

Avaliação da taxa de positividade do receptor HER2 e da influência de três tipos de biópsia mamária no resultado imunohistoquímico em mulheres com câncer de mama invasivo no Hospital Universitário de Brasília

Evaluation of the HER2 positivity rate and the influence of three types of breast biopsy in immunohistochemistry result in women with invasive breast cancer at the Brasília's University Hospital

Tatiane Oliveira Borges¹, Maria de Fátima Brito Vogt², Fernanda Cristina Afonso Salum³, Carlos Marino Cabral Calvano Filho^{3,4}, Miriam da Silva Wanderley⁵, Alberto Carlos Moreno Zaconeta⁵, João Carlos Félix Souza⁶

Descritores

Neoplasias da mama
Imunoistoquímica
Receptor erB-2
Biópsia percutânea
Biopsy core-large needle

Keywords

Breast neoplasms
Immunohistochemistry
Receptor, erB-2
Percutaneous biopsy
Biopsy core-large needle

RESUMO

Objetivo: Avaliar a taxa de positividade do HER2 em pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e verificar se o tipo de biópsia influencia no resultado da imunohistoquímica. **Métodos:** Estudo analítico, retrospectivo e descritivo, para o qual foram coletados dados de pacientes atendidas no período compreendido entre janeiro de 2009 a dezembro de 2010, sendo os critérios de inclusão: carcinoma infiltrante de mama, sexo feminino e anatomopatológico realizado no HUB. Foi feita uma planilha com os resultados do HER2 da imunohistoquímica e o tipo de biópsia realizada. Os dados foram analisados pelo teste de diferença de χ^2 . **Resultados:** Foram incluídas no estudo 134 pacientes. Dessa amostra, obteve-se uma frequência de positividade para o HER2 de 13,43%, de negatividade de 82,84% e de inconclusivo (2+) de 3,73%. A biópsia feita por *core biopsy* teve uma tendência à positividade (desvio 1,32), setor à negatividade (desvio -2,29) e por mastectomia foi indiferente (desvio 0,97). **Conclusões:** Baseando-se nesse resultado, o melhor tipo de biópsia para se realizar a imunohistoquímica é a *core biopsy*. A taxa de positividade do HER2 está abaixo da literatura. Por isso, sugerimos que o material enviado para imunohistoquímica deva ser criteriosamente preparado desde a coleta. Dessa forma, muito provavelmente, serão obtidos resultados, com tumores que superexpressam o HER2, mais próximos da literatura.

ABSTRACT

Purpose: To assess the rate of HER2 positivity in patients with breast cancer at Brasília's University Hospital (HUB) and to verify if the type of biopsy influences the outcome of immunohistochemistry.

Trabalho realizado no Hospital Universitário de Brasília (HUB) – Brasília (DF), Brasil.

¹Médica residente de Mastologia do HUB – Brasília (DF), Brasil.

²Professora Doutora de Ginecologia e Mastologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB); Chefe do Serviço de Mastologia do HUB – Brasília (DF), Brasil.

³Mastologista do HUB – Brasília (DF), Brasil.

⁴Mastologista da Unidade de Oncologia do Hospital Sírio Libanês – Brasília (DF), Brasil.

⁵Professores Adjuntos da Área de Ginecologia e Obstetrícia da UnB – Brasília (DF), Brasil.

⁶Professor Adjunto da Faculdade de Tecnologia da UnB – Brasília (DF), Brasil.

Endereço para correspondência: Tatiane Oliveira Borges – Quadra 203, lote 3, Edifício Portal das Andorinhas, Bloco D, apto. 601 – CEP 91939-360 – Brasília (DF), Brasil – E-mail: tatioborges@yahoo.com.br

Conflito de interesse: nada a declarar

Recebido em: 11/07/2012. Aceito em: 06/06/2013

Methods: *Observational, retrospective and descriptive study. The data were collected from patients treated from January 2009 to December 2010 and the selection criteria were: female patients with invasive breast cancer and with histopathological diagnosis carried out at HUB. A spreadsheet was made with the results of HER2 immunohistochemistry and the type of biopsy realized. Data were analyzed by χ^2 difference test. Results:* The study included 134 patients. In this sample, it was observed 13.43% of HER2 positivity frequency, 82.84% of negative and 3.73% was inconclusive (2+). Biopsy done by core biopsy had a tendency to positivity (1.32 deviation), by sector to negativity (-2.29 deviation) and lumpectomy was indifferent (0.97 deviation). **Conclusions:** *Based on this result, the best type of biopsy to perform immunohistochemistry is a core biopsy. The rate of HER2 positivity is below the literature. Therefore, we suggest that the material sent for immunohistochemistry should be carefully prepared from the collection. Thus, very probably, results will be obtained, with tumors that overexpress HER2, closer to the literature.*

