

# Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em *array* de carcinomas mamários

Primeira submissão em 01/02/07  
Última submissão em 05/06/07  
Aceito para publicação em 09/07/07  
Publicado em 20/10/07

## *Interobserver agreement in scoring immunohistochemical overexpression of Her2 detected by five different antibodies on tissue microarrays of breast carcinomas*

Cristiana Buzelin Nunes<sup>1</sup>; Rafael Malagoli Rocha<sup>2</sup>; Agostinho Pinto Gouvêa<sup>3</sup>; Luciene Simões de Assis Tafuri<sup>4</sup>; Vanessa Fortes Zschaber Marinho<sup>2</sup>; Marina Alvarenga Rezende<sup>5</sup>; Helenice Gobbi<sup>6</sup>

unitermos	resumo
Concordância interobservador	<p>Objetivo: Estudar a concordância interobservador na interpretação da superexpressão imuno-histoquímica para a proteína Her2 empregando diferentes anticorpos em <i>array</i> de carcinomas mamários. Material e método: Foi construído um <i>array</i> contendo dois cilindros (2 mm de diâmetro cada) de 25 carcinomas mamários. Cortes histológicos seriados do <i>array</i> foram submetidos à imuno-histoquímica utilizando-se cinco anticorpos anti-Her2: SP3 (NeoMarkers), HercepTest e A0485 (Dako), CB11 (Novocastra) e 4D5 (Genentech). Uma lâmina corada por cada anticorpo (total = cinco lâminas) foi submetida à avaliação individual por cinco observadores seguindo-se o sistema de escore proposto no HercepTest<sup>TM</sup>. Para a avaliação interobservador os resultados foram interpretados em três diferentes análises: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 e 1+; 2+ e 3+) e III (0 e 1+; 2+; 3+) e aplicado o teste estatístico de <i>kappa</i>. Resultados: A concordância interobservador foi boa quando os casos foram avaliados em quatro categorias (0; 1+; 2+; 3+). Quando avaliados em duas categorias (0 e 1+; 2+ e 3+), a concordância interobservador foi boa para os casos corados por SP3 e CB11 e muito boa para os corados por A0485, HercepTest e 4D5. Na análise III (0 e 1+; 2+; 3+), a concordância interobservador foi considerada moderada para os casos corados por CB11 e boa para os corados pelos outros anticorpos. Conclusão: A concordância interobservador foi considerada entre moderada e muito boa na avaliação dos cinco anticorpos. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos com marcações fraca (1+) e moderada (2+). A experiência dos observadores influenciou as taxas de concordância.</p>
Imuno-histoquímica	
Her2	
Carcinomas mamários	

## abstract

## key words

*Aim: To examine interobserver agreement in immunohistochemical evaluation of Her2 overexpression using five different antibodies on breast cancer array. Material and method: One array was built with two cores (2 mm diameter each) from 25 breast carcinomas. Serial sections from the array were submitted to immunohistochemistry using five anti-Her2 antibodies: SP3 (NeoMarkers), HercepTest and A0485 (Dako), CB11 (Novocastra), and 4D5 (Genentech). One slide immunostained for each antibody (total = five slides) were independently scored by five observers following HercepTest<sup>TM</sup> scoring system. Interobserver agreement was evaluated in three different analysis: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 and 1+; 2+ and 3+) and III (0 and 1+; 2+; 3+), and the kappa statistics was applied. Results: There was a good rate of interobserver agreement when the four scores were considered (0; 1+; 2+; 3+). When the scores were considered in two categories (0 and 1+; 2+ and 3+) the interobserver agreement rate was considered substantial for cases stained for SP3 and CB11, and almost perfect for cases stained for A0485, HercepTest and 4D5. For analysis III (0 and 1+; 2+; 3+), a moderate rate of interobserver agreement was considered for cases stained for CB11, and a substantial rate for other antibodies. Conclusion: The overall interobserver agreement was considered moderate to substantial in the evaluation of cases stained for the five antibodies. The lowest rate of agreement was obtained in the evaluation of the cases scored as weak (1+) and moderate (2+). The observers experience altered the concordance rates.*

