

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO DOS CARCINOMAS DA MAMA: ASPECTOS TÉCNICOS E UTILIDADE CLÍNICA

CAMILA FURQUIM PRIETO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Prieto, Camila Furquim

Avaliação do índice proliferativo dos carcinomas da mama: aspectos técnicos e utilidade clínica / Camila Furquim Prieto – São Paulo, 2014.

74p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS. 2. CARCINOMA.
3. KI-67. 4. ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO. 5. CARCINOMA INVASOR.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

“Em alguma outra vida devemos ter feito algo de muito grave para sentirmos tanta saudade...”

Dedico este projeto as pessoas mais importantes da minha vida, minha família! À minha mãe Carmen, meu pai Celso, meu irmão Renan, ao meu avô Noel e à memória de minha avó Isaura.

E por que começar minha dedicatória falando em saudade? Simples, porque estas são as pessoas que sempre estiveram ao meu lado, e de alguma forma, hoje não estão tão perto de mim o quanto eu gostaria, seja pelos 500 quilômetros que me separam de vocês, seja pela distância de dimensões. Mas essa distância é perdoada quando a explicação são vocês! Sim, vocês! Pois foi por vocês que eu parti atrás de meus sonhos, vocês que sempre me ensinaram a sonhar e correr atrás do que sempre quis. E foi sonhando em ser um pouquinho de cada um de vocês que eu corri pra essa louca cidade, foi sonhando em mostrar que tudo o que fizeram por mim até hoje não foi em vão que eu mergulhei de cabeça nessa história.

Querendo ter a garra do meu pai, a determinação da minha mãe, a coragem do meu avô, a força da minha avó e querendo ser um pequeno exemplo ao meu irmão foi que eu deixei tudo que eu mais amo na pequena cidade do interior de São Paulo. E não foi fácil ficar sozinha, porque se você trancar sua mão em uma porta, vai doer; se você morder a língua, vai doer; um tapa, um soco, uma cárie, uma cólica doem... mas o que mais dói é a saudade. A saudade da família que está longe, a saudade dos amigos que a muito você não vê, a saudade de uma pessoa que se foi a 11 anos, isso sim dói de verdade. Mas se aguentei a saudade e as dificuldades que encontrei, foi porque vocês me prepararam pra enfrentar tudo, e o fato de saber que ao final de tudo isso eu iria ver o sorriso de felicidade de cada um de vocês, fez tudo valer a pena.

O que eu estou querendo dizer, é que tudo que eu fiz até hoje foi por vocês e pra vocês. Muito obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim. Obrigada por serem a melhor família que alguém poderia ter.

Amo vocês!

Camila Furquim Prieto

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de mestrado tenho muito a agradecer pela dedicação e ajuda de várias pessoas que foram fundamentais na realização deste projeto. Sendo assim, este não estaria completo sem o meu sincero “muito obrigada” a cada um de vocês.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pelos imensos esforços realizados para que meu sonho pudesse ser concretizado.

Agradeço a Dra Cynthia A.B. de Toledo Osório, ao Dr. Luis Guilherme C.A. Lima e ao Dr. Marcelo L. Balancin pela ajuda, assistência e pelo tempo dedicado para que a pesquisa fosse concluída.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Dr. Wesley Pereira Andrade, Dra. Monica Maria Agatha Stiepcich, Dr. Renato Cagnacci Neto e a Dra. Maria Socorro Maciel pela ajuda com a coleta e fornecimento de dados.

Agradeço ao Dr. Rafael Malagoli Rocha e a bióloga Marina França de Resende pela realização da imuno-histoquímica.

Agradeço ao Severino da Silva Ferreira pelo corte e montagem das lâminas.

Agradeço aos biomédicos Juliana Bartholo de Andrade e André Lavorato pela ajuda na utilização dos equipamentos de escaneamento digital.

Agradeço ao biomédico Júlio Cirullo Neto e ao biólogo Felipe Fidalgo pela atenção e acompanhamento em técnicas no Centro Internacional de Pesquisa e Ensino.

Agradeço a bibliotecária Suely Francisco pela ajuda na formatação do projeto.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio, incentivo e amizade.

Agradeço ao professor e amigo Arthur Cardoso de Castro pela ajuda na tradução do projeto.

E agradeço principalmente ao meu orientador Victor Piana de Andrade por toda confiança a mim depositada, pela paciência, atenção, dedicação e por tudo que me ensinou nesses dois anos de trabalho e convivência.

FINANCIAMENTO: Este projeto recebeu o Prêmio Ricardo Renzo Brentani oferecido pelo AC Camargo Cancer Center aos melhores projetos concorrendo ao financiamento interno da instituição no ano de 2012. E bolsa de mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

RESUMO

Prieto CF. **Avaliação do índice proliferativo dos carcinomas da mama: aspectos técnicos e utilidade clínica.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: A avaliação do índice proliferativo pela expressão do Ki67 por imuno-histoquímica (IP-Ki67) é uma importante ferramenta prognóstica em alguns tumores. No câncer de mama seu uso ainda é opcional devido a discussões sobre o seu valor prognóstico, valor preditivo e o melhor ponto de corte. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo para avaliar os métodos de quantificação do IP-Ki67 (estimativa global, contagem diferencial de células e análise digital automatizada), diferentes pontos de corte, o valor preditivo e prognóstico no carcinoma invasor da mama (CDI). **RESULTADOS:** O IP-Ki67 avaliado pelos diferentes métodos mostrou ótima correlação direta variando entre 0,86 e 0,95 ($p < 0,0001$). O índice Kappa entre as metodologias variou de moderada a excelente para o *ponto de corte* de 14% variou entre 0,53 e 0,87 ($p < 0,0001$) e o índice Kappa ponderado para os grupos $<10\%$, $10-20\%$ e $>20\%$ variou entre 0,46 e 0,85 ($p < 0,0001$). A sobrevida livre de doença em 10 anos foi de 54,9%, 43,7%, 43,8% para o IP-Ki67 $<10\%$, $10\%-20\%$ e $>20\%$, respectivamente ($p = 0,0373$). A melhor sobrevida em 10 anos foi observada mesmo nos pacientes com doença em estágio clínico I e IIA (87,5% vs 80,2% vs 30,2%, respectivamente, $p = 0,0001$). Pacientes com CDI em estágio precoce (axila negativa) com ou sem quimioterapia e IP-Ki67 muito baixo, exibiram curvas de sobrevida livre de doença similares em 10 anos ($p = 0,3842$). A variável IP-Ki67 não foi capaz de identificar as pacientes com tumores luminais sensíveis a quimioterapia neoadjuvante. **CONCLUSÃO:** O IP-Ki67 avaliado pela estimativa global do patologista tem boa correlação com a quantificação digital automatizada. A biopsia por agulha grossa é um espécime adequado para avaliar o IP-Ki67. O IP-Ki67 não tem valor prognóstico para sobrevida

livre de doença em 5 e 10 anos. O valor preditivo de resposta a quimioterapia neoadjuvante do IP-KI67 é limitado com uso dos pontos de corte atualmente sugeridos pela literatura e não deve ser considerado para a indicação do tratamento.

SUMMARY

Prieto CF. **[Evaluation of proliferative index of breast carcinoma: technical aspects and clinical utility]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Evaluation of tumor proliferation by Ki67 expression using immunohistochemistry (IP-Ki67) has been studied as a prognostic and predictive tool in some tumors. In breast cancer, its use remains optional due to discussions on best cutoff and methods of quantification. **METHODS:** We performed a retrospective study to evaluate distinct methods of quantification of Ki67-IP (global estimate differential cell count and automated digital processing), different cutoff points, the predictive and prognostic value in invasive breast carcinoma (IBC). **RESULTS:** The IP-Ki67 assessed by different methods showed excellent correlation, (r between 0.86 and 0.95 ($p < 0.0001$)). Kappa Index between methodologies for the *cut-off* of 14% ranged from 0.53 to 0.87 ($p < 0.0001$) and the weighted Kappa index for groups $<10\%$, $10\text{-}20\%$ and $> 20\%$ ranged between 0.46 and 0.85 ($p < 0.0001$). Disease-free survival (DFS) at 10 years was 54,9%, 43,7%, 43,8% for IP-Ki67 $<10\%$, $10\text{-}20\%$ e $>20\%$, respectively ($p = 0.0373$) but it was highly associated with traditional prognostic factors. IBC patients in early stage (negative axilla) with or without chemotherapy and very low IP-Ki67 showed similar 10y-DFS compared to higher IP-Ki67 ($p = 0.3842$). IP-Ki67 did not identify a subgroup of patients with luminal tumors with higher sensitivity to neoadjuvant chemotherapy. **CONCLUSION:** The IP- Ki67 assessed by overall has good correlation to automated digital quantification. Core needle biopsy is adequate for IP-Ki67 evaluation. The IP-Ki67 is not independent prognostic factor for IBC. The predictive value is very limited and should not be used to indicate the neoadjuvant treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Carcinoma Invasor da Mama
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
H.E.	Hematoxilina/Eosina
HER2	Receptor Epidérmico Humano
IC	Índice de Correlação
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP-CDC	Índice Proliferativo do Ki67 segundo a Contagem Diferencial de Células
IP-DIG	Índice Proliferativo do Ki67 segundo a contagem Digital
IP-KI67	Índice Prolifetarivo do Ki67
IP-PRO	Índice Proliferativo do Ki67 segundo o Prontuário do paciente
IP-PT1	Índice Proliferativo do Ki67 segundo o Patologista1
IP-PT2	Índice Proliferativo do Ki67 segundo o Patologista 2
OR	Razão de Possibilidades, do inglês <i>Odds Ratio</i>
PAM50	Análise Preditiva de Microarranjo, do inglês <i>Predictive Analysis of Microarray – 50 Genes</i>
PCR	Resposta Patológica Completa, do inglês <i>Pathologic Complete Response</i>
QT	Quimioterapia Neoadjuvante
RCB	Carga de Cancer Residual, do inglês <i>Residual Cancer Burden</i>
RCP	Resposta Patológica Completa
RP	Receptores de Progesterona
RE	Receptores de Estrógeno
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction</i>
SBR	Scarf-Bloom-Richardson, sistema de graduação histológica modificado por Elson & Ellis em 1991
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
TMA	Microarranjo Tecidual, do inglês, <i>Tissue Microarray</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina).....	2
Figura 2	Contagem do IP-Ki67 através da marcação imuno-histoquímica do Ki67 no carcinoma invasor da mama.....	12
Figura 3	Correlação entre contagem mitótica e imuno-histoquímica do Ki67.....	13
Figura 4	Expressão da proteína Ki67 durante o ciclo celular.....	14
Figura 5	Distribuição dos valores de Ki67 de acordo com o método de avaliação.....	16
Figura 6	Representação da contagem digitalizada da marcação imuno-histoquímica do Ki67.....	21
Figura 7	Área referente ao tecido a ser analisado em uma lâmina de TMA.....	24
Figura 8	Análise da Correlação da Percentagem do Ki67 na <i>Core Biopsy</i> entre os Diferentes Métodos e Observadores.....	27
Figura 09	Gráfico referente a correlação de Pearson do IP-Ki67 entre <i>Core Biopsy</i> e Peça Cirúrgica de acordo com a contagem diferencial de células.....	31

Figura 10	Gráfico mostrando a relação entre sobrevida livre de doença e a variância do índice proliferativo do Ki67 considerando um <i>ponto de corte</i> de <10%, 10-20% e >20%	35
Figura 11	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e a variância do índice proliferativo do Ki67 <10% considerando os estadios I, II, III e IV.....	36
Figura 12	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e a variância do índice proliferativo do Ki67 <10% em estágio precoce considerando pacientes com e sem quimioterapia.....	37
Figura 13	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e a variância da marcação imuno-histoquímica do Receptor de Estrógeno.....	38
Figura 14	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e a variância da marcação imuno-histoquímica do HER2.....	39
Figura 15	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e o comprometimento linfonodal.....	40
Figura 16	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e a graduação histológica.....	41
Figura 17	Gráfico mostrando a correlação entre sobrevida livre de doença e o tamanho do tumor.....	42
Figura 18	Correlação entre o IP-Ki67 e a resposta das pacientes com carcinoma mamário à quimioterapia neoadjuvante.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela de Correlação de Pearson do índice de proliferação do Ki67 entre as quantificações em <i>core biopsy</i> dos diferentes observadores e métodos utilizados. Todas as comparações apresentaram significância estatística ($p < 0,0001$).....	26
Tabela 2	Tabela representando a discrepância da quantificação do Ki67 entre os diferentes métodos analisados para obtenção do índice proliferativo do Ki67 considerando <i>ponto de corte</i> de 14%.....	26
Tabela 3	Tabela de concordância Kappa da quantificação do IP-Ki67 entre as análises dos diferentes métodos e observadores considerando o <i>ponto de corte</i> de 14%.....	29
Tabela 4	Análise dos valores de Kappa ponderado referentes a quantificação do IP-Ki67 entre as análises dos diferentes métodos e observadores considerando um <i>ponto de corte</i> dividido em <10%, 10-20%, >20%.....	30
Tabela 5	Tabela de comparação da Média do IP-Ki67 segundo avaliação da contagem diferencial de células com o Tamanho Tumoral (cm).....	33
Tabela 6	Tabela de comparação da Média do IP-Ki67 segundo avaliação da contagem diferencial de células com a graduação histológica.....	34

Tabela 7	Tabela de comparação da Média do IP-Ki67 segundo avaliação da contagem diferencial de células com o índice mitótico.....	34
Tabela 8	Tabela da percentagem da Sobrevida Livre de Doença de acordo com a Média do IP-Ki67 considerando um ponto de corte dividido em <10%, 10-20% e >20% em um período de 5 anos e 10 anos.....	34
Tabela 9	Tabela da percentagem da Sobrevida Livre de Doença de acordo com a Média do IP-Ki67 <10% considerando os estadios I + II A, II B e III + IV em um período de 5 anos e 10 anos.....	41
Tabela 10	Tabela da percentagem de correlação da Sobrevida Livre de Doença de acordo com a Média do IP-Ki67 <10% em estágio precoce considerando pacientes com e sem o tratamento de quimioterapia em um período de 5 anos e 10 anos.....	43
Tabela 11	Tabela de comparação entre variáveis relacionadas ao câncer de mama como estadio, graduação histológica, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.....	44
Tabela 12	Análise univariada de sobrevida livre de recidiva em 5 e 10 anos de acordo com o estadio, graduação histológica, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.....	45
Tabela 13	Risco Relativo e seus respectivos intervalos de confiança de acordo com estadio, graduação histológica, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.....	46

Tabela 14	Análise multivariada considerando o estadio da doença e a graduação histológica.....	47
Tabela 15	Análise Múltipla considerando o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e a graduação histológica.....	48
Tabela 16	Taxas de percentagem da resposta patológica completa por Imunofenótipo em Pacientes submetidos à Quimioterapia Neoadjuvante.....	49
Tabela 17	Revisão da Literatura quanto às taxas de Resposta Patológica Completa à Quimioterapia neoadjuvante nos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama.....	59

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama: Incidência, Diagnóstico e Tratamento	1
1.2	Variáveis Prognósticas e Preditivas do Câncer de Mama	3
1.3	A Proliferação Tumoral	10
1.4	Gene e Proteína Ki-67	13
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral.....	18
3.2	Objetivos Específicos	18
4	METODOLOGIA.....	19
5	RESULTADOS	25
5.1	Comparação da Quantificação do Ki67 entre Diferentes Métodos e Observadores em Espécime de Biópsia por Agulha Grossa	25
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

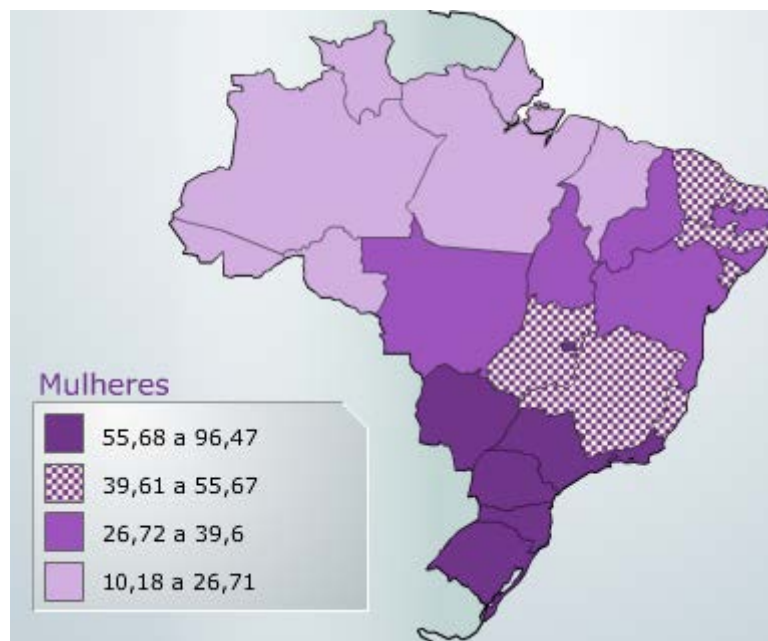
ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Caracterização da amostra dos 100 casos consecutivos do acervo do arquivo de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, diagnosticados no ano de 2012 como Carcinoma Mamário Invasor
- Anexo 3** Bula Anticorpo anti Ki67 (30-9) - imuno-histoquímica Automatizada no Aparelho Ventana
- Anexo 4** Sistema de classificação TNM AJCC 7ª edição

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA: INCIDÊNCIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O câncer de mama é uma questão de saúde pública, com vista em sua incidência e letalidade. A nível mundial o câncer de mama corresponde a 23% dos cânceres e a 14% de óbitos por câncer entre as mulheres (SIEGEL et al. 2013). Segundo o Instituto Nacional de Câncer-INCA, as taxas de mortalidade por câncer de mama ainda continuam altas no Brasil, muito provavelmente pelo diagnóstico tardio. As estatísticas indicam uma diminuição na incidência do câncer de mama e taxas de óbito em muitos países da Europa e Estados Unidos, devido à diminuição do uso da terapia de reposição hormonal e da maior proporção de casos diagnosticados em estágio precoce (JEMAL et al. 2011). Em contrapartida, o Brasil registra um aumento da incidência do câncer mamário no ano de 2014 com estimativa de 57.120 novos casos (Ministério da Saúde 2014).



Fonte: Ministério da Saúde (2014)

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina)

O tratamento do câncer de mama é multimodal e variável a cada caso, podendo incluir uma combinação de cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, quimioterapia e terapias a alvos específicos. A cirurgia e radioterapia estão indicadas para a quase totalidade das pacientes [St. Gallen 2013] Pacientes portadoras de tumores com expressão de receptores hormonais – receptor de estrógenos (RE) e receptor de progesterona (RP) são candidatas a hormonioterapia e pacientes com tumores hiperexpressores/amplificação do gene HER2 são candidatos a terapias alvo como os anticorpos monoclonais ou moléculas inibidoras da proteína HER2. A indicação da quimioterapia gera mais discussão do que as modalidades anteriores. Por décadas a administração da quimioterapia nos casos de carcinoma mamário pareceu inexorável, entretanto, mais e mais são

observados tumores diagnosticados em estágio precoce e que pelo muito baixo risco (<10%) de recidiva loco regional ou sistêmica seriam candidatas a se evitar os importantes efeitos colaterais da quimioterapia (JEMAL et al. 2011). A identificação do subgrupo de pacientes com estágios precoces da doença mas que constituem os 10% que sofrerão recidiva, ou óbito pela doença, é um dos maiores desafios da prática clínica (DOWSETT et al. 2011).

1.2 VARIÁVEIS PROGNÓSTICAS E PREDITIVAS DO CÂNCER DE MAMA

Desde a década de 70 tem-se desenhado modelos prognósticos para prever a evolução e resposta a tratamentos específicos. Em termos prognósticos, tanto fatores clínicos como a biologia do tumor são importantes. O estadiamento clínico pelo sistema TNM (T = tamanho do tumor, N = status linfonodal e M= metástase sistêmica), o grau histológico, os receptores hormonais e o status do gene *HER2* são fatores tradicionalmente usados na decisão terapêutica (FITZGIBBONS et al. 2000; ELZAWAHRY et al. 2013; STRAND et al. 2013; VERONESE et al. 2013; LI et al. 2014). Atualmente, a maioria dos carcinomas mamários é diagnosticado em estágio precoce e livre de metástases sistêmicas. Neste contexto, o status dos linfonodos regionais é um dos fatores prognósticos mais importantes do carcinoma mamário utilizado para determinação dos tratamentos adjuvantes. Pacientes diagnosticados com tumores menores

que 2cm e com axila livre de metástase têm maior probabilidade de cura e seu tratamento é decidido pelas características intrínsecas do tumor. Cerca de 30% das pacientes com tumores restritas à mama exibem recidiva e morte pela doença, expondo a necessidade de tratamento sistêmico em subgrupos da doença. O grau histológico utilizado atualmente foi descrito por Scarff-Bloom-Richardson e modificado por ELSTON e ELLIS (1991) e é utilizado para este refinamento prognóstico (BLOON e RICHARDSON 1957; ELSTON e ELLIS 1991). Este *score* reúne critérios morfológicos como o índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica para prever a agressividade biológica e foi validado por diversos estudos nas últimas décadas, seja como fator prognóstico isolado ou como parte de índices que incluíam outras variáveis como o tamanho tumoral e o status linfonodal (ELSTON e ELLIS 1991; PEREIRA et al. 1995; DALTON et al. 2000; RAKHA et al. 2008; SOBIN et al. 2012). A validade da graduação histológica foi confirmada recentemente por métodos moleculares que demonstraram perfis de expressão gênica baseados em 97 genes associados à proliferação celular (Genomic Grade Index) distintos entre os tumores grau I e grau III e que os tumores grau II se dividem naqueles similares ao grau I ou similares ao grau III, sempre associados a evolução biológica estatisticamente significativas (SOTIRIOU et al. 2006).

Os principais fatores preditivos de resposta disponíveis atualmente são baseados na expressão dos receptores hormonais e do gene *HER2*. Tumores de alto grau mostram uma percentagem significativamente maior de respondedores a QT neoadjuvante em comparação com tumores de

baixo grau (PETIT et al. 2004). O status do RE é um marcador de quimiosensibilidade no câncer de mama. Aparentemente, carcinomas mamários RE negativos são mais sensíveis à quimioterapia baseada em antraciclinas.

Com relação ao HER2, não existem provas suficientes para usar a expressão de HER2 como fator preditivo a quimioterapia convencional em câncer de mama, uma vez que revisão de estudos apresentam dados conflitantes (HAMILTON e PICCART 2000; VINCENT-SALOMON et al. 2000; FANEYTE et al. 2003; PETIT et al. 2004). Porém COLLEONI et al. (1999) relataram aumento significativo na taxa de resposta ao tratamento neoadjuvante com doxorrubicina em tumores HER2 positivos).