Introdução

O câncer de mama é uma das neoplasias humanas mais comuns, correspondendo a 25% dos cânceres em mulheres e com grande impacto na morbidade e mortalidade feminina em todo o mundo^{1,2}. O principal desafio em pacientes com câncer de mama é a melhor forma de avaliar essas pacientes e prever a repercussão clínica da doença para que o tratamento mais apropriado possa vir a ser utilizado².

O receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) é um importante fator prognóstico e preditivo no câncer de mama³. Esse valor prognóstico do oncogene HER2 foi descrito pela primeira vez em 1987⁴. O HER2 é um membro da família dos fatores de crescimento epidérmico, está localizado no cromossomo 17q12 e codifica um produto proteico de 185 kDa, um receptor transmembrana com atividade de tirosina-quinase⁵.

A avaliação da agressividade biológica das células tumorais pode ser usada como fator prognóstico⁶. O HER2 está associado à maior agressividade da doença, pior prognóstico, menor sobrevida livre de doença, rápido crescimento tumoral, aumento do risco de recorrência após cirurgia, resistência à terapia hormonal e pouca resposta à quimioterapia convencional^{4,7,8}.

A amplificação do gene HER2 ou a superexpressão da proteína do HER2 é detectada em aproximadamente 20% dos carcinomas de mama^{1,4}, tendo variações descritas na literatura de 15 a 30%^{9,10}. Evidências experimentais têm mostrado que a amplificação do HER2 é um fator precoce para a tumorigênese mamária, destacando o HER2 como um alvo para tratamento¹¹.

O resultado do HER2 tem sido usado para determinar quais pacientes com tumores primários provavelmente responderiam ao trastuzumab, um anticorpo monoclonal direcionado ao HER2². O trastuzumab tem sido utilizado tanto para melhorar a resposta clínica da doença metastática quanto no

tratamento adjuvante nas pacientes com câncer de mama invasivo e com HER2+, como terapia adjuvante combinado ou após a quimioterapia^{9,12}.

O mecanismo de ação do trastuzumab ainda é incerto. Existe um trabalho de revisão sistemática, com nível de evidência 2A¹³, defendendo a ação do trastuzumab na regulação ou na inibição da transmissão do HER2. Além disso, mostra o trastuzumab com ação antiangiogênica, inibição da divisão proteica e indução da toxicidade celular dependente de anticorpo contra as células tumorais¹⁴.

A positividade do HER2 determina a indicação da terapia alvo com o trastuzumab. Por isso, é importante o uso de métodos simples, precisos, amplamente aplicáveis e reproduzíveis para rastrear tumores com amplificação e/ou superexpressão deste gene¹⁵. Dois métodos são normalmente usados e recomendados: *fluorescent in situ hybridization* (FISH), um método quantitativo para detecção de genes amplificados, e a análise imunohistoquímica (IHQ) para a detecção de expressão proteica¹⁶.

A IHQ é oferecida na maioria dos laboratórios, e embora seja relativamente barata e de fácil execução, é susceptível a variações na fixação e processamento dos tecidos. Além disso, a IHQ tem limitações tanto na variabilidade da especificidade e sensibilidade dos anticorpos, quanto na subjetividade da interpretação dos resultados. Estes problemas são resolvidos pelo método FISH, que apesar do alto custo é um método quantitativo e permite uma melhor análise dos dados^{17,18}.

A Sociedade Americana de Oncologistas e o Colégio de Patologistas Americanos recomendam que, no teste do HER2, as categorias devam ser claramente definidas como positivo (IHQ 3+), inconclusivo (IHQ 2+) e negativo (IHQ 0/1+). A categoria inconclusiva (2+) gera confusão quanto ao tratamento com trastuzumab, portanto requer a adição do teste de FISH¹⁹.

