

Imuno-histoquímica no Diagnóstico de Câncer de Mama: Principais Marcadores Proteicos

Immunohistochemistry in Breast Cancer Diagnosis: Main Protein Markers

Victor Hugo Patuci da Silva¹ ; Tereza Raquel Xavier Viana¹ ; Juliana Isquierdo Miron¹ ;
Regiane Priscila Ratti² ; Larissa Teodoro Rabi³ 

¹Graduando(a) em Biomedicina, Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP), Itu-SP, Brasil. ²Doutora em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Docente do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP), Itu-SP, Brasil. ³Mestra em Ciências, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP), Itu-SP, Brasil.

*Autor correspondente: espacotr@hotmail.com.

Recebido: 27/04/2024 | Aprovado: 23/05/2024 | Publicado: 16/06/2024

Resumo

Introdução: O câncer de mama (CM) é uma neoplasia maligna que impacta consideravelmente a vida das mulheres, representando uma das principais causas de mortalidade. Sua prevalência e gravidade destacam a importância da pesquisa contínua para aprofundar o conhecimento sobre essa doença. **Objetivo:** Explorar o papel da imuno-histoquímica como uma ferramenta essencial no diagnóstico e avaliação prognóstica do CM. **Métodos:** Trata-se de uma revisão de literatura, utilizando artigos científicos nas bases de dados *US National Library of Medicine* (PubMed) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO). Para identificar os estudos pertinentes, foram empregados descritores do DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) com o operador booleano "AND", incluindo os termos "Breast cancer", "Immunohistochemistry" e "HER2+ protein". Textos completos gratuitos, publicados em revistas revisadas por pares, disponíveis em inglês e português, e estudos publicados no período de 2019 a 2023. Os estudos que não estavam diretamente relacionados ao tema proposto foram excluídos da análise. **Resultados:** A imuno-histoquímica demonstra eficácia na detecção precisa da proteína HER2+ no CM, sendo essencial para avaliar fatores prognósticos e diferenciar lesões no tecido mamário. Sua capacidade de identificação confiável da proteína e discriminação entre diferentes tipos de CM contribui para uma abordagem terapêutica mais precisa e personalizada, melhorando os desfechos clínicos das pacientes. **Conclusão:** A imuno-histoquímica é crucial no diagnóstico e compreensão do CM. Além de confirmar o diagnóstico, identifica a presença de HER2+ e outros marcadores, influenciando decisões terapêuticas e prognósticas. Essa abordagem personalizada promove um tratamento mais eficaz, destacando a importância da imuno-histoquímica na gestão do CM.

Palavras-chave: Câncer de mama. Imuno-histoquímica. Proteína HER2+.

Abstract

Introduction: Breast cancer (BC) is a malignant neoplasm that has a considerable impact on women's lives and is one of the main causes of mortality among women. Its prevalence and severity highlight the importance of ongoing research to deepen our understanding of this disease. **Objective:** To explore the role of immunohistochemistry as an essential tool in the diagnosis and prognostic evaluation of CM. **Methods:** This is a literature review using scientific articles from the US National Library of Medicine (PubMed) and Scientific Electronic Library Online (SciELO) databases. To identify the relevant studies, descriptors from DeCS (Health Sciences Descriptors) were used with the Boolean operator "AND", including the terms "Breast cancer", "Immunohistochemistry" and "HER2+ protein". Free full texts, published in peer-reviewed journals, available in English and Portuguese, and studies published between 2019 and 2023. Studies that were not directly related to the proposed topic were excluded from the analysis. **Results:** Immunohistochemistry demonstrates efficacy in accurately detecting the HER2+ protein in breast cancer, and is essential for assessing prognostic factors and differentiating lesions in breast tissue. Its ability to reliably identify the protein and discriminate between different types of BC contributes to a more precise and personalized therapeutic approach, improving patients' clinical outcomes. **Conclusion:** Immunohistochemistry is crucial in the diagnosis and understanding of breast cancer. In addition to confirming the diagnosis, it identifies the presence of HER2+ and other markers, influencing therapeutic and prognostic

decisions. This personalized approach promotes more effective treatment, highlighting the importance of immunohistochemistry in the management of BC.

Keywords: Breast cancer. Immunohistochemistry. HER2+ protein.

