incluindo antígenos e ácidos nucleicos, foram incluídos neste estudo.

Um cilindro (1,0 mm de diâmetro) de cada tumor com áreas representativas da neoplasia foi selecionado do bloco de parafina para confeccionar um TMA. Dois cilindros representativos de tumor da mama em condições pré-analíticas não controladas que mostraram resultados positivos e negativos para HER2 pela IIQ, foram incluídos como controle interno do TMA. Secções sequenciais de 4 μ m foram obtidas desse TMA, colocadas em lâminas e coradas com H&E (primeira e última secção) para confirmar a presença de spots suficientes para a análise. As secções intermediárias foram usadas para os estudos de IIQ e ISH. Três lâminas contendo a secção do tumor mamário positivo para HER2 foram incluídas em testes de IIQ,

FISH, CISH e SISH como controle externo.

3.2 A CONSTRUÇÃO DO MICROARRANJO DE TECIDO (TMA)

Os casos foram selecionados após avaliação e revisão por dois patologistas. Os blocos dos tumores selecionados foram utilizados para construção de TMAs e as áreas representativas dos tumores foram cuidadosamente selecionadas em lâminas coradas por H&E. As áreas tumorais selecionadas foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments Micro-array technology, Silver Spring, USA). Foi utilizado um fragmento de cada amostra do bloco doador, depositados de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados com espaço de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco de TMA foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à - 20°C no freezer para utilização em estudo IIQ e ISH.

3.3 PROCEDIMENTOS DE IIQ E FISH

A IIQ foi realizada seguindo os procedimentos de rotina (DIETEL et al. 2007) usando o kit HER2 Test 4B5 (Ventana Medical Systems, SA, Illkirch, France). Todas as amostras em blocos de parafina foram cortadas em 4µm utilizando técnicas histológicas convencionais e foram transferidas para

lâminas (Super Frost Plus, Menzel, Germany). A IIQ foi realizada automaticamente com o equipamento Ventana Benchmark® XT (MAYR et al. 2009).

O kit Vysis PathVysion HER2 DNA Probe Kit™, Abbott™ (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA), foi utilizado para realizar o FISH. No primeiro dia, após a desparafinização em três banhos de xilol 100% por 10 minutos cada, a lâmina foi reidratada em três banhos de álcool 100% por 5 minutos cada e três banhos de água destilada por 2 minutos cada. Logo após, a lâmina foi tratada com 0.2N HCl por 20 minutos à temperatura ambiente e um pré-tratamento foi feito em citrato salino pH 6,0 à 80°C em banho-maria por 1 hora. Depois disso, foi realizada a digestão enzimática com pepsina pronta para uso por 7 minutos à temperatura ambiente. A lâmina foi submetida a um banho em tampão 2X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente. A desidratação foi feita com três banhos consecutivos em diferentes concentrações de etanol, 75%, 80% e 100%, por 2 minutos cada e a lâmina foi secada ao ar. As sondas de FISH e o DNA alvo foram desnaturados simultaneamente por 5 minutos à 82°C, e incubados *overnight* (20 horas) à 45°C com 10µl de sonda.

No segundo dia, a lâmina foi enxaguada em solução 1,5M UREA/0,1X SSC e lavada em solução 2X SSC por 2 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada desidratação novamente com três mudanças consecutivas, 75%, 80% e 100%, em etanol por 2 minutos cada e a lâmina foi secada ao ar. Para a detecção do sinal, a lâmina foi colocada em uma câmara pós-hibridização e foram aplicados 15µl de DAPI (2X SSC/0,03 ug/mL 4',6-

diaminido-2-phenylindole dihydrochloride para a identificação do núcleo) e montada em equipamento automático (Tissue-Tek film).

3.4 PROCEDIMENTOS DE CISH (DAKO), CISH (ZYTIVISION) E SISH

3.4.1 DAKO DuoCISH

DAKO DuoCISH™ foi usado para realizar o CISH. A conversão do sinal do FISH para o CISH foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A lâmina foi colocada em uma solução de pré-tratamento da DAKO, Wash Buffer, por 3 minutos. Depois disso, foi feito o Bloqueio da Peroxidase e a lâmina foi incubada por 5 minutos. A imersão da lâmina na solução Wash Buffer foi repetida. Então, foi adicionado o CISH Mix de Anticorpo e foi feita incubação de 30 minutos em câmara úmida. Novamente lavagem em Wash Buffer. Logo após, foi aplicada a Solução de Cromógeno Vermelho e incubada por 10 minutos em câmara úmida, seguida pela imersão em Solução Wash Buffer. Então, é aplicada a Solução de Cromógeno Azul e incubada por 10 minutos, seguida por imersão em Wash Buffer. A lâmina foi imersa em Hematoxilina e lavada com Wash Buffer e água destilada, e depois foi seca à 37°C por 30 minutos e confeccionada com o meio de montagem do kit.

3.4.2 ZytoVision ZytoDot CISH

CISH ZytoVision® (Kit Sonda ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN17) foi utilizado para realizar o segundo CISH. No primeiro dia, após a desparafinização em três lavagens de xilol 100% por 10 minutos cada, a lâmina foi reidratada em três banhos de álcool 100% por 5 minutos cada. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente por 5 minutos e em água destilada por 2 minutos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase por 5 minutos, seguido por três banhos em água corrente por 2 minutos cada. Depois disso, a lâmina foi incubada por 30 minutos à 95°C em solução de pré-tratamento, seguido de três banhos em água corrente por 2 minutos cada. Então, foi aplicada a pepsina pronta para uso. Foram feitos três banhos em água destilada por 2 minutos cada. A desidratação foi feita em etanol gradiente (70, 85 e 2X 100%). A sonda foi aplicada e a lâmina foi vedada com cola para o processo de desnaturação à 80°C por 5 minutos. A lâmina foi incubada *overnight* (20 horas) à 37°C no hibridizador. No segundo dia, a lâmina foi colocada em Wash Buffer (SSC) à 80°C por 5 minutos para soltar a cola para vedação. Três banhos de 2 minutos cada foram feitos em água destilada. A solução de bloqueio foi aplicada e a lâmina foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Ao remover a solução de bloqueio, o mix anti-DIG/anti-DNP foi aplicado na lâmina, que foi incubada em um hibridizador à 37°C por 30 minutos, seguido de três lavagens em 1X wash buffer Tris-buffer salino (TBS) por 2 minutos. O mix de Polímero HRP foi aplicado na lâmina, que foi incubada em hibridizador à 37°C por 30 minutos. A lâmina foi lavada três vezes em 1X wash buffer TBS por 2 minutos. Em

seguida, o mix de Polímero AP foi aplicado e a lâmina foi novamente incubada em hibridizador à 37°C por 30 minutos. Durante os procedimentos de lavagem, a Solução AP-Red foi preparada misturando uma gota da Solução A AP-Red e uma gota da Solução B AP-Red em um recipiente graduado e foi incubada por 3 minutos em uma câmara escura. Após a incubação, seis gotas da Solução C AP-Red foram adicionadas e água destilada até completar 1 ml, e homogeneizar bem. Essa Solução AP-Red foi aplicada e incubada em câmara escura por 10 minutos. A lâmina foi então transferida para um recipiente de lavagem e enxaguada em água corrente por 2 minutos. Durante os procedimentos de lavagem, a Solução HRP-Green foi preparada adicionando duas gotas da Solução A HRP-Green em um recipiente graduado, completando 1 ml com a Solução B HRP-Green. Duas gotas de Solução C HRP-Green foram adicionadas e o recipiente foi homogeneizado. Essa Solução HRP-Green foi aplicada e incubada em uma câmara escura à temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, a lâmina foi lavada em 1X wash buffer TBS por 1 minuto, contra corada com Hematoxilina de Mayer por 10 segundos, e lavada em água corrente por 2 minutos. Finalmente, a lâmina foi desidratada em etanol 100% três vezes por 30 segundos e incubada duas vezes em xilol por mais 30 segundos. A lâmina foi imediatamente confeccionada com meio de montagem.

3.4.3 Ventana SISH

A Hibridização *in situ* Dual Color, Dual ISH, Ventana foi utilizada para realizar o SISH. A lâmina foi colocada no aparelho corador de lâmina

automatizado BenchMark XT, Ventada onde todo o processo de marcação foi realizado. A lâmina foi submetida à recuperação do epítipo induzida por calor (HIER) em um tampão de reação por 40 minutos à 90°C, seguido pelo pré-tratamento proteolítico na hibridização *in situ* (ISH)-Protease 3 (Ventana) por 16 minutos. A sonda de HER2 DNA foi desnaturada à 80°C por 20 minutos e a hibridização foi realizada à 44°C por 6 horas. Após a hibridização, banhos adstringentes (3 vezes à 72°C) foram realizados por 8 minutos. A sonda HER2 marcada com dinitrofenol foi visualizada pela incubação do anticorpo de coelho anti-dinitrofenol, seguido pelo anticorpo de cabra anti-coelho marcado com HRP e, finalmente, a enzima HRP foi desenvolvida por um precipitado de prata, portanto os sinais de HER2 foram depositados como pontos pretos no núcleo. Na sequência, a sonda do cromossomo 17 foi aplicada e a hibridização foi realizada à 44°C por 2 horas. Após a hibridização, banhos adstringentes (3 vezes à 59°C) foram realizados. A precipitação da prata é depositada no núcleo e uma única cópia do gene HER2 é visualizada como um ponto preto. A amostra é então contra corada com Hematoxilina II Ventana para interpretação.

Todas as técnicas e análises foram realizadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo, São Paulo, Brasil. As análises foram feitas por dois observadores, às cegas.