A importância do HER2 como marcador prognóstico, preditivo e terapêutico no câncer de mama invasivo é bem

reconhecida e, portanto, é fundamental uma avaliação acurada da presença do HER2. Os objetivos do presente estudo foram verificar a taxa de positividade do HER2 nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama no Hospital Universitário de Brasília, compará-la com a descrita na literatura e analisar se o tipo de biópsia influencia no resultado da imunohistoquímica.

Métodos

Trata-se de um estudo analítico, retrospectivo e descritivo, para o qual foram coletados dados de pacientes atendidas no serviço de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), com diagnóstico de câncer de mama, no período compreendido entre janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Na imunohistoquímica, foram analisados o resultado do HER2 e o tipo de biópsia realizada. Cada paciente teve o teste HER2 analisado uma única vez, sendo a imunohistoquímica feita somente em um tipo de biópsia.

Foram considerados como critério de inclusão sexo feminino, anatomopatológico realizado no HUB e diagnóstico histopatológico de carcinoma infiltrante. Foram excluídas as pacientes com carcinoma *in situ*, com dados de imunohistoquímica insuficientes ou que não se enquadrassem nos critérios de inclusão.

Amostra

A amostra foi composta por 134 biópsias de pacientes que realizaram imunohistoquímica após o diagnóstico de carcinoma mamário.

Os exames executados foram feitos a partir de três tipos de biópsia:

1. *Core biopsy* (biópsia realizada por agulha grossa, calibre 14G).
2. Setor, nódulo, quadrante, biópsia incisional ou excisional (aproximadamente 2 a 10 cm).
3. Mastectomia.

Hipóteses

A hipótese em questão visou testar, conforme os resultados da amostra, a existência de diferenças estatisticamente significativas das proporções de positividade dos tipos de procedimentos de biópsia. Portanto, pretendeu-se concluir sobre a taxa de positividade desse exame, HER2, e conferir se o tipo de biópsia 1, 2 e 3 alteraria o resultado.

A imunohistoquímica realizada no Serviço de Anatomia Patológica do HUB utiliza como método de coloração a LSAB (Estreptavidina/Biotina). Os resultados do exame de HER2 podem ser considerados, independentemente do tipo de biópsia, como: positivo (3+), negativo (1+) e inconclusivo ou indeterminado (2+). Os símbolos (+) são para resultados positivos, (-) resultados negativos e (2+) inconclusivos. Foi feita a tentativa de se fazer o FISH nas pacientes com teste HER2

inconclusivo (2+), mas com alguns resultados insatisfatórios e como não foi possível realizar em todas as pacientes, não houve mudança no resultado.

No experimento, apurou-se a eficácia dos diferentes tipos de biópsia para o diagnóstico: 1, 2 e 3 como descritos anteriormente. Foi elaborado um banco de dados utilizando-se uma planilha do programa Excel para *Windows*[®]. As pacientes foram identificadas pelo número do prontuário e os dados analisados pelo teste de diferença do χ^2 ²⁰, com a intenção de se comparar as frequências esperadas de resultados positivos, negativos ou inconclusivos, com os tipos de biópsias. Era esperado que os resultados, proporcionalmente à quantidade utilizada para cada tipo de biópsia, fossem compatíveis ou iguais.

Em concordância às normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) de 1996²¹, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília (UnB), sob o Registro nº 101/11, em 14 de Setembro de 2011.

Resultados

Os resultados para 134 pacientes foram 18 positivos (13,43%), 111 negativos (82,84%) e 5 (3,73%) inconclusivos (Tabela 1 e Figura 1).