A partir de 1999, alguns estudos demonstraram que o perfil de expressão gênica identifica subtipos de câncer de mama nunca antes descritos, com valor preditivo e prognóstico independentes em relação ao estadiamento e graduação histológicas (PEROU et al. 1999; PEROU et al. 2000). Nesta subtipagem molecular feita por *microarrays* a expressão combinada de centenas de genes relacionados à diferenciação do epitélio mamário, aos receptores hormonais, a via de sinalização do gene *HER2* e genes relacionados à proliferação celular é avaliada em um algoritmo que categoriza os tumores em Luminal A, Luminal B, HER2, Basal-símile, entre outros mais raros e menos bem definidos. Os tumores Luminal A compõem cerca de 40% de todos os cânceres de mama, exibindo alta expressão dos receptores hormonais e genes relacionados, baixa expressão de *HER2* e baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular. Os tumores

Luminal B compõem cerca de 20% dos tumores mamários, e possuem baixa expressão de receptores hormonais e genes relacionados, HER2 variável e alta expressão de genes relacionados à proliferação celular. O subtipo HER2-enriquecido corresponde a cerca de 10% a 15% dos carcinomas de mama e caracteriza-se por uma elevada expressão de HER2, com baixa expressão de receptores hormonais e alta expressão de genes relacionados à proliferação celular. Os tumores Basal-símile compõem um grupo heterogêneo de cerca de 15% a 20% dos tumores mamários e são caracterizados pela alta expressão de citoceratinas usualmente associadas ao mioepitêlio, EGFR, além da baixa expressão de receptores hormonais e alta expressão de genes relacionados à proliferação celular (PEROU et al. 1999; PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; SOTIRIOU et al. 2003; FAN et al. 2006; HU et al. 2006; LOI et al. 2007; VODUC et al. 2010). A classificação molecular trouxe uma nova perspectiva para o câncer de mama e dois pontos são considerados os mais importantes: 1) a identificação do subgrupo basal-like (que embora apresente características histopatológicas singulares não havia sido descrito morfologicamente), associado a idade jovem, mutação dos genes BRCA , resistência a hormonioterapia e terapias anti-Her2 e maior sensibilidade a esquemas quimioterápicos com taxanos e 2) identificação de um subgrupo de tumores mamários (Luminal A) com risco baixo de recorrência pela boa resposta a hormonioterapia (PRAT e PEROU 2009; PRAT e PEROU 2011; BASTIEN et al. 2012).

O uso de plataformas de *microarrays* de expressão gênica é pouco prático para a rotina dos pacientes. Assim, este conhecimento foi

simplificado em um painel de 50 genes (PAM50), com nível de expressão gênica avaliado por RT-PCR, aplicável a amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (PARKER et al. 2009). Estudos subsequentes confirmaram o valor prognóstico independente da classificação molecular pelo PAM50 para o carcinoma mamário (NIELSEN et al. 2010; CHIA et al. 2012).

Ainda que de forma imperfeita este conhecimento obtido pela expressão gênica pode também ser traduzido para a expressão proteica utilizando imuno-histoquímica, com vantagens de custo, logística e com maior aplicabilidade clínica. Os marcadores RE, RP e HER2 definem os subgrupos Luminal (RE/RP positivos), HER2 (RE/RP negativos e HER2+) e triplo negativo (RE, RP, HER2 negativos). A subdivisão em Luminal A e B de acordo com a proliferação celular pode ser feita pela dicotomização da expressão do Ki67 em alto e baixo índice (PRAT e PEROU 2009; PRAT e PEROU 2011; BASTIEN et al. 2012).

As proporções de câncer de mama com diferentes fenótipos moleculares foram avaliados em um estudo que incluiu 61.309 mulheres diagnosticadas com câncer de mama invasivo entre 1999 e 2004 (PARISE et al. 2009). Neste estudo, a distribuição dos marcadores individuais foi de 78% positivos para RE, 66% positivos para RP e 22,7% positivos para HER2. Os pacientes tumores positivos para ER e PR tiveram maior sobrevida em 5 anos do que os pacientes com tumores negativos. Tumores HER2 positivos tiveram um pior prognóstico do que os tumores HER2 negativos. Os luminais apresentaram sobrevida de 96,4%, enquanto os triplo negativos e HER2

apresentaram sobrevida de 76,2% e 75,9%, respectivamente.

Outras variáveis moleculares de avaliação do prognóstico baseados em expressão gênica são o score de recorrência Oncotype DX, validado para estratificar o risco de recorrência em pacientes com receptores hormonais positivos e axila livre de metástase, o *Genomic Grade Index* que traduz para o mundo transcriptômico as diferenças observadas nos diferentes graus de diferenciação dos tumores da mama e o Mamaprint que dicotomiza os cânceres de mama em bom e mau prognóstico baseado na expressão de 70 genes (VAN DE VIJVER et al. 2002; PAIK et al. 2004; SOTIRIOU et al. 2006). Estas ferramentas visam em particular identificar pacientes que pelo alto risco de recorrência merecem receber tratamento sistêmico daquelas em que pelo risco baixo de recorrência, poderiam ser poupadas do tratamento, sem prejuízo para sobrevida global. A utilidade clínica do PAM50 e do risco de recorrência avaliado pelo Oncotype DX[®] foi demonstrada em estudo recente. Neste estudo foi avaliado uma coorte de 1.017 pacientes na pós-menopausa tratadas com tamoxifeno adjuvante ou anastrozol e o score do Oncotype DX foi relacionado com o risco de recorrência em 10 anos de forma direta e contínua tanto nas pacientes com linfonodos axilares negativos como nas pacientes com linfonodos axilares positivos e acrescentou informação prognóstica significativa em todos os subgrupos de pacientes (GNANT et al. 2012; DOWSETT et al. 2013).

CHEANG et al. (2009) reavaliaram 357 pacientes RE+ axila N0, previamente incluídas e publicação utilizando expressão gênica por *RT-PCR* (HU et al. 2006) que demonstraram o pior prognóstico nas pacientes com

alto índice proliferativo em relação àqueles com baixo índice proliferativo. Foram selecionadas as pacientes com os imunofenótipos Luminais A e B através do PAM50 para determinar o valor de ponto de corte ideal para o índice do Ki67 por imuno-histoquímica. Baseado na comparação dos dados quantitativos de avaliação visual de Ki67 imuno-histoquímica com os índices de expressão gênica, foi encontrado o valor de corte 13,25% para o Ki67 por imuno-histoquímica. Houve correspondência prognóstica quanto a sobrevida livre de doença (OR de 1,59 para IC de 1,25 a 2,03, com $p < 0,01$) e sobrevida global (OR de 1,60 para IC de 1,22 a 2,10, com $p < 0,01$) maior para luminais A, tornando os Luminais B fortes candidatos a quimioterapia adjuvante. No entanto, para os autores, o valor de 13,25% não seria reproduzível ao microscópio óptico comum, o que levou à sugestão do valor de 14% (CHEANG et al. 2009). Já DENKERT et al. (2013) em estudo realizado em 2013 com 1.166 pacientes diagnosticados com câncer de mama sugeriram que o Ki67 é um marcador preditivo e prognóstico com uma ampla gama de pontos de corte relevantes, uma vez que obtiveram em seu estudo pontos de corte significantes entre 6% e 46% para SLD, 4% e 58% para SG 3% e 94% para resposta a quimioterapia neoadjuvante.

Diversas investigações subsequentes foram conduzidas com a finalidade de validação de tais dados e aplicação clínica. Estudo realizado em 2013 por PRAT e PEROU (2009) mostrou associação entre a pontuação de RE, RP, HER2 e Ki67 com a sobrevida do paciente e que tumores luminal A e luminal B são beneficiados de forma semelhante a partir de terapias endócrinas, mas que os pacientes com tumores luminal A possuem melhor

prognóstico quando comparados aos pacientes com tumores classificados como luminal B. No ano seguinte, utilizando 253 pacientes com câncer de mama que realizaram a operação sem quimioterapia anterior com seguimento clínico de 10 anos, NISHIMIYA et al. (2014) perceberam que os pacientes com tumores luminal A apresentaram melhores resultados de sobrevida quando comparados com os grupos HER2 positivo ou triplo negativo.

1.3 A PROLIFERAÇÃO TUMORAL

Os métodos mais utilizados e de maior viabilidade para a determinação da proliferação do tumor são a contagem mitótica e a expressão imunohistoquímica. A contagem mitótica é um indicador indireto da proliferação tumoral avaliável ao microscópio óptico comum que, tem seu valor reconhecido e representa a variável mais importante de prognóstico adverso dentre os três fatores avaliados no grau histológico SBR. A contagem de mitoses pode ser feita por patologistas sem custo adicional. No entanto, esse método de avaliação nos carcinomas invasivos da mama nunca atingiu o status de fator prognóstico importante, sendo questionado por parte dos patologistas devido as dificuldades na caracterização morfológica das mitoses, da variabilidade entre as áreas avaliadas em microscópios de diferentes marcas e modelos (que necessitam de correções matemáticas), pelo tempo gasto na avaliação ou pelas variações interobservador.

A avaliação da proliferação tumoral através da expressão imuno-histoquímica é feita em microscópio óptico comum e realizada com a utilização de marcadores de proliferação, especialmente o Ki67 (Figura 2). (ELLIS et al. 1979; BAAK et al. 1989, 1990 e 2005; LEHR et al. 1999; URRUTICOECHA et al. 2005; TAWFIK et al. 2007). O uso da expressão imuno-histoquímica do Ki67 para a avaliação da proliferação tumoral foi recomendada pelo *Breast Cancer Working Group* em seu último consenso, porém com o conhecimento das suas limitações técnicas (DOWSETT et al. 2011). Segundo este consenso, deve-se considerar a heterogeneidade de marcação, sendo estabelecidos alguns critérios para um possível consenso entre os patologistas, uma vez que isso tem sido um questionamento do método. Considera-se positiva a marcação nuclear, com a estimativa da porcentagem de células tumorais marcadas, em relação ao total de células tumorais, sendo importante a avaliação do corte histológico inteiro da neoplasia para o delineamento do padrão de expressão, pontual (em “*hot spot*”) ou em gradiente, principalmente na periferia do tumor, sendo que no último faz-se necessário a avaliação de pelo menos três campos de grande aumento (DOWSETT et al. 2011).

Com a imuno-histoquímica sendo considerada viável para a análise da proliferação tumoral por inúmeros estudos, LEHR et al. (1999), utilizou-se de uma coorte de carcinomas ductais invasivos onde 5 patologistas realizaram a contagem de figuras de mitoses e correlacionaram com a imuno-histoquímica, obtendo valores estatisticamente significativos entre as correlações semi-quantitativas e quantitativas (r entre 0,36 e 0,53),

mostrando que ambos os métodos podem ser utilizados na análise de proliferação tumoral, como observado na Figura 3. Outro estudo, realizado 14 anos depois, buscou realizar a comparação entre os métodos de estudo da proliferação (contagem visual e automatizada de mitoses, imuno-histoquímica e expressão gênica através do *Oncotype DX*) para a busca por pacientes de pior prognóstico, candidatos a tratamento agressivo, demonstrou correlação entre a análise visual e automatizada da imuno-histoquímica (k ponderado 0,84; spearman 0.89, ambos com $p < 0.001$), entre a contagem mitótica e o *Oncotype DX* (spearman 0.30, $p < 0.001$), entre a imuno-histoquímica visual e o *Oncotype DX* (spearman 0.28, $p < 0.001$) em ensaio envolvendo 137 pacientes (ZBYTEK et al. 2013).

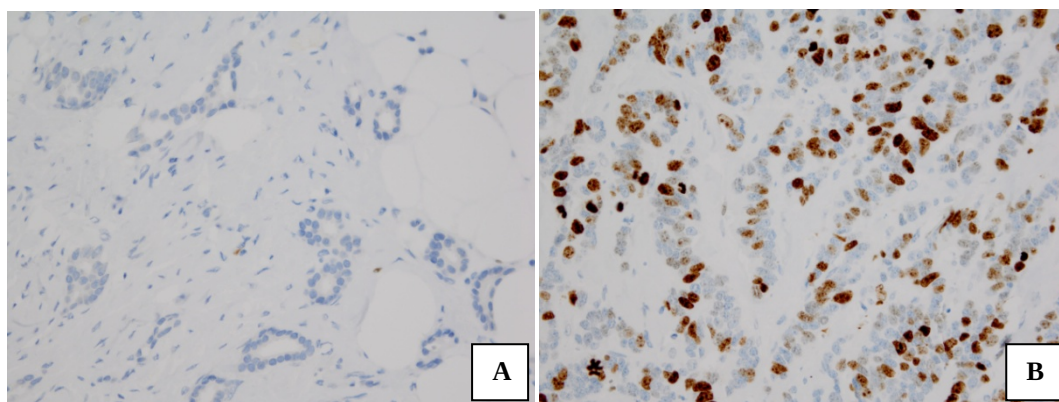
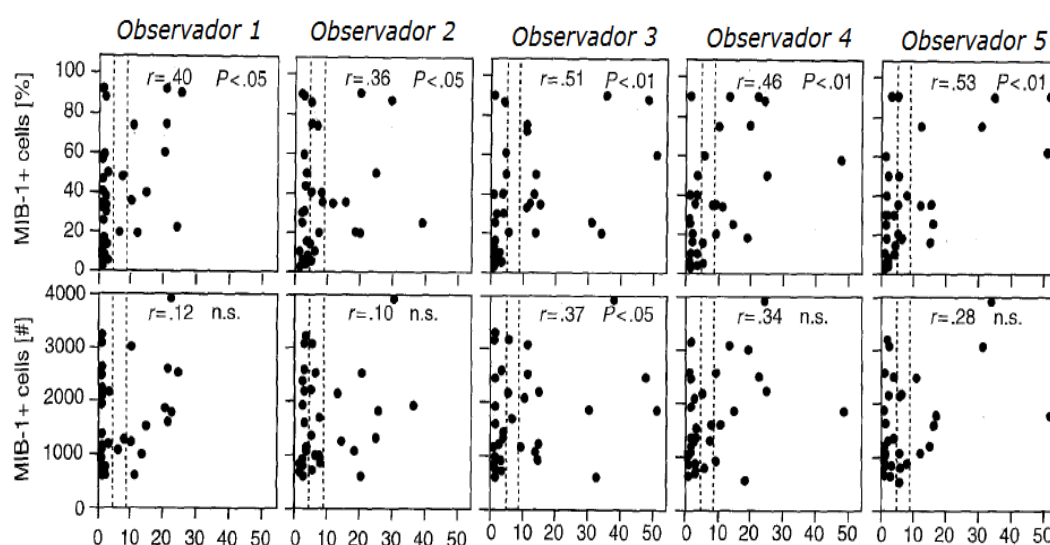


Figura 2 - Contagem do IP-Ki67 através da marcação imuno-histoquímica do Ki67 no carcinoma invasor da mama. (A) Caso 30. Baixa proliferação tumoral, Ki67 igual a zero. (B) Caso 95. Alta proliferação tumoral. Alto índice de Ki67. (Aumento 400x).



Fonte: LEHR et al. (1999)

Figura 3 - Correlação entre contagem mitótica e imuno-histoquímica do Ki67.

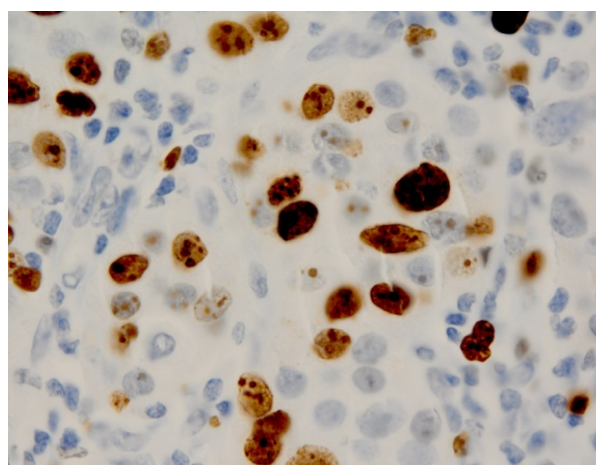
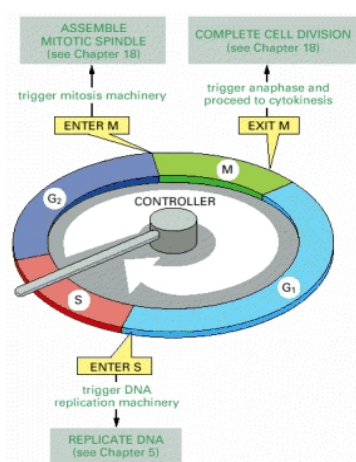
Nos painéis temos os dados positivos de Ki67 e as linhas verticais indicam os pontos de corte da contagem mitótica.

1.4 GENE E PROTEÍNA KI67

A proteína Ki67 é uma proteína nuclear não-histona detectada em células em proliferação, produto da expressão do gene MKI67, localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). Ela foi descrita em 1991, por um grupo de pesquisadores liderado por GERDES et al. (1991) assim nomeada em razão de sua identificação na cidade de Kiel (Ki) e por ter sido observada no 67º clone de anticorpos usado nas placas de 96 espaços contendo linhagem L428 de células de Linfoma de Hodgkin.

A expressão da proteína Ki67 durante o ciclo celular (Figura 4) não é homogênea, sendo maior no fim da fase S e toda a fase M. Durante G1 e início da fase S, a expressão pode reduzir ou estar ausente. Tais dados, advindos de estudos de quantificação por citometria de fluxo, são aliados à

observações morfológicas, as quais se evidencia o padrão de marcação imunohistoquímico fraco em focos discretos no carioplasma durante G1, com condensações progressivas durante a fase tardia G1 em grânulos perinucleares, até a marcação focal e grosseira em região nucleolar e em heterocromatina, de S a G2 (PATHMANATHAN e BALLEINE 2013; YAMAMOTO et al. 2013).



Fonte: ALBERTS et al. (2002)

Figura 4 – Expressão da proteína Ki67 durante o ciclo celular. (A) Esquema do ciclo celular mostrando as fases do ciclo mitótico. (B) Marcação positiva do Ki67 (Caso 80) com variação da intensidade e localização nuclear/nucleolar entre as células nas diferentes fases do ciclo celular.

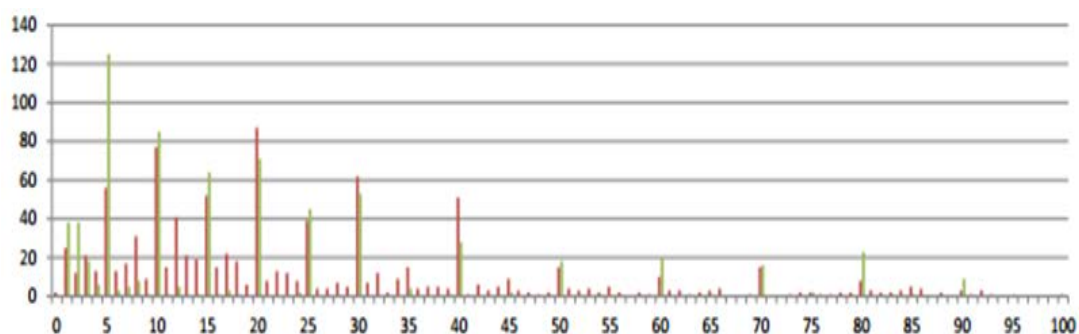
Logo que foi descrita a proteína aventou-se a sua aplicação prognóstica para melhor definição da atividade proliferativa tumoral (DENKERT et al. 2013; STRAND et al. 2013). Investigações em pacientes portadores de Linfoma e de Sarcomas de partes moles foram as pioneiras na década de 80, seguidos pelos estudos em pacientes com neoplasia mamária (VERONESE et al. 2013).

Os primeiros estudos, focaram no estabelecimento do ponto de corte

que delimitavam a expressão do Ki67 entre baixo e alto, com o intuito de se correlacionar ao prognóstico e à predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante. SPYRATOS et al. (2002) definiu pontos de corte de 10% e 25%, para finalidades diferentes: quando a avaliação do Ki67 designava-se a exclusão da quimioterapia em pacientes com tumores de baixa proliferação, o *ponto de corte* de 10% seria mais seguro. Porém, se utilizado para identificar pacientes sensíveis aos protocolos de quimioterapia, seria preferível a utilização de um *ponto de corte* de 25%. AZAMBUJA et al. (2007) observaram a discrepância de pontos de corte estabelecidos na literatura, com a adoção empírica de valores, segundo sua aplicação clínica. Em linhas gerais, nos 38 estudos comparados, o valor de Ki67 variou entre 3,5% e 34%. Mais tarde, a atenção a este tópico voltou em 2009 com a publicação de investigação liderada por CHEANG et al. (2009) e no ano de 2014, em pesquisa para análise do ponto de corte do Ki67, CSEMI et al. (2014) observou que o *ponto de corte* de 14% não é adequado e que diferentes pontos de corte podem ser gerados para propósitos clínicos diferentes (Figura 5). Apesar dos vários estudos realizados sobre o Ki67, a deficiência de métodos como a heterogeneidade dos subgrupos investigados, a ausência de um valor de corte imunoistoquímico universal e quantas células devem ser contabilizadas, sua participação no delineamento de condutas permanece incerto (DOWSETT et al. 2011; CHRISTGEN et al. 2014; ROMERO et al. 2014).

O trial IMPACT considerou a supressão de Ki67 pré e pós tratamento como instrumento de medida de eficácia de droga (DOWSETT et al. 2005).

Em 2013, analisando a capacidade do Ki67 em prever a eficácia da quimioterapia nos paciente com câncer de mama, LIU et al. (2013) concluiu que o alto Ki67 tem pior prognóstico e pode ser mais sensível a antraciclina e que o melhor ponto de corte para predizer a quimiosensibilidade é o valor 19% em pacientes com receptor hormonal positivo.



Fonte: CSEMI et al. (2014).