3.5 ANÁLISES DE IIQ, FISH, CISH E SISH

Todas as análises foram feitas por patologistas do Hospital A C Camargo, seguindo as novas recomendações do ASCO/CAP. Todos os resultados foram arquivados em uma planilha no Microsoft Excel.

A IIQ para HER2 foi analisada seguindo as novas orientações recomendadas para teste de HER2 da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e do Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP): 0 ou 1+, sem marcação ou com marcação em menos de 10% das células, respectivamente; 2+, marcação fraca à moderada da membrana completa em mais de 10% das células malignas; 3+, forte marcação imunohistoquímica, definida como marcação uniforme e intensa da membrana em mais de 30% das células tumorais invasivas. Casos interpretados como 0 ou 1+ foram considerados negativos; aqueles interpretados como 2+ foram considerados *borderline* (indeterminado ou equívocos), e 3+ foram considerados positivos (BRUNELLI et al. 2008).

A análise do FISH foi realizada utilizando o microscópio Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany) com filtros apropriados para Spectrum Orange (sonda HER2 locus-específico, Abbott), Spectrum Green (sonda da região centromérica do cromossomo 17, Abbott), e o filtro UV para a contra coloração nuclear DAPI. Os sinais de todas as técnicas de hibridização *in situ* foram gravados com a câmera CCD (Axiocam HRm, Zeiss). As amostras foram determinadas como amplificadas se a razão entre os sinais de *HER2* e do cromossomo 17 foram maiores que 2.2 pontuação recomendada pela

Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) / Colégio Americano de Patologia (CAP) (negativo: $HER2/CEN17 < 1.8$, equívoco: $1.8 \leq HER2/CEN17 \leq 2.2$ e positivo: $HER2/CEN17 > 2.2$) (BRÜGMANN et al. 2011). Casos com a razão de ISH entre 1.8 - 2.2 ou número de cópias do gene *HER2* de 4.0 – 6.0 foram avaliados como equívocos. As avaliações dos resultados das hibridizações foram realizadas às cegas (MAYR et al. 2009).

Um único ponto foi contado como 1, um pequeno *cluster* foi contado como 6 e um *cluster* maior foi contado como 12 pontos. A razão de *HER2*/cromossomo 17 foi então calculada dividindo o total contabilizado de *HER2* pelo total de cromossomos 17 contados. Para casos com a razão entre 1.8 e 2.2, os sinais de 20 ou mais núcleos do tumor foram analisados e uma nova razão foi calculada (SHOUSHA et al. 2009).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software R, versão 2.13 (R Foundation of Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010) foi utilizado. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, e valor preditivo negativo foram calculados para a comparação entre as técnicas.

4 RESULTADOS

Dentre as pacientes selecionadas, a média da idade entre elas foi de 55 anos (intervalo de 32 a 77 anos). Um total de 115/320 pacientes eram pré-menopausadas e 205/320 eram menopausadas. Os casos foram subdivididos de acordo com os estágios da doença, sendo 202 pacientes em estágio I, 91 em estágio II e 27 em estágio III. A média do tamanho tumoral apresentado foi de 12 mm (intervalo de 2 a 50 mm). Todos os casos selecionados eram do tipo ductal. O grau histológico foi classificado como I em 125 pacientes, II em 163 pacientes, e III em 32 pacientes.

Entre os 320, 234 puderam ser avaliados pela IIQ e pelo FISH, com 86 casos sendo não interpretáveis devido à má preservação tecidual (Tabela 1). Dentre os tumores avaliáveis, 27 casos foram negativos para IIQ (0 ou 1+) e mostraram amplificação de *HER2*, representando um falso negativo de 11,53%. A maior parte dos casos classificados como 2+ pela IIQ (14/15) foi amplificada. Além disso, todos os 12 casos indicados como positivos pela IIQ (3+) foram amplificados, representando 0% de falso positivo. Cento e oitenta e oito casos puderam ser avaliados pelos métodos de IIQ e pelo CISH da DAKO. Entre esses casos, 5,48% dos casos negativos pela IIQ foram amplificados (9/173). Dos 10 casos classificados com score 3+ pela IIQ, 3 foram não amplificados por este método, mas amplificados pelo FISH.

Centos e quinze casos puderam ser avaliados pela IIQ e pelo CISH da ZytoVision. Vinte e nove casos dos 115 foram negativos pela IIQ e

amplificados por este CISH (25,21%). Em contraste, todos os 11 casos que tiveram score 3+ pela IIQ foram de fato amplificados, e todos os 13 casos com score 2+ foram também amplificados.

Cento e oitenta casos puderam ser avaliados pelos métodos de IIQ e SISH. Quinze casos de 180 (8,34%) se mostraram negativos pela IIQ e amplificados pelo SISH. Todos os 9 casos com score 3+ foram amplificados por este método (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre a detecção da proteína HER2 pela IIQ e FISH, e BDISH

Técnicas ISH		Score Imunoistoquímica				Total
		Negativo	2+	3+	N. Inter	
FISH	N	180	1	0	-	181
	Ampl	27	14	12	-	53
	N. Inter	-	-	-	86	86
	Total	207	15	12	86	320
CISH-Dako	N	164	4	3	-	171
	Ampl	9	1	7	-	17
	N. Inter	-	-	-	132	132
	Total	173	5	10	132	320
CISH-Zytovision	N	62	-	-	-	62
	Ampl	29	13	11	-	53
	N. Inter	-	-	-	205	205
	Total	91	13	11	205	320
SISH-Ventana	N	145	2	-	-	147
	Ampl	15	9	9	-	33
	N. Inter	-	-	-	140	140
	Total	160	11	9	140	320

Legenda - ISH: hibridização in situ (ISH); FISH: ISH fluorescente; CISH: ISH cromogênica; SISH: ISH pela prata; N: não-amplificado; Ampl: amplificado; N. Inter: resultados não interpretáveis pela IIQ e/ou pelas técnicas de FISH/BDISH.

Considerando o FISH como padrão ouro, o CISH-DAKO mostrou resultados discordantes em 18/178 casos (10,11%), os quais foram casos

falsos positivos (Tabela 2). Em comparação com o FISH, o CISH-ZytoVision foi discordante em 11/116 casos (9,48%), em que 8 casos foram falsos positivos e 3 casos foram falsos negativos. SISH-Ventana não mostrou discordância quando comparado ao FISH.

Tabela 2 - Comparação entre os resultados de FISH e BDISH para avaliação de HER2

ISH		FISH			TOTAL
		N	Ampl	Indet	
CISH-Dako	N	144	0	-	144
	Ampl	18	16	-	34
	Indet	-	-	142	142
	Total	162	16	142	320
CISH-Zytovision	N	61	3	-	64
	Ampl	8	44	-	52
	Indet	-	-	204	204
	Total	69	47	204	320
SISH-Ventana	N	135	0	-	135
	Ampl	0	36	-	36
	Indet	-	-	149	149
	Total	135	36	149	320

Legenda - FISH: hibridização *in situ* fluorescente; IIQ: scores de imunistoquímica para a detecção de HER2; N: não-amplificado; Ampl: amplificado; N. Inter: resultado não interpretável em um ou mais métodos.

A Tabela 3 mostra baixa sensibilidade da IIQ em prever amplificação (30,7%) tratando-se de tecidos preservados sob más condições pré-analíticas, embora esse método tenha mostrado especificidade completa (100%).

Tabela 3 - Parâmetros de concordância com o FISH: comparação da IIQ e BDISH

	IIQ	CISH-Dako	CISH- Zytovision	SISH - Ventana
Falso negativo	13.1	0	5.2	0
Falso positivo	0	11.2	12.7	0
Sensibilidade	30.7	100	93.6	100
Especificidade	100	88.8	87.3	100
VPP	100	45.4	84.6	100
VPN	86.9	100	94.8	100

* Amostras referentes às Tabelas 1 a 3. Para estes cálculos, a imunistoquímica foi considerada negativa (scores 0+1) ou positiva (score 3); score 2 foi excluído. Para ISH, não-amplificado foi contabilizado junto com a polissomia (negativa) e a amplificação foi considerada positiva; casos indeterminados foram excluídos.

Todos os resultados apresentados correspondem à porcentagem. VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

A Tabela 4 mostra números relativos de spots que não foram interpretáveis, que não apresentaram sinais de marcação, ou foram perdidos devido às questões pré-analíticas, para cada diferente método de ISH e FISH. A relação entre falso negativo / falso positivo e sensibilidade / especificidade são favoráveis ao SISH na avaliação da amplificação do gene.

Tabela 4 - Comparação do efeito deletério relativo dos diferentes procedimentos de marcação em tecidos mal conservados em termos de % de spots do TMA que não foram interpretáveis ou não apresentavam tumor, que não apresentaram nenhum sinal, ou foram perdidos durante o processo de coloração

Técnicas	Spots com tumor	N. Aval.	SS	SP	Perda devido à fixação inadequada (%)
FISH	291	1	12	40	13.7
CISH - DAKO	288	27	7	61	21.1
CISH - Zytovision	288	21	96	51	17.7
SISH - Ventana	292	16	45	48	16.4
IIQ	306	0	N/A	41	13.4

Legenda – N. Aval.: Casos não avaliáveis devido marcação fraca da localização do sinal; SS: Sem Sinal de FISH ou BDISH; SP: Spot Perdido. ISH: hibridização in situ; FISH: hibridização in situ fluorescente; CISH: hibridização in situ cromogênica; SISH: hibridização in situ pela prata; IIQ: imunistoquímica.