1 Introdução

O câncer de mama (CM) é um tumor maligno, resultante da proliferação descontrolada de células alteradas. Sendo a causa oncológica mais comum em mulheres, o CM pode levar a óbito caso não seja diagnosticado e tratado precocemente (Direito *et al.*, 2022). Essa neoplasia mamária pode ocasionar várias complicações, e seu tratamento é feito com o uso de quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia. Em alguns casos, é essencial realizar procedimentos cirúrgicos, como a mastectomia (remoção total da mama com margens livres) ou a lumpectomia (remoção apenas do tumor com margens livres). Quando necessário, a remoção dos linfonodos axilares e linfonodos sentinelas durante o procedimento cirúrgico visa evitar a reinfecção por células neoplásicas alojadas nos linfonodos (Bonacho *et al.* 2020; Magnoni *et al.*, 2020).

O CM não acomete apenas pacientes com predisposição genética, podendo afetar mulheres ao longo da vida, incluindo também o sexo masculino. Embora os casos de CM em homens representem apenas 1% do total, esse risco ainda persiste (Loibl *et al.*, 2021).

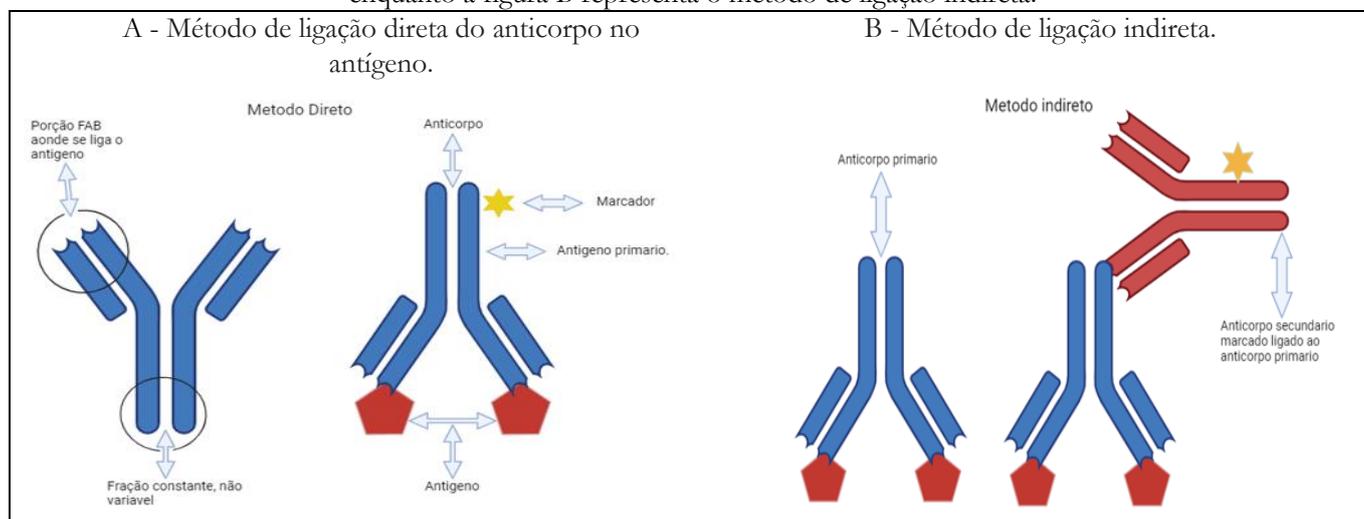
A compreensão de que o CM pode acometer mesmo sem predisposição genética é essencial, uma vez que fatores externos também podem contribuir para o desenvolvimento dessa neoplasia. Entre esses fatores estão a obesidade, considerada uma doença crônica não transmissível, além do estilo de vida, fertilidade prolongada, uso prolongado de contraceptivos hormonais, terapias de reposições hormonais, consumo elevado de álcool e, após a menopausa, o risco de incidência pode ser maior. Portanto manter atividades físicas mesmo após a menopausa é essencial (Zhang *et al.*, 2021).

É reconhecido subtipos do CM, como Luminal A e Luminal B, ambos positivos para progesterona e receptores hormonais. O Luminal B possui uma taxa de proliferação mais elevada em comparação ao Luminal A. Além disso, destaca-se o subtipo *HER2+*, bem como os carcinomas mamários basais também conhecidos como triplo-negativos; negativos para *HER2*, progesterona e receptores hormonais (Yin *et al.*, 2020; Holm *et al.*, 2020).