Figura 5 - Distribuição dos diferentes pontos de corte sugeridos para o Ki67 de acordo com o método de avaliação nos diferentes estudos (eixo x: Ki67 e eixo y: números absolutos).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma neoplasia comum, com apresentação clínica e evolução heterogêneas. A busca por fatores que permitam a individualização do tratamento é contínua e, cada vez mais, informações precisas devem ser extraídas de amostras pequenas para decisões pré-operatórias do tratamento. O índice proliferativo medido pelo Ki67 foi proposto mais recentemente como uma variável que identifica pacientes com muito baixo risco que poderiam ser poupados do uso de quimioterapia. Entretanto, sua utilização não é uma rotina e a avaliação do ponto de corte de 14% de células positivas parece não ser consensual na literatura. Este trabalho visou quantificar as limitações da avaliação da expressão proteica do Ki67 ao microscópio óptico em amostras de biópsia por agulha em uma coorte retrospectiva, bem como a propriedade prognóstica e preditiva de resposta a quimioterapia deste marcador nos tumores de mama com expressão de receptor de estrógeno. O aprimoramento do método e a adequação do ponto de corte poderão melhor individualizar o tratamento das pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos técnicos e aplicabilidade clínica da quantificação da proliferação celular pelo índice Ki67 no carcinoma invasor de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Quantificar a variação entre métodos visuais e automatizados na quantificação do Ki67 por imuno-histoquímica nos cortes histológicos de biópsia por agulha do carcinoma invasivo da mama;
- 2 Testar a associação da quantificação do índice proliferativo obtido pelo Ki67 com variáveis clinico-patológicas clássicas
- 3 Comparar a quantificação do índice proliferativo obtido pelo Ki67 nos espécimes pareados de biópsia por agulha grossa e os espécimes cirúrgicos;
- 4 Avaliar o valor dos pontos de corte do Ki67 propostos na literatura quanto a identificação das pacientes de muito baixo risco para recorrência da doença.
- 5 Avaliar o papel do Ki67 na predição de resposta a quimioterapia neoadjuvante nas pacientes com expressão de receptores hormonais.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo retrospectivo composto de três populações distintas. A primeira visa responder os objetivos específicos 1, 2 e 3. Sendo representada por 100 casos consecutivos disponíveis no arquivo de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center (Anexo 1), diagnosticados no ano de 2012 como Carcinoma Mamário Invasor de qualquer tipo histológico com lâminas de Ki67 e dados clínicos-patológicos disponíveis. A segunda população visa responder ao objetivo específico 4 e é composta por 576 casos de câncer de mama invasor com expressão de receptores hormonais, também correspondentes a pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, diagnosticados entre 1980 e 2001. A terceira população visa responder ao objetivo 5 e é composta por 236 pacientes com carcinoma mamário invasor do A.C.Camargo Cancer Center diagnosticados de 2009 a 2012 submetidos à quimioterapia neoadjuvante.

Inicialmente, foram selecionados 100 casos de biópsia mamária do ano de 2012 com análise prontuário na versão digitalizada, onde avaliamos os dados anatomopatológicos como tipo histológico, medida da neoplasia, grau de SBR modificado (formação tubular, grau nuclear e índice mitótico) ELSTON e ELLIS (1991) e perfil imuno-histoquímico para fatores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária (expressão de receptores de estrógenos, de progesterona, de HER2 e de Ki67).

Para responder ao primeiro objetivo específico, fizemos uma

comparação em pares dos seguintes grupos:

- a) a avaliação do Ki67 obtida através do prontuário do paciente (avaliação realizada por vários profissionais distintos (IP-PRO);
- b) a estimativa global obtida por único patologista; seguindo o protocolo usado na rotina diagnóstica (DOWSETT et al. 2011), ou seja, quantificação do índice do Ki67 (IP-Ki67) considerando toda a área tumoral, incluindo áreas de maior atividade mitótica tumoral (*“hot spot”*). (IP-PT1);
- c) a estimativa global obtida por único patologista; seguindo o protocolo usado na rotina diagnóstica (DOWSETT et al. 2011), ou seja, quantificação do índice do Ki67 (IP-Ki67) considerando toda a área tumoral, incluindo áreas de maior atividade mitótica tumoral (*“hot spot”*). (IP-PT2);
- d) a análise através da contagem diferencial de células por único patologista utilizando o equipamento Phoenix EC-2088 e microscópio Olympus BX51. Foram analisadas 500 células por lâmina incluindo cinco áreas com 100 células cada, que representassem a heterogeneidade da marcação em cada caso. (IP-CDC);
- e) contagem digitalizada no equipamento Aperio ScanScope XT, para quantificação da proliferação tumoral (Figura 6), realizada através da seleção das regiões tumorais que representassem a heterogeneidade tumoral para obtenção aproximada de 500 células (IP-DIG).

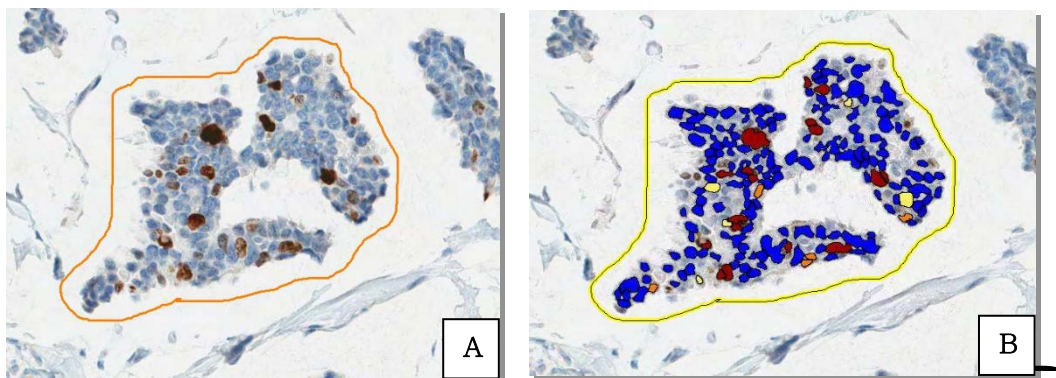


Figura 6 – Representação da contagem digitalizada da marcação imuno-histoquímica do Ki67. (A) Seleção de área a ser quantificada pelo IP-DIG. (B) Marcação das células contabilizadas pelo IP-DIG.

Utilizamos o teste de Pearson para avaliar a correlação entre as diferentes quantificações. Os índices kappa para as categorias <14 e $>14\%$, ou nas categorias $<10\%$, $10-20\%$ e $>20\%$ foram calculados entre cada um dos métodos. Os testes estatísticos foram realizados no software Graph Prism 5.0a.

Para responder ao segundo objetivo específico, fizemos a comparação do IP-Ki67 obtido pela contagem diferencial de células com variáveis clínico-patológicas (tamanho tumoral, graduação histológica, índice mitótico e marcadores imunohistoquímicos). Para as variáveis contínuas foi usado o teste de correlação de Pearson. Para a análise de variância do índice proliferativo entre os subtipos moleculares foi realizada através do teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

Para responder ao terceiro objetivo específico, comparamos a quantificação digital obtida pela contagem diferencial de células do valor do IP-Ki67 onde pareamos os valores obtidos de espécimes cirúrgicos e de

biópsia por agulha grossa. Os valores foram comparados através do índice Kappa através do programa Graph Prism 5.0a.

Para responder ao quarto objetivo específico, analisamos uma população de 576 casos de carcinoma mamário invasor diagnosticado entre 1980 e 2001 e acompanhadas por no mínimo 10 anos no AC Camargo Cancer Center. Estes foram casos selecionados de outro estudo de cerca de 1200 casos incluídos em *tissue microarrays* e com coloração para Ki67 disponível. Os motivos para exclusão dos 624 casos foram a falta de representação do tecido no TMA, a falta do componente invasivo no TMA e a negatividade para o Ki67 (possível perda da reatividade antigênica). As lâminas de imuno-histoquímica para o anticorpo Ki67 utilizadas, foram as lâminas de TMA utilizadas em estudo anterior, uma vez que segundo estudo realizado por BATISTATOU et al. (2013), mostraram que para o câncer de mama, TMAs são uma alternativa eficiente e confiável para protocolos de avaliação e valores de *ponto de corte* (Figura 7). Nessa população, nós comparamos o IP-Ki67 com diversas variáveis relacionadas ao câncer de mama como receptores hormonais, graduação e tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, estadiamento e analisamos a sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos onde foram consideradas a data do tratamento, a data da recidiva e a data do último retorno para o cálculo da SLD em meses. Tivemos um paciente com sobrevida maior do que 500 meses, que teve seu valor alterado para 167 meses que foi o segundo valor máximo observado na amostra.

Em nossa análise multivariada, como o estadio é obtido a partir das

variáveis T e N, para evitar problemas de multicolinearidade, foram ajustados dois modelos: um com as variáveis estadio e SBR e outro com as variáveis T, N e SBR. Foram incluídas todas as variáveis significativas ao nível de 20% na análise univariada.

Para a associação das variáveis de interesse com a marcação do Ki67 foi utilizado o teste Qui-Quadrado. O estimador de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foram utilizados na análise de sobrevida univariada. Na análise de sobrevida múltipla foram ajustados modelos de riscos proporcionais de Cox. O nível de significância adotado foi o de 5% e o software livre R versão 3.0.1 foi utilizado nas análises.

Para responder ao objetivo 5 , selecionamos 236 diagnosticadas com carcinoma mamário invasor e submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Analisamos os dados de resposta patológica calculados através do *Residual Cancer Burden* (RCB) Calculator do *M.D.Anderson Cancer Center* (<http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert>) de cada um dos casos e correlacionamos com índice de Ki67 considerando o *ponto de corte* proposto de 14%. O RCB quantifica a percentagem de tumor viável residual nos linfonodos axilares e leito tumoral mapeado após quimioterapia neoadjuvante. E o RCB=0 significa resposta patológica completa é considerado preditor de boa resposta a quimioterapia neoadjuvante a longo prazo. RCB I significa doença residual mínima, RCB II significa doença residual moderada e RCB III significa doença residual volumosa. (Anexo 4).

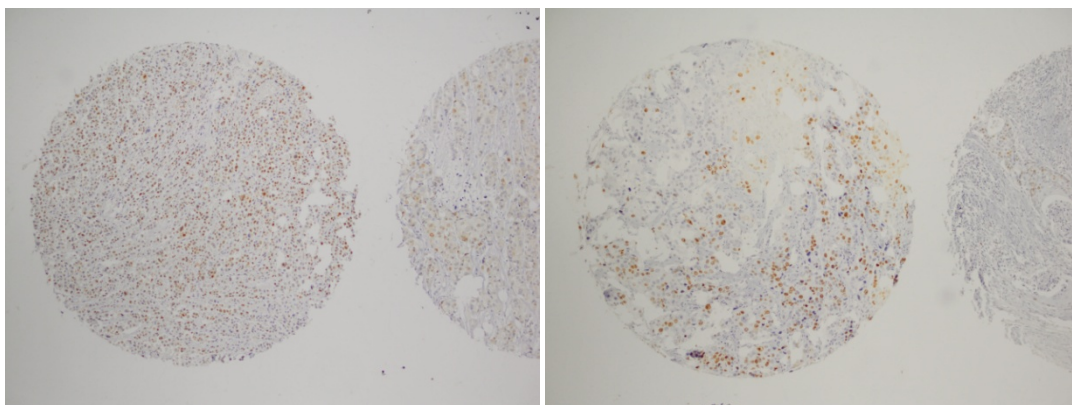


Figura 7 - Área referente ao tecido a ser analisado em uma lâmina de TMA. (Aumento de 100x)

Para as análises estatísticas, foi considerado período de seguimento, o tempo contido entre a data da cirurgia e a data do último contato com a paciente. Recorrência local ou à distância e foram considerados como evento para o cálculo da sobrevida livre de doença. As pacientes foram então divididas em dois grupos separados pelo IP-CDC usando os pontos de corte de 10%, 14% e 20% e tiveram as curvas de sobrevida preparadas pelo método de Kaplan-Meier, e suas diferenças mensuradas pelo método de Log-rank, utilizando o programa Graph Prism 5.0a.

Todas as colorações foram avaliadas nos cortes histológicos das lâminas disponíveis nos arquivos e selecionamos os blocos correspondentes a peça mamária, que continham a maior representação tumoral possível para que realizássemos imuno-histoquímica de forma automatizada no equipamento Beenchmark-Ventana (Protocolo, vide Anexo 2) pelo anticorpo de clone 30-9 revelado por polímero biotinilado e revelado por diaminobenzidina.

5 RESULTADOS

5.1 COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO KI67 ENTRE DIFERENTES MÉTODOS E OBSERVADORES EM ESPÉCIME DE BIÓPSIA POR AGULHA GROSSA

Dos 100 casos selecionados inicialmente, 99 casos foram validados e 1 caso foi excluído por não se tratar de carcinoma in situ com área de micro invasão. As características de cada caso estão expressas no Anexo 1

A Correlação de Pearson para a quantificação do Ki67 entre os diferentes métodos/indivíduos (Tabela 1 e Figura 8) foi de 0,95 entre IP-PT1 e IP-PRO; 0,89 entre IP-CDC e IP-PRO; 0,86 entre IP-DIG e IP-PRO; 0,89 entre IP-CDC e IP-DIG; 0,88 entre o IP-PT1 e IP-DIG; e 0,93 entre IP-PT1 e IP-CDC; 0,82 entre IP-PT2 e IP-DIG; 0,86 entre IP-PT2 e IP-PT1; 0,87 entre IP-PT2 e IP-CDC; 0,78 entre IP-PT2 e IP-PRO com significância estatística $p < 0,0001$ em todas as comparações.

Tabela 1 - Tabela de Correlação de Pearson do índice de proliferação do Ki67 entre as quantificações em *core biopsy* dos diferentes observadores e métodos utilizados. Todas as comparações apresentaram significância estatística ($p < 0,0001$).

	IP-PRO	IP-PT1	IP-PT2	IP-CDC
IP-PT1	0,95	-	-	-
IP-PT2	0,78	0,86	-	-
IP-CDC	0,89	0,93	0,87	-
IP-DIG	0,86	0,88	0,82	0,89

IP-PRO: Índice Proliferativo segundo o Prontuário do Paciente; IP-PT1: Índice Proliferativo segundo o Patologista 1; IP-PT2: Índice Proliferativo segundo o Patologista 2; IP-CDC: Índice Proliferativo segundo a Contagem Diferencial de Células; IP-DIG: Índice Proliferativo segundo a Contagem Digital

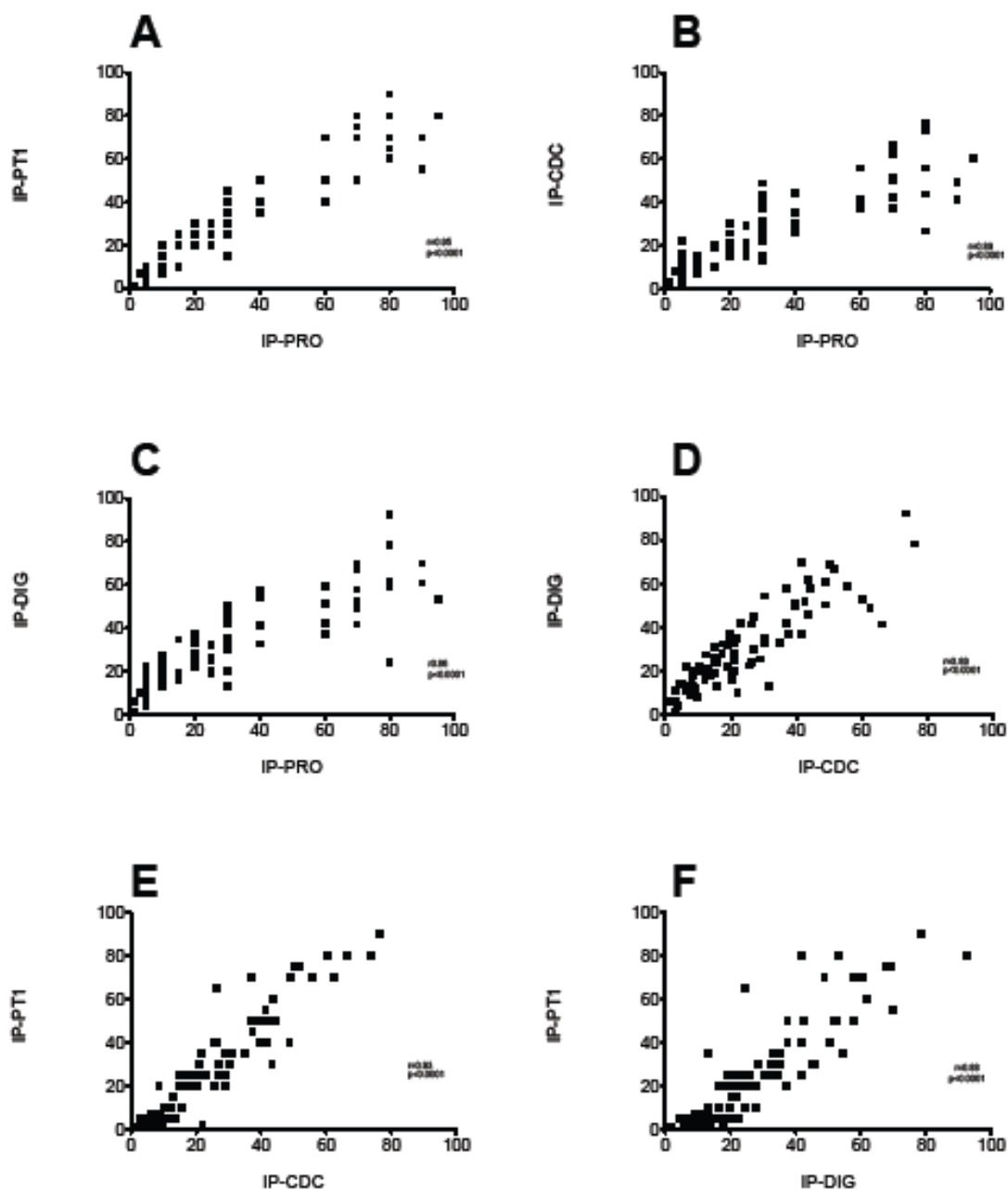
Considerando o *ponto de corte* de 14% para definir categorias IP-Ki67 baixo e IP-Ki67 alto, a discrepância entre as análises foi de 4,3% entre IP-PT1 e IP-PRO; 5,44% entre IP-CDC e IP-PRO; 15,91% entre IP-DIG e IP-PRO; 16,30% entre IP-DIG e IP-CDC; 13,64% entre IP-DIG e IP-PT1; 5,43% entre IP-PT1 e IP-CDC; 12,9% entre IP-PT2 e IP-PRO; 11,1% entre IP-PT2 e IP-PT1; 10,9% entre IP-CDC e IP-PT2; e 17,5% entre IP-DIG e IP-PT2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Tabela representando a quantificação da discrepância da do Ki67 entre os diferentes métodos analisados para obtenção do índice proliferativo do Ki67 considerando *ponto de corte* de 14% para as categorias IP-Ki67 baixo e IP-Ki67 alto.

	IP-PRO	IP-PT1	IP-PT2	IP-CDC
IP-PRO	-	-	-	-
IP-PT1	4,3%	-	-	-
IP-PT2	12, 9%	11, 1%	-	-
IP-CDC	5,44%	5,43%	10, 9%	-
IP-DIG	15,91%	13,64%	17, 5%	16,30%

IP-PRO: Índice Proliferativo segundo o Prontuário do Paciente; IP-PT1: Índice Proliferativo segundo o Patologista 1; IP-PT2: Índice Proliferativo segundo o Patologista 2; IP-CDC: Índice Proliferativo segundo a Contagem Diferencial de Células; IP-DIG: Índice Proliferativo segundo a Contagem Digital

Correlação Percentagem Ki-67
Biópsia por Agulha Grossa



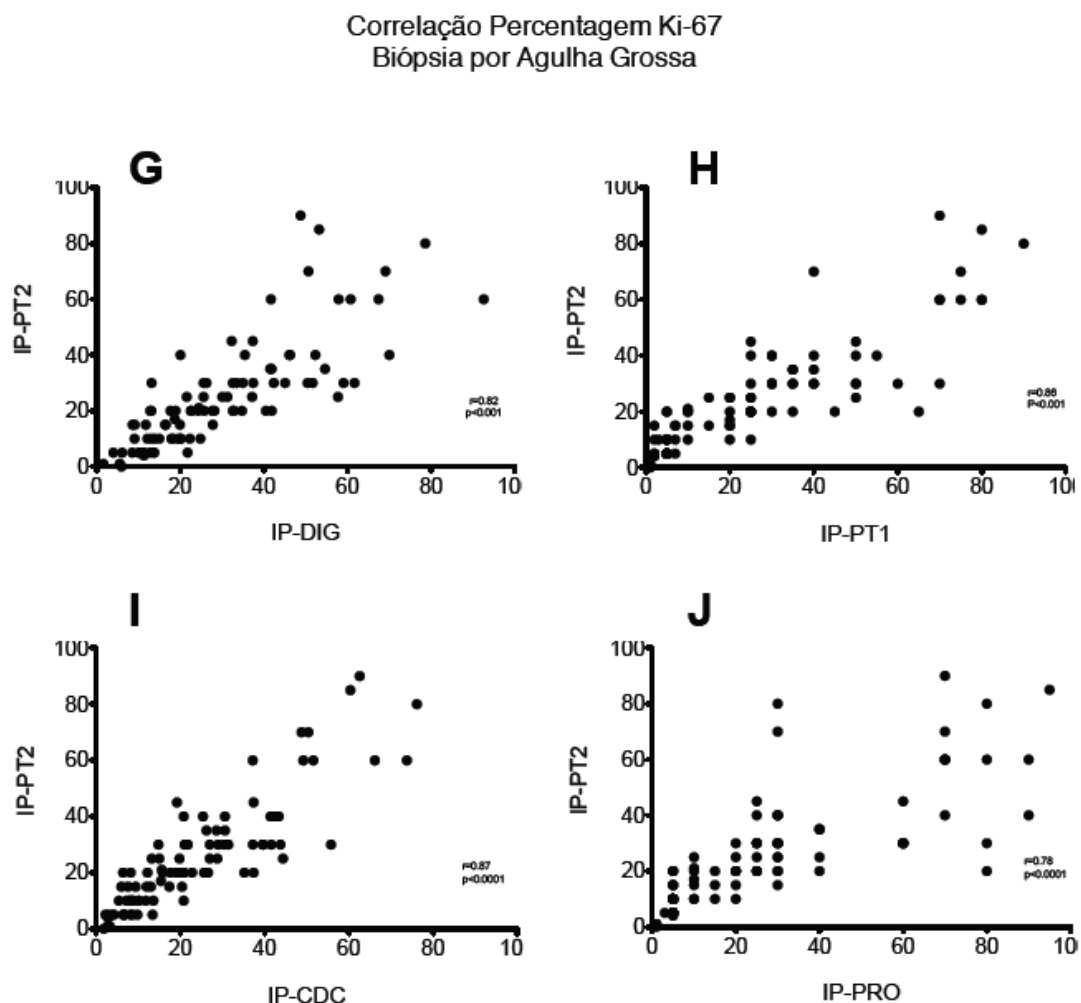


Figura 8 - Análise da Correlação da Percentagem do Ki67 na *Core Biopsy* entre os Diferentes Métodos e Observadores. (A) Correlação entre IP-PT1 e IP-PRO ($r=0,95$). (B) Correlação entre IP-CDC e IP-PRO ($r=0,89$). (C) Correlação entre IP-DIG e IP-PRO ($r=0,86$). (D) Correlação entre IP-DIG e IP-CDC ($r=0,89$). (E) Correlação entre IP-PT1 e IP-CDC ($r=0,93$). (F) Correlação entre IP-PT1 e IP-DIG ($r=0,88$). (G) Correlação entre IP-PT2 e IP-DIG ($r=0,82$). (H) Correlação entre IP-PT2 e IP-PT1 ($r=0,86$). (I) Correlação entre IP-PT2 e IP-CDC ($r=0,87$). (J) Correlação entre IP-PT2 e IP-PRO ($r=0,78$). Todos com valor de $p<0,0001$. IP-PRO: Índice Proliferativo segundo o Prontuário do Paciente; IP-PT1: Índice Proliferativo segundo o Patologista 1; IP-PT2: Índice Proliferativo segundo o Patologista 2; IP-CDC: Índice Proliferativo segundo a Contagem Diferencial de Células; IP-DIG: Índice Proliferativo segundo a Contagem Digital

Os índices Kappa das comparações dois a dois com *ponto de corte* de 14% estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Índices de concordância Kappa da quantificação do IP-KI67 entre as análises dos diferentes métodos e observadores considerando o *ponto de corte* de 14% para definir o IP-KI67 baixo e o IP-KI67 alto.