5 DISCUSSÃO

A confiabilidade dos biomarcadores de câncer nas análises de secções de tecidos é significativamente afetada pela falta de controle essencialmente de dois fatores pré-analíticos: o atraso na fixação e a duração da fixação no tecido. Atraso excessivo (mais de 2 horas) está associado com a perda morfológica e a integridade molecular do tecido devido a ação das enzimas autolíticas ativadas pela diminuição do pH do ambiente causado pela hipóxia resultante da cessação do fornecimento de sangue oxigenado no tecido excisado. Em contraste, uma duração muito curta de fixação (menor que 4 a 6 horas) está associada com a baixa estabilidade do tecido contra os potenciais efeitos prejudiciais dos preparativos necessários para os procedimentos de análise de IIQ, FISH e os outros métodos de ISH. A fixação inadequada e tardia pode também estar associada com a penetração lenta do fixador em espécimes grandes, inadequadamente dissecadas.

Este estudo foi desenvolvido para examinar amostras de tecidos com evidências histológicas de autólise, isto é, perda de detalhes nucleares, indicativo de um atraso significativo na fixação. A duração inadequada da fixação nas amostras selecionadas foi observada a partir da análise retrospectiva da perda de *spots* de tecido resultante de possíveis efeitos prejudiciais do ensaio de diversos procedimentos utilizados para a análise de status HER2.

A partir da Tabela 4 pôde-se observar que todos os procedimentos levaram a perda de, pelo menos, alguns *spots* de tecido, sendo o FISH o procedimento que mostrou menos danos teciduais com uma porcentagem de perda de 13,7%, e o DuoCISH com a maior perda tecidual, 21,1%. As lâminas de TMA são produzidas manualmente e sujeitas a processamento e seccionamento dos blocos, o que facilita a perda de alguns *spots*. A representatividade da amostra no TMA, em relação ao tecido original, é variável e depende do diâmetro do cilindro e dos cilindros inseridos no TMA, além de ser um tipo de tumor bastante heterogêneo. Além disso, devido à grande quantidade de passos de lavagem nos procedimentos, pode promover a perda de cilindros de tecido.

Espécimes de tecido fixados em formol e embebidos em parafina são amplamente utilizados para executar os métodos de IIQ e FISH. A ASCO / CAP emitiu diretrizes para padronizar o processamento pré-analítico de tecidos para testes de HER2 em amostras de carcinoma da mama, no entanto, a má fixação tecidual ainda desempenha um papel importante na qualidade da coloração global para os resultados de IIQ e FISH. Foi determinado que o atraso na fixação de mais de 2 horas à temperatura ambiente e a fixação insuficiente (menos de 6 horas de fixação) geralmente resultam em uma aparente perda de material nuclear que poderia levar ao enfraquecimento do sinal e danos morfológicos (NASSIRI et al. 2008; MIDDLETON et al. 2009). O formol tamponado a 10% é o fixador mais utilizado em laboratórios de Anatomia Patológica e garante uma fixação tecidual satisfatória. No entanto, existem variações na fixação de amostras

de biópsias e peças cirúrgicas como o tempo para a fixação e o período de fixação. Todas as peças devem ser imediatamente enviadas para fixação, porém, antes de fixá-las, são feitos cortes histológicos para facilitar a penetração do formol. As biópsias sofrem menor interferência da degradação tecidual uma vez que apresentam menores tamanhos e são mais rapidamente enviadas para fixação e fixadas. Já a peça cirúrgica apresenta um tamanho maior e requer cortes mais específicos para que as áreas de interesse sejam devidamente fixadas. Considerando que a velocidade de penetração de formol no tecido é de 1,0mm por hora, até uma profundidade máxima de 1,0cm, a peça cirúrgica está mais vulnerável ao processo de autólise por permanecer um tempo maior fora do fixador podendo, posteriormente, dificultar a avaliação por técnicas de IIQ e ISH.

O FISH é considerado o padrão ouro para avaliar o status de *HER2* em câncer de mama (DI PALMA et al. 2007; CHIBON et al. 2009). Como este método não é facilmente disponível em laboratórios de Patologia, a IIQ permanece sendo a técnica mais comum utilizada para esta avaliação. Seguindo as recomendações internacionais, apenas os casos indeterminados (2+) são atualmente elegíveis para serem posteriormente analisados pelo FISH (PENAULT-LLORCA et al. 2009). A taxa de concordância entre a IIQ e o FISH para a avaliação de *HER2* ainda é uma grande preocupação clínica (KHOURY et al. 2011). O alto nível de discordância entre a expressão proteica de *HER2* pela IIQ e a amplificação do gene *HER2* pelo FISH tem sido documentado em vários estudos. As taxas de discordância podem ser elevadas, por volta de 20%, quando o teste

para HER2 é realizado em menor volume, como em laboratórios locais, enquanto acredita-se que a discordância pode ser inferior quando o teste é realizado em larga escala, como em laboratórios referência (GOWN et al. 2008). Isso pode representar alguns problemas práticos. Em primeiro lugar, a suposição da expressão da proteína que prediz a amplificação do gene, e, como tal, indica a resposta a uma terapia alvo dirigida deve ser vista com cautela, especialmente com o aumento da indicação para avaliação de HER2, por exemplo, para o carcinoma gástrico. Em segundo lugar, as questões pré-analíticas podem afetar a avaliação inicial pela IIQ e dificultar a indicação de uma terapia mais adequada (GROENEN et al. 2011). Pode-se argumentar que as questões pré-analíticas prejudiciais à integridade do tecido também podem dificultar a análise de ISH. Embora isso possa ser verdade, em alguns casos, os dados aqui apresentados contradizem essa suposição, já que a IIQ foi o método menos sensível. No presente estudo, a IIQ mostrou 13,1% de resultados falsos negativos quando comparados com o FISH. Esta taxa elevada é mais provavelmente associada com a preservação subótima do tecido associado com a nossa coorte de casos. Parece, portanto, que a avaliação do status de HER2 utilizando a amplificação do gene é mais confiável em circunstâncias onde é difícil controlar as condições pré-analíticas para um nível ideal.

Como o FISH requer equipamento especializado, esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de técnicas não fluorescente, as quais permitem o armazenamento de lâminas para reavaliação posterior. A este respeito, as diferentes fontes de sondas que têm sido desenvolvidas para

HER2, e muitas publicações têm comparado seus desempenhos em relação ao FISH (SHOUSA et al. 2009; PAPOUCHADO et al. 2010; GARCÍA-CABALLERO et al. 2010; BRÜGMANN et al. 2011). No presente estudo, três métodos de hibridização *in situ* de campo claro (do inglês Brightfield Dual-probe *in situ* Hybridization – BDISH) foram comparados, além do FISH e da IIQ, em tecidos em más condições pré-analíticas, o que constitui uma maior contribuição para a decisão do método mais adequado a ser utilizado.

Até recentemente, a codetecção do número de cópias do cromossomo 17 não foi possível por CISH. Consequentemente, a diferenciação entre amplificação e a polissomia do cromossomo 17 não foi possível (PENAULT-LLORCA et al. 2009). Esta desvantagem potencialmente leva a mais diagnósticos de amplificação, como a polissomia que foi vista pelo FISH em 21/234 (8,97%) casos, sendo constantemente associada com a expressão negativa da proteína (escores 0 ou 1+ em 20 casos e 2+ em 1 caso) (dados não mostrados). De fato, a polissomia não é uma indicação para o tratamento com Herceptin.

Dako DuoCISH apresentou alta sensibilidade e valor preditivo negativo em comparação com o FISH. No entanto, este método mostrou 11,2% de falsos positivos e não permitiu a avaliação dos casos indeterminados. Utilizando este kit, observamos que o sinal vermelho de *HER2* geralmente tinha um diâmetro maior e uma borda desfocada, enquanto o sinal azul CEN17 era menor e bem demarcado. É plausível que este padrão de coloração possa ter resultado em superestimação do sinal vermelho do *HER2*. Três casos foram classificados como 3+ pela IIQ e

amplificados pelo FISH, mas não amplificados pelo DuoCISH-Dako. Isso pode ser explicado pelo fato de que o método DuoCISH foi o que apresentou o sinal mais fraco e menor nitidez dos sinais, resultando em uma difícil análise. Quanto à histologia, todos os três casos são de carcinoma ductal invasivo da mama de grau III. O CISH-ZytoVision mostrou sensibilidade e valor preditivo negativo ligeiramente mais baixos do que o método Dako DuoCISH, mas obteve um maior valor preditivo positivo (Figura 3). Embora as análises de correlação dos CISHs tenham mostrado boa concordância com o FISH, a avaliação dos casos *borderline* é mais desafiadora. A dificuldade pode ser devido à baixa intensidade de sinal ou presença de marcação de fundo nessas técnicas. Fatores pré-analíticos, incluindo a variação no tratamento da amostra e o nível de peroxidase endógena do tecido, podem ser responsáveis por dificuldades na interpretação (GONG et al. 2005; MAYR et al. 2009; BRÜGMANN et al. 2011).