A Tabela 1 mostra que entre os tipos de biópsia, 72 (53,73%) foram feitos com *core biopsy*, 30 (22,39%) por mastectomia e 32 (23,88%) por setor. Das 72 pacientes submetidas a *core biopsy*, a taxa de positividade obtida foi de 15,28%, semelhante às obtidas nas pacientes submetidas

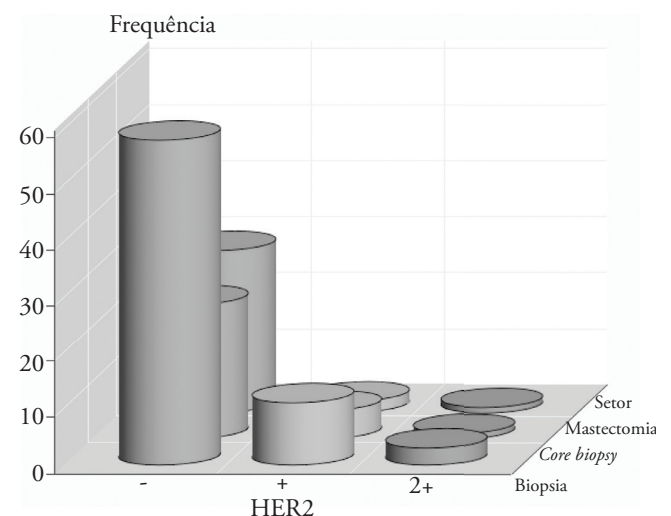


Figura 1. Distribuição do HER2 em três dimensões.

à mastectomia. Não houve diferença estatística para os casos negativos ou inconclusivos.

Testes

Os resultados dos testes estatísticos foram conclusivos, embora no limite de significância. Eles demonstram que, na imunohistoquímica do HER2 obtida por *core biopsy*, houve tendência de positividade estatisticamente significativa.

Conforme a Tabela 2, a frequência, que atesta positividade, é de 11 na *core biopsy* na situação esperada por χ^2 (teste estatístico de confirmação de frequência) que deveria ser de 9,67. Da

mesma forma, nas situações de negatividade, a frequência foi de 58, e a esperada de 59,64, o que comprova, embora no limite de significância, que no teste em questão exista a tendência a ser positivo. No caso da biópsia realizada por setor, o resultado mostrou diferença significativa contrária à *core biopsy*. Isso significa tendência à negatividade. O resultado da mastectomia, embora com pouca aplicação e reduzida amostra, mostrou equilíbrio de proporcionalidade nas frequências.

A Figura 2 mostra os desvios e a diferença entre a frequência observada menos a frequência esperada para os resultados positivos. Essa diferença que irá compor a estatística χ^2 . A diferença

Tabela 1. HER2 versus biópsia

HER2	Biópsia			Total
	Core biopsy	Mastectomia	Setor	
+ Frequência	11	5	2	18
Percentual	8,21	3,73	1,49	13,43
Linha paciente	61,11	27,78	11,11	
Coluna paciente	15,28	16,67	6,25	
- Frequência	58	24	29	111
Percentual	43,28	17,91	21,64	82,84
Linha paciente	52,25	21,62	26,13	
Coluna paciente	80,56	80,00	90,63	
2+ Frequência	3	1	1	5
Percentual	2,24	0,75	0,75	3,73
Linha paciente	60,00	20,00	20,00	
Coluna paciente	4,17	3,33	3,13	
Total Frequência	72	30	32	134
Percentual	53,73	22,39	23,88	100,00

Tabela 2. HER2 e biópsia

HER2	Biópsia			Total
	Core biopsy	Mastectomia	Setor	
+ Frequência	11	5	2	18
Esperado	9,6716	4,0299	4,2985	
Desvio	1,3284	0,9701	-2,299	
Cell Chi-Square	0,1824	0,2336	1,2291	
Linha paciente	61,11	27,78	11,11	
Coluna paciente	15,28	16,67	6,25	
- Frequência	58	24	29	111
Esperado	59,624	24,851	26,507	
Desvio	-1,642	-0,851	2,4925	
Cell Chi-Square	0,0452	0,0291	0,2344	
Linha paciente	52,25	21,62	26,13	
Coluna paciente	80,56	80,00	90,63	
2+ Frequência	3	1	1	5
Esperado	2,6866	1,1194	1,194	
Desvio	0,3134	-0,119	-0,194	
Cell Shi-Square	0,0366	0,127	0,0315	
Linha paciente	60,00	20,00	20,00	
Coluna paciente	4,17	3,33	3,13	
Total Frequência	72	30	32	134

positiva representa o quanto a frequência observada sobrepõe à esperada, indicando tendência a resultados positivos no tipo de teste. No caso do tipo de biópsia de setor a indicação se inverte, isto é, o quanto o teste empírico deveria medir positividade e não o fez.