A técnica imuno-histoquímica (IHC), possui inúmeras aplicações no diagnóstico de patologias, inclusive o CM, sendo capaz de auxiliar na diferenciação dos subtipos e na avaliação do impacto da neoplasia na vida do paciente. Nos exames de IHC, duas estratégias são utilizadas para a detecção da patologia, mas nenhuma imunocoloração utilizada nas IHC é totalmente específica para o diagnóstico de CM. No exame pode-se empregar o método direto ou o método indireto. No método direto os anticorpos utilizados são marcados com compostos fluorescentes ou radioativos, os quais se ligam a esse anticorpo, permitindo a visualização no microscópio comum ou de fluorescência, quando utilizado um fluorocromo (figura 1 - A). Já no método indireto, além de um anticorpo primário, utiliza-se um anticorpo secundário com um marcador. Posteriormente, o anticorpo secundário se liga ao anticorpo primário, adquirindo uma sensibilidade mais

elevada (figura 1 – B). Isso ocorre porque os anticorpos secundários reagem de maneira distinta aos antígenos presentes no anticorpo primário, resultando em uma amplificação maior no sinal (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

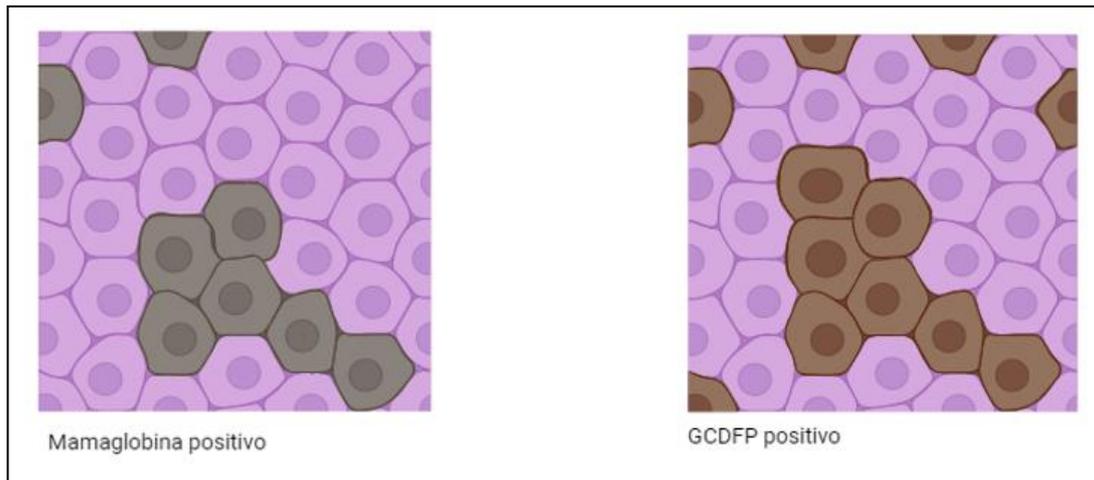
Figura 1: A figura A representa o método de ligação direta do anticorpo no antígeno no teste de imuno-histoquímica, enquanto a figura B representa o método de ligação indireta.



Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Algumas proteínas são utilizadas como marcadores nos exames de IHC para avaliar amostras do tecido mamário. Os testes de IHC utilizam anticorpos específicos para detectar a presença de proteínas nas amostras, auxiliando na compreensão dos diferentes tipos de células. Comumente, são utilizadas as proteínas mamaglobina e *Gross Cystic Disease Fluid Protein* (GCDFP). No entanto, vale destacar que GCDFP não é uma proteína em si, mas sim um derivado de uma proteína geralmente encontrado em tumores metastáticos. O diagnóstico precoce da neoplasia é essencial para o tratamento e contribui para a obtenção de um prognóstico favorável (Cambruzzi *et al.*, 2011).