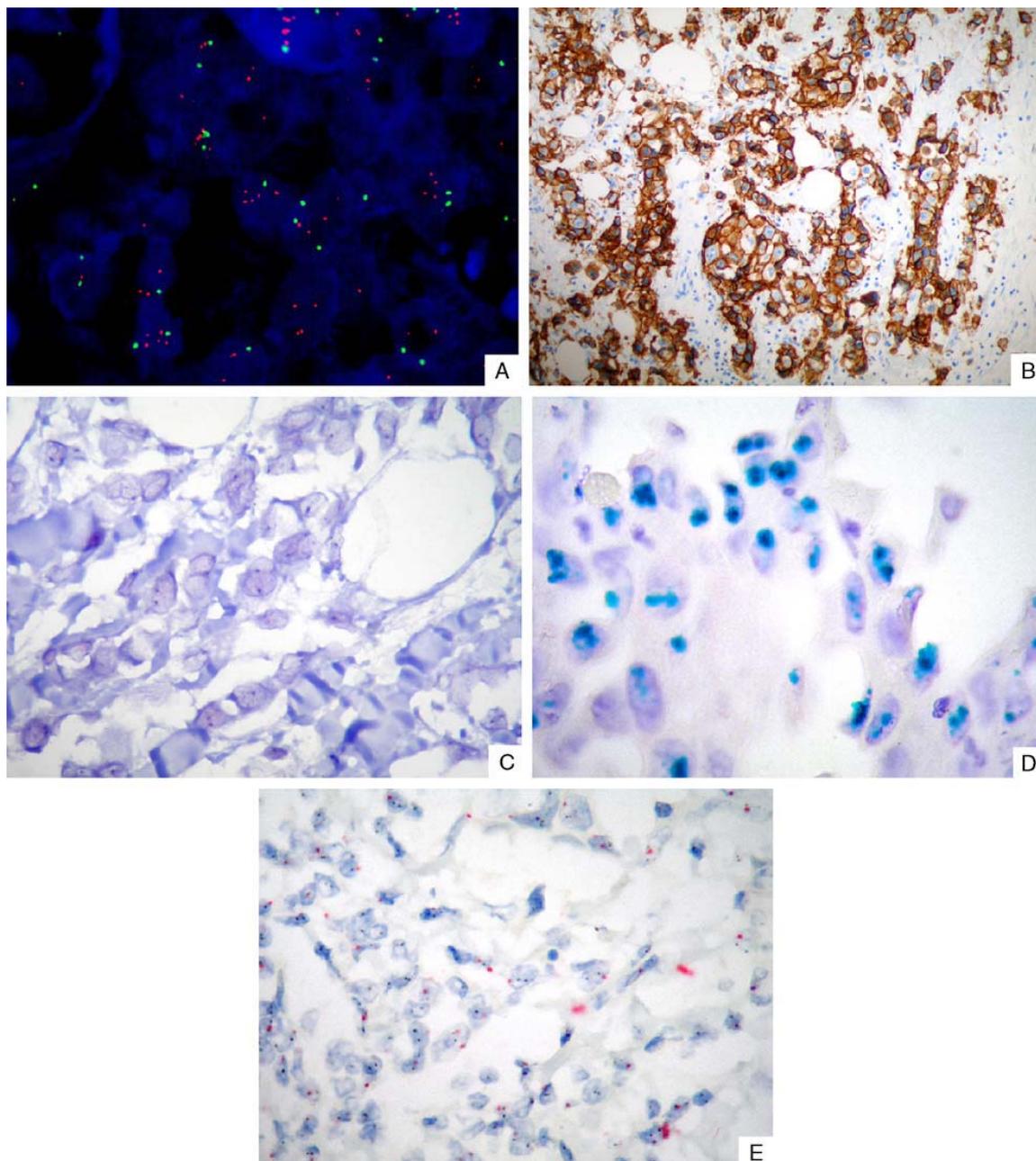


Figura 3 - Amostras mal preservadas devido a problemas pré-analíticos ilustrados por cada método. FISH (A) com danos nuclear. IHC (B) mostra a coloração mal localizada. DuoCISH-Dako (C) sem marcação dos sinais vermelhos. ZytoDot CISH-ZytoVision (D) com sinal verde superexpresso, escondendo os sinais vermelhos. SISH (E) com marcação não específica.

Os resultados mostraram dados importantes na Tabela 4 sobre os problemas pré-analíticos, especialmente quanto a fixação inadequada devido ao aumento do tempo de fixação, secção inadequada do material antes da fixação, baixo tempo de fixação, e utilização de formol não tamponado, que podem muitas vezes ocorrer nas instituições participantes deste estudo. O Brasil é um país muito heterogêneo em relação ao desenvolvimento tecnológico. Grandes investimentos são feitos em regiões de maior desenvolvimento social e tecnológico, onde há instituições de referência. Em contraste, a falta de formação profissional e de investimento em instituições terciárias limita a melhoria destas instituições de ensino superior na área da saúde, levando a diversos problemas de qualidade.

O FISH continua sendo a técnica com o melhor desempenho em tecido com problemas pré-analíticos, apresentando 53 (18,2%) *spots* tecnicamente perdidos de 291 *spots* com a presença de tumor. A perda técnica reflete o efeito crucial negativo de mau controle das condições pré-analíticas (em particular a fixação insuficiente) nas amostras de tecido selecionadas, como conjunto aparente da perda dos cilindros de TMA (40/53), a falta de sinal (12/53) e fraca marcação para localização do sinal (1/53), respectivamente. Este conjunto de fatores caracteriza os casos “não interpretáveis” mostrados nas tabelas de resultados, onde é possível visualizar a quantidade de casos que levaram a uma interpretação duvidosa ou até mesmo a ausência do *spot* para análise (Tabelas 1 e 2). No contexto de fixação insuficiente, o FISH provou ser o método que sofreu menor interferência das questões pré-analíticas, com menor frequência de perda de

cilindros de tecido no TMA (13,7%). Esta porcentagem de perda se correlaciona bem com a perda observada na IIQ, de 13,4%. O SISH foi o método que sofreu menor interferência das questões pré-analíticas entre os métodos de BDISH, com uma porcentagem de perda tecidual de 16,4%.

Os dados mais discrepantes foram os números de casos não interpretáveis pelos CISHs e SISH quando comparados com o FISH, que apresentou apenas um caso não interpretável.

Entre outras técnicas, o SISH foi o que mais se aproximou do FISH em relação ao menor número de casos não interpretáveis e menor perda dos *spots*, que são propriedades cruciais para uma maior possibilidade de resultados confiáveis para o paciente.

A principal razão para a alta proporção de casos não interpretáveis em ambos os CISHs foi a falta de nitidez da marcação que representa os cromossomos e genes. Em contraste, o SISH provou ser o melhor método em termos de nitidez e clareza dos sinais, o que permite mais fácil interpretação e confiabilidade, especialmente em casos com baixa amplificação ou *borderlines*. O SISH mostrou um equilíbrio mais satisfatório de parâmetros de concordância de acordo com o FISH. Com relação aos resultados do SISH, SHOUSA et al. (2009) considerou a interpretação dos resultados relativamente fácil, como na maioria dos casos, a digitalização das lâminas imediatamente fornece uma indicação se o caso será negativo ou positivo, antes da avaliação quantitativa ser realizada. Na plataforma Ventana, o SISH é totalmente automatizado, o que garante maior

consistência e reprodutibilidade, e os resultados podem ser disponibilizados em 6 a 12 horas (BARTLETT et al. 2009; FRITZSCHE et al. 2010).

Os presentes resultados permitem pressupor que os métodos cromogênicos de BDISH, especialmente o método de marcação pela prata, podem ser utilizados como uma abordagem primária nos laboratórios de Patologia para avaliar a amplificação de *HER2* em carcinomas da mama, para evitar o potencial falso negativo dos resultados da IIQ (13,1% neste trabalho). Segundo ARNOULD et al. (2003), estes métodos podem ser utilizados como linha de frente para *screening* do status de *HER2* em biópsias e peças cirúrgicas, e também para calibração e controle de qualidade da IIQ em laboratórios de rotina. Nos casos em piores condições pré-analíticas detectáveis por hematoxilina e eosina, a utilização do FISH é recomendada como a primeira técnica a ser realizada na rotina laboratorial, para garantir resultados mais fidedignos, porém, o SISH mostrou-se uma boa opção para a substituição do FISH em laboratórios que não disponham dessa tecnologia molecular de custo mais elevado, apresentando resultados semelhantes e alta confiabilidade da técnica, sendo o melhor método a ser adotado entre os métodos cromogênicos de BDISH disponíveis.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados analisados neste trabalho, concluiu-se:

- Na comparação das técnicas de BDISH com o padrão ouro de análise, FISH, a maior correlação foi encontrada entre SISH e FISH.
- SISH apresentou concordância com o FISH acima de 95%, sendo uma técnica validada e habilitada pela ASCO/CAP como alternativa ao FISH, permitindo sua inserção nos laboratórios.
- A técnica de SISH demonstrou maior facilidade para a avaliação de casos de baixa amplificação e borderline.
- Os métodos de CISH, apesar de terem apresentado boa concordância com o FISH, não permitem uma avaliação clara e precisa da marcação devido à intensa precipitação dos cromógenos. Além disso, apresentam protocolos mais longos de realização, sendo uma desvantagem para laboratórios de rotina.
- O SISH foi o método mais confiável entre os BDISH, com sensibilidade e especificidade altamente comparável ao FISH.
- Houve baixa correlação entre a expressão protéica nos achados imunohistoquímicos com a amplificação do gene pelos métodos de FISH e BDISH.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertson DG. Gene amplification in cancer. **Trends Genet** 2006; 22:447-55.

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

[ACS]. American Cancer Society. **What are the key statistics about breast cancer ?** Available form: <URL:<http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breast-cancer-key-statistics>> [2012 jan 31].

Arnould L, Fargeot P, Bonneterre J, et al. Epirubicin dose response effect in node positive breast cancer patients is independent of HER2 overexpression: 10 year retrospective analysis of French Adjuvant Study Group 05 trial. **Breast Cancer Res Treat** 2003; 76 suppl 1:A538. [Presented at 25th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; 2002 December 11-14; San Antonio, Tx.]

Babic A, Loftin IR, Stanislaw S, et al. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E dual hapten dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. **Methods** 2010; 52: 287-300.

Bánkfalvi A, Simon R, Brandt B, et al. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. **Histopathology** 2000; 37:411-9.

Barros FF, Powe DG, Ellis IO, Green AR. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands dimerization and treatments. **Histopathology** 2010; 56:560-72.

Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, et al. Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. **Am J Clin Pathol** 2009; 132:514-20.

Bast RC, Ravdin JP, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol** 2001; 19:1865-78.

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

Bilous M, Morey A, Armes J, et al. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. **Pathology** 2006; 38:120-4.