Nos demais casos (Figuras 3 e 4), a representação é a mesma para uma situação empírica de resultados negativos e inconclusivos, ou seja, a biópsia por setor mostrou mais valores negativos e inconclusivos que as biópsias por *core biopsy* e mastectomia.

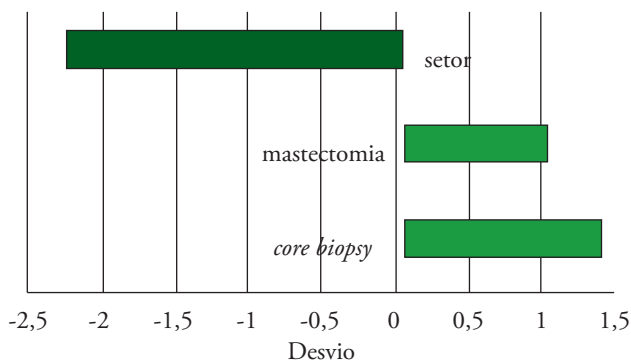


Figura 2. Desvio do valor esperado de HER2 positivo (+)

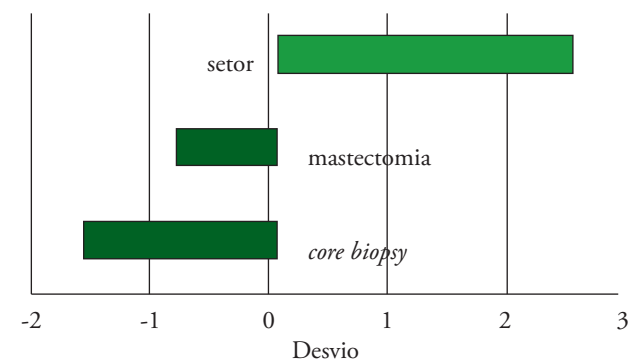


Figura 3. Desvio do valor esperado de HER2 negativo (-)

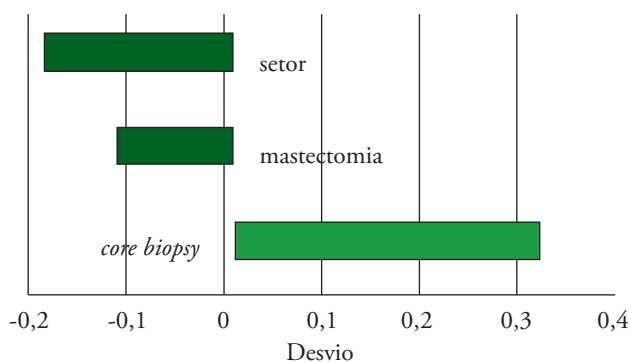


Figura 4. Desvio do valor esperado de HER2 inconclusivo (2+)

Discussão

A expressão do HER2 ocorre entre 15 a 30% dos carcinomas invasivos de mama^{9,10,22}. A amplificação do HER2 é um fator prognóstico individual para prever a agressividade do tumor e o benefício da terapia adjuvante. Sjogren et al.²³ relataram que a expressão do HER2 representa um impacto prognóstico independente de outros fatores, como o comprometimento axilar, o grau histológico, tamanho do tumor e os receptores hormonais.

O trastuzumab suprime a atividade do HER2, assim como facilita a apoptose celular. Ensaios clínicos mostram que o risco relativo de recorrência diminui em 50% quando o trastuzumab é adicionado ao regime de quimioterapia adjuvante em pacientes com HER2 positivo¹⁹.

A importância dessa pesquisa está na comparação da taxa de positividade do HER2 da literatura com a encontrada nas pacientes do HUB, analisando-se com o tipo de biópsia à qual a paciente foi submetida. Além disso, busca-se evitar o subdiagnóstico e oferecer o trastuzumab como mais uma opção terapêutica a essas pacientes.

A taxa de positividade do HER2 encontrada no presente estudo foi de 13,43%. Esse resultado está abaixo da taxa descrita na literatura, que varia em torno de 20% nos carcinomas invasivos de mama^{24,25}. Dois trabalhos, com grau de recomendação B¹³, mostraram taxas maiores de positividade do HER2. Dimitrakakis et al.²⁶ realizaram uma pesquisa, em 121 pacientes, com 24,1% de taxa de positividade para o HER2. Outro estudo teve uma positividade semelhante, com superexpressão do HER2 em 21,5% das pacientes²⁷.