	N	Kappa	IC 95%
IP-PRO vs IP-PT1	94	0,865	0,760 – 0,969
IP-PT1 vs IP-CDC	92	0,862	0,755 – 0,969
IP-PT1 vs IP-DIG	85	0,675	0,514 – 0,836
IP-CDC vs IP-DIG	85	0,621	0,450 – 0,792
IP-CDC vs IP-PRO	93	0,886	0,789 – 0,983
IP-PRO vs IP-DIG	86	0,655	0,492 – 0,817
IP-PT2 vs IP-PT1	90	0,729	0,582 - 0,876
IP-PT2 vs IP-CDC	90	0,752	0,610 - 0,894
IP-PT2 vs IP-PRO	93	0,716	0,570 - 0,863
IP-PT2 vs IP-DIG	91	0,528	0,326 - 0,729

IP-PRO: Índice Proliferativo segundo o Prontuário do Paciente; IP-PT1: Índice Proliferativo segundo o Patologista 1; IP-PT2: Índice Proliferativo segundo o Patologista 2; IP-CDC: Índice Proliferativo segundo a Contagem Diferencial de Células; IP-DIG: Índice Proliferativo segundo a Contagem Digital

Os índices kappa ponderado das comparações 2x3 com categorias do IP-KI67 definidos como baixo <10%, intermediário entre 10-20% e alto >20% estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Índices Kappa ponderado referentes a quantificação do IP-KI67 pelos diferentes métodos e observadores as categorias IP-KI67 baixo <10%, intermediário entre 10-20% e alto >20%.

	N	Kappa Ponderado	IC 95%
IP-PT1 vs IP-PRO	94	0,857	0,672 – 0,891
IP-PT1 vs IP-CDC	92	0,818	0,596 – 0,831
IP-PT1 vs IP-DIG	85	0,515	0,262 – 0,507
IP-CDC vs IP-DIG	85	0,525	0,240 – 0,523
IP-CDC vs IP-PRO	93	0,763	0,509 – 0,759
IP-PRO vs IP-DIG	86	0,462	0,201 – 0,444
IP-PT2 vs IP-PT1	90	0,697	0,444 - 0,708
IP-PT2 vs IP-CDC	90	0,708	0,443 - 0,719
IP-PT2 vs IP-PRO	93	0,720	0,481 - 0,734
IP-PT2 vs IP-DIG	91	0,495	0,247 - 0,515

IP-PRO: Índice Proliferativo segundo o Prontuário do Paciente; IP-PT1: Índice Proliferativo segundo o Patologista 1; IP-PT2: Índice Proliferativo segundo o Patologista 2; IP-CDC: Índice Proliferativo segundo a Contagem Diferencial de Células; IP-DIG: Índice Proliferativo segundo a Contagem Digital

a. Comparação do Índice Proliferativo (Ki67) obtido em espécimes pareados de biópsia por agulha grossa e peça cirúrgica

A correlação de Pearson também foi realizada entre a *core biopsy* e a peça cirúrgica nos casos utilizando o método de contagem diferencial de células por único observador. Obtivemos um valor de $r = 0,86$; IC 95% entre 0,79 e 0,91 e $p < 0,0001$ (Figura 9).

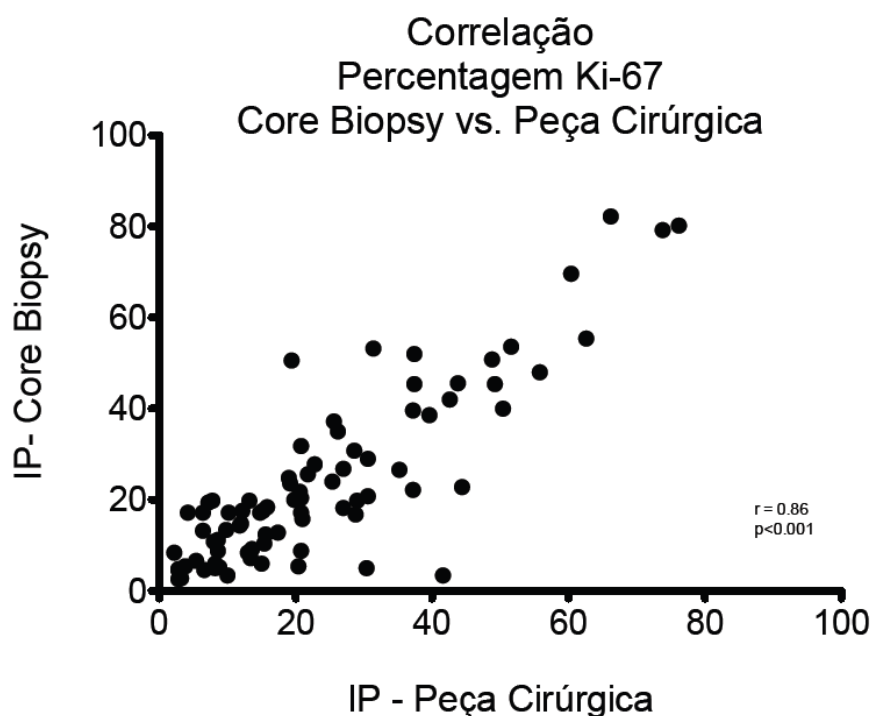


Figura 9 - Gráfico referente a correlação de Pearson do IP-Ki67 entre *Core Biopsy* e Peça Cirúrgica de acordo com a contagem diferencial de células. $n = 81$. $r = 0,86$ ($p < 0,0001$).

b. Análise retrospectiva do IP-Ki67 nos casos de carcinoma mamário invasor quanto a associação com variáveis clínico-patológicas e sobrevida livre de doença

Entre os casos de carcinoma mamário invasor diagnosticados entre 1980 e 2001, dos 1.200 casos incluídos no TMA, muitos já não estavam representados nos níveis avaliados e 576 casos mostravam-se adequados para **análise** do Ki67 (Tabela 5). Desses casos, 294 casos possuíam Ki67 $\leq 10\%$; 183 casos com Ki67 entre 11% e 20%; 145 casos com Ki67 entre 21% e 50% e 54 casos com Ki67 $> 50\%$.

Tabela 5 - Características clínico patológicas dos 576 casos de carcinoma mamário invasor

Variáveis	Categoria	Total
ESTADIO	1	38 (7)
	2	225 (39)
	3	271 (47)
	4	42 (7)
SBR	1	86 (15)
	2	346 (60)
	3	144 (25)
T	1	38 (7)
	2	225 (39)
	3	269 (47)
	4	44 (8)
N	0	183 (32)
	1	176 (31)
	2	132 (23)
	3	83 (14)
ER	0	147 (26)
	1	429 (74)
HER2	0	340 (60)
	1	98 (17)
	2	63 (11)
	3	67 (12)

A contagem mitótica foi realizada pelo patologista na *core biopsy* através da contagem diferencial de células por único patologista, com n=93, obtivemos um valor de $r = 0,60$; IC 95% entre 0,4478 e 0,7140; com $p < 0,0001$.

A comparação do IP-Ki67 médio entre as categorias do tamanho tumoral (cm) pode ser observada na Tabela 5. Não houve diferença significativa do Ki67 médio nas diferentes categorias de tamanho tumoral ($p=05036$).

Tabela 6 - Comparação entre o IP-KI67 médio (segundo avaliação da contagem diferencial de células) nas diferentes categorias do Tamanho Tumoral (cm).

	< 1cm	1-2 cm	2-5 cm	>5cm
Média IP-KI67	16,9%	16,5%	20,6%	21,2%

A comparação da média do IP-KI67 entre as categorias da graduação histológica SBR pode ser observada na tabela 6. Não houve diferença significativa do Ki67 médio nas diferentes categorias da graduação histológica ($p=0.1096$).

Tabela 7 - Comparação do IP-KI67 médio (segundo avaliação da contagem diferencial de células) com as categorias da graduação histológica (Sistema Nottingham/ SBR modificado)

	SBR I	SBR II	SBR III
Média IP-KI67	11,7%	17,2%	30,6%

A comparação do IP-KI-67 médio com as diferentes categorias do índice mitótico pode ser observada na Tabela 7. Não houve diferença significativa do Ki67 médio nas diferentes categorias do índice mitótico ($p=0.2005$).

Tabela 8 - Tabela de comparação da Média do IP-KI67 segundo avaliação da contagem diferencial de células com o índice mitótico

	Score 1	Score 2	Score 3
Média IP-KI67	22,7%	22,1%	23,2%

As curvas de sobrevida livre de doença em função do índice do Ki67 revelam não haver diferença entre as categorias <10%, 10-20% e >20% ($p=0.881$; Log-Rank test) (Figura 10). Dos 576 casos, 32 casos possuíam estadio I; 138 casos com estadio IIA; 129 casos com estadio IIB; 265 casos com estadio III e 12 casos com estadio IV.

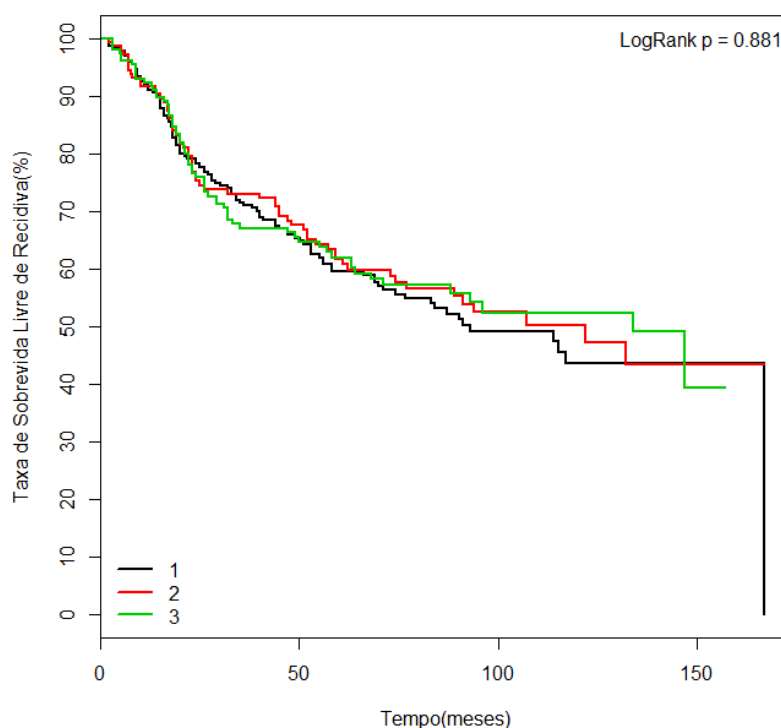


Figura 10 – Gráfico da sobrevida livre de doença e as categorias do índice proliferativo do Ki67 considerando um *ponto de corte* de <10%, 10-20% e >20%. n= 576 (P=0.881). Log-Rank Test. 1= <10%; 2= 10-20%; 3=>20%

Na Figura 11, podemos observar a análise realizada de sobrevida livre de doença em pacientes com Ki67 <10% em função do estadiamento patológico. Nesta análise obtivemos um n= 255, onde 89 casos foram classificados como estadio I ou IIA; 52 casos foram classificados como estadio IIB e 114 casos foram classificados como estadio III ou IV.

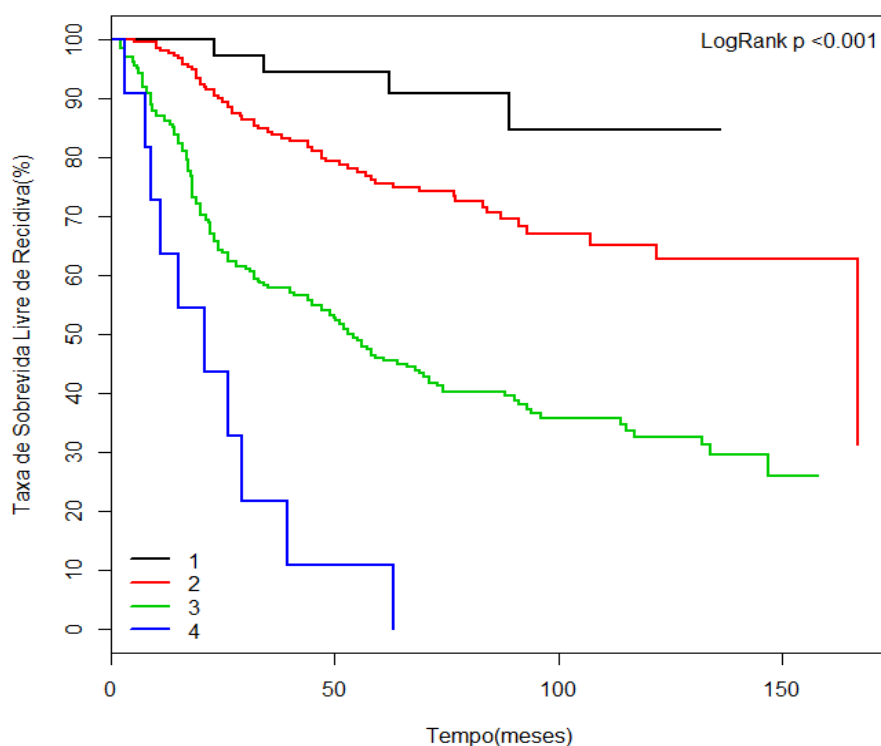


Figura 11 - Gráfico da sobrevida livre de doença em pacientes com índice proliferativo do Ki67 <10% considerando os estadios I, II, III e IV . n= 255 (P<0.001).

Na Figura 12 fizemos a comparação das sobrevidas livre de recidiva entre as categorias do estadiamento linfonodal.

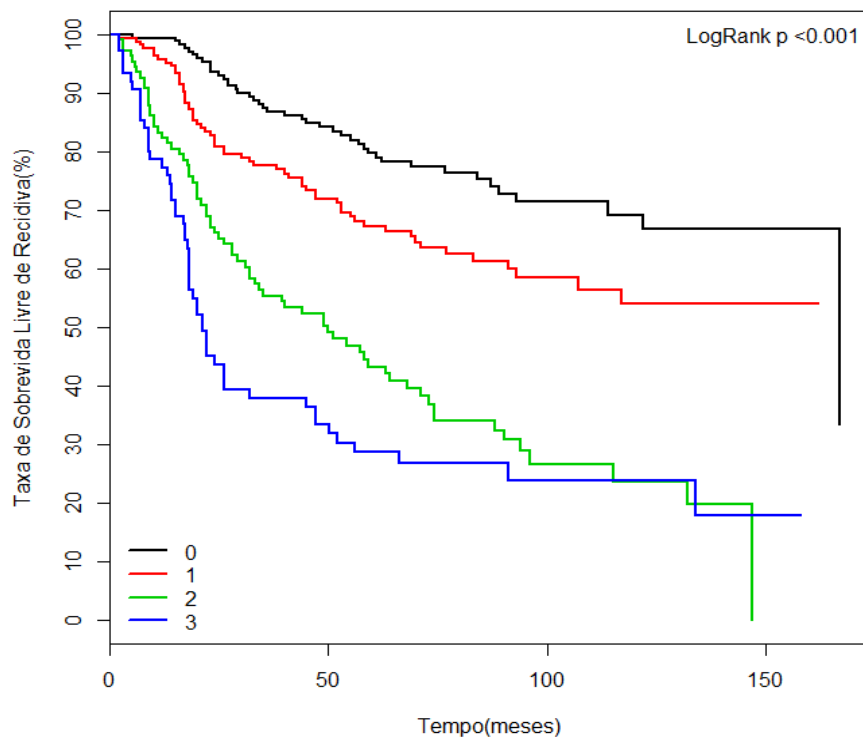


Figura 12 - Gráfico mostrando a comparação das curvas de sobrevida livre de doença entre as categorias do estadiamento linfonodal. n= 574 ($p < 0.001$). Comprometimento Linfonodal (N): 0= Ausência de comprometimento linfonodal / 1= Comprometimento Linfonodal (Até 3 linfonodos) / 2= Comprometimento Linfonodal (4 a 10 linfonodos) / 3= Comprometimento linfonodal (>10 linfonodos).

Na Figura 13 podemos observar a comparação da sobrevida livre de recidiva com as categorias da graduação histológica seguindo o sistema de Nottingham (SBR modificado).

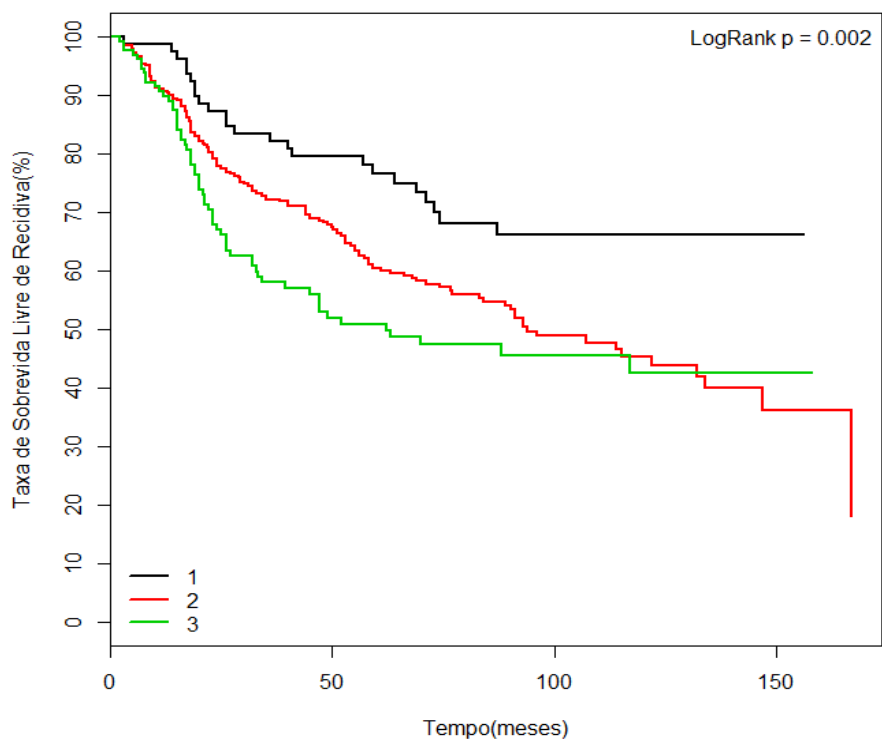


Figura 13 - Gráfico mostrando a comparação entre as curvas de sobrevida livre de doença e a graduação histológica. n= 576 ($p>0.002$). 1= Baixo Grau / 2= Grau Intermediário / 3= Alto Grau.

Na Figura 14 observamos a comparação existente entre a sobrevida livre de recidiva das pacientes com carcinoma mamário invasor e o tamanho tumoral.

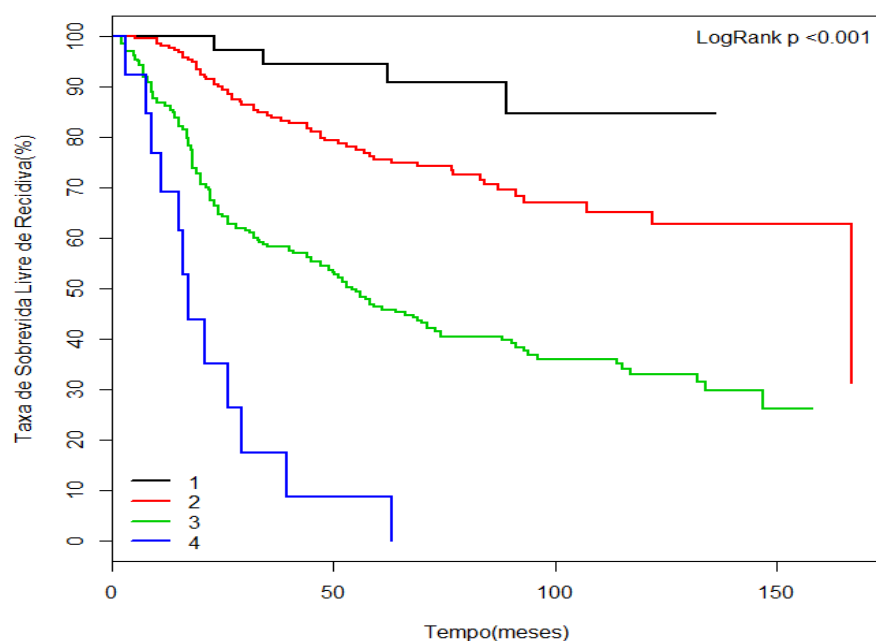


Figura 14 - Gráfico mostrando a comparação entre sobrevida livre de doença e as categorias do tamanho do tumor. $n = 576$ ($p < 0.001$). 1= < 20 mm / 2= 20 – 50 mm / 3= > 50 mm / 4= Invasão de pele/ parede torácica.

Na Figura 15 correlacionamos a sobrevida livre de recidiva das pacientes com a positividade e negatividade da marcação imunoistoquímica do RE.