Brand FX, Ravanel N, Gauchez AS, et al. Prospect for anti-her2 receptor therapy in breast cancer. **Anticancer Res** 2006; 26:463-70.

Brügmann A, Lelkaitis G, Nielsen S, et al. Testing HER2 in breast cancer: a comparative study on BRISH FISH and IHC. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2011; 19:203-11.

Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, et al. HER-2/neu Assessment in Breast Cancer Using the Original FDA and New ASCO/CAP Guideline Recommendations: Impact on Selecting Patients for Herceptin Therapy. **Am J Clin Pathol** 2008; 129:907-11.

Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, et al. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. **J Natl Compr Canc Netw** 2006; 4 Suppl 3:S1-22; quiz S23-4

Chibon F, Mascarel I, Sierankowski G, et al. Prediction of HER2 gene status in Her2 2+ invasive breast cancer: a study of 108 cases comparing ASCO/CAP and FDA recommendations. **Mod Pathol** 2009; 22:403-9.

DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:409-18.

Di Palma S, Collins N, Faulkes C, et al. Chromogenic in situ hybridization (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. **J Clin Pathol** 2007; 60:1067-8.

Dietel M, Ellis IO, Höfler H, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. **Virchows Arch** 2007; 451:19-25.

Fritzsche FR, Bode PK, Moch H, et al. Determination of the Her-2/neu gene amplification status in cytologic breast cancer specimens using automated silver-enhanced in-situ hybridization (SISH). **Am J Surg Pathol** 2010; 34:1180-5.

Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. **Expert Rev Anticancer Ther** 2011; 11:263-75.

García-Caballero T, Grabau D, Green AR, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. **Histopathology** 2010; 56:472-80.

Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA, et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. **Histopathology** 2000; 36:168-77.

Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. **Mod Pathol** 2005; 18:1015-21.

Gouvêa AP, Pinto A, Fernandes JRM, et al. Her-2/neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the herceptest. **J Bras Patol** 2004; 40:47-52.

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

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; 21:1271-7.

Groenen PJ, Blokx WA, Diepenbroek C, et al. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the preanalytical phase. **Histopathology** 2011; 59:1-7.

Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, et al. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. **Am J Clin Pathol** 2003; 119:381-7.

Hammond ME, Barker P, Taube S, Gutman S. Standard reference material for Her2 testing: report of a National Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2003; 11:103-6.

Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. **Mod Pathol** 1999; 12:827-34.

Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. **Mod Pathol** 2006; 19:481-7.

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; 14:149-53.

Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. **Hum Pathol** 2005; 36:250-61.

Jatoi I, Miller AB. Why is breast-cancer mortality declining? **Lancet Oncol** 2003; 4:251-4.

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

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

Khoury T, Kulkarni S, Morrison C, et al. HER2 testing: how to reach a high concordance rate between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2011; 19:424-30.

Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. **Hum Pathol** 2007; 38:1105-22.

Loring P, Cummins R, O'Grady A, et al. HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2005; 13:194-200.

Mayr D, Heim S, Weyrauch K, et al. Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Histopathology** 2009; 55:716-23.

Middleton LP, Price KM, Puig P, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:775-80.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Informações de referência ao câncer**. Disponível de: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>> [2011 fev 2].

Myllykamgas S, Knuutila S. Manifestation mechanisms and mysteries of gene amplifications. **Cancer Lett** 2006; 232:79-89.

Nassiri M, Ramos S, Zohourian H, et al. Preservation of biomolecules in breast cancer tissue by a formalin-free histology system. **BMC Clin Pathol** 2008; 8:1.

Nunes CB, Rocha RM, Gouvêa AP, et al. Concordância interobservador na interpretação imunohistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em *arrays* de carcinomas mamários. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:365-71.

Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:767-76.

Park K, Han S, Kim J-Y, Kim H-J, et al. Silver-Enhanced *In Situ* Hybridization as an Alternative to Fluorescence *In Situ* Hybridization for Assaying HER2 Amplification in Clinical Breast Cancer. **J Breast Cancer** 2011; 14:276-82.

Penault-Llorca F, Cayre A. Assessment of HER2 status in breast cancer. **Bull Cancer** 2004; 91 Suppl 4: S211-5.

Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. **Am J Clin Pathol** 2009; 132:539-48.

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

Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. **N Engl J Med** 2006; 354:2103-11.

Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton AJ. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:408-17.

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

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

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

Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. **Am J Clin Pathol** 1999; 112:S53-67.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **Oncologist** 2009; 14:320-68.

Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, et al. Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. **Histopathology** 2003; 43:354-62.

Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. **Mod Pathol** 2001; 14:213-8.

Seidenfeld J, Samson DJ, Rothenberg BM, et al. HER2 testing to manage patients with breast cancer or other solid tumors. **Evid Rep Technol Assess (Full Rep)** 2008; (172):1-362.

Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, et al. Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. **Histopathology** 2009; 54:248-53.

Subik K, Lee JF, Baxter L, et al. The Expression Patterns of ER PR HER2 CK5/6 EGFR Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. **Breast Cancer (Auckl)** 2010; 20:35-41.

Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. Breast cancer. **Lancet** 2005; 365:1727-41.

Wick MR, Swanson PE. Targeted controls in clinical immunohistochemistry; a useful approach to quality assurance. **Am J Clin Pathol** 2002; 117:7.

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; 25:118-45.

Zhao J, Wu R, Au A, et al. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. **Mod Pathol** 2002; 15:657-65.

Evaluation of Reliability of FISH Versus Brightfield Dual-probe In Situ Hybridization (BDISH) for Frontline Assessment of HER2 Status in Breast Cancer Samples in a Community Setting

Influence of Poor Tissue Preservation

Beatriz N. Schiavon, MSc,* Bharat Jasani, PhD,† Louise de Brot, MD,*
José Vassallo, PhD,‡ Aline Damascena, BSc,* Julio Cirullo-Neto, MSc,*
José Ivanildo Neves, MSc,* Fernando Augusto Soares, PhD,*
Helenice Gobbi, PhD,§ and Rafael Malagoli Rocha, MSc, PhD*

Aims: To evaluate the reliability of novel brightfield microscopy-based dual in situ hybridization (BDISH) methods for frontline HER2 status analysis in selected suboptimally preserved breast cancer tissue samples reflecting of the worst scenario in a community.

Methods and Results: A total of 320 morphologically poorly preserved breast invasive ductal carcinomas from the archives of 2 tertiary institutions in Brazil were selected for a tissue microarray-based analysis. 4B5 antibody was used for immunohistochemistry. Fluorescence in situ hybridization (FISH), DuoCISH, ZytoDot CISH, and silver in situ hybridization (SISH) were performed and compared. The highest agreement was observed between SISH and FISH. In addition, SISH was easier to assess in both amplified and nonamplified cases when compared with the other chromogenic methods, due to the sharpness of its dots. DuoCISH produced false-positive results, associated with thicker ill-defined dots, causing poor distinction between nonamplification and low amplification. ZytoDot CISH showed lower sensitivity, with increased frequency of false-positive results.

Conclusions: SISH is the most reliable of the BDISH methods, with sensitivity and specificity highly comparable with FISH. It is also less deleterious than other BDISH methods, producing signals that were more distinct and therefore more readily analyzable even in poorly preserved tissue.

From the *Department of Anatomic Pathology, Hospital AC Camargo; ‡State University of Campinas, Laboratory Investigative and Molecular Pathology Campinas, São Paulo, SP; §Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; and †School of Medicine, Cardiff, UK.

Conflicts of Interest and Source of Funding: The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Beatriz N. Schiavon, MSc, Department of Anatomic Pathology, Hospital AC Camargo, 211 Antonio Prudente St, São Paulo 01509-900, SP, Brazil (e-mail: beatriznschi@gmail.com).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

Key Words: breast cancer, HER2, SISH, in situ hybridization

(*Am J Surg Pathol* 2012;36:1489–1496)

The evaluation of *HER2* status has become a critical element for determining the prognosis and management of breast cancer. The American Society of Clinical Oncology has recommended the assessment of *HER2* in all breast tumors, either at the time of diagnosis or recurrence.^{1,2} *HER2* overexpression in immunohistochemical (IHC) analysis and/or gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) has been found to be prognostic and predictive in patients with breast cancer, and positive results select patients for treatment with trastuzumab (Herceptin) immunotherapy, which has been shown to inhibit the proliferation of human breast cancer cells. The US Food and Drug Administration approved immunotherapy only for patients whose breast cancer cells show strong 3+ IHC staining, defined as uniform, intense membrane staining of more than 30% of invasive tumor cells, and for cases with 2+ staining (complete membrane profiles in at least >10% of invasive tumor cells) showing *HER2* gene amplification by in situ hybridization (ISH), as evidenced by an average ratio of more than 2.2 when comparing *HER2* gene and chromosome 17 associated signals present within individual cancer cell nuclei³ (Fig. 1).