Analisando-se o tipo de biópsia com o resultado do HER2, a *core biopsy* teve tendência à positividade, com desvio de 1,32, mais próxima à descrita nos estudos. A imunohistoquímica realizada a partir dos setores teve a mais baixa frequência de positividade do HER2, com desvio de -2,29. A partir dessa análise, podemos questionar se o tipo de biópsia não está influenciando no resultado do HER2.

Alguns fatores influenciam na qualidade da biópsia realizada, como o tipo de fixador utilizado, a duração da fixação (insuficiente preservação de tecido pode levar a degradação proteica e reduzir a sensibilidade da imunohistoquímica), ou o método utilizado²⁸. A fixação deve ser feita em formol tamponado neutro a 10%, com o tempo de fixação ideal entre 6 e 48 horas. O tempo de fixação pode alterar a expressão antigênica das proteínas e uma fixação prolongada, por mais de 48 horas, pode levar a resultados falsos-negativos²².

Outro fator importante para a correta utilização do formol tamponado é a relação entre o volume da peça e o fixador, que deve ser de 1 para 20²⁹. A *core biopsy* geralmente possui maior quantidade de fixador para o volume da peça em nosso serviço e possui o menor tempo entre a retirada da peça e a fixação. Analisando a importância desses fatores, isso representaria

uma explicação para a menor taxa de positividade do HER2 no nosso caso?

O teste do HER2 é rotineiramente realizado por imunohistoquímica pela coloração de sua proteína e/ou por FISH, que determina a amplificação gênica¹¹. Entretanto, o *guideline* da Sociedade Americana de Oncologistas/Colégio Americano de Patologistas²⁰ conclui que aproximadamente 20% dos testes usados podem ser incorretos e imprecisos.

Um estudo realizado por Wludarski et al.¹ no Brasil mostra uma pobre concordância (34,2%) entre os resultados de laboratórios locais e o laboratório de referência (Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brasil). Os laboratórios locais tiveram 10,9% de falsos-positivos e 2,5% de falsos-negativos. Esses dados mostram que alguns laboratórios não estão seguindo as diretrizes para o teste do HER2. Nestes casos, a paciente será submetida a um tratamento desnecessário no falso-positivo, com os potenciais de toxicidade. Já no falso-negativo, deixará de receber mais uma opção terapêutica e de controle da doença.

Conclusão

Considerando-se a acurácia do teste do HER2 como fator importante para o tratamento das pacientes com câncer de mama, a análise da taxa de positividade do HER2 nas pacientes dessa pesquisa está abaixo da taxa descrita na literatura. Isso sugere que deva existir uma revisão desde o centro cirúrgico até a anatomia patológica, incluindo a conscientização da equipe de enfermagem, técnicos da anatomia patológica, mastologistas e patologistas. O cuidado tem que ser feito na escolha do frasco ideal para colocar a peça, no tempo entre a retirada da peça e sua fixação, na quantidade do fixador, no tempo de fixação e no preparo da peça para clivagem. A intenção é que se tenha mais diagnóstico de positividade no teste do HER2 nas pacientes candidatas ao tratamento com trastuzumab que por acaso estejam deixando de ter esse resultado.

Os resultados obtidos mostram que há, nas frequências observadas, tendência significativa, embora discreta, de positividade do teste HER2 quando a biópsia é realizada por *core biopsy*. Portanto, essa análise pode indicar, tecnicamente, que o tipo de biópsia direciona os resultados. Se a imunohistoquímica for realizada a partir da biópsia feita por *core biopsy*, serão obtidos dados sobre a taxa de positividade do HER2 mais próximos ao descrito na literatura. A confirmação de tal hipótese poderia ser aprofundada com comparações futuras dos três tipos de biópsia realizadas nos mesmos indivíduos.

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao mastologista do HUB, Gustavo de Castro Gouveia, que muito ensina e contribui para a

residência médica de Mastologia e para o funcionamento do serviço. À oncologista, Daniele Xavier Assad, e à patologista, Melissa Iole Da Cás Vita, pelo apoio e colaboração na pesquisa.