*Interobserver agreement*  
*Immunohistochemical*  
*Her2*  
*Breast cancer*

1. Mestre em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM/UFMG), Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal.  
2. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Patologia na UFMG.  
3. Doutor em Patologia pela UFMG; médico-patologista do Hospital das Clínicas da UFMG.  
4. Doutora em Patologia pela UFMG; professora de Patologia Geral da Fundação Mineira de Educação e Cultura.  
5. Estudante de graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais.  
6. Professora-associada; doutora em Patologia do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM/UFMG.  
Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da FM/UFMG.  
Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## Introdução

A proteína Her2, um receptor de atividade tirosina-quinase, encontra-se superexpressa em cerca de 30% dos carcinomas ductais invasores, e a superexpressão protéica está geralmente associada à amplificação gênica<sup>(1)</sup>. A amplificação/superexpressão de Her2 está associada a tumores mamários de comportamento biológico agressivo, principalmente em pacientes com linfonodo positivo<sup>(23)</sup>. No entanto, em pacientes com linfonodo negativo esta associação ainda é pouco definida<sup>(8)</sup>. Os trabalhos pioneiros de Slamon et al. (1987) apontaram o Her2 como fator prognóstico independente no câncer de mama<sup>(24)</sup>. Estudos posteriores mostraram a sua associação com outros fatores prognósticos, entre eles comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, alto grau histológico, elevado índice proliferativo e ausência de expressão de receptores hormonais<sup>(4, 19)</sup>.

Tumores que superexpressam Her2 são menos responsivos a ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil (CMF) e tamoxifeno e mais responsivos às antraciclinas do que tumores sem superexpressão de Her2<sup>(13, 16)</sup>. A detecção do Her2 se tornou mais importante após a aprovação do trastuzumab, que, associado à quimioterapia, pode diminuir a progressão tumoral do carcinoma mamário invasor<sup>(13)</sup>. Existe, então, uma grande demanda clínica para detecção precisa do *status* do Her2 em carcinomas mamários invasores. Apesar de existir uma variedade de métodos diferentes para detectar o *status* do Her2, os dois testes recomendados na prática clínica são a imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de superexpressão protéica e a hibridação *in situ* para detecção de amplificação gênica<sup>(29)</sup>. A reação imuno-histoquímica é o teste de rotina mais atrativo para a avaliação do Her2 em carcinomas mamários devido ao menor custo, à facilidade técnica e à relevância biológica. A IHQ detecta a superexpressão protéica do Her2 localizada na membrana citoplasmática da célula tumoral. Há vários anticorpos mono e policlonais disponíveis comercialmente para o uso em IHQ com diferenças na sensibilidade e na especificidade, podendo resultar em variação na qualidade final das reações<sup>(8, 9)</sup>.

Assim, a escolha do anticorpo primário tem importância fundamental no resultado final do teste imuno-histoquímico, o que poderá influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente individualmente. Não há na literatura definição sobre quais anticorpos seriam mais específicos e sensíveis para a avaliação do Her2 através de IHQ<sup>(2, 8)</sup>.

A forma mais utilizada para avaliar a superexpressão da proteína Her2 na membrana detectada por IHQ é semi-

quantitativa e não-automatizada, empregando um sistema de escore proposto no HercepTest<sup>TM(3)</sup>. Esse sistema avalia a proporção de células com membrana corada e a intensidade da reação, gerando uma escala de quatro pontos que varia de zero ("0") a três ("3"). O emprego dessa escala tem variações de interpretação que dependem da qualidade técnica da reação, do tipo de anticorpo empregado e da experiência do examinador. Mesmo para um patologista treinado, a distinção nítida entre categorias nominais é difícil e geralmente arbitrária, e tem sido demonstrada falta de reprodutibilidade na determinação da superexpressão do Her2, principalmente das categorias intermediárias (1+ e 2+)<sup>(14)</sup>.

Estudos de comparação do teste imuno-histoquímico para detecção de superexpressão do Her2 entre laboratórios mostram maior índice de concordância entre laboratórios de referência, destacando a importância do treinamento com maior volume de casos analisados e experiência do patologista<sup>(6, 15)</sup>.

Alguns estudos abordaram variações na técnica imuno-histoquímica para determinação do Her2, principalmente comparando diferentes anticorpos mono e policlonais<sup>(20, 22, 28)</sup>, incluindo trabalhos de nosso grupo<sup>(8, 9)</sup>. No entanto, há poucos estudos sobre a variação interobservador na análise da reação IHQ para Her2<sup>(10, 11, 24, 26, 27)</sup>.

No presente trabalho decidimos estudar a variação na interpretação da reação imuno-histoquímica para Her2 empregando diferentes anticorpos em *array* de carcinomas mamários.