FISH analysis is currently recognized to be the gold standard method for determining *HER2* status. It is considered to be more reliable than IHC-based analysis as it is quantitative and the quality of its performance evaluable in individual samples through analysis of the *HER2* status of background cell nuclei as an internal control quality check close to the point of diagnostic analysis, thereby avoiding potential of misdiagnosis associated with suboptimal preservation of the tissue. The FISH method, however, uses fluorescent probes generating signals that require labor-intensive specialized skills and the use of expensive fluorescence microscopic

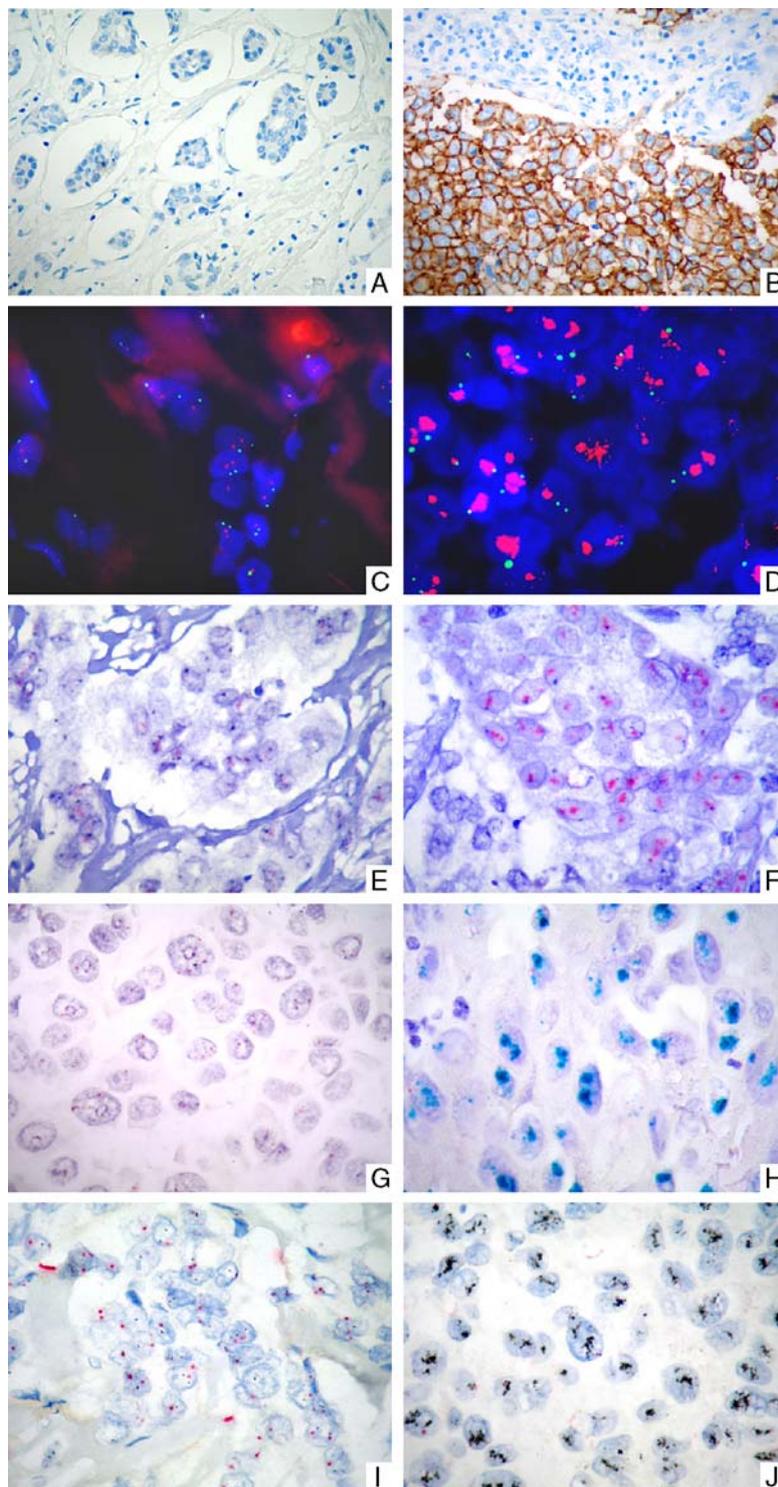


FIGURE 1. Negative and positive IHC and different ISH methods. Negative (A) and positive (B) IHC in material with damaged morphology due to preanalytical problems. Nonamplified (C) and amplified (D) FISH. Nonamplified (E) and amplified (F) DuoCISH—Dako. Nonamplified (G) and amplified (H) CISH—ZytoVision. Nonamplified (I) and amplified (J) SISH—Ventana, showing better conditions of morphology evaluation and higher sharpness for dot counting when compared with other chromogenic BDISH methods.

equipment for accurate analysis. The fluorescent signals also suffer from fading and loss of clarity on long-term storage, compromising stable archiving of the results.⁴

The recent advent of the brightfield dual-probe ISH (BDISH) methods such as chromogenic substrate [chromogenic in situ hybridization (CISH)] and silver-enhanced signal system [silver in situ hybridization (SISH)], have offered a means overcoming the above difficulties, by allowing visualization and quantification of *HER2* and centromere 17 (CEN17)-specific signals using an ordinary light microscope.⁵

The purpose of the present study was to evaluate the relative capacity of the BDISH-based methods to overcome the potential difficulties of the FISH method with the aim of identifying a test that may be amenable for application in a community setting. To this aim commercially available dual-color FISH, CISH, SISH, and IHC methods approved for *HER2* status analysis in breast cancer were assessed on 320 archived samples of invasive breast cancer, showing evidence of poor tissue.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

Three hundred twenty cases diagnosed as invasive breast carcinoma between 1990 and 2005 were selected from the files of 2 different tertiary institutions in Brazil.

To confirm diagnosis and to select tumors that had been collected under suboptimal preanalytical conditions, original hematoxylin and eosin-stained slides were reviewed and tumors with evidence of poor morphology as indicated by damaged nuclei associated with autolysis or impairment of subcellular components, including antigens and nucleic acids and poor targets of stains were included in the study.

One cylinder (1 mm diameter) of each tumor with representative areas of neoplasia was selected from paraffin blocks to build a tissue microarray (TMA). Two cylinders representative of breast carcinomas preserved under standardized optimal preanalytical and fixation conditions and known to be positive and negative for *HER2* (IHC), respectively, were included in the TMA as internal controls. Sequential 4- μ m sections were obtained from the TMA for the IHC, FISH, and BDISH studies. TMA construction and all further procedures were carried out at the Laboratory of Investigative Pathology of the Hospital AC Camargo—Fundação Antonio Prudente, São Paulo, Brazil. The present study was approved by the Ethics Committee in Medical Research of the institutions.

IHC and ISH Procedures

IHC was performed automatically using a Ventana Benchmark XT equipment (Ventana Medical Systems Inc., Illkirch, France), and the primary antibody 4B5 (Ventana).

FISH was performed using a Vysis PathVysion *HER2* DNA Probe Kit (Abbott, Abbott Park, IL), according to the manufacturer's instructions. Probes were

directed to the *HER2* gene and to the centromere of chromosome.⁶

Nonfluorescence ISH techniques were performed manually using the kit Dako DuoCISH (Dako, Carpinteria, CA), and ZytoVision CISH (ZytoDot 2C SPEC *HER2*/CEN 17 Probe kit; Zytovision GmbH, Bremerhaven, Germany). The silver-based dual-color in situ hybridization, Dual ISH (Ventana), was automatically performed in the BenchMark XT instrument (Ventana). In all instances, the manufacturers' protocols accompanying the kits were strictly followed.

IHC, FISH, CISH, and SISH Analysis

All evaluations were carried out by 2 observers blindly.⁷ Discordant cases were discussed by both observers and a consensus was achieved. The IHC for *HER2* was analyzed following the new guidelines by the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists (ASCO/CAP) for *HER2* testing: 0 or 1+, no or fewer than 10% stained neoplastic cells, respectively; 2+, weak to moderate complete membrane staining in more than 10% malignant cells; 3+, strong IHC staining, defined as uniform, complete, intense membrane staining of more than 30% of invasive tumor cells. Cases interpreted as 0 or 1+ were considered negative; those interpreted as 2+ were considered borderline (undetermined or equivocal), and 3+ were considered positive.³ Cases whose interpretation was impossible due to extreme preanalytical damage were considered uninterpretable and excluded from concordance analysis.

The procedures for FISH analysis were performed by using an Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany) with appropriate filters for spectrum orange (locus-specific probe *HER2*, Abbott), spectrum green (centromeric probe 17, Abbott), and the UV filter for the DAPI nuclear counterstain. The signals were recorded with a CCD camera (Axiocam HRm, Zeiss). For the CISH and SISH techniques, only nuclei with a distinct nuclear border being evaluated. A single dot was counted as 1, a small cluster as 6, and a large cluster as 12.⁸ All overlapping nuclei were avoided.⁷

The counting for ISH followed the new recommendations of the ASCO/CAP: the counting was performed on 20 nuclei; negativity for *HER2* gene amplification was considered when ISH ratio was < 1.8; positivity, when ISH ratio was > 2.2.⁷ For cases with a ratio between 1.8 and 2.2, signals from 20 additional tumor nuclei were counted and a new ratio was calculated. This was repeated in the borderline cases until a clear decision was reached.⁸

Statistical Analysis

Software R, version 2.13 (R Foundation of Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010) has been used. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated for the comparison among the techniques.

RESULTS

Taken together, median age of patients was 55 years (range, 32 to 77 y). A total of 115/320 patients were

premenopausal and 205/320 were menopausal. The stage of disease was I in 202 patients, II in 91 patients, and III in 27 patients. Tumor size presented a median of 12 mm (range, 2 to 50 mm). All cases corresponded to the ductal type. Histological grade was I in 125 patients, II in 163 patients, and III in 32 patients.

Among all 320 cases, 234 were available for joint evaluation of IHC and FISH results, with 86 being uninterpretable due to poor tissue preservation (Table 1). Among the evaluable tumors, 27 cases were negative for IHC (0 or 1+) and showed amplification of HER2, representing a false negativity rate of 11.53%. Most cases classified as 2+ by IHC (14/15) were amplified. In addition, all 12 cases indicated as positive by IHC (3+) were amplified, representing a 0% false positivity rate. One hundred eighty-eight cases were available for joint evaluation of the results of IHC and CISH—Dako methods. Among these, 5.48% of IHC-negative cases were amplified (9/173). Out of the 10 cases scored as 3+ by IHC, 3 were nonamplified by this method, but amplified by FISH.