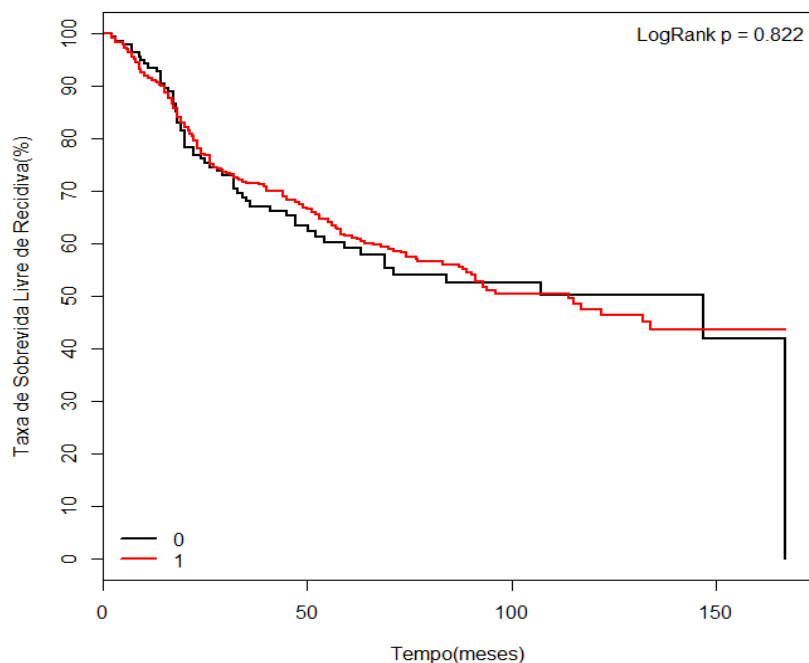


Figura 15 - Comparação das curvas de sobrevida livre de doença em função da marcação imuno-histoquímica do Receptor de Estrógeno. n= 576 ($p=0,822$; Log-Rank test). 0= negativo / 1= positivo

Na Figura 16, observamos as curvas de sobrevida livre de doença em pacientes Ki67 <10% nos casos com estadio I ou IIA com axila negativa em função do uso da quimioterapia. Dos 99 casos analisados, 75 casos fizeram radioterapia e 47 casos fizeram hormonioterapia. Não foi observada diferença significativa na sobrevida com o uso de quimioterapia nesta população.

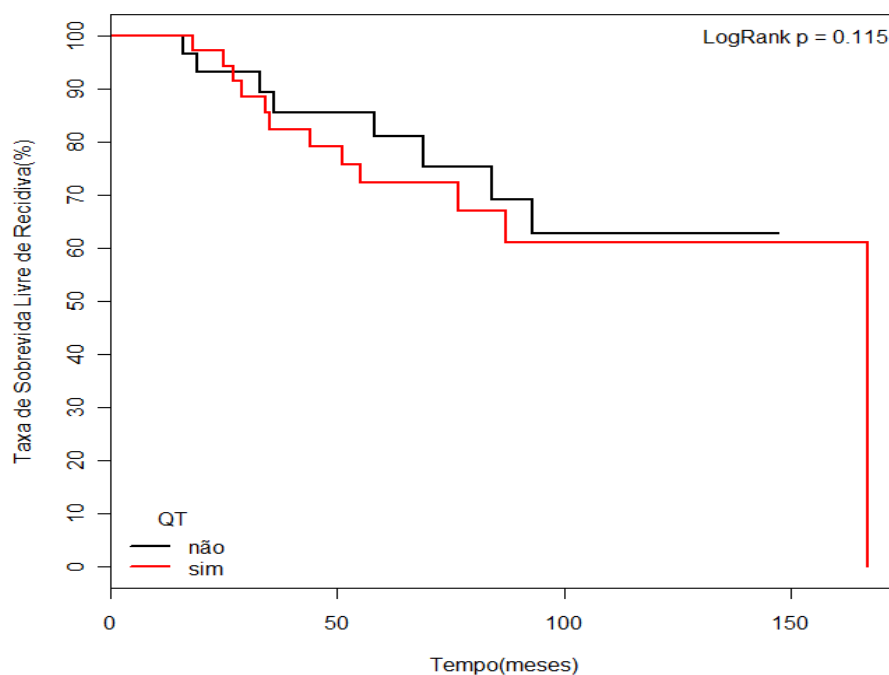


Figura 16 - Gráfico da sobrevida livre de doença em pacientes com índice proliferativo Ki67 <10% em estágio precoce em função do uso da quimioterapia. n=68 (p= 0.115).

Tabela 9 - Sobrevida livre de doença em pacientes com índice proliferativo Ki67 <10% em estágio precoce em função do uso da quimioterapia em 5 e 10 anos.

		n	SLR(5anos)	SLR(10anos)	Mediana
QT	Não	33	81%	63%	NA
	Sim	35	72%	61%	167.2

Na Figura 17 fizemos a comparação da sobrevida livre de recidiva entre as categorias de marcação imuno-histoquímica do HER2.

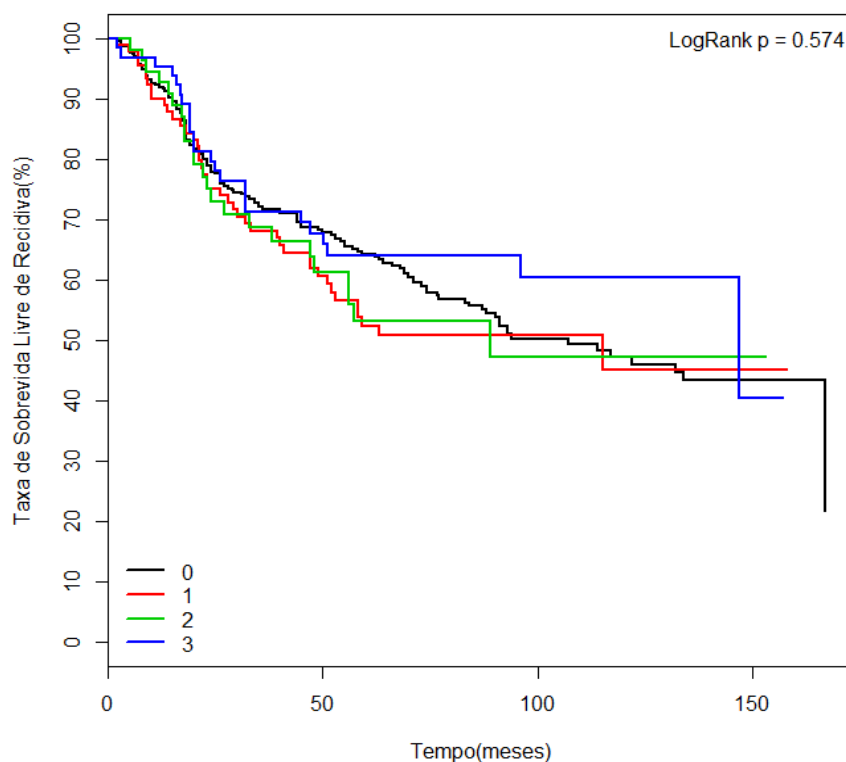


Figura 17 - Gráfico mostrando a comparação entre as curvas de sobrevida livre de doença e as categorias da marcação imuno-histoquímica do HER2. n= 568 (p= 0,574). 0= sem marcação / 1= marcação incompleta / 2= marcação intermediária / 3= marcação forte na membrana em <10% das células tumorais

Na Tabela 10 podemos observar uma análise multivariada associada a marcação do Ki67.

Tabela 10 - Tabela de comparação entre variáveis relacionadas ao câncer de mama como estadio, graduação histológica, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.

Variáveis	Categoria	Ki67			Total	p
		1	2	3		
ESTADIO	1	15 (6)	17 (11)	6 (4)	38 (7)	0.1652
	2	101 (40)	53 (35)	71 (42)	225 (39)	
	3	116 (46)	74 (48)	81 (47)	271 (47)	
	4	20 (8)	9 (6)	13 (8)	42 (7)	
SBR	1	34 (13)	25 (16)	27 (16)	86 (15)	0.4268
	2	154 (61)	97 (63)	95 (56)	346 (60)	
	3	64 (25)	31 (20)	49 (29)	144 (25)	
T	1	15 (6)	17 (11)	6 (4)	38 (7)	0.1821
	2	101 (40)	53 (35)	71 (42)	225 (39)	
	3	116 (46)	73 (48)	80 (47)	269 (47)	
	4	20 (8)	10 (7)	14 (8)	44 (8)	
N	0	79 (32)	52 (34)	52 (30)	183 (32)	0.8552
	1	80 (32)	46 (30)	50 (29)	176 (31)	
	2	60 (24)	31 (20)	41 (24)	132 (23)	
	3	31 (12)	24 (16)	28 (16)	83 (14)	
ER	0	70 (28)	34 (22)	43 (25)	147 (26)	0.4575
	1	182 (72)	119 (78)	128 (75)	429 (74)	
HER2	0	153 (62)	84 (56)	103 (61)	340 (60)	0.1162
	1	40 (16)	26 (17)	32 (19)	98 (17)	
	2	33 (13)	20 (13)	10 (6)	63 (11)	
	3	22 (9)	20 (13)	25 (15)	67 (12)	

Tamanho (T): 1= <20mm / 2= 20 – 50mm / 3= >50mm / 4= Invasão de pele/ parede torácica.
 Comprometimento Linfonodal (N): 0= Ausência de comprometimento linfonodal / 1= Comprometimento Linfonodal (até 3 linfonodos) / 2= Comprometimento Linfonodal (4 a 10 linfonodos) / 3= Comprometimento linfonodal (acima de 10 linfonodos); ER: 1= Negativo / 2= Positivo; HER2: 0= Negativo / 1= Marcação Fraca / 2= Marcação Moderada / 3= Marcação Forte e completa na membrana de pelo menos 10% das células tumorais

Na Tabela 11 podemos observar uma análise de sobrevida univariada em 5 e 10 anos.

Tabela 11 - Análise univariada de sobrevida livre de recidiva em 5 e 10 anos de acordo com o estadio, graduação SBR, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.

		n	SLR-5 anos	SLR-10 anos
ESTADIO	1	38	94%	85%
	2	225	76%	65%
	3	266	46%	33%
	4	11	11%	0%
SBR	1	81	77%	66%
	2	328	61%	45%
	3	131	51%	43%
T	1	38	94%	85%
	2	225	76%	65%
	3	264	46%	33%
	4	13	9%	0%
N	0	181	80%	69%
	1	172	67%	54%
	2	111	43%	24%
	3	75	29%	24%
ER	0	138	59%	50%
	1	402	61%	48%
HER2	0	317	64%	47%
	1	94	52%	45%
	2	56	53%	47%
	3	65	64%	61%
Ki67	1	233	60%	44%
	2	146	62%	50%
	3	161	62%	52%

Tamanho (T): 1= <20mm / 2= 20 – 50mm / 3= >50mm / 4= Invasão de pele/ parede torácica;
 Comprometimento Linfonodal (N): 0= Ausência de comprometimento linfonodal / 1= Comprometimento Linfonodal (até 3 linfonodos) / 2= Comprometimento Linfonodal (de 4 a 10 lindonodos) / 3= Comprometimento linfonodal (acima de 10 linfonodos); ER: 0= Negativo / 1= Positivo; HER2: 0= Negativo / 1= Marcação Fraca / 2= Marcação Moderada / 3= Marcação Forte.

Na tabela 12 temos a análise do risco relativo e respectivos intervalos de confiança de acordo com as variáveis de interesse.

Tabela 12 - Risco Relativo e seus respectivos intervalos de confiança de acordo com estadi, graduação SBR, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, ER e HER2 e o Ki67.

Variável	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
ESTADI O	1	38	1	1	1	6.24E-21
	2	225	2.85	1.03	7.84	
	3	266	8.15	3.02	22.00	
	4	11	25.73	8.03	82.42	
SBR	1	81	1	1	1	0.0024
	2	328	1.80	1.17	2.77	
	3	131	2.28	1.42	3.65	
T	1	38	1	1	1	1.37E-22
	2	225	2.85	1.03	7.84	
	3	264	8.08	2.99	21.80	
	4	13	27.67	8.87	86.27	
N	0	181	1	1	1	1.63E-23
	1	172	1.71	1.15	2.54	
	2	111	3.99	2.72	5.84	
	3	75	5.71	3.81	8.56	
ER	0	138	1	1	1	0.8215
	1	402	0.97	0.72	1.30	
HER2	0	317	1	1	1	0.5744
	1	94	1.15	0.81	1.62	
	2	56	1.11	0.71	1.73	
	3	65	0.82	0.53	1.26	
Ki67	1	233	1	1	1	0.8811
	2	146	0.93	0.68	1.27	
	3	161	0.94	0.69	1.29	

Tamanho (T): 1= <20mm / 2= 20 – 50mm / 3= >50mm / 4= Invasão de pele/ parede torácica; Comprometimento Linfonodal (N): 0= Ausência de comprometimento linfonodal / 1= Comprometimento Linfonodal (até 3 linfonodos) / 2= Comprometimento Linfonodal (de 4 a 10 linfonodos) / 3= Comprometimento linfonodal (acima de 10 linfonodos); ER: 0= Negativo / 1= Positivo; HER2: 0= Negativo / 1= Marcação Fraca / 2= Marcação Moderada / 3= Marcação Forte; Ki67: 1= <10% / 2= 10-20% / 3= >20%.

Na Tabela 13 temos a análise multivariada do estadio e da graduação histológica.

Tabela 13 - Análise multivariada considerando o estadio da doença e a graduação histológica.

		N	RR	IC(95%)		p
ESTADIOS						
	1	38	1			
	2	225	2.67	0.97	7.36	0.058
	3	266	7.62	2.82	20.61	<0.001
	4	11	21.81	6.70	70.98	<0.001
SBR						
	1	81	1.00			
	2	328	1.72	1.11	2.65	0.015
	3	131	1.83	1.13	2.95	0.013

Na tabela 14 observamos uma segunda análise multivariada, nesse instante considerando o tamanho, o comprometimento linfonodal e a graduação histológica.

Tabela 14 - Análise multivariada considerando o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e a graduação histológica.

	n		RR	IC(95%)		p
T						
	1	38	1			
	2	225	2.41	0.86	6.78	0.096
	3	263	3.97	1.36	11.60	0.012
	4	13	12.12	3.53	41.61	<0.001
N						
	0	181	1			
	1	172	1.31	0.86	1.99	0.205
	2	111	2.09	1.26	3.46	0.004
	3	75	3.16	1.88	5.32	<0.001
SBR						
	1	81	1			
	2	328	1.65	1.07	2.54	0.024
	3	130	1.60	0.99	2.58	0.057

Tamanho (T): 1= <20mm / 2= 20 – 50mm / 3= >50mm / 4= 4= Invasão de pele/ parede torácica; Comprometimento Linfonodal (N): 0= Ausência de comprometimento linfonodal / 1= Comprometimento Linfonodal (até 3 linfonodos) / 2= Comprometimento Linfonodal (de 4 a 10 lindonodos) / 3= Comprometimento linfonodal (acima de 10 linfonodos)

Na correlação de percentagem do Ki67 com os RE, RP e HER2. Nas análises entre Ki67 e RE, obtivemos um $r = -0,54$ e $p < 0,0001$; entre Ki67 e RP, obtivemos um $r = -0,28$ e $p = 0,0101$.

c. Análise das taxas de resposta patológica à QT neoadjuvante segundo o índice proliferativo e expressão de marcadores preditivos clássicos

Na Tabela 15, podemos observar as taxas de RPC (Resposta Patológica Completa) por imunofenótipo de 236 pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante.

Tabela 15 - Taxas de percentagem da resposta patológica completa por Imunofenótipo em Pacientes submetidos à Quimioterapia Neoadjuvante

Imunofenótipo	RPC	Total	%
Luminal A	2	36	5,56
Luminal B (Ki67 alto)	5	83	6,02
Luminal B (Her)	11	27	40,74
HER2	12	26	46,15
Triplo Negativo	27	64	42,19
Total	57	236	24,15

Luminal A= ER/PR positivos, Her2 negativo, Ki67<14%; Luminal B= ER/PR positivos; Her2 negativo, Ki67>14%; Luminal B (Her)= ER/PR positivos; Her2positivo; Her= ER/PR negativos, Her2 positivo; Triplo Negativo= ER/PR/Her2 negativos.

Na Tabela 16 e Figura 18, podemos comparar a frequência das categorias de resposta patológica em pacientes submetidos a QT neoadjuvante. Nesta análise, com n= 224 pacientes, 37 casos possuíam Ki67 ≤10%, 14 casos possuíam Ki67 entre 10% e 20% e 173 casos possuíam Ki67 >20%.

Tabela 16 - Correlação entre IP-Ki67 e pacientes tratados com Quimioterapia Neoadjuvante de acordo com a Resposta Patológica (%).

Ki67	RCB0	RCB I	RCB II	RCB III	Total
≤10%	16,3	8,1	43,2	32,4	37
10%-20%	21,4	28,6	36	14	14
>20%	26,6	12,2	30,6	30,6	173

Correlação Quimioterapia Neoadjuvante VS Ki67

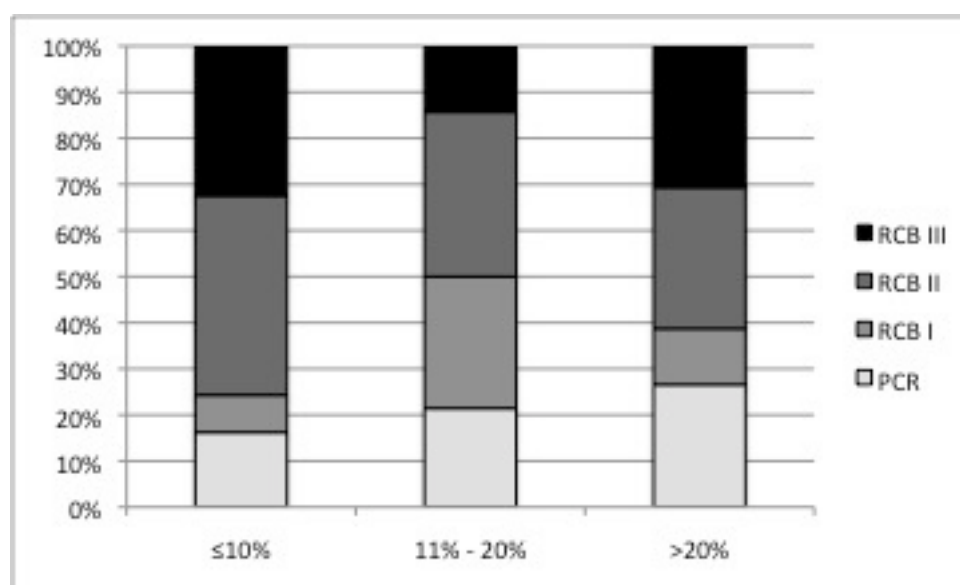


Figura 18 - Associação entre o IP-Ki67 e a resposta das pacientes com carcinoma mamário à quimioterapia neoadjuvante. n=224.

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea nos seus aspectos clínicos, anatomopatológicos, moleculares e também quanto a resposta aos tratamentos complementares. Esta heterogeneidade desafia a escolha do melhor tratamento para cada paciente. O tratamento loco-regional feito com cirurgia radical (mastectomia) ou cirurgia conservadora complementada pela radioterapia, com ou sem esvaziamento axilar pode ser seguido de tratamentos sistêmicos como a hormonioterapia, terapia anti-HER2, quimioterapia. A expressão de marcadores hormonais é um bom marcador preditivo de resposta a hormonioterapia, enquanto a hiperexpressão ou amplificação do gene *HER2* é um bom marcador preditivo de resposta a terapia anti-HER2. Identificar quais as pacientes são mais beneficiadas pela escolha da quimioterapia é hoje o principal desafio no tratamento deste tumor. Existem ferramentas auxiliares nesta decisão em subgrupos específicos, como o score obtido pelo nível de expressão gênica no teste Oncotype DX[®] mas outros biomarcadores estão em investigação para auxiliar na decisão, entre eles o índice proliferativo avaliado pela imunomarcção Ki67. A vantagem do uso do Ki67 como ferramenta auxiliar à decisão do uso da quimioterapia se baseia na simplicidade e grande disponibilidade do método, além da quantificação *in situ* que permite considerar a heterogeneidade tumoral e excluir elementos não tumorais da quantificação.

A quantificação imunohistoquímica do índice proliferativo pelo Ki67 ainda não foi totalmente padronizada e existem questionamentos sobre o melhor método de análise (visual ou digitalizado), a sistemática de quantificação (quantas células, em quais áreas avaliar) e sobre o melhor ponto de corte (14%, 20% ou outro). A recomendação mais recente do *International Breast Cancer Working Group on Ki67* (DOWSETT et al. 2011), sugere a contagem visual em 5 áreas de 100 células cada, incluindo nelas as áreas de *hotspot*, mas não se limitando a elas, considerando positivas células com qualquer intensidade de marcação. O ponto de corte de 14% foi sugerido pelo estudo de CHEANG et al. (2009), mas sua aplicação prática é criticada pela subjetividade do ponto de corte e o Consenso de St. Gallen de 2013 sugere que pacientes sem outros critérios de alto risco para recorrência e com Ki67 abaixo 20% seriam melhores candidatas a serem poupadas da quimioterapia adjuvante. (HARBECK et al. 2013). A quantificação do Ki67 pela análise subjetiva do patologista é o método mais utilizado na rotina diagnóstica de tumores mamários mas sua reprodutibilidade é questionável e a subjetividade desfavorece seu uso. A quantificação por métodos digitais vem sendo testada quanto a sensibilidade e aplicabilidade com relação aos métodos visuais. Os estudos que compararam a quantificação do índice proliferativo pelo Ki-67 em tumores mamários entre os métodos análise automatizada e visual e obtiveram em sua maioria uma concordância maior que 85% (FASANELLA et al. 2011; KONSTI et al. 2011), ou a correlação de Spearman de 0.87 e correlação de Pearson de 0.94 (MOHAMMED et al. 2012). Uma exceção recente foi o estudo de GUDLAUGSSON et al. (2012)

que mostrou grande subjetividade e variação entre patologistas na análise visual global, com baixa correlação com a análise digital. Nosso estudo comparou dois a dois as avaliações visuais globais feita por vários patologistas (dados obtidos do prontuário), àquela feita por apenas 1 patologista especializado em patologia mamária, à contagem diferencial de células utilizando hematocítômetro e à quantificação por análise digital. Os resultados corroboram os dados já publicados pela maioria dos estudos com uma correlação de Pearson entre 0,82 a 0,88 entre os pares de métodos. A pior correlação foi entre a avaliação por diversos patologistas e a quantificação digital e a melhor correlação foi entre a estimativa visual global de um patologista especializado em patologia mamária e a quantificação digital.

Durante estas comparações, observamos que a quantificação digital detectava índices quase sempre maiores em relação a da análise visual por detectar pixels marcados com intensidade leve, imperceptíveis ao olho humano, mesmo descontadas as falhas da identificação das células devido a sobreposição nuclear, esmagamento celular e irregularidades no contorno nuclear. As desvantagens da análise digital para quantificação da proteína Ki-67 em relação à análise visual são principalmente relacionadas ao custo de aquisição do equipamento (entre US\$ 95.000 e US\$ 150.000), ao tempo estimado de análise por lâmina (aproximadamente 20 minutos comparadas a 1 minuto e 6 minutos para a análise do patologista e a contagem diferencial de células, respectivamente) e dificuldades técnicas. No nosso estudo, não foi possível realizar a quantificação de 8,6% dos casos devido à falha

operacional do equipamento no momento de escaneamento das lâminas. Por todos estes motivos de custo, logística e de não inferioridade significativa de um método em relação ao outro, a quantificação visual global pode ser aplicada na rotina desde que realizada cuidadosamente, considerando também a positividade fraca ou nucleolar exclusiva dos núcleos neoplásicos.

A biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) é um método menos invasivo e muito aceito para o diagnóstico de alterações mamárias, podendo nos casos de quimioterapia neoadjuvante ser o único espécime para direcionar o tratamento. As acurácias da *core biopsy* no diagnóstico de malignidade, na avaliação do tipo histológico, grau histológico e expressão protéica dos fatores preditivos como RE, RP e HER2 foram testadas em estudos a partir da década de 1980. Uma meta-análise recente reportou que a Core biopsy guiada por ultra-som ou por estereotaxia apresenta sensibilidade acima de 97% e especificidade de 92% e 98%, respectivamente, quanto ao diagnóstico de malignidade em relação a biópsia cirúrgica, com menos efeitos adversos (DAHABREH et al. 2014). Para a avaliação de fatores prognósticos morfológicos os autores mostraram correlações em torno de 75%, variando de 66% a 100% para o tipo histológico e 73% a 81% para o grau histológico (ANDRADE e GOBBI 2004, BURGE et al. 2006, DAVEAU et al. 2014; MOTAMEDOLSHARIATI et al. 2014). Já ao nível molecular, a concordância da core biopsy parece ser melhor do que ao nível morfológico, uma vez que os estudos mostram, com raras exceções, concordância para o status dos receptores hormonais e

HER2 superior a 95% (KANEKO et al. 2002; TAUCHER et al. 2004; BURGE et al. 2006; APPLE et al. 2009). O espécime da core biopsy é hoje considerado adequado para o diagnóstico e avaliação de fatores moleculares preditivos de resposta, e é utilizado rotineiramente para testar os receptores hormonais, HER2 e também perfis moleculares como o ONCOTYPE DX, Mamaprint e PAM 50 que auxiliarão para a decisão terapêutica.

Em relação ao Ki67, que aliás é parte importante dos scores de perfis moleculares, a literatura mais recente mostra inconsistências quanto a concordância entre as quantificações na core biopsy e na peça cirúrgica. Nosso resultado da comparação do índice proliferativo entre core biopsy e espécime cirúrgico pareado revelou uma ótima correlação ($r= 0,86$; $p<0,0001$). KNUTSVIK et al. (2014) mostraram uma concordância 65% e kappa de apenas 0.29 entre core biopsy e peça cirúrgica em relação ao ponto de corte de 14%. Já RICCI et al. (2012) encontraram índice kappa de 0.74 e OBERMANN et al. (2012) uma concordância de 81% entre categorias definidas pelo ponto de corte de 20%. Este resultado é especialmente importante para as pacientes em programação para tratamento quimioterápico neoadjuvante. Assim como no caso dos demais marcadores imunohistoquímicos considerados fatores preditivos clássicos (RE, RP e HER2), recomendamos a utilização da *core biopsy* em substituição à excisão cirúrgica para avaliação do índice proliferativo pelo Ki67.

Nosso estudo avaliou também o valor prognóstico do índice proliferativo avalido pela imunomarcção do Ki67 em uma coorte

retrospectiva de 576 casos com seguimento mediano de 500 meses. Nesta coorte, o Ki67 não apresentou diferença na sobrevida livre de doença entre os grupos <10%, 10-20% e maior que 20% ($p=0.881$) Outras variáveis consideradas fatores prognósticos clássicos como o estágio clínico, o tamanho tumoral, o status linfonodal e o grau histológico mostraram valor prognóstico independente nesta coorte. O Ki67 esteve associado com o grau histológico de SBR modificado e exibiu ainda correlação inversa com a expressão de receptores de estrógenos e receptores de progesterona. Não observamos associação significativa entre o índice Ki67 com o tamanho tumoral. A conferência de St. Gallen 2013 considera o índice de Ki67 na decisão no cálculo do risco de recorrência da doença, entretanto, a literatura mostra dados controversos quanto ao valor prognóstico do Ki67. KNUTSVIK et al. (2014) mostraram um valor prognóstico do Ki67 usando a mediana como ponto de corte tanto nos espécimes de core biopsy como na peça cirúrgica. O valor prognóstico esteve presente nos casos de tumores ER+/HER2- mas não foi observado nos casos HER2+/ER- e triplo negativos. Além disto, a exemplo do nosso estudo, o Ki67 esteve associado a variáveis prognósticas clássicas como o grau histológico e a negatividade para receptores hormonais, e não exibiu valor prognóstico independente na análise multivariada. HONMA et al. (2013) demonstraram valor prognóstico do Ki67 nos pacientes ER+/HER2- em uso de tamoxifeno adjuvante. GUDLAUGSSON et al. (2012) mostraram um forte valor prognóstico para o índice proliferativo pelo Ki67 quando avaliado na periferia do tumor, quantificado por método digital com ponto de corte de 6,5%.

PATHMANATHAN et al. (2014) estudaram 2013 pacientes com doença restrita à mama e tratadas com cirurgia e radioterapia apenas e utilizando um ponto de corte de 10% demonstraram sobrevida câncer específica significativamente maior no grupo com Ki67 baixo (97.1 vs 77.6%). Neste estudo o valor prognóstico do Ki67 foi considerado independente em um modelo multivariado que incluiu os fatores prognósticos clássicos. KONTZOGLU et al. (2013) revisaram 78 artigos que avaliaram o valor prognóstico do Ki67 no câncer de mama e concluíram que o assunto ainda está em aberto. Em resumo, alguns estudos demonstraram valor prognóstico em análises univariadas e raros observaram valor prognóstico independente em subgrupos específicos do câncer de mama. Entretanto, o melhor ponto de corte e metodologias para este fim são discutíveis e parecem depender muito das características do grupo estudado, incluindo perfis imunofenotípicos e tratamentos aplicados.

A quimioterapia neoadjuvante está indicada a pacientes com carcinoma de mama localmente avançado com taxa de resposta patológica completa de 24% (VIEIRA et al. 2011). Atualmente, mesmo tumores em estágio precoce estão sendo considerados para receber quimioterapia neoadjuvante, com o benefício de observamos *in vivo* o comportamento da neoplasia frente ao tratamento. Sabemos que os diferentes tumores da mama respondem de forma heterogênea a aplicação de quimioterapia e que pacientes com resposta patológica completa (pCR) exibem sobrevida global superior aos pacientes com doença residual (CORTAZAR et al. 2014). Buscamos identificar fatores preditivos de resposta a quimioterapia que nos

permitam prever a resposta patológica completa e assim identificar quais pacientes seriam mais beneficiadas por este tratamento e potenciais candidatas a evitar a cirurgia e quais delas devem iniciar o tratamento por outras modalidades terapêuticas. LIPS e colaboradores consideraram que a predição de resposta depende da avaliação de múltiplas variáveis como a graduação histológica, a positividade do RE, RP e Her2. SUETA et al. (2014) demonstraram que pacientes ER+ com e sem resposta patológica completa exibem índices Ki67 diferentes (média 43% versus 29%, respectivamente). Resultados similares foram descritos por FASCHING et al. (2011) onde o Ki67 médio dos casos com pCR foi de 51% comparados a 27% dos casos sem PCR. Além disto o Ki67 acima de 13% foi considerado uma variável independente na predição de pCR (risco relativo 3.5, IC95% 1.4-10.1). DENKERT et al. (2013) demonstraram o valor preditivo de pCR para o Ki67, com taxas de 4.2%, 12.9% e 29% para os casos com Ki67 <15%, 15-35% e >35%, respectivamente. Nosso estudo avaliou 236 pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante e mostrou taxas de resposta patológica completa ao redor de 45% para as pacientes portadoras de tumores triplo negativo e HER2+ (com ou sem receptores hormonais), mas taxas de apenas 5% para pacientes ER+/HER2-. Importante ressaltar que o índice proliferativo Ki67 acima ou abaixo de 14% não esteve associado com diferenças nas taxas de resposta patológica completa nas pacientes com tumores ER+/HER2-, sugerindo um papel de quimioresistência dos receptores hormonais, que é pelo menos em parte diminuído pela presença da hiperexpressão do Her2. JONES et al. (2010) apresentaram resultados

similares aos nossos, com menores taxas de pCR nos tumores ER+ (com possível efeito de quimioresistência) e Ki67 sem valor independente para prever pCR. DARB-ESFAHANI et al. (2009) também demonstraram melhores taxas de pCR em pacientes triplo negativos e HER2+ e as piores taxas de pCR sendo observadas nas pacientes com tumores ER+/HER2-. Entretanto, diferente do nosso estudo, o Ki67 acima de 20% foi considerado uma variável independente de predição da pCR. Por tudo isto exposto, o Ki67 ainda não pode ser considerado uma variável de predição de resposta a quimioterapia neoadjuvante, ao menos utilizando o ponto de corte mais comumente discutido na literatura. Está em aberto a discussão sobre o uso de diferentes pontos de corte a depender do status dos receptores hormonais e HER2.

Tabela 17 - Revisão da Literatura quanto às taxas de Resposta Patológica Completa à Quimioterapia neoadjuvante nos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama.

AUTOR/ANO	ER+/Her2-	ER+/Her2+	ER-/Her2+	Triplo Negativo
Sueta et al. 2014	14,3%	41,2%	81,8%	42,3%
Denkert et al. 2013	3,4% ¹ 18,2% ²	5,1% ¹ 11,8% ²	13,3% ¹	10% ¹ 22,4% ²
	18,5% ³	15,4% ³	27,1% ²	39% ³
			30,8% ³	
Fasching et al. 2011	5%	40,2% *	40,2%*	47,3%
Salim et al. 2014	0%	21,4%	36,4%	27,3%
Balmativola et al. 2014	16%	40%	58,2%	42,1
Baulies et al. 2014	38,7%	-	67,6%	45,5%
Babyskhina et al. 2014	38,1%	0%	0%	10,7%P
Bria et al. 2015		5,6%		
Nosso estudo	5,6% [#]	40,74%	46,15%	42,19%
	6,0% [*]			

RE= Receptor de Estrógeno; Her2= Receptor Epidérmico Humano * = Her2+/RE e RP +ou-;

¹ = Ki-67 <15%; ² = Ki-67 15-35%; ³ = Ki-67 >35%.

= Ki67 <14%; * = Ki67 >14%

Nosso estudo apresenta algumas limitações principalmente em relação à coorte retrospectiva utilizada para o estudo do valor prognóstico do Ki67. Apesar da casuística grande e do longo seguimento clínico, com todos os casos revistos por uma patologista especializado em patologia mamária (Dra. Monica Maria Ágata Stiepcich), as pacientes foram em sua maioria diagnosticadas nas décadas de 1980 e 1990 quando os tumores na nossa instituição se apresentavam frequentemente em estágio avançado e o tratamento era algo diferente do atual em relação ao tipo de quimioterapia e uso de terapia anti-HER2. O resultado disto pode ser visto nas curvas de sobrevida, que exibem taxas de sobrevida livre de doença sistematicamente piores do que as observadas nos dias atuais para os mesmos estágios

clínicos. Além disto, cerca da metade das pacientes RE positivos, usou Tamoxifeno pelo tempo recomendado, resultando em curvas de sobrevida livre de doença similares nos grupos RE positivo e negativo. O uso do TMA, é considerado subótimo por alguns (GUDLAUGSSON et al. 2012); de fato observamos algumas dificuldades na quantificação do Ki67 na área restrita do TMA e coloração fraca em muitas amostras o que pode ter influenciado nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

A quantificação do índice proliferativo pelo KI67 no câncer de mama:

1. Apresenta boa correlação entre a análise visual e a análise automatizada, com $r > 0,8$ em todas as comparações realizadas;
2. Está associado com o grau histológico de SBR e exibe correlação inversa com a expressão de receptores hormonais
3. Pode ser avaliado na biopsia por agulha grossa baseado na excelente correlação direta ($r = 0,86$) com a peça cirúrgica;
4. Está associado a fatores prognósticos clássicos do câncer de mama mas não apresenta valor prognóstico independente quanto a sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos.
5. Não identifica um subgrupo de pacientes com expressão de receptores hormonais mais sensível à quimioterapia neoadjuvante, pelo menos com o uso dos atuais ponto de corte sugeridos pela literatura. Novos pontos de corte específicos para cada subtipo molecular poderão ter um papel nesta predição no futuro.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Ciclo celular e morte celular programada; 983-1026.

Andrade VP, Gobbi H. Accuracy of typing and grading invasive mammary carcinomas on core needle biopsy compared with the excisional specimen. **Virchows Arch** 2004; 445:597-602.

Apple SK, Lowe AC, Rao PN, et al. Comparison of fluorescent in situ hybridization HER-2/neu results on core needle biopsy and excisional biopsy in primary breast cancer. **Mod Pathol** 2009; 22:1151-9.

Azambuja E, Cardoso F, Castro Jr G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **Br J Cancer** 2007; 96:1504-13.

Baak JP, van Diest PJ, Ariens AT, et al. The multicenter morphometric mammary carcinoma Project (MMMCP). A nationwide prospective study on reproducibility and prognosis power of routine quantitative assessment in the Netherlands. **Pathol Res Pract** 1989; 185:664-70.

Baak JP. Mitosis counting in tumors (editorial). **Hum Pathol** 1990; 21:683-5.

Baak JPA, van Diest PJ, Voorhorst FJ, et al. Prospective multicenter validation of independent prognostic value of mitotic activity index in lymphode-negative breast cancer patients younger than 55 years. **J Clin Oncol** 2005; 23:5993-6001.

Babyshkina N, Malinovskaya E, Patalyak S, et al. Neoadjuvant chemotherapy for different molecular breast cancer subtypes: a retrospective study in russian population. **Med Oncol** 2014; 31:165.

Balmativola D, Marchiò C, Maule M, et al. Pathological non-response to chemotherapy in a neoadjuvant setting of breast cancer: an inter-institutional study. **Breast Cancer Res Treat** 2014;148:511-23.

Bastien RR, Rodrigues-Lescure A, Ebbert MT, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standart clinical molecular markers. **BMC Med Genomics** 2012; 5:44.

Baulies S, Cusidó M, González-Cao M, et al. Hormone receptor and HER2 status: The only predictive factors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Obstet Gynaecol** 2014 Nov 10 [Epub ahead of print]

Batistatou A, Televantou D, Bobos M, et al. Evolution of current prognostic and predictive markers in breast cancer a validation study of tissue microarrays. **Anticancer Res** 2013; 33:2139-45.

Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Breast Cancer** 1957; 11:359-77.

Bria E, Furlanetto J, Carbognin L, et al. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: heat shock protein 90 overexpression, Ki67 proliferative index, and topoisomerase II- α co-amplification as predictors of pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab and docetaxel. **Clin Breast Cancer** 2015; 15:16-23.

Burge CN, Chang HR, Apple SK. Do the histologic features and results of breast cancer biomarker studies differ between core biopsy and surgical excision specimens? **Breast** 2006; 15:167-72

Colleoni M, Oevieto E, Nol   F, et al. Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. **Eur J Cancer** 1999; 35:574-9.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet** 2014; 384:164-72.

Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. **Clin Cancer Res** 2012; 18:4465-72.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 Status, and prognosis of patients with Luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:736-50.

Christgen M, Winkens W, Kreipe H. Determination of proliferation in breast cancer by immunohistochemistry detection of Ki-67. **Pathologe** 2014; 35:54-60.

Csemi G, Voros A, Liepniece-Karele I, et al. Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-offs value. **Breast** 2014; 23:259-6.

Darb-Esfahani S, Loibl S, M  ller BM, et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. **Breast Cancer Res** 2009 ;11:R69.

Dahabreh IJ, Wieland LS, Adam GP, et al. **Core needle and open surgical biopsy for diagnosis of breast lesions: an update to the 2009 report** [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2014. (Report No 14-EHC040-EF. AHRQ Comparative Effectiveness Reviews).

Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, et al. Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. **Mod Pathol** 2000; 13:730-5.

Daveau C, Baulies S, Lalloum M, et al. Histological grade concordance between diagnostic core biopsy and corresponding surgical specimen in HR-positive/HER2-negative breast carcinoma. **Br J Cancer** 2014 ;110:2195-200.

Denkert C, Loibl S, Müller BM, et al. Ki-67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant Gepar Trio trial. **Ann Oncol** 2013; 24:2786-93.

Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Short-term changes in Ki-67 during neoadjuvant treatment and proliferation of primary breast cancer with anastrozole or tamoxifen alone or combined correlate with recurrence-free survival. **Clin Cancer Res** 2005; 11:951s-8s.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in Breast Cancer Working Group. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:1656-64.

Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. **J Clin Oncol** 2013;31:2783-90.

Ellis PSJ, Chir B, Whitehead R. Mitosis counting – a need for reappraisal (comment). **Hum Pathol** 1979; 12:3-4.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19: 403-10.

Elzawahry HM, Saber MM, Mokhtar MN, et al. Role of Ki-67 in predicting resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. **J Egypt Natl Cancer Inst** 2013; 25:181-91.

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N Engl J Med** 2006;355:560-9.

Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. **Br J Cancer** 2003; 88:406-12.

Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. **BMC Cancer** 2011;11:486.

Fasanella S, Leonardi E, Cantaloni C, et al. Proliferative activity in human breast cancer: ki-67 automated evaluation and the influence of different ki-67 equivalent antibodies. **Diagn Pathol** 2011; 6 Suppl 1:S7.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:966-78.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol** 1991; 138:867-73.

Gnant M, Filipits M, Mlineritsch B et al. Clinical validation of the PAM50 risk of recurrence (ROR) score for predicting residual risk of distant-recurrence (DR) after endocrine therapy in postmenopausal women with ER+ early breast cancer (EBC): An ABCSG study [abstract]. **Cancer Res** 2012; 72:P2-10-02. [Present at AACR Annual Meeting 2012; 2012 March 31-April 4; Chicago].

Gudlaugsson E, Skaland I, Janssen EA, et al. Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction accuracy in breast cancer. **Histopathology** 2012; 61:1134-44.

Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on Her-2, p53 and BCL-2. **Ann Oncol** 2000; 11:647-63.

Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. **Eur J Cancer** 2013; 49:1825-35.

Honma N, Horii R, Iwase T, et al. Ki-67 evaluation at the hottest spot predicts clinical outcome of patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. **Breast Cancer**. 2015; 22:71-8.

Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics** 2006; 7:96.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jones RL, Salter J, A'Hern R, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 116:53-68.

Kaneko S, Gerasimova T, Butler WM, et al. The use of FISH on breast core needle samples for the presurgical assessment of HER-2 oncogene status. **Exp Mol Pathol** 2002; 73:61-6.

Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, et al. Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: a population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. **PLoS One** 2014; 9:e112121.

Konsti J, Lundin M, Joensuu H, et al. Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of ki-67 expression in breast cancer. **BMC Clin Pathol** 2011; 11:3.

Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. **Oncology** 2013; 84:219-25.

Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. **Hum Pathol** 1999; 30:1314-20.

Li FY, Wu SG, Zhou J, et al. Prognostic Value of Ki-67 in breast cancer patients with positive axillary lymph nodes: a retrospective cohort study. **PLoS One** 2014; 9:e87264.

Liu Y, Yin W, Yan T, Du Y, Shao Z, Lu J. The Clinical Significance of Ki-67 as a marker of prognostic value and chemosensitivity prediction in hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of the published literature. **Curr Med Res Opin** 2013; 29:1453-61.

Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. **J Clin Oncol** 2007; 25:1239-46.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> [2014 jan 12].

Mohammed ZMA, McMillan DC, Elsberger B, et al. Comparison of Visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. **Br J Cancer** 2012; 106:383-8.

Motamedolshariati M, Memar B, Aliakbaian M, Shakeri MT, Samadi M, Jangjoo A. Accuracy of prognostic and predictive markers in core needle breast biopsies compared with excisional specimens. **Breast Cancer** 2014; 9:107-10.

Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5222-32.

Nishimiya H, Kosaka Y, Yamashita K, et al. Prognostic significance of Ki-67 in chemotherapy-naïve breast cancer patients with 10-year follow-up. **Anticancer Res** 2014; 34:259-68.

Obermann EC, Eppenberger-Castori S, Tapia C. [Assessment of proliferation: core biopsy or resection specimen? Discrepancies in breast cancer with low and high proliferation]. **Eur J Surg Oncol** 2012; 38:645-50.

Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:2817-26.

Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. **Breast J** 2009; 15:593.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol** 2009; 27:1160-7.

Pathmanathan N, Balleine RL. Ki-67 and proliferation in breast cancer. **J Clin Pathol** 2013; 66:512-6.

Pathmanathan N, Balleine RL, Jayasinghe UW, et al. The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. **J Clin Pathol** 2014; 67:222-8.

Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. **Histopathology** 1995; 27:219-26.

Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:9212-17.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Petit T, Wilt M, Velten M, et al. Comparative value of tumors grade, hormonal receptors, Ki67, Her2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. **Eur J Cancer** 2004; 40:205-11.

Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. **Nat Med** 2009; 15:842-4.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 2011; 5:5-23.

Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **J Clin Oncol** 2008; 26:3153-8.

Ricci MD, Calvano Filho CM, Oliveira Filho HR, Filassi JR, Pinotti JA, Baracat EC. Analysis of the concordance rates between core needle biopsy and surgical excision in patients with breast cancer. **Rev Assoc Med Bras** 2012; 58:532-6

Romero Q, Bendahl PA, Klintman M, et al. Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples - a model for neo-adjuvant breast cancer studies. **BMC Cancer** 2014, 11:341.

Salim DK, Mutlu H, Eryilmaz MK, et al. Molecular types and neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer- while molecular shifting is more common in luminal a tumors, the pathologic complete response is most frequently observed in her-2 like tumors. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:9379-83.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013. **CA Cancer J Clin** 2013; 63:11-30.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM: classificação de tumores malignos**. 7^a ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012; Tumores de mama; p.187-200.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:10393-8.

Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **JNCI** 2006; 98:262-72.

Spyratos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implication of the MIB-1 cutoff value. **Cancer** 2002; 94:2151-9.

Strand C, Bak M, Borgquist S, et al. The combinations of Ki-67, histological grade and estrogen receptor status identifies a low-risk group among 1,854 chemo-naïve women with N0/N1 primary breast cancer. **Springerplus** 2013; 2:111.

Sueta A, Yamamoto Y, Hayashi M, et al. Clinical significance of pretherapeutic Ki67 as a predictive parameter for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: is it equally useful across tumor subtypes?. **Surgery** 2014;155:927-35.

Taucher S, Rudas M, Mader RM, et al. Prognostic markers in breast cancer: the reliability of HER2/neu status in core needle biopsy of 325 patients with primary breast cancer. **Wien Klin Wochenschr** 2004; 116:26-31.