## Material e método

Foram selecionados 25 carcinomas mamários diagnosticados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM/UFMG). A partir da revisão das lâminas originais foram selecionados os blocos de parafina contendo amostras representativas dos tumores. Dois cilindros de 2 mm de diâmetro foram obtidos de cada bloco doador, construindo-se um *array* com 50 amostras de carcinomas. Foram incluídos ainda três cilindros de fígado (cilindros iniciadores de leitura) e dois de tumores previamente testados utilizados como controles negativo e positivo, totalizando 55 cilindros. O *array* foi construído utilizando-se um equipamento alternativo não-comercial desenvolvido e validado no próprio laboratório<sup>(18)</sup>. O bloco do *array* foi submetido a cortes histológicos seriados de 4 µm, colhendo-se as secções em lâminas silanizadas, que foram numeradas seqüencialmente. A primeira e a última lâmina foram coradas por hematoxilina

e eosina. As lâminas dos intervalos foram coradas pela IHQ utilizando-se cinco diferentes anticorpos. Os anticorpos utilizados, suas diluições e métodos de reativação antigênica estão listados na **Tabela 1**. Para o HercepTest foi empregado o respectivo *kit*, seguindo-se as instruções do fabricante. Para os demais anticorpos o método empregado foi o da estreptoavidina-biotina-peroxidase (SABP) (Biogenex®, San Ramon, EUA). Dependendo do anticorpo primário, nenhum pré-tratamento, tratamento com tripsina (Sygma, St. Louis, EUA) ou com solução de citrato em calor úmido (10 mM, pH 6) foi utilizado para reativação antigênica (Tabela 1). A revelação foi feita com diaminobenzidina (Liquid DAB, Dako, Carpinteria, EUA) e a contracoloração, com hematoxilina de Harris. Os protocolos de reação foram previamente padronizados e validados no laboratório para uso em pesquisa<sup>(7, 8)</sup> e rotina clínica.

Cinco lâminas do *array* de câncer de mama coradas por SP3, HercepTest, A0485, CB11 e 4D5 foram distribuídas a cinco observadores (C.B.N., A.P.G., V.F.Z.M., L.S.A.T. e H.G.). Todos eles tinham experiência prévia na avaliação do Her2 por imuno-histoquímica variando de quatro a 10 anos. As lâminas foram codificadas por um dos pesquisadores (M.A.R.) e analisadas individualmente e em separado pelos observadores, sem que tivessem conhecimento do tipo de anticorpo e do resultado da leitura das reações feitas pelos demais colegas. Todos os observadores receberam uma planilha contendo campos correspondentes à disposição dos discos de tumores no *array* para cada uma das cinco lâminas. Eles preencheram as planilhas de acordo com sua

interpretação do estudo imuno-histoquímico de cada um dos cinco anticorpos, empregando o sistema de escore do HercepTest<sup>TM(3)</sup>.

Para a avaliação da concordância interobservador, os resultados foram interpretados em três diferentes análises. Na análise I, os resultados foram considerados separadamente em quatro categorias (0; 1+; 2+ e 3+); na análise II, em duas categorias, agrupando-se os casos classificados como 0 e 1+ (casos negativos) e os casos 2+ e 3+ (casos positivos), como se faz na interpretação do HercepTest. Na análise III, os casos foram considerados em três categorias, sendo os casos 0 e 1+ considerados negativos, os casos 2+ indeterminados e os casos 3+ positivos, seguindo as recomendações para avaliação do Her2 pelo Colégio Americano de Patologistas/Sociedade Americana de Oncologia Clínica<sup>(29)</sup> e a atualização das normas do programa de qualidade do Reino Unido<sup>(5)</sup>.

## Análise estatística

A avaliação da concordância interobservador na leitura das reações foi realizada utilizando-se o teste estatístico de *kappa* ( $\kappa$ ). Os valores de  $\kappa$  foram divididos em intervalos para avaliar o grau de concordância segundo os critérios de Landis e Koch<sup>(12)</sup>. O grau de concordância foi considerado baixo quando o valor do *kappa* ficou entre 0 e 0,2; razoável, entre 0,21 e 0,4; moderado, entre 0,41 e 0,6; bom, entre 0,61 e 0,8; e muito bom, entre 0,8 e 1.

**Tabela 1** Anticorpos, fabricantes, diluições e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Tipo de anticorpo	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
SP3	Monoclonal, coelho	NeoMarkers, EUA	1:300	Citrato pH 6 por 25' em panela a vapor a 98°C
HercepTest	Policlonal, coelho	Dako, EUA	Pronto para uso	Citrato por 40' em banho-maria a 98°C
A0485	Policlonal, coelho	Dako, EUA	1:750	Citrato pH 6 por 25' em panela a vapor a 98°C
CB11	Monoclonal, camundongo	Novocastra, RU	1:80	Não realizada
4D5	Monoclonal, camundongo	Genentech, EUA	1:250	Tripsina por 5'

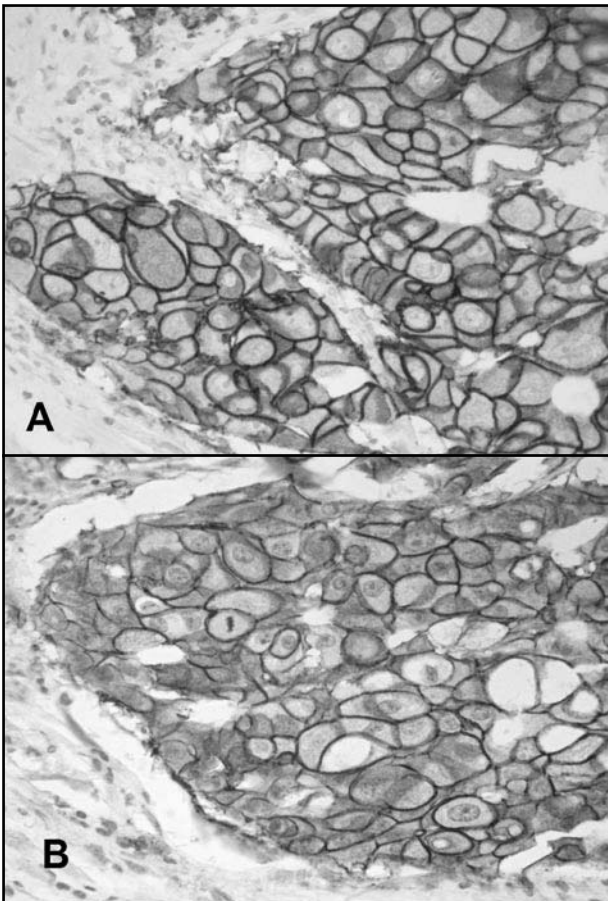
EUA = Estados Unidos da América; RU = Reino Unido.

## Resultados

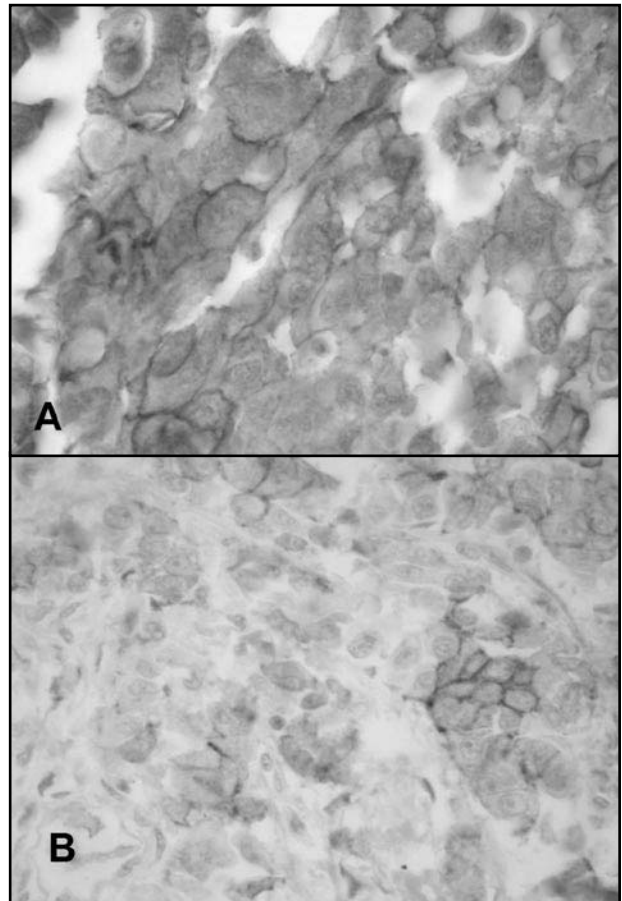
Os resultados da concordância entre os cinco observadores para cada anticorpo em cada um dos três grupos analisados estão sumarizados na **Tabela 2** e ilustrados nas **Figuras 1 e 2**.