One hundred fifteen cases were available for joint evaluation of the results of IHC and CISH—ZytoVision. Twenty-nine of 115 cases were negative for IHC and amplified by CISH—ZytoVision results (25.21%). In contrast, all 11 cases that were scored 3+ by IHC were indeed amplified, and all 13 cases scored 2+ were also all amplified.

One hundred eighty cases were available for joint evaluation of the results of IHC and SISH methods. Fifteen of 180 cases (8.34%) showed negative IHC and

TABLE 1. Comparison Between IHC Protein Detection of HER2 and FISH and BDISH

ISH Technique	IHC Score				Total
	Negative	2+	3+	Unint	
FISH					
N	180	1	0	—	181
Ampl	27	14	12	—	53
Unint	—	—	—	86	86
Total	207	15	12	86	320
CISH—Dako					
N	164	4	3	—	171
Ampl	9	1	7	—	17
Unint	—	—	—	132	132
Total	173	5	10	132	320
CISH—ZytoVision					
N	62	—	—	—	62
Ampl	29	13	11	—	53
Unint	—	—	—	205	205
Total	91	13	11	205	320
SISH—Ventana					
N	145	2	—	—	147
Ampl	15	9	9	—	33
Unint	—	—	—	140	140
Total	160	11	9	140	320

For these calculations, IHC was considered negative (score 0 or 1+) or positive (score 3); score 2 was excluded. For ISH, nonamplified were counted together with polysomy (negative) and amplification was considered positive; undetermined cases were excluded.

Ampl indicates amplified; N, nonamplified; Unint, uninterpretable result in IHC and/or FISH/BDISH technique.

TABLE 2. Comparison Between FISH Results of HER2 Assessment and BDISH

ISH	FISH			Total
	N	Ampl	Unint	
CISH—Dako				
N	144	0	—	144
Ampl	18	16	—	34
Unint	—	—	142	142
Total	162	16	142	320
CISH—ZytoVision				
N	61	3	—	64
Ampl	8	44	—	52
Unint	—	—	204	204
Total	69	47	204	320
SISH—Ventana				
N	135	0	—	135
Ampl	0	36	—	36
Unint	—	—	149	149
Total	135	36	149	320

For these calculations, IHC was considered negative (score 0 or 1+) or positive (score 3); score 2 was excluded. For ISH, nonamplified were counted together with polysomy (negative) and amplification was considered positive; undetermined cases were excluded.

Ampl indicates amplified; IHC, scores of immunohistochemical detection of HER2; N, nonamplified; Unint, uninterpretable result for one or both methods.

amplified SISH. All 9 cases scored 3+ were amplified by this method (Table 1).

Considering FISH as gold standard, CISH—Dako showed discordant results in 18/178 cases (10.11%), all of which were false-positive cases (Table 2). In comparison with FISH, CISH—ZytoVision was discordant in 11/116 cases (9.48%), in which 8 cases were false positive and 3 cases were false negative. SISH—Ventana showed no discordance at all when compared with FISH.

Table 3 shows very low sensitivity of IHC in predicting amplification (30.7%) when dealing with tissue preserved under poor preanalytical conditions, although this method showed complete specificity (100%).

Table 4 shows numbers concerning spots that were uninterpretable, presented no signal, or were missing, due to tissue preanalytical issues, for each different ISH and

TABLE 3. Parameters of Agreement With FISH: Comparison of IHC and BDISH

	IHC	CISH—Dako	CISH—ZytoVision	SISH—Ventana
False negative	13.1	0	5.2	0
False positive	0	11.2	12.7	0
Sensitivity	30.7	100	93.6	100
Specificity	100	88.8	87.3	100
PPV	100	45.4	84.6	100
NPV	86.9	100	94.8	100

For these calculations, IHC was considered negative (score 0 or 1+) or positive (score 3); score 2 was excluded. For ISH, nonamplified were counted together with polysomy (negative) and amplification was considered positive; undetermined cases were excluded.

All figures presented correspond to percentage.

NPV indicates negative predictive value; PPV, positive predictive value.

TABLE 4. Comparison of Relative Deleterious Effect of Various Labeling Procedure on Poorly Preserved Tissue in Terms of % of Tumor-bearing TMA Spots That Were Uninterpretable, Presented No Signal, or Were Lost During the Staining Process

ISH	Tumor-bearing Spots	Presumed Loss Due to Inadequate Tissue Fixation (%)			
		U	NS	SM	Fixation (%)
FISH	291	1	12	40	13.7
CISH—Dako	288	27	7	61	21.1
CISH—ZytoVision	288	21	96	51	17.7
SISH—Ventana	292	16	45	48	16.4
IHC	306	0	N/A	41	13.4

N/A indicates not applicable; NS, no signal of FISH or BDISH; SM, spot missing; U, uninterpretable.

FISH methods. The balances between false negative/false positive and sensitivity/specificity favor SISH in evaluating gene amplification.

DISCUSSION

The reliability of cancer biomarking in tissue section-based analysis is significantly adversely affected by lack of control of essentially 2 preanalytical factors—the delay and the duration of tissue fixation. Excessive delay (> 2 h upwards) is associated with a loss of morphological and molecular integrity of the tissue due to the action of autolytic enzymes activated by the lowering of the ambient pH caused by hypoxia resulting from the cessation of oxygenated blood supply in the excised tissue. In contrast, too short a duration of fixation (< 4 to 6 h) is associated with poor stability of tissue against potential deleterious effects of preparative procedures required for IHC-based, FISH-based, and BDISH-based analysis. The delayed and inadequate fixation may also be associated with slow penetration of the fixative in inadequately dissected large specimens.

The present study was designed to examine tissue samples with histological evidence of autolysis, that is, loss of nuclear details, indicative of a significant delay in fixation. The inadequacy of duration of fixation associated with the selected samples was surmised from retrospective observation of loss of tissue cores resulting from the potential deleterious effects of the various assay procedures used for HER2 status analysis.

From Table 4 it is noticeable that all the procedures led to at least some loss of tissue cores, the least damaging procedure found to be FISH with 13.7% loss, and the most deleterious being DuoCISH with 21.1% loss. As TMA slides are produced manually and subject to processing and sectioning artifacts it facilitates the release of some cylinders. The representativeness of the TMA sample, relative to the original tissue, are variables and depend on the diameter of the cylinder and of those cylinders are inserted into the TMA, besides being a very heterogenous tumor type. Furthermore, due to lots of wash steps in the procedures, it promotes the loss of tissue cores.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens are widely used to perform IHC and FISH methods. ASCO/CAP has issued preanalytical guidelines to standardize tissue processing for HER2 testing in breast carcinoma specimens; however, suboptimal fixation still plays a major role in the quality of the overall staining results in IHC and FISH. It has been determined that delay in fixation of > 2 hours at ambient temperature and underfixation (< 6 h of fixation) generally result in apparent loss of nuclear material that could lead to weakened signal and damaged morphology.^{6,9}

FISH is considered the gold standard to evaluate *HER2* status in breast cancer.^{10,11} As this method is not readily available in Pathology laboratories, IHC remain the most widespread technique used for this evaluation. Following the international recommendations, only undetermined cases (2+) are currently eligible to be further analyzed by FISH.¹² The concordance rate between IHC and FISH for *HER2* is still a major clinical concern.¹³ The high level of discordance between *HER2* protein expression by IHC and *HER2* gene amplification by FISH has been documented in several studies. Discordance rates may be as high as 20% when *HER2* testing is performed in low volume, local laboratories, whereas discordance is believed to be lower in high volume, central laboratories.¹⁴

This may pose some practical problems. First, the assumption that protein expression predicts gene amplification, and, as such, indicates response to a target driven therapy must be viewed with caution, especially with the increase of indication for *HER2* evaluation, for example, for gastric carcinoma. Second, preanalytical issues may affect the initial evaluation by IHC and hamper the indication of a more adequate therapy.¹⁵ It may be argued that such preanalytical issues deleterious to tissue integrity may also hinder ISH analysis. Although this may be true in some instances, data presented here contradict this supposition, as IHC was the least sensitive method. In the present study, IHC showed 13.1% false-negative results when compared with FISH. This high rate is most probably associated with the suboptimal tissue preservation associated with our cohort of cases. It appears therefore that evaluation of *HER2* status using gene amplification is more reliable under circumstances where it is difficult to control the preanalytical conditions to an optimal level.

As FISH demands specialized equipment, efforts are being made to develop nonfluorescence techniques, which additionally allow storage of slides for latter reevaluation. In this respect, different sources of probes have been developed for *HER2*, and many publications have been delivered comparing their performances in relation to FISH.^{5,8,16,17} In the present study, 3 different BDISH methods were compared, besides FISH and IHC, in tissue under poor preanalytical conditions, what constitutes a further contribution to the decision of the most suitable method to use.