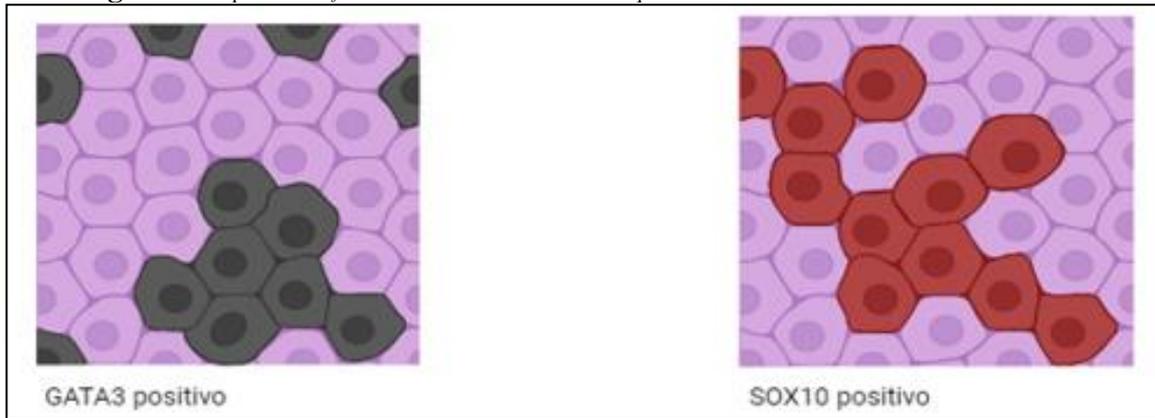
A mamaglobina tende a ser mais sensível que a GCDFP, mas ambas podem marcar carcinomas mamários com receptores de estrogênio (ER) positivos e também positivos para o fator de crescimento epidérmico humano (HER2). No entanto, tanto a mamaglobina e o GCDFP apresentam baixa sensibilidade para marcar cânceres do subtipo triplo negativo, conforme visualizado na figura 2. Nesse tipo de carcinoma, esse exame tem uma utilidade diagnóstica um pouco mais limitada devido a não expressão dos três fatores mais presentes nos cânceres de mama. Ambas as colorações do exame de IHC são citoplasmáticas e, em sua grande maioria, mostram marcação variável ou em uma parte específica da lâmina. Portanto, a análise necessita ser bem mais minuciosa para evitar o diagnóstico inadequado da lâmina (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

Figura 2: Exame de imuno-histoquímica utilizando a mamaglobina e o GCDFP.

Fonte: Própria Autoria (2023).

GATA3 é um fator de transcrição envolvido na diferenciação de diversos tecidos, incluindo as células epiteliais do tecido mamário. Essa proteína desempenha um papel especializado na produção de células normais e saudáveis, sendo associada aos receptores hormonais (RE) quando se trata das neoplasias da mama. GATA3 é um marcador com sensibilidade superior ao GCDFP ou até mesmo a mamaglobina para carcinomas ER+, com uma marcação consistente em média de 90% dos cânceres de mama ER+, o GATA3 também é mais sensível aos cânceres triplo negativo com efeito de diagnóstico em mais de 50% dos casos. Essa característica confere ao GATA3 uma utilidade significativamente maior do que a mamaglobina e o GCDFP nesse contexto (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

Uma das últimas proteínas mais recentemente utilizadas no contexto das neoplasias mamárias é a SOX10, produzida por células normais da pele, glândulas salivares e nervos. Essa proteína desempenha um papel essencial na diferenciação das células da crista neural. Inicialmente, a SOX10 foi descrita como um marcador de derivação da crista neural, com marcações em melanomas e tumores de nervos periféricos. Além disso, ela está envolvida nas células mioepiteliais da mama, que circundam os alvéolos e os ductos, desempenhando um papel na excreção do leite materno durante a amamentação. Embora a SOX10 raramente marque carcinomas ER+, ela demonstra uma eficácia de 60% em pesquisas de cânceres triplo negativo e é comumente utilizada quando o GATA3 é negativo, auxiliando assim a assertividade do exame já que ela se faz mais sensível que GATA3 nos cânceres triplo negativos, conforme figura 3 (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

Figura 3: Representação de exame imuno-histoquímica utilizando o GATA3 e SOX10.

Fonte: Própria Autoria (2023).