A concordância geral entre os cinco observadores para avaliação de cada anticorpo nas três diferentes análises

foi considerada de moderada a muito boa ( $\kappa = 0,596$  a  $0,872$ ). A melhor concordância foi observada quando os resultados foram agrupados em 0 e 1+; 2+ e 3+ (análise II) para as lâminas coradas pelos cinco anticorpos. A concordância interobservador foi muito boa nesta análise para as lâminas coradas pelos anticorpos A0485, Herceptest e 4D5 ( $\kappa = 0,872$ ;  $0,858$  e  $0,855$ , respectivamente). A menor concordância entre os observadores foi obtida quando



**Figura 1** – Caso 23 corado pelos anticorpos SP3 (A) e CB11 (B) e avaliado com escore 3+ por todos os observadores (400x)



**Figura 2** – Caso 22 corado pelo anticorpo CB11 (A) e caso 4 corado pelo Herceptest (B), ambos analisados com escores variáveis (1+, 2+ ou 3+) pelos observadores (400x)

**Valores de kappa na avaliação da concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica do Her2 usando cinco diferentes anticorpos e considerando três formas de análise dos resultados**

**Tabela 2**

Anticorpo	Valor de kappa (intervalo de confiança)		
	Análise I (0; 1+; 2+; 3+)	Análise II (0 e 1+; 2+ e 3+)	Análise III (0 e 1+; 2+; 3+)
SP3	0,641 (0,567-0,716)	0,771 (0,653-0,888)	0,701 (0,609-0,793)
A0485	0,609 (0,540-0,679)	0,872 (0,764-0,98)	0,708 (0,791-0,625)
Herceptest	0,658 (0,585-0,731)	0,858 (0,751-0,964)	0,706 (0,620-0,677)
CB11	0,611 (0,541-0,68)	0,747 (0,641-0,853)	0,596 (0,516-0,677)
4D5	0,636 (0,575-0,696)	0,855 (0,764-0,945)	0,621 (0,621-0,765)

as reações foram analisadas em quatro categorias: 0; 1+; 2+; 3+ (análise I) nas lâminas coradas por SP3, A0485 e HercepTest ( $\kappa = 0,641$ ;  $0,609$  e  $0,658$ , respectivamente). A menor concordância interobservador foi obtida quando os casos 2+ foram analisados separadamente (análise III) nas lâminas coradas por 4D5 ( $\kappa = 0,621$ ) e CB11 ( $\kappa = 0,596$ ), e foi interpretada como moderada nas lâminas coradas por CB11. Os casos corados pelos anticorpos policlonais (HercepTest e A0485) mostraram marcação mais forte das reações, e os anticorpos monoclonais mostraram marcação mais fraca do que o RabMab SP3.

Quando avaliada a concordância interobservador entre os três observadores (C.B.N., A.P.G., H.G.) com maior experiência na avaliação imuno-histoquímica do Her2 (superior a quatro anos), o valor de *kappa* variou de  $0,765$  a  $0,972$  nas três diferentes análises.

## Discussão

A detecção correta do Her2 assegura que pacientes com tumores que superexpressam Her2 recebam tratamento adequado e que uma terapêutica com trastuzumab, de custo elevado e potencialmente tóxico, não seja indicada a pacientes com tumores sem superexpressão da proteína Her2. Dificuldades na consistência da avaliação IHQ do Her2 têm sido atribuídas ao uso de anticorpos diferentes, com distinções nas fases pré-analítica e analítica da reação<sup>(17, 28)</sup>.

Recentemente surgiu uma nova geração de anticorpos monoclonais de coelho (RabMabs), cujos fabricantes relatam ter altas afinidade, sensibilidade e especificidade, com marcação bem definida na IHQ<sup>(21)</sup>. Em nosso trabalho, estudamos a concordância interobservador em lâminas coradas por anticorpos monoclonais de camundongo, anticorpos policlonais e incluímos o novo anticorpo monoclonal de coelho, o SP3.

O sistema de escore mais empregado e aceito na avaliação das reações IHQs para Her2 é o proposto pelo HercepTest<sup>TM</sup>. Nesse sistema os casos 0 e 1+ são considerados negativos, enquanto 2+ e 3+, positivos fraco (2+) e forte (3+). No entanto, mais recentemente, as recomendações para a avaliação do Her2 do Colégio Americano de Patologistas e da Sociedade Americana de Oncologia Clínica<sup>(29)</sup> e a atualização das normas do programa de qualidade do Reino Unido<sup>(5)</sup> propõem que todos os casos avaliados como 2+ na IHQ devem ser considerados indeterminados. Esses casos devem ser reavaliados por testes mais específicos, como a hibridação *in situ* fluorescente, para definição de tratamento<sup>(5, 29)</sup>. Assim, resolvemos interpretar os resultados

dos nossos casos avaliados pelos diferentes observadores de três formas, considerando na primeira as categorias em separado; na segunda, agrupadas como no HercepTest<sup>TM</sup>; e, na terceira, como sugerido nos novos guias de recomendações dos Estados Unidos e do Reino Unido. Também nesses guias, os laboratórios e patologistas que realizam as reações para Her2 devem ter protocolos de reações validados, utilizar procedimentos qualificados e participar de testes de creditação, proficiência e competência. Em nosso trabalho empregamos protocolos de reação previamente padronizados e bem estabelecidos em nosso laboratório há 10 anos, considerados controle da fase analítica da reação<sup>(7, 8)</sup>. No presente trabalho procuramos avaliar a variação interobservador na interpretação das reações, que é considerada a fase pós-analítica da reação imuno-histoquímica.

A avaliação da superexpressão da proteína Her2 nas lâminas coradas pelos cinco anticorpos mostrou níveis de concordância interobservador satisfatórios ( $\kappa 0,596$  a  $0,872$ ). A interpretação dos resultados em três análises mostrou melhor concordância quando agrupamos os casos em negativos (0 e 1+) e positivos (2+ e 3+). A maior concordância interobservador ocorreu na análise dos casos fortemente positivos (3+) e totalmente negativos (0). Semelhante ao descrito por outros autores, há maior dificuldade na discriminação das categorias intermediárias (1+ e 2+), pois a marcação pode ser heterogênea, com áreas em que a membrana está marcada completamente, ou incompletamente, ou não está marcada, e com diferenças na intensidade de marcação, dificultando a interpretação. O método de interpretação é arbitrário, semiquantitativo e dependente da qualidade da reação e de treinamento do examinador. Quando resultados da reação imuno-histoquímica são comparados com métodos de hibridação *in situ*, nota-se um número significativo de casos falso-positivos, principalmente aqueles interpretados como 2+, justificando a adoção de critérios propostos mais recentemente de se considerarem os casos 2+ indeterminados ou *borderline*<sup>(10, 24, 27)</sup>, devendo ser confirmados por métodos de hibridação *in situ*.

O guia de interpretação original da reação imuno-histoquímica para expressão da proteína Her2, HercepTest<sup>TM</sup>, aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA), tem demonstrado especificidade insuficiente. As novas recomendações para interpretação do Her2 em câncer de mama do Colégio Americano de Patologistas/Sociedade Americana de Oncologia Clínica indicam que mais de 30% das células neoplásicas invasoras (ao invés de 10%) devem mostrar coloração completa e forte da membrana celular para ser o resultado considerado positivo. O corte

em mais de 30% das células reflete uma experiência que vem se acumulando e mostrando que geralmente uma maior porcentagem de células será marcada se o caso for realmente 3+, em comparação com o corte de 10%, sendo a intenção de se utilizar 30%, diminuir a incidência de casos 3+ falso-positivos<sup>(29)</sup>.

A literatura tem ressaltado a importância da experiência com o método para a análise do Her2 (fase pós-analítica). Em nosso estudo, a maior concordância da análise entre observadores ( $\kappa = 0,765$  a  $0,972$ ) foi constatada entre os analisadores com maior experiência com o método (mais de quatro anos).

Notamos uma concordância maior nas lâminas coradas pelos anticorpos policlonais ( $\kappa = 0,609$  a  $0,872$ ), com mar-

cação mais forte, devido ao reconhecimento de múltiplos epitopos. O novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 mostrou marcação intermediária entre os anticorpos policlonais e monoclonais de camundongo ( $\kappa = 0,641$  a  $0,771$ ), estando de acordo com os relatos dos fabricantes<sup>(20)</sup>.

## Conclusão

A concordância geral entre os observadores foi considerada entre moderada e muito boa nos cinco anticorpos anti-Her2. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos com marcação fraca (1+) a moderada (2+). A experiência dos observadores influenciou as taxas de concordância.

## Referências

1. BANKFALVI, A. *et al.* Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, v. 37, n. 5, p. 411-9, 2000.
2. BILOUS, M. *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*, v. 16, n. 2, p. 173-82, 2003.
3. DAKO HERCEPTEST™. *A manual for interpretation*. Carpinteria, 1999.
4. DANDACHI, N.; DIETZE, O.; HAUSER-KRONBERGER, C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest*, v. 82, n. 8, p. 1007-14, 2002.
5. ELLIS, I. O. *et al.* Best Practice Nº 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*, v. 57, n. 3, p. 233-7, 2004.
6. FITZGIBBONS, P. L. *et al.* Interlaboratory comparison of immunohistochemical testing for HER2: results of the 2004 and 2005 College of American Pathologists HER2 Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey. *Arch Pathol Lab Med*, v. 130, n. 10, p. 1440-5, 2006.
7. GOUVEA, A. P. *et al.* Her-2/neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the Herceptest. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 1, p. 47-52, 2004.
8. GOUVEA, A. P. *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v. 14, n. 1, p. 103-8, 2006.
9. HANNA, W.; KAHN, H. J.; TRUDEAU, M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol*, v. 2, n. 8, p. 827-34, 1999.
10. HOANG, M. P. *et al.* HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, v. 113, n. 6, p. 852-9, 2000.
11. LACROIX-TRIKI, M. *et al.* High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer: A multicentre GEFPICS study. *Eur J Cancer*, v. 42, n. 17, p. 2946-53, 2006.
12. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-74, 1977.
13. MILES, D. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res*, v. 3, n. 6, p. 380-4, 2001.
14. Paik, S. *et al.* Real-world performance of HER2 testing: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*, v. 94, n. 11, p. 852-4, 2002.
15. PEREZ, E. A. *et al.* HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*, v. 24, n. 19, p. 3032-8, 2006.
16. PICCART, M. J.; DI LEO A.; HAMILTON, A. HER2. a "predictive factor" ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer*, v. 36, n. 14, p. 1755-61, 2000.
17. PRESS, M. F. *et al.* Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*, v. 20, n. 14, p. 3095-105, 2002.
18. ROCHA, R. M. *et al.* Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo

- imunoistoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 6, p. 477-82, 2006.
19. ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, v. 112, n. 1, suppl 1, p. S53-67, 1999.
  20. ROSSI, S. *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*, v. 124, n. 2, p.2 95-302, 2005.
  21. SALES, A. O.; RODRIGUES, S. J. P.; BACCHI, C. E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 4, p. 265-71, 2004.
  22. SAMPATANUKUL, P. *et al.* A two-phase study model for the standardization of HER2 immunohistochemical assay on invasive ductal carcinoma of the breast. *J Med Assoc Thai*, v. 88, n. 11, p. 1680-8, 2005.
  23. SCHNITT, S. J. Breast cancer in the 21st century: neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol*, v. 14, n. 3, p. 213-8, 2001.
  24. SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, n. 4785, p. 177-82, 1987.
  25. THOMSON, T. A. *et al.* HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, v. 14, n. 11, p. 1079-86, 2001.
  26. TSUDA, H. *et al.* Concordance in judgments among c-erbB-2 (HER2/neu) overexpression detected by two immunohistochemical tests and gene amplification detected by Southern blot hybridization in breast carcinoma. *Pathol Int*, v. 51, n. 1, p. 26-32, 2001.
  27. TSUDA, H. *et al.* Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by Herceptest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma. *Pathol Int*, v. 52, n. 2, p. 126-34, 2002.
  28. VINCENT-SALOMON, A. *et al.* Re: HER2 testing in the real world. *J Natl Cancer Inst*, v. 95, n. 8, p. 628; author reply p. 628-9, 2003.
  29. WOLFF, A. C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, v. 25, n. 1, p. 118-45, 2006.

---

**Endereço para correspondência**

Cristiana Buzelin Nunes  
Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de  
Medicina da UFMG  
Avenida Alfredo Balena, 190 – sala 305  
CEP 30130-100 – Belo Horizonte-MG  
e-mail: cristianabnunes@gmail.com