Until recently, codetection of chromosome 17 copy number was not possible by CISH. Consequently,

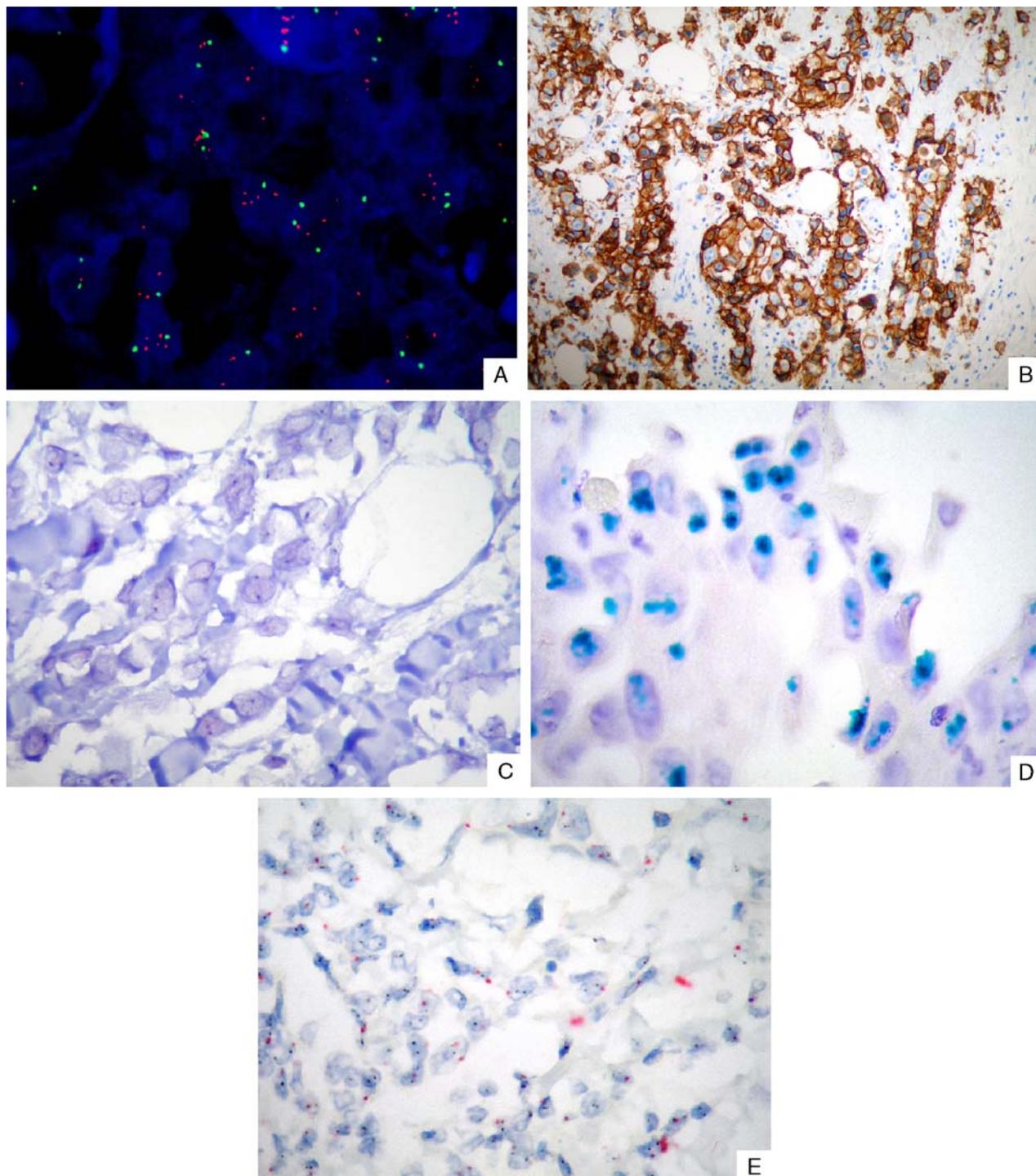


FIGURE 2. Poorly preserved specimens due to preanalytical issues illustrated by each method. FISH (A) with nuclear damaging. IHC (B) showing badly localized staining. DuoCISH—Dako (C) showing no red signals. ZytoDot CISH—ZytoVision (D) with overexpressed green signal, hiding red signals. SISH (E) with nonspecific labeling.

differentiation between amplification and chromosome 17 polysomy was not possible.¹² This drawback potentially leads to over diagnosis of amplification, as polysomy was

seen by FISH in 21/234 (8.97%) of our cases, being constantly associated with negative protein expression (scores 0 or 1+ in 20 cases and 2+ in 1 case) (data not

shown). In fact, polysomy is not an indication of treatment with Herceptin.¹⁸

In our cases, Dako DuoCISH showed high sensitivity and negative predictive value compared with FISH. However, this method showed 11.2% false positive and did not allow the evaluation of undetermined cases. Using this kit, we found that the red *HER2* signal generally had a larger diameter and a blurry edge, whereas the blue CEN17 signal was smaller and sharply demarcated. It is plausible that this staining pattern could have resulted in overestimation of the red *HER2* signal. There were 3 cases classified as 3+ by IHC and amplified by FISH but nonamplified by DuoCISH—Dako. This may be explained by the fact that the DuoCISH method is the one which showed the weakest signal and poorest dot sharpness, resulting in difficult analysis. Concerning histology, all 3 cases are invasive ductal carcinomas of the breast grade III. ZytoVision CISH showed sensitivity and negative predictive value slightly lower than those by Dako DuoCISH, but a higher positive predictive value (Fig. 2).

Although correlation of CISH assays have generally attested good agreement with FISH, evaluation of borderline signals is more challenging. The difficulty can be due to low signal intensity or high background staining in CISH. Preanalytical factors, including variation in specimen handling and the level of endogenous peroxidase may be responsible for difficulties in interpretation.^{5,7,19}

Our results show important data on Table 4 concerning preanalytical issues, especially inappropriate fixation due to increased time to fixation, inappropriate gross section before fixation, under fixation, and nonbuffered formalin, which may often occur in the participant institutions of this study. Brazil is a very heterogeneous country concerning technological development. Major investments are made in regions of higher technological and social development, where there are reference institutions. In contrast, the lack of professional training and investment in tertiary care institutions limit the improvement of these tertiary institutions in health, leading to many diverse quality issues.

According to our data, FISH remains to be the technique with best performance on tissue with preanalytical problems, presenting 53 (18.2%) technically lost results out of 291 cores with detectable tumor presence. The technical loss reflects the crucial negative effect of poor control of preanalytical conditions (in particular the inadequacy of fixation) in the selected tissue samples, as collectively apparent from loss of TMA cores (40/53), lack of signal (12/53) and poor staining signal localization (1/53), respectively. In the context of the presumed inadequacy of fixation, the FISH method proved to be the least deleterious method with the lowest frequency of loss of TMA tissue cores (13.7%). This compared well with 13.4% loss observed with IHC. The SISH was the least deleterious amongst the BDISH with a 16.4% loss of tissue cores.

The most discrepant data were the number of uninterpretable spots by both CISHs and SISH when compared with FISH, which presented only one uninterpretable case.

Among the other techniques, SISH was the one that most approximated to FISH in terms of less uninterpretable cases and less missing spots, which are crucial properties of a technique for a higher possibility of reliable results for the patient.

The main reason for the high proportion of uninterpretable cases in both CISHs was found to be the lack of sharpness of the dots that represent chromosomes and genes. In contrast, SISH proved to be the best system in terms of the sharpness and clarity of the signals, allowing easier interpretation and reliability, especially in those cases with low amplification or borderlines. SISH showed the most satisfactory balance of parameters of agreement with FISH. In conformity with our results about SISH, Shousha et al,⁸ considered interpretation of the results relatively easy, as in most cases scanning of the stained sections will immediately provide an indication on whether the case is going to be negative or positive, before the quantitative assessment is carried out. On the Ventana platform, SISH is completely automated, which ensures higher consistency and reproducibility, and results may be available in up to 6 hours.^{20,21}

In conclusion, the present findings allow the assumption that chromogenic BDISH methods, especially the silver-based one, should be used as the primary pathological approach to evaluate *HER2* amplification in breast carcinomas, to avoid the potential false-negative results of IHC (13.1% in our series). In cases with suboptimal preanalytical conditions detectable by hematoxylin and eosin examination, the use of FISH method is recommended as the frontline approach to adopt, with SISH as the best method to adopt among the available chromogenic BDISH methods available.

REFERENCES

1. Bast RC, Ravdin JP, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001;19:1865–1878.
2. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Human Pathol*. 2005;36:250–261.
3. Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, et al. HER-2/neu assessment in breast cancer using the original FDA and new ASCO/CAP Guideline recommendations: impact on selecting patients for Herceptin therapy. *Am J Clin Pathol*. 2008;129:907–911.
4. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch*. 2007;451:19–25.
5. Brüggemann A, Lelkaitis G, Nielsen S, et al. Testing HER2 in breast cancer: a comparative study on BRISH, FISH, and IHC. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:203–211.
6. Nassiri M, Ramos S, Zohourian H, et al. Preservation of biomolecules in breast cancer tissue by a formalin-free histology system. *BMC Clin Pathol*. 2008;8:1.
7. Mayr D, Heim S, Weyrauch K, et al. Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu- oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Histopathology*. 2009;55:716–723.

8. Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, et al. Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. *Histopathology*. 2009;54:248–253.
9. Middleton LP, Price KM, Puig P, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:775–780.
10. Di Palma S, Collins N, Bilous M, et al. A quality assurance exercise to evaluate the accuracy and reproducibility of chromogenic in situ hybridisation for HER2 analysis in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2008;61:757–760.
11. Chibon F, de Mascarel I, Sierankowski G, et al. Prediction of HER2 gene status in Her2 2p invasive breast cancer: a study of 108 cases comparing ASCO/CAP and FDA recommendations. *Modern Pathol*. 2009;22:403–409.
12. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:539–548.
13. Khoury T, Kulkarni S, Morrison C, et al. HER2 testing: how to reach a high concordance rate between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:424–430.
14. 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. *Modern Pathol*. 2008;21:1271–1277.
15. Groenen PJ, Blokx WA, Diepenbroek C, et al. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. *Histopathology*. 2011;59:1–7.
16. Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:767–776.
17. García-Caballero T, Grabau D, Green AR, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology*. 2010;56:472–480.
18. Rosenberg CL. Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. *J Clin Oncol*. 2008;26:4856–4858.
19. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Modern Pathol*. 2005;18:1015–1021.
20. Fritzsche FR, Bode PK, Moch H, et al. Determination of the Her-2/neu gene amplification status in cytologic breast cancer specimens using automated silver-enhanced in-situ hybridization (SISH). *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1180–1185.
21. Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, et al. Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:514–520.