Referências

1. Wludarski SCL, Lopes LF, Berto e Silva TR, Carvalho FM, Weiss LM, Bacchi CE. HER2 testing in breast carcinoma very low concordance rate between reference and local laboratories in Brazil. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(2):112-8.
2. Rauser S, Marquardt C, Balluff B, Delninger SO, Albers C, Eckhard B, et al. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2010;9(4):1854-63.
3. Chen B, Shah S. Testing for HER2 in breast cancer: a continuing evolution. *Patholog Res Int*. 2011;2011:903202.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/new oncogenes. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
5. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
6. Agrawal AK, Jelen M, Rudnicki J, Grzebieniak Z, Zukrowski P, Nienartowick E. Molecular markers (c-erbB-2, p53) in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(4):449-55.
7. Ross JS, Fletcher JA. The HER2/neu oncogene in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer*. 2000;16:170-6.
8. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koener F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*. 1994;330(18):1260-6.
9. Minot DM, Kipp BR, Root RM, Meyer RG, Reynolds CA, Nassar A, et al. Automated cellular imaging system III for assessing HER2 status in breast cancer specimens: development of a standardized scoring method that correlates with FISH. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(1):133-8.
10. Slamon DF, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-12.
11. Kovács A, Stenman G. HER2-testing in 538 consecutive breast cancer cases using FISH and immunohistochemistry. *Pathol Res Pract*. 2010;206(1):39-42.
12. Nishimura R, Okumura Y, Arima N. Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer: time to progression and survival. *Breast Cancer*. 2008;15(1):57-64.
13. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes – Texto Introdutório. AMB/CFM; 2008. pp 3-5 [cited 2012 Feb 27]. Available from: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/texto_introdutorio.pdf
14. Moasser MM. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene*. 2007;26(46):6577-92.
15. Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(4):563-70.
16. Vogel CL, Franco SX. Clinical experience with trastuzumab (herceptin). *Breast J*. 2003;9(6):452-62.
17. Francz M, Egervari K, Kardos L, Toth J, Nemes Z, Szanto J, et al. Comparison of Pathvysion and Poseidon HER2 FISH assays in measuring HER2 amplification in breast cancer: a validation study. *J Clin Pathol*. 2010;63(4):341-6.

18. Gong Y, Sweet W, Duh YJ, Greenfield L, Fang Y, Zhao J, et al. Chromogenic in situ hybridization is a reliable method for detecting HER2 gene status in breast cancer: a multicenter study using conventional scoring criteria and the new ASCO/CAP recommendations. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(4):490-7.
19. Yosepovich A, Avivi C, Bar J, Polak CS, Mardoukh C, Barshack I. Breast cancer HER2 equivocal cases: is there an alternative to FISH testing? A pilot study using two different antibodies sequentially. *Isr Med Assoc J*. 2010;12(6):353-6.
20. Hair JFJ, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Análise multivariada de dados*. São Paulo: Artmed, 2009.
21. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Resolução nº 196/96 de 14 de maio de 1996. Brasília: Ministério da Saúde; 1996.
22. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43.
23. Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*. 1988;16(2):462-9.
24. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. HER2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004;291(16):1972-7.
25. Rasmussen BB, Anderson M, Christensen IJB, Moller S. Evaluation of and quality assurance in HER2 analysis in breast carcinomas from patients registered in Danish Breast Cancer Group (DBCG) in the period of 2002-2006. A nationwide study including correlation between HER-2 status and other prognostic variables. *Acta Oncol*. 2008;47(4):784-8.
26. Dimitrakakis C, Konstadoulakis M, Messaris E, Kymionis G, Karayannis M, Panousopoulos D, et al. Molecular markers in breast cancer: can we use c-erbB-2, p53, bcl-2 and bax gene expression as prognostic factors? *Breast*. 2002;11(4):279-85.
27. Barron JJ, Cziraky MJ, Weisman T, Hicks DG. HER2 testing and subsequent trastuzumab treatment for breast cancer in a managed care environment. *Oncologist*. 2009;14(8):760-8.
28. Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen, Wlodarska I, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology*. 2005;46(4):431-41.
29. Le Botlan BJ, Mechin BG, Martin GJ. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry of formaldehyde in water. *Anal Chem*. 1983;55(3):587-91.