Tawfik O, Kimler BF, Davis M, et al. Grading invasive ductal carcinoma of the breast: advantages of using automated proliferation index instead of mitotic count. **Virchows Arch** 2007; 450:627-36.

Urruticoecha A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:7212-20.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene- expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002; 347:1999-2009.

Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. **Cancer** 1993; 71:3926-31.

Vieira IT, de Senna V, Harper PR, et al. Tumour doubling times and the length bias in breast cancer screening programmes. **Health Care Manag Sci** 2011; 14:203-11.

Yamamoto S, Ibusuki M, Yamamoto Y, et al. Clinical relevance of ki-67 gene expression analysis using formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens. **Breast Cancer** 2013; 20:262-70.

Vincent-Salomon A, Carton M, Freneaux P, et al. ERBB2 overexpression in breast carcinomas: no positive correlation with complete pathological response to preoperative highdose anthracycline-based chemotherapy. **Eur J Cancer** 2000; 36:586-91.

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol** 2010; 28:1684-91.

Zbytek B, Cohen C, Wang J, Page A, Williams DJ, Adams AL.. Nottingham-defined mitotic score: comparison with visual and image cytometric phosphohistone H3 labeling indices and correlation with oncotype DX recurrence score. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2013; 21:48-53.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 01 de outubro de 2012.

Ao
Dr. Victor Piana de Andrade.

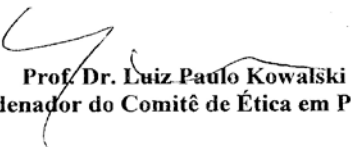
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1700/12
“Avaliação do índice proliferativo dos carcinomas da mama: aspectos técnicos e utilidade clínica”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/09/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 13 de agosto de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Mastologia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Caracterização da amostra dos 100 casos consecutivos do acervo do arquivo de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, diagnosticados no ano de 2012 como Carcinoma Mamário Invasor

StudyID	Núcleo	Túbulo	Mitose	ER (%)	PR (%)	HER2	Dimensão (cm)
1	3	3	0	0	5	0	2,5
2	2	2	2	99	60	2	0,29
3	3	3	11	90	30	0	2,5
4	2	3	2	100	1	0	5,8
5	2	3	0	100	30	2	1,8
6	2	2	0	95	60	1	1,7
7	2	1	0	80	80	0	0,7
8	3	3	22	90	90	1	3,5
9	2	3	3	100	15	1	1,5
10	2	2	4	95	100	1	2
11	2	2	10	100	100	0	1,7
12	1	2	1	95	80	1	1,5
13	3	3	6	70	30	2	1,4
14	2	3	0	100	90	1	0,7
15	3	3	30	0	0	0	2,3
16	2	3	4	95	60	0	3
17	3	2	0	90	90	1	1,1
18	2	3	5	95	95	2	0,7
19	3	3	2	5	5	3	0,39
20	3	3	12	90	90	2	0,7
21	3	3	3	100	0	1	2,1
22	3	3	6	100	60	2	1,5
23	3	2	1	90	1	0	1,7
24	3	3	12	0	0	0	2,3
25	2	2	9	90	5	1	0,5
26	2	3	3	100	100	1	1,1
27	3	3	23	95	80	2	3
28	3	3	11	1	5	1	1,4
29	2	3	0	90	60	0	4,1
30	1	2	1	90	80	1	0,7
31	3	3	27	60	50	0	0,8
32	2	3	3	95	1	0	2,2
33	2	3	3	90	90	1	3,5
34	2	3	11	90	80	1	2
35	1	3	0	80	50	1	1,7
36	2	1	1	90	90	1	1
37	3	2	20	0	0	3	4
38	3	3	39	90	80	3	1,4
39	2	3	23	90	65	1	1,6
40	3	3	9	75	25	2	3,8
41	1	2	0	100	10	0	0,8
42	3	3	1	100	20	1	0,8
43	2	2	0	100	25	2	1,1
44	3	3	81	90	70	1	1,6
45	1	3	5	95	80	1	1,3
46	2	2	1	100	40	1	1,5
47	2	3	15	99	99	1	0,9
48	1	3	6	80	60	2	2,7
49	3	3	3	80	80	3	1,9
50	2	1	3	95	95	1	1,2
51	1	3	1	80	90	0	0,4
52	2	3	0	95	50	1	1,3
53	3	3	15	90	20	0	3
54	3	3	2	100	5	1	1,1
55	2	3	1	95	90	1	4
56	2	1	0	90	70	1	2,2

57	2	3	2	5	1	2	1,6
58	3	3	5	50	50	3	1,5
59	1	1	0	95	70	1	1,1
60	2	3	14	10	10	2	4,5
61	2	3	7	95	95	1	1,4
62	1	1	1	95	90	1	0,6
63	2	3	0	100	60	0	1,9
64	3	3	6	100	90	2	1,7
65	3	3	15	85	80	2	0,8
66	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO
67	3	3	11	0	0	2	2,2
68	3	3	11	90	95	3	3,5
69	1	3	1	90	95	1	3,2
70	2	1	1	100	50	2	1,5
71	3	3	12	90	60	2	2,5
72	3	3	2	80	40	1	4,1
73	1	1	2	100	70	2	1,2
74	1	3	12	85	60	2	0,6
75	1	3	0	100	95	1	2,6
76	3	2	25	80	90	2	1,8
77	3	3	25	90	80	3	2,2
78	3	3	29	40	60	1	2,5
79	3	3	3	90	30	1	3,5
80	3	3	14	80	0	0	2,9
81	2	2	12	90	70	1	1,7
82	3	3	21	95	80	2	1,7
83	2	2	1	95	5	1	1
84	2	3	5	100	100	1	1,5
85	1	3	1	90	80	1	2,3
86	3	3	16	0	10	3	2,3
87	3	2	8	100	100	2	1,5
88	2	3	6	90	70	3	1
89	1	2	0	100	100	2	0,6
90	3	3	10	80	80	1	3,5
91	2	2	9	90	90	2	0,7
92	1	2	0	100	60	1	2,3
93	1	3	56	80	80	2	4
94	2	3	15	95	80	0	3,5
95	3	3	56	100	20	1	1,5
96	2	3	1	95	90	2	1
97	1	3	2	90	60	2	2,5
98	2	3	9	95	40	3	1
99	1	3	1	95	90	2	0,8
100	3	3	59	90	5	1	2,5

Anexo 3 - Bula Anticorpo anti Ki67 (30-9) - imuno-histoquímica Automatizada no Aparelho Ventana



CONFIRM™ anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Catalog Number 790-4286

INDICATIONS AND USE

Intended Use

This antibody is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

Ventana Medical Systems' (Ventana) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Primary Antibody is a rabbit monoclonal antibody (IgG) directed against C-terminal portion of Ki-67 antigen. Staining for Ki-67 can be used to aid in assessing the proliferative activity of normal and neoplastic tissue.^{1,2,3} This antibody is intended for use to identify stained proliferating cells by light microscopy in sections of formalin fixed, paraffin embedded tissue on a Ventana automated slide stainer.

The clinical interpretation of any staining, or the absence of staining, must be complemented by morphological studies and evaluation of proper controls. Evaluation must be made by a qualified pathologist within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests.

Summary and Explanation

Ki-67 is a nuclear protein expressed in proliferating cells. During the cell cycle, the Ki-67 antigen is present in the G1, S, G2 and M phase but is absent in the G0 (quiescent phase).^{4,5}

Principles and Procedures

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) may be used as the primary antibody for immunohistochemical staining of paraffin tissue sections. In general, immunohistochemical staining allows the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody (primary antibody) that binds to the antigen, a secondary antibody (link antibody) that binds to the primary antibody, an enzyme complex and a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and cover slipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) is optimally diluted for use with VEW™ DAB detection kit and Ventana automated slide stainers. CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) is compatible with *ultraView™* Universal DAB, AEC, and Enhanced Alkaline Phosphatase Red detection kits. Each step in the staining protocol includes incubation for a precise time at a specific temperature. At the end of each incubation step, the sections are rinsed by the Ventana automated slide stainer to stop the reaction and remove unbound material that would hinder the desired reaction in subsequent steps. To minimize evaporation of the aqueous reagents from the specimen containing slide, a coverslip solution is applied in the slide stainer. Staining is completed after incubation with a substrate chromogen and optional counterstaining. For more detailed information on instrument operation, refer to the appropriate Ventana automated slide stainer Operator's Manual.

MATERIALS AND METHODS

Reagents Provided

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) contains sufficient reagent for 50 tests.

1 – 5 mL dispenser of CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) contains approximately 10 µg (2 µg/mL) of a rabbit monoclonal antibody directed against Ki-67 present in tissue. The antibody is diluted in a buffer containing carrier protein and preservative.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

This antibody is optimized for use on a Ventana automated slide stainer in combination with MEW DAB Detection Kit. No reconstitution, mixing, dilution, or titration is required. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such changes. Differences in tissue processing and technical procedures in the laboratory may produce significant variability in results and require regular use of controls (see Quality Control Procedures section).

Materials and Reagents Needed But Not Provided

The following reagents and materials may be required for staining but are not provided.

1. Ventana CONFIRM Negative Control Rabbit Ig

2. Microscope slides, positively charged
3. Positive and negative tissue controls
4. Drying oven capable of maintaining a temperature of 70° C ± 5° C
5. Barcode labels (appropriate for negative control and primary antibody being tested)
6. 10% neutral buffered formalin
7. Staining jars or baths
8. Timer
9. Xylene
10. Ethanol or reagent alcohol
11. Deionized or distilled water
12. Biocare Medical's Deblocking Chamber™ (NexES IHC automated slide stainers)
13. Staining dishes*
14. NexES IHC, BenchMark® Series automated slide stainers
15. Ventana *ultraView™* Universal DAB, MEW DAB, AEC and Enhanced Alkaline Phosphatase Red detection kits*
16. Ventana Amplification Kit*
17. Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit*
18. Ventana APK Wash* (10X) (NexES IHC automated slide stainers)
19. Ventana Liquid Coverslip™ (Low Temperature)* (NexES IHC automated slide stainers)
20. Ventana EZ Prep™ (10X)* (BenchMark Series automated slide stainers)
21. Ventana Reaction Buffer (10X)* (BenchMark Series automated slide stainers)
22. Ventana Liquid Coverslip (High Temperature)* (BenchMark Series automated slide stainers)
23. Ventana Cell Conditioning 1 (Pre-dilute) (BenchMark Series automated slide stainers)
24. 1 mM EDTA buffer (pH 8.0)
25. Ventana Hematoxylin II counterstain
26. Ventana Bluing Reagent
27. Mounting medium
28. Cover glass
29. Light microscope (20-80X)

* As needed for specific applications.

Storage and Handling

Store at 2-8° C. Do not freeze. The user must validate any storage conditions other than those specified in the package insert.

To ensure proper reagent delivery and stability of the antibody after every run, the cap must be replaced and the dispenser must be immediately placed in the refrigerator in an upright position.

Every antibody dispenser is expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date for the prescribed storage method.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with unknown specimens. Your local Ventana office should be contacted immediately if there is an indication of reagent instability.

Specimen Collection and Preparation for Analysis

Routinely processed, formalin fixed, paraffin embedded tissues are suitable for use with this primary antibody when used with Ventana detection kits and a Ventana automated slide stainer (see Materials and Reagents Needed, But Not Provided section). The recommended tissue fixative is 10% neutral buffered formalin.⁶ Variable results may occur as a result of prolonged fixation or special processes, such as decalcification of bone marrow preparations.

Each section should be cut to the appropriate thickness and placed on a positively charged glass slide. Slides containing the tissue section may be baked for at least 2 hours (but not longer than 24 hours) in a 70° C ± 5° C oven.

Manual Deparaffinization Procedure

Required when using the NexES IHC automated slide stainer or if deparaffinization is not selected on the BenchMark Series automated slide stainer:

1. For instructions on when to label slides with barcode label, refer to the Instructions for Use section of the specific automated slide stainer Operator's Manual.
2. Immerse the slides sequentially in 3 xylene baths for 5 ± 1 minutes each.
3. Transfer the slides to 100% ethanol and immerse sequentially in 2 baths for 3 ± 1 minutes each.



- Transfer the slides to 95% ethanol and immerse them in a bath of this solution for 3 ± 1 minutes.
- Transfer the slides to 80% ethanol and immerse them in this solution for 3 ± 1 minutes.
- Transfer the slides to a bath of deionized or distilled water and dip a minimum of 10 times.
- Transfer slides to APK Wash (1X) or buffer solution as appropriate. For APK Wash, the slides should remain until you are ready to perform the staining run. For buffer solution, the slides should remain until you are ready to perform the antigen unmasking procedure. Do not allow the slides to dry.

Slides stained on the BenchMark Series automated slide stainers can be deparaffinized on the instrument. If this option is selected, apply barcode labels to slides and place slides on the instrument. If the option is not selected, follow the Manual Deparaffinization Procedure above.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Take reasonable precautions when handling reagents. Use disposable gloves when handling suspected carcinogens or toxic materials (example: xylene or formaldehyde).
- Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
- Patient specimens and all materials contacting them should be handled as biohazardous materials and disposed of with proper precautions. Never pipette by mouth.
- Avoid microbial contamination of reagents, as this could produce incorrect results.
- Incubation times and temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change.
- The reagents have been optimally diluted, and further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.
- Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.
- The preservative in the reagent is either ProClin 300 or sodium azide (NaCN). Symptoms of overexposure to ProClin 300 or NaCN include skin and eye irritation, and irritation of mucous membranes and upper respiratory tract. The concentration of ProClin 300 in this product is less than or equal to 0.05% and does not meet the OSHA criteria for a hazardous substance. Systemic allergic reactions are possible in sensitive individuals. The concentration of NaCN in this product is less than 0.1% and does not meet the OSHA criteria for a hazardous substance. Build up of NaCN may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide accumulation in plumbing.

INSTRUCTIONS FOR USE

Step by Step Procedure

Ventana primary antibodies have been developed for use on a Ventana automated slide stainer in combination with Ventana detection kits and accessories. Recommended staining protocols for the automated slide stainers are listed below in Table 1. The parameters for the automated procedures can be displayed, printed and edited according to the procedure in the Operator's Manual. Other operating parameters for the automated slide stainers have been preset at the factory.

Table 1. Recommended Staining Protocols for CONFIRM anti-IG-67 (30-9)

Procedure Type	Platform or Method	
	NexES IHC	BenchMark Series
Deparaffinization	Off Line	Selected
Cell Conditioning (Antigen Unmasking)	1 mM EDTA buffer (pH 8.0), 2 minutes, Dedocking Chamber, 120° C	Cell Conditioning 1 Standard
Enzyme (Protease)	None required	None required
Antibody (Primary)	Approximately 32 minutes, 37° C	Approximately 16 minutes, 37° C
AIS Block (Biotin Blocking)	Selected	Selected
Amplify (Amplification)	Optional	Optional
Counterstain (Hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 minutes	Hematoxylin II, 4 minutes
Post Counterstain	Bluing, 2 to 4 minutes	Bluing, 2 to 4 minutes

The procedures for staining on the Ventana automated slide stainers are as follows. For more detailed instructions and additional protocol options, refer to your Operator's Manual.

NexES IHC Automated Slide Stainers

Antigen Unmasking Required:

- Slides are to be deparaffinized through a series of xylene and gradient alcohols to water and then to appropriate buffer. Perform antigen unmasking procedure and transfer slides to APK Wash (1X).
- Load the primary antibody, appropriate detection kit dispensers and required accessory reagents onto the reagent tray and place the reagent tray on the automated slide stainer. Check bulk fluids and waste.
- Dry the painted end of the slide and then apply slide barcode label that corresponds to the antibody protocol to be performed.
- Load the deparaffinized, antigen unmasked, labeled slides from the APK Wash (1X). Avoid tissue drying.

Manual Antigen Unmasking Procedure

Manual antigen unmasking is required when using the NexES IHC automated slide stainer.

Antigen enhancement (cell conditioning) procedure (for tissue slides to be stained on NexES IHC, or manual methods):

- Prepare the Dedocking Chamber for use.
- Place the pan into the chamber. Note: Make sure that the outside of the pan is completely dry prior to placing it in the chamber. If the outside of the pan is wet, the Dedocking Chamber will make a cracking noise and any water in the chamber will cause a malfunction.
- Align the handles of the pot with the handles of the chamber.
- Fill the pan with 500 mL of deionized water and place the heat shield, (circular screen), in the center of the pot. Note: The heat shield keeps the plastic containers from warping.
- Place each staining dish, filled with 250 mL of 10 mM sodium citrate (pH 6.0) or 1 mM EDTA buffer (pH 8.0) as indicated in the Recommended Staining Protocols (Table 1) in the package insert for each primary antibody, and the appropriate slides on the heat shield which is placed in the center of the pan. Cell Conditioning 1 (pH 8.5) may be substituted for EDTA Buffer and Cell Conditioning 2 (pH 6.0) may be substituted for 10 mM sodium citrate if desired. Up to 2 containers may be placed in the chamber, but make sure both are touching the heat shield.
- Put the lid on the Dedocking Chamber and secure (align the open arrow with the white dot on the pan handle). Grip the lid handle, and rotate clockwise to the closed position; when the lid is locked in the proper position, the Vent Lever will lower the weight on the vent nozzle.
- Turn the rheostat to 10 and lock into place (approximately 120° C).
- Turn on the Dedocking Chamber and monitor until the pressure reaches 17-25 psi and the temperature is 120° - 125° C. Once the Dedocking Chamber reaches the desired temperature, time for 2 minutes using a calibrated manual timer, as the Dedocking Chamber timer is not "real time" consistent. When the manual timer goes off, turn the Dedocking timer to the off position. The heat will turn off and the

- light will turn from "heat on" to "keep warm". Note: Technician must monitor temperature and pressure conditions to confirm desired specifications are met.
- Once the antigen enhancement procedure is completed, turn off the Decloaking Chamber.
 - The technician can monitor the declining pressure by periodically checking the pressure gauge. When pressure reaches 0 psi, the Decloaking chamber can be opened safely. Rotate the lid counterclockwise and remove it slowly, allowing steam to escape away from your hand. Note: Be very careful when opening lid, as surface and liquid temperatures remain high.
 - Remove the container of slides from the pan and place slide holders containing processed slides in a container of room temperature, deionized water.
 - Once rinsing is complete, place the slides in a slide rack filled with deionized water, for maintaining hydration while barcode labels are applied to slides. One by one, remove the slides from the slide rack and blot the frosted end dry, ensuring the tissue sections do not dry during the process. Label each slide with the appropriate barcode label, and return it to the slide container. Repeat this process for all slides.
 - Once all slides have been labeled, empty the deionized water from the slide container and refill it with APK Wash (1X). Slides should remain in this solution until ready to perform staining run.

Benchmark Series Automated Slide Stainers

- Apply slide barcode label that corresponds to the antibody protocol to be performed.
- Load the primary antibody, appropriate detection kit dispensers and required accessory reagents onto the reagent tray and place the reagent tray on the automated slide stainer. Check bulk fluids and waste.
- Load the slides onto the automated slide stainer.

For All Instruments

- Start the staining run.
- At the completion of the run, remove the slides from the automated slide stainer.
- For DAB and Alkaline Phosphatase Red chromogens, wash in a mild dishwashing detergent or alcohol to remove the coverslip solution; dehydrate, clear, and coverslip with permanent mounting media in the usual manner.
- For AEC chromogen, do not dehydrate and clear. Mount AEC with aqueous mounting medium. The stained slides should be read within 2 to 3 days of staining, and are stable for at least 2 years if properly stored at room temperature (15° - 25° C).

Quality Control Procedures

Positive Tissue Control

A positive tissue control must be run with every staining procedure performed. An example of a positive control for CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) is tonsil or lymph node. The positive staining tissue components (nuclei of cycling cells) are used to confirm that the antibody was applied and the instrument functioned properly. This tissue may contain both positive and negative staining cells or tissue components and may serve as both the positive and negative control tissue. Control tissues should be fresh autopsy, biopsy or surgical specimens prepared or fixed as soon as possible in a manner identical to the test sections. Such tissues may monitor all steps of the procedure, from tissue preparation through staining. Use of a tissue section fixed or processed differently from the test specimen will provide control for all reagents and method steps except fixation and tissue processing.

A tissue with weak positive staining is more suitable for optimal quality control and for detecting minor levels of reagent degradation.

Known positive tissue controls should be utilized only for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, and not as an aid in determining a specific diagnosis of patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

The same tissue used for the positive tissue control may be used as the negative tissue control. The variety of cell types present in most tissue sections offers internal negative control sites, but this must be verified by the user. The components that do not stain should demonstrate the absence of specific staining, and provide an indication of non-specific background staining. If specific staining occurs in the negative tissue control sites, results with the patient specimens should be considered invalid.

Unexplained Discrepancies

Unexplained discrepancies in controls should be referred to your local Ventana office immediately. If quality control results do not meet specifications, patient results are invalid. If discrepancies occur, refer to the Troubleshooting section of this insert. Identify and correct the problem, then repeat the patient samples.

Negative Reagent Control

A negative reagent control must be run for every specimen to aid in the interpretation of results. A negative reagent control is used in place of the primary antibody to evaluate nonspecific staining. The slide should be stained with CONFIRM Negative Control Rabbit Ig as appropriate. If an alternative negative reagent control is used, dilute to the same concentration as the primary antibody antiserum with Ventana Antibody Diluent. The diluent alone may be used as an alternative to the previously described negative reagent controls. The incubation period for the negative reagent control should equal the primary antibody incubation period.

When panels of several antibodies are used on serial sections, a negative reagent control on one slide may serve as a negative or nonspecific binding background control for other antibodies.

Assay Verification

Prior to initial use of an antibody or staining system in a diagnostic procedure, the specificity of the antibody should be verified by testing it on a series of tissues with known immunohistochemistry performance characteristics representing known positive and negative tissues (refer to the Quality Control Procedures previously outlined in this section of the product insert and to the Quality Control recommendations of the College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, or the NCCLS Approved Guideline[®] or both documents). These quality control procedures should be repeated for each new antibody lot, or whenever there is a change in assay parameters. Tissues listed in the Summary of Expected Results section of this insert are suitable for assay verification.

Interpretation of Results

The Ventana automated immunostaining procedure causes a colored reaction product to precipitate at the antigen sites localized by the primary antibody. Refer to the appropriate detection kit package insert for expected color reactions. A qualified pathologist experienced in immunohistochemistry procedures must evaluate positive and negative controls before interpreting results.

Positive Tissue Control

The stained positive tissue control should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of an appropriately colored reaction product within the target cells is indicative of positive reactivity. Refer to the package insert of the detection kit used for expected color reactions. Depending on the incubation time and potency of the hematoxylin used, counterstaining will result in a pale to dark blue coloration of cell nuclei. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

The negative tissue control should be examined after the positive tissue control to verify the specific labeling of the target antigen by the primary antibody. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody cross reactivity to cells or cellular components. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimen should be considered invalid.