Necessitamos compreender que os exames de IHC são extremamente importantes para diagnosticar as neoplasias com mais assertividade, proporcionando segurança para determinar qual carcinoma está sendo expressado no paciente, como iniciar o tratamento e para onde direcioná-lo. O exame de IHC requer uma sequência específica para que seja funcional. Inicialmente, as amostras são submetidas à lavagem com o composto químico xileno, promovendo a desparafinação, ou seja, a extração da parafina. A lâmina é então reidratada com álcool em concentrações crescentes, garantindo a preservação da amostra ao ser colocada na lâmina. Posteriormente, é realizada uma lavagem com uma solução salina, seguida pela aplicação dos antígenos marcados para efetuar a marcação da proteína, caso esteja presente na amostra (Leeha *et al.*, 2023).

A crescente incidência do CM destaca a necessidade urgente de aprimorar abordagens diagnósticas. A imuno-histoquímica, especialmente na detecção da proteína HER2+, emerge como uma ferramenta essencial para confirmar diagnósticos e compreender aspectos clínicos. No entanto, desafios persistentes, como a precisão na detecção e a aplicação em linfonodos sentinelas, exigem mais pesquisas. Superar essas limitações fortalecerá a confirmação diagnóstica e impulsionará avanços no tratamento do câncer de mama. O objetivo deste trabalho foi explorar o papel da imuno-histoquímica como uma ferramenta essencial no diagnóstico e avaliação prognóstica do CM, buscando aprimorar sua eficácia e precisão, visando contribuir para avanços significativos no tratamento e manejo dessa doença devastadora.

2 Material e métodos

Trata-se de uma revisão de literatura, utilizando artigos científicos nas bases de dados *US National Library of Medicine* (PubMed) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO). Para identificar os estudos pertinentes, foram empregados descritores do DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) com o operador booleano "AND", incluindo os termos "*Breast cancer*", "*Immunohistochemistry*" e "*HER2+ protein*". Inicialmente, foram encontrados 31 artigos. No entanto, após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão, apenas 3 artigos foram selecionados para compor o estudo. Os critérios de seleção incluíram a disponibilidade de textos completos gratuitos, publicação em revistas revisadas por pares, idioma (inglês e português), período de publicação entre 2019 e

2023, ensaio clínico, metanálise e revisão. Os estudos que não estavam diretamente relacionados ao tema proposto foram excluídos da análise, assegurando a relevância e a precisão dos resultados obtidos.

3 Resultados e discussão

Após a revisão dos três trabalhos selecionados, constatou-se que todos empregaram a técnica imuno-histoquímica (IHC) como parte integrante do processo diagnóstico do câncer de mama (CM). A utilização dessa abordagem revelou-se fundamental não apenas para confirmar o diagnóstico da doença, mas também para aprofundar a compreensão dos aspectos clínicos relacionados a ela.

Tab. 1 – Apresentação dos artigos incluídos na revisão.

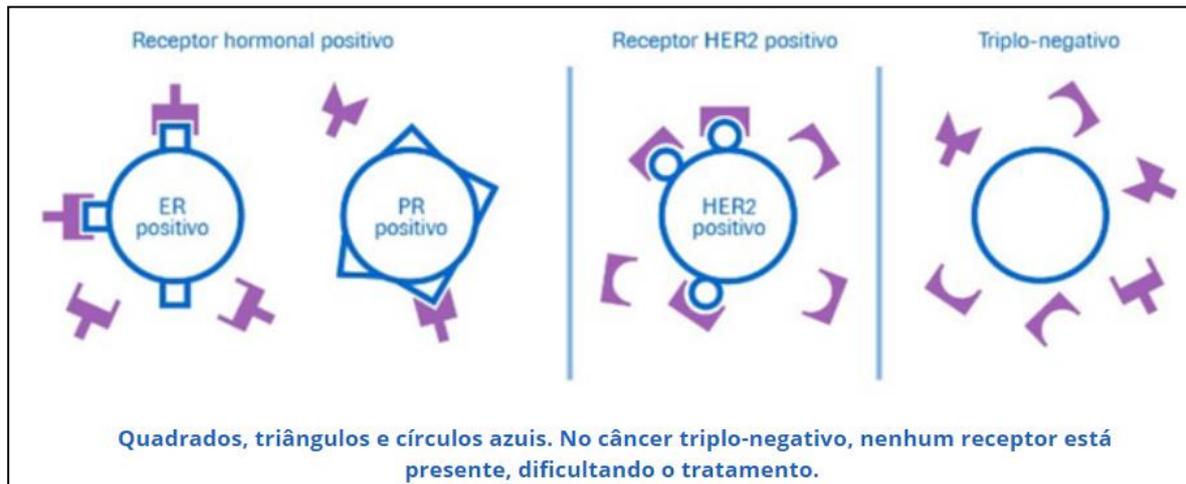
Título do Trabalho	Autores	Ano da Publicação	Título do Periódico
Concordance of Immunohistochemistry-Based and Gene Expression-Based Subtyping in Breast Cancer	Holm J. et al.	2020	JNCI Cancer Spectr
The Clinicopathological Significance of BiP/GRP-78 in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Public Datasets and Immunohistochemical Detection	Direito I. et al.	2022	Curr Oncol
Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer	Wolff A.C. et al.	2023	Arch Pathol Lab Med

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os exames de IHC desempenham um papel essencial na determinação de carcinomas, tanto mamários quanto de outros órgãos. Essa análise utiliza amostras de biópsias em conjunto com anticorpos monoclonais, derivados de linfócitos B, marcados com compostos radioativos ou substâncias fluorescentes. Nesse processo, se a amostra contiver a substância alvo, o anticorpo se conecta à célula (antígeno), liberando compostos químicos e marcando a célula. Essa interação antígeno/anticorpo é essencial para diagnósticos precisos de carcinomas (Magaki *et al.*, 2019; Wolff *et al.*, 2023).

Este teste envolve dois parâmetros essenciais: os anticorpos provenientes do sistema imunológico e a biópsia do tecido em questão, conhecida como histologia. Para garantir precisão e assertividade na análise das amostras solicitadas, é essencial possuir conhecimento sobre as células dos tecidos, permitindo a identificação das estruturas e do órgão em análise, além de determinar o tipo adequado de anticorpo para se ligar à proteína específica. Embora o teste de IHC seja amplamente utilizado em carcinomas, é importante ressaltar que ele pode representar um exame de alto custo benefício e invasivo para alguns pacientes, uma vez que a amostra é coletada do tecido interno, não do externo (Moreno *et al.*, 2022).

A maior dificuldade no diagnóstico do CM reside na identificação do subtipo triplo negativo. Nesse subtipo, a ausência dos três biomarcadores essenciais para o diagnóstico, receptores de estrogênio, receptor hormonal e HER2, torna o diagnóstico desafiador, conforme figura 4. Se nenhum desses biomarcadores for expresso, podemos concluir que se trata do subtipo neoplásico conhecido como CM triplo negativo (Dass *et al.*, 2021).

Figura 4: Representação de células no CM com diferentes receptores na superfície.

Fonte: <https://www.pesquisaclinica.roche.com.br/pt/trials/cancer/bc.html>

A IHC oferece análises precisas da expressão proteica em neoplasias, permitindo o diagnóstico precoce de processos neoplásicos antes que a proliferação celular atinja estágios avançados. Esse exame identifica positividade para HER2 mesmo em estágios iniciais, facilitando o diagnóstico e melhorando as perspectivas de tratamento. Além disso, contribui para determinar a extensão da disseminação do carcinoma, indicando se está localizado *in situ* ou se já ocorreu metástase. É essencial observar que, para seguir esses parâmetros, a IHC não apenas influencia o estadiamento do carcinoma, mas também o tipo de tumor e a resposta do hospedeiro a ele, evidenciando a complexidade do processo de avaliação clínica (Tarantino *et al.*, 2022).

Embora o teste de IHC seja valioso na determinação de neoplasias, há contrapontos e limitações associadas a essa técnica. Um desses desafios é a variação na interpretação do IHC, a qual depende da experiência do observador com o exame. Isso pode resultar em interpretações divergentes entre profissionais, levando a diagnósticos e conclusões discrepantes, o que, por sua vez, pode resultar na emissão de laudos falsos negativos ou falsos positivos. Essa disparidade pode comprometer a precisão do diagnóstico, tornando-o inconsistente com a condição real do paciente (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

A técnica de IHC é essencial para compreender o estadiamento de carcinomas, mapear e direcionar o tratamento de neoplasias. Integrada frequentemente no tratamento, a IHC avalia a eficácia do tratamento, fornecendo informações cruciais sobre a progressão e diagnósticos carcinogênicos. Apesar de sua importância, a taxa de degradação de antígenos na IHC é relativamente baixa em comparação com outros exames. Contudo, é fundamental que os profissionais tenham conhecimento adequado para evitar diagnósticos incorretos. A degradação dos antígenos, influenciada pela manipulação durante o processo de IHC e o armazenamento da amostra, emerge como um fator essencial que pode impactar a interpretação final do exame (Cimino-Mathews *et al.*, 2021).

Embora a técnica de IHC desempenhe um papel essencial na determinação de carcinomas, é necessário abordar algumas questões relacionadas às suas limitações. Destaca-se a variação na interpretação dos resultados, que depende da experiência do observador com o exame, podendo resultar em diagnósticos e conclusões

discrepantes e comprometendo a precisão do diagnóstico, levando à emissão de laudos falsos negativos ou positivos. Além disso, a degradação dos antígenos durante o processo de IHC e o armazenamento das amostras podem afetar a interpretação final do exame. Diante dessas limitações, é crucial garantir que os profissionais sejam devidamente capacitados e atentos aos cuidados necessários durante a manipulação e o armazenamento das amostras, a fim de evitar diagnósticos incorretos e garantir a confiabilidade dos resultados.

4 Conclusão

A técnica de Imuno-Histoquímica (IHC) é essencial para analisar a expressão proteica em carcinomas, mas sua interpretação variável e os desafios relacionados ao custo e invasividade podem levar a diagnósticos imprecisos. É fundamental que os profissionais sejam capacitados para realizar o exame corretamente e cuidem adequadamente das amostras para garantir resultados precisos. Apesar das limitações, a IHC continua sendo uma ferramenta valiosa no diagnóstico e tratamento de neoplasias. Diante disso, compreendemos que a agregação da técnica de IHC para avaliação e estadiamento das doenças neoplásicas é de extrema importância. No entanto, é essencial contar com um profissional capacitado para a manipulação desse exame a fim de obter um laudo preciso.

A técnica de IHC utiliza antígenos de uma biópsia e anticorpos marcados, destacando-se pela rapidez na identificação do grau e tipo do carcinoma, além de determinar se a doença já afetou outros órgãos. Em conjunto com diversos tratamentos, como a quimioterapia, esse exame contribui para melhorar a condição do paciente e reduzir os danos causados por intervenções invasivas. O acompanhamento da doença por meio de exames de IHC permite avaliar se o paciente está progredindo positivamente contra a neoplasia ou se está apenas enfrentando os impactos da medicação e tratamento, sem alcançar a evolução desejada na melhora do paciente.

Referências

Bonacho, T., Rodrigues, F., & Liberal, J. (2020). Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 95(2), 71–91. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1651901>

Cambruzzi E, Pêgas KI, Ferrari MB. Avaliação imuno-histoquímica de 100 casos de metástases encefálicas e correlação com o sítio primário do tumor. *J Bras Patol Med Lab* [Internet]. 2011Feb;47(1):57–64. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000100008>

Cimino-Mathews A. (2021). Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 34(Suppl 1), 62–77. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00697-3>

Dass, S. A., Tan, K. L., Selva Rajan, R., Mokhtar, N. F., Mohd Adzmi, E. R., Wan Abdul Rahman, W. F., Tengku Din, T. A. D. A., & Balakrishnan, V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>

Direito I. et al. The Clinicopathological Significance of BiP/GRP-78 in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Public Datasets and Immunohistochemical Detection. *Current oncology*, v. 29, n. 12, p. 9066–9087, 23 nov. 2022.

Fujiyama, S., Nakahashi-Oda, C., Abe, F., Wang, Y., Sato, K., & Shibuya, A. (2019). Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry. *International immunology*, 31(1), 51–56. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy064>

Holm, J. et al. Concordance of Immunohistochemistry-Based and Gene Expression-Based Subtyping in Breast Cancer. *JNCI cancer spectrum*, v. 5, n. 1, 7 out. 2020.

Leeha, M., Kanokwiroon, K., Laohawiriyakamol, S., & Thongsuksai, P. (2023). Immunohistochemistry-based molecular subtyping of triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Pathology oncology research : POR*, 29, 1611162. <https://doi.org/10.3389/pore.2023.1611162>

Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet (London, England)*, 397(10286), 1750–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3)

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Magnoni, F., Galimberti, V., Corso, G., Intra, M., Sacchini, V., & Veronesi, P. (2020). Axillary surgery in breast cancer: An