Nonspecific staining, if present, will have a diffuse appearance. Sporadic light staining of connective tissue may also be observed in tissue sections that are excessively formalin fixed. Intact cells should be used for interpretation of staining results, as necrotic or degenerated cells often stain nonspecifically.

Patient Tissue

Patient specimens should be examined last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen in question was not detected, not that the antigen is absent in the cells or tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to aid in the identification of false negative reactions (see Summary of Expected Results section). The morphology of each tissue sample should also be examined utilizing a hematoxylin and eosin stained section when interpreting any immunohistochemical result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted by a qualified pathologist.

LIMITATIONS

General Limitations

- Immunohistochemistry is a multiple step diagnostic process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents and tissues, fixation,

processing, preparation of the immunohistochemistry slide, and interpretation of the staining results.

2. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be a consequence of variations in fixation and embedding methods, or inherent irregularities within the tissue.
3. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
4. The clinical interpretation of any positive staining, or its absence, must be evaluated within the context of clinical history, morphology and other histopathological criteria. The clinical interpretation of any staining, or its absence, must be complemented by morphological studies and proper controls as well as other diagnostic tests. This antibody is intended to be used in a panel of antibodies. It is the responsibility of a qualified pathologist to be familiar with the antibodies, reagents and methods used to produce the stained preparation. Staining must be performed in a certified, licensed laboratory under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewing the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.
5. Ventana provides antibodies and reagents at optimal dilution for use when the provided instructions are followed. Any deviation from recommended test procedures may invalidate expected results. Appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results.
6. This product is not intended for use in flow cytometry; performance characteristics have not been determined.
7. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated because of biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues.⁹ Contact your local Ventana office with documented unexpected reactions.
8. Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.¹⁰
9. When used in blocking steps, normal sera from the same animal source as the secondary antisera may cause false negative or false positive results due to autoantibodies or natural antibodies.
10. False positive results may be seen because of nonimmunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), alkaline phosphatase, or endogenous biotin (examples: liver, brain, breast, kidney) depending on the type of immunostain used.¹¹
11. As with any immunohistochemistry test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells or tissue assayed.

Specific Limitations

1. The antibody has been optimized for a 15 minute incubation time with the Benchmark Series and 32 minute incubation time with the NexES IHC automated slide stainers and MVIEW DAB detection kit. Because of variation in tissue fixation and processing, it may be necessary to increase or decrease the primary antibody incubation time on individual specimens. This antibody does not produce an appropriate staining pattern when used on tissue fixed with Bouin's fixative. For further information on fixation variables, refer to "Immunohistochemistry Principles and Advances".¹²
2. The antibody, in combination with Ventana detection kits and accessories, detects antigen that survives routine formalin fixation, tissue processing and sectioning. Users who deviate from recommended test procedures are responsible for interpretation and validation of patient results.

SUMMARY OF EXPECTED RESULTS

1. Specificity of CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) was determined by testing formalin fixed, paraffin embedded normal and neoplastic tissues. CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) has shown cross reactivity in the cytoplasm of some types of skeletal and cardiac muscle but is not likely to be confused with the nuclear staining pattern of Ki-67. For normal tissues, results are as follows: for brain medulla, 1 out of 3 cases stained; for brain cerebellum, 0 out of 3 cases stained; for adrenal gland, 3 out of 3 cases stained; for ovary, 2 out of 2 cases stained; for pancreas, 3 out of 3 cases stained; for parathyroid, 2 out of 3 cases stained; for pituitary, 3 out of 3 cases stained; for testis 3 out of 3 cases stained; for thyroid, 2 out of 3 cases stained; for breast, 3 out of 3 cases stained; for spleen, 3 out of 3 cases stained; for tonsil, 3 out of 3 cases stained; for thymus, 3 out of 3 cases stained; for bone marrow, 0 out of 3 cases

stained; for lung, 1 out of 3 cases stained; for heart, 1 out of 3 cases stained; for esophagus, 2 out of 3 cases stained; for stomach, 3 out of 3 cases stained; for intestine, 2 out of 3 cases stained; for colon, 3 out of 3 cases stained; for liver, 1 out of 3 cases stained; for salivary gland, 2 out of 3 cases stained; for kidney, 2 out of 3 cases stained; for prostate, 2 out of 2 cases stained; for uterus, 2 out of 2 cases stained; for cervix, 2 out of 3 cases stained; for striated muscle, 0 out of 3 cases stained; for skin, 3 out of 3 cases stained; for mesothelium, 0 out of 1 case stained. For neoplastic tissues, the following exhibited Ki-67 staining: glioblastoma, atypical meningioma, ependymoma and oligodendroglioma in brain; ovarian serous and mucous papillary adenocarcinoma, leiomyosarcoma, liver carcinoma, adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, lung, stomach, intestine, colon, rectum, prostate, uterus, and cervix; testicular seminoma and embryonal carcinoma; medullary and papillary carcinoma of the thyroid; infiltrating ductal carcinoma of the breast; B cell lymphoma in spleen; three squamous cell carcinomas, mesenchymoma in intestine, hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma; rhabdomyosarcoma in striated muscle; neurofibroma and neuroblastoma; melanoma, sarcoma, undifferentiated carcinoma, carcinoids, and lymphoma. The following neoplastic tissues did not exhibit staining: intraductal carcinoma of the breast; clear cell carcinoma in kidney; and leiomyoma in uterus.

2. Sensitivity is dependent upon the preservation of the antigen. Any improper tissue handling during fixation, sectioning, embedding or storage which alters antigenicity weakens Ki-67 detection by CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) and may generate false negative results.
3. Inter run reproducibility of staining was determined by staining 9 slides containing the same tissue. Nine of 9 slides stained positively. All slides stained with the same staining intensity. Users should verify between run reproducibility results by staining several sets of serial sections with low, medium and high antigen density on different days.
4. Intra run reproducibility of staining was determined by staining slides containing the same tissue on 3 different instrument runs. Twenty-seven of 27 slides stained positively. All slides stained with similar staining intensity. Users should verify within run reproducibility results by staining several sets of serial sections with low, medium and high antigen density in a single run.

TROUBLESHOOTING

1. If the positive control exhibits weaker staining than expected, other positive controls run concurrently should be checked to determine if it is due to the primary antibody or one of the common secondary reagents.
2. If the positive control is negative, it should be checked to ensure that the slide has the proper barcode label. If the slide is labeled properly, other positive controls run concurrently should be checked to determine if it is due to the primary antibody or one of the common secondary reagents. Tissues may have been improperly collected, fixed or deparaffinized. The proper procedure should be followed for collection, storage and fixation.
3. If excessive background staining occurs, high levels of endogenous biotin may be present. A biotin blocking step may be included.
4. If all of the paraffin has not been removed, the deparaffinization procedure should be repeated.
5. If specific antibody staining is too intense, the run should be repeated with the primary antibody incubation time shortened by 4 minute intervals until the desired stain intensity is achieved.
6. If tissue sections wash off the slide, slides should be checked to ensure that they are positively charged.
7. For corrective action, refer to the Step By Step Procedure section of the automated slide stainer Operator's Manual or contact your local Ventana office.

REFERENCES

1. Keng PC, Siemann DW. Measurement of proliferation activities in human tumor models: a comparison of flow cytometric methods. *Radiat Oncol Invest*, 6(3): 120-7, 1998.
2. Ray A, Liao PC. Ki67 proliferation index in tumors of the upper urinary tract as related to established prognostic factors and long-term survival. *Arch Exp Urol*, 51(2): 204-10, 1998.
3. Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res*, 26(7): 677-87, 1993.
4. Alliego M. Colloid body heterogeneity induced by G(1) arrest with anilide bismaleimide. *Exp Cell Res*, 279(1): 111-17, 2002.
5. Scholten T, Giesels J. The Ki-67 protein from the know and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3): 311-22, 2000.
6. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.



7. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
8. NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. NCCLS document MM4-A. (ISBN 1-56238-396-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
9. Herman GE, Elfont EA. The tanning of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biochem Histochim* 66(4): 194-199, 1991.
10. Omata M, Liew CT, Ashcaval M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 73(5): 826-32, 1980.
11. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
12. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

INTELLECTUAL PROPERTY

CONFIRM™, EZ Prep™, VIEW™, uView™ and Liquid Coverlip™ are trademarks of Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, NexES® and Ventana® are registered trademarks of Ventana Medical Systems, Inc.

Ventana grants to Purchaser a single use only license under the following patents: U.S. Pat. Nos. 6045 760, 6160 945, 6116 713, 6645 128 and foreign counterparts.

Anexo 4 - Sistema de classificação TNM AJCC 7ª edição.

Avaliação do Tumor

- Tx - Tumor não pode ser avaliado
- T0 - Sem evidência de tumor
- Tis - Carcinoma in situ
- Tis (CDIS) - carcinoma ductal in situ
- Tis (CLIS) - carcinoma lobular in situ
- Tis (Paget) - Doença de Paget não associada a carcinoma subjacente.
- T1 - Tumor ≤ 20 mm in greatest dimension
 - T1mi - Tumor ≤ 1 mm na maior dimensão
 - T1a - Tumor > 1 mm but ≤ 5 mm na maior dimensão
 - T1b - Tumor > 5 mm but ≤ 10 mm na maior dimensão
 - T1c - Tumor > 10 mm but ≤ 20 mm na maior dimensão
- T2 - Tumor > 20 mm but ≤ 50 mm na maior dimensão
- T3 - Tumor > 50 mm na maior dimensão
- T4 - Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica e/ou pele (ulceração ou nódulos)
 - T4a - Extensão para a parede torácica, não incluindo o músculo peitoral
 - T4b - Ulceração e/ou nódulo cutâneo ipsilateral e/ou edema da pele que não preencha critério para carcinoma inflamatório.
 - T4c - Ambos (T4a and T4b)
 - T4d - carcinoma inflamatório**

*Nota: Invasão da derme apenas não caracteriza T4.

**Nota: Carcinoma inflamatório é restrito aos casos com alterações cutâneas típicas envolvendo um terço ou mais da pele da mama. A presença histológica de carcinoma invadindo linfáticos da derme suporta o diagnóstico mas não é necessário e nem suficiente para a caracterização.

- cNX - Linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, previamente removido)
 - cN0 - Não há metástases do Linfonodo regional
 - cN1 - Metástase ipsilateral móvel nível I, II para linfonodos axilares (s)
 - cN2 - Metástase ipsilaterais nível I, II para gânglios linfáticos axilares que são clinicamente fixos ou emaranhados; ou clinicamente detectada nas mamas internas na ausência de metástases de nó axilar clinicamente evidente.
 - cN2a - Metástases ipsilaterais nível I, linfonodos axilares fixados um ao outro (emaranhado) ou a outras estruturas
 - cN2b - Metástases ipsilaterais clinicamente detectadas apenas em nós mamários internos e na ausência de metástases de nó axilar clinicamente evidente
 - cN3 - Metástases em linfonodo(s) ipsilaterais infraclavicular (axilares de nível III) com ou sem nível I, envolvimento de Linfonodo axilar II; ou clinicamente detectada no linfonodo(s) mamário ipsilateral interno com nível clinicamente evidente ou, metástases de Linfonodo axilar II; ou metástases em supraclavicular ipsilaterais linfonodo(s) com ou sem envolvimento axilar ou Linfonodo mamário interno. cN3a - Metástase infraclavicular para linfonodos ipsilaterais
 - cN3b - Metástases ipsilaterais de linfonodo(s) mamário interno e linfonodos axilares cN3c - Metástase em linfonodo ipsilateral supraclavicular
- Classificação patológica dos linfonodos regionais pNX
- Gânglios regionais, nós que não podem ser avaliados (por exemplo, anteriormente removidos ou não removidos para estudo patológico)
 - pN0 - Não há metástases do Linfonodo regional
 - pNO - Nenhuma metástase regional Linfonodo identificados histologicamente
 - pNO(i-) - nenhuma metástase em linfonodo regional, negativos histologicamente, IHC pN0(i+) — células malignas na região linfonodal não superior a 0,2 mm (detectado por H & E ou IHC incluindo ITC)

- pNO(mol-) - Nenhuma metástase em linfonodo regional histologicamente. Conclusões moleculares negativas (RT-PCR)
- pNO(mol+) - resultados moleculares positivos (RT-PCR), mas nenhuma metástase em linfonodo regional detectados pela histologia ou IHC
- pN1 - Micrometastases ou metástases em um a três linfonodos axilares, e/ou nós de mamilários internos com metástases detectadas por biópsia de Linfonodo Sentinela, mas não clinicamente detectado

pN1mi - Micrometastases (maior que 0,2 mm e/ou mais de 200 células, mas nenhum superior a 2,0 mm)

pN1a - metástases em 1 a 3 dos gânglios linfáticos axilares, pelo menos uma metástase maior que 2.0 mm

pN1b - metástases em nós mamilários internos com micrometastases ou macrometastases detectadas por biópsia de Linfonodo Sentinela, mas não clinicamente detectado **

pN1c - metástases em um a três linfonodos axilares e nos linfonodos mamilários internos com micrometastases ou macrometastases detectadas por biópsia de Linfonodo Sentinela, mas não clinicamente detectado **

pN2 - Metástase clinicamente detectada em quatro para nove gânglios linfáticos axilares, ou em linfonodos mamilários internos, na ausência de metástase em Linfonodo axilar ****

pN2a - metástases em quatro a nove linfonodos axilares (depósito de pelo menos um tumor maior que 2,0 mm)

N2b - metástase detectada clinicamente apenas em nós mamilários ipsilaterais internos e na ausência de pN2b de metástases de nó axilar clinicamente evidente - metástases detectada clinicamente em linfonodos mamilários internos, na ausência de metástases do Linfonodo axilar.

pN3 - metástases em 10 ou mais linfonodos axilares; ou em linfonodos infraclavicular (axilares de nível III); ou clinicamente detectada em linfonodos mamilários ipsilaterais internos na presença de 1 ou mais linfonodos axilares positivo de nível I, II; ou em mais de 3 linfonodos axilares e linfonodos mamilários internos com micrometastases ou macrometastases detectadas

por biópsia de Linfonodo Sentinela, mas não clinicamente detectado ; ou em supraclaviculares ipsilaterais.

Metástases distantes (M)

M0 - Nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases distantes.

cMO(i+) - nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases distantes, mas depósitos de grãos ou pilhas do tumor ao microscópio detectado na circulação de sangue, medula óssea ou outro tecido nodal extra-regionais não maiores que 0,2 mm em um paciente sem sintomas ou sinais de metástases

M1 - metástases distantes detectáveis pelos meios clínicos e radiográficos clássicos e/ou histologicamente comprovada maiores que 0.2 mm.

Estadiamento Clínico			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1 ȳȳ	N0	M0
Estágio IB	T0	N1mi	M0
	T1 ȳȳ	N1mi	M0
Estágio IIA	T0	N1 ‡‡	M0
	T1 ȳȳ	N1 ‡‡	M0
	T2	N0	M0
Estágio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIA	T0	N2	M0
	T1 ȳȳ	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estágio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estágio IIIC	Any T	N3	M0
Estágio IV	Any T	Any N	M1

- *A classificação de t do tumor primário é o mesmo, independentemente se ele é baseado em critérios clínicos ou patológicos, ou ambos. Designação deve ser feita com o subscrito "c" ou "p" para indicar se a classificação de t foi determinada pelo clínico (exame físico ou radiológica) ou patológicos , respectivamente. Em

geral, determinação patológica deveria prevalecer sobre determinação clínica de tamanho T.

- Tamanho deve ser medido para o milímetro mais próximo. Se o tamanho do tumor é ligeiramente menor ou maior que um ponto de corte para uma determinada classificação de T, recomenda-se que o tamanho deve ser arredondado para a leitura de milímetro mais próximo o ponto de corte.
- Δ Múltiplos carcinomas ipsilaterais simultâneos primários são definidos como carcinomas infiltrando na mesma mama, que são grosseiramente ou macroscopicamente distintas e mensuráveis. Fase de t é baseado somente em tumor maior. A presença e tamanhos de tumores menores devem ser registrados usando o modificador "(m)".
- ◇ Invasão da derme por si só não se qualifica como T4; retração do mamilo, ou qualquer outra alteração de pele exceto aquelas descritas em T4b e T4d pode ocorrer em T1, T2 ou T3 sem alterar a classificação. A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais e serrátil anterior muscular, mas não os músculos do peitoral.
- § Carcinoma inflamatório é uma entidade clínica-patológica caracterizada por eritema e edema (peau d'Orange) envolvendo um terço ou mais da pele da mama. Estas mudanças de pele são devido ao Linfedema causada por tumor dentro de linfáticos dérmicos. Embora a participação linfática dérmica suporta o diagnóstico de câncer de mama inflamatório, é necessário, na ausência de achados clínicos clássicos, para o diagnóstico de câncer de mama inflamatório.
- ¥ Se um câncer foi designado como inflamatória antes da quimioterapia neoadjuvante, o paciente será designado para ter câncer de mama inflamatório em todo, mesmo se o paciente tem resolução completa das conclusões inflamatórias.
- ‡ Detectada clinicamente é definido como detectar estudos imagens (excluindo limfocintilografia) ou pelo exame clínico e com características altamente suspeitas para malignidade ou um macrometastasis patológico presumida com base em biópsia de

aspiração de agulha fina com exame citológico. Confirmação de, clinicamente detectada, doença metastática por aspiração de agulha fina sem biópsia de excisão é designada com um sufixo (f), por exemplo, cN3a(f). Biópsia excisional de um linfonodo ou biópsia de um nó sentinela, na ausência de atribuição de um pT, é classificada como um clínico N, por exemplo, cN1. Informações sobre a confirmação do status nodal serão designadas em fatores de site específicos como aspiração de clínicos, fina agulha, biópsia de núcleo ou biópsia de Linfonodo Sentinela. Classificação patológica (pN) é usada para excisão ou biópsia de linfonodo sentinela apenas em conjunto com uma atribuição de t patológico.

- † Classificação baseia-se na dissecação de Linfonodo axilar com ou sem biópsia de Linfonodo Sentinela. Classificação baseada unicamente na biópsia de Linfonodo Sentinela sem Linfonodo axilar posterior, dissecação é designada (sn) para "nó de sentinela", por exemplo, pN0(sn).
- **Aglomerados de Célula tumoral (ITC) são definidos como pequenos aglomerados de células não superiores a 0,2 mm, ou pilhas do tumor único ou um cluster de menos de 200 células em uma única seção transversal histológica isolada. ITCs podem ser detectadas pela histologia de rotina ou por métodos de imuno-histoquímica (IHQ). Nós que contenham apenas ITCs são incluídos na contagem total nó positivo para fins de classificação N, mas devem ser incluídos no número total de nós avaliados.
- ••RT-PCR: transcriptase reversa/RT-PCR.
- ΔΔ "Não clinicamente detectado" é definido como não detectado por estudos (excluindo linfocintilografia) de imagem ou não detectados pelo exame clínico.
- ◇◇"Clinicamente detectado" é definido como detectado por imagem estudos (excluindo limfocintilografia) ou pelo exame clínico e com características altamente suspeitas para malignidade ou

macrometastase patológica presumida com base em biópsia de aspiração de agulha fina com exame citológico.

- §§ Estágio anatômico:
- -M0 inclui M0(i+).
- -PM0 designação não é válido; qualquer M0 deve ser clínica.
- -Se um paciente apresenta M1 antes da terapia sistêmica neoadjuvante, o estágio é considerado fase IV e permanece fase IV independentemente da resposta à terapia neoadjuvante.
- -Designação de fase pode ser alterada se, pós-cirúrgicas, estudos de imagem revelarem a presença de metástases distantes, desde que os estudos são realizados dentro de 4 meses de diagnóstico na ausência de progressão da doença e desde que o paciente não recebeu terapia neoadjuvante.
- -Terapia pós-neoadjuvante é designada com o prefixo "y". Para pacientes com uma resposta patológica completa (pCR) à terapia neoadjuvante, não é atribuído a nenhum grupo de estágio.
- ¥¥ T1 inclui T1mi.
- ‡‡ Tumores T0 e T1 com micrometastases nodal só são excluídos da fase II e classificados fase IB. (Usado com permissão do Comité Misto americana sobre câncer (AJCC), Chicago, Illinois. Fonte original para este material é o AJCC câncer Staging Manual, sétima edição (2010), publicado pela Springer New York, Inc.)

Anexo 4 - Webpage utilizada para o cálculo on-line da doença residual após Quimioterapia Neoadjuvante – Residual Cancer Burden – através do site do MD Anderson Cancer Center.

Residual Cancer Burden Calculator

*Values must be entered into all fields for the calculation results to be accurate.

(1) Primary Tumor Bed

Primary Tumor Bed Area: (mm) X (mm)

Overall Cancer Cellularity (as percentage of area): (%)

Percentage of Cancer That is *in situ* Disease: (%)

(2) Lymph Nodes

Number of Positive Lymph Nodes:

Diameter of Largest Metastasis: (mm)

Residual Cancer Burden:

Residual Cancer Burden Class:

The following parameters are required from pathologic examination in order to calculate Residual Cancer Burden (RCB) after neoadjuvant treatment:

1. The largest two dimensions (mms) of the residual tumor bed in the breast (largest tumor bed if multicentric disease)
2. Submission of the entire largest cross-sectional area of the residual tumor bed for histologic mapping, with specific identification of those slides in the pathology report (e.g. "the largest cross-sectional area of primary tumor bed was submitted in cassettes A5 - A9")
 - If the residual tumor is large (i.e. largest diameter > 5 cm), then at least 5 representative cassettes from the largest cross-sectional area are sufficient, but should be identified in the original pathology report (e.g. "representative sections from the largest cross-sectional area of primary tumor bed were submitted in cassettes A5 - A9")
3. Histologic assessment of the percentage of the tumor bed area that contains carcinoma (all carcinoma, i.e. invasive and in situ), select one of the following:
 - 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%
 - To assess cellularity it is helpful to scan across the sections of tumor bed and then estimate the average cellularity from the different microscopic fields.
 - When estimating percentage cancer cellularity in any microscopic field, compare the involved area with obvious standards, e.g. more or less than half, one quarter, one fifth, one tenth, one twentieth, etc.
 - Expect there to be variable cellularity within the cross section of any tumor bed, but estimate the overall cellularity from the average of the estimates in different microscopic fields of the tumor bed.
 - e.g. if cellularity in different fields of the tumor bed were estimated as 20%, 10%, 20%, 0%, 20%, 30%, then an average estimate of overall cellularity would be 20%.
4. Histologic estimate of the percentage of the carcinoma in the tumor bed that is in situ, select one of the following:
 - 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%
5. The number of positive (metastatic) lymph nodes
6. The largest diameter (mm) of the largest nodal metastasis

[Guide for Measuring Cancer Cellularity \(pdf\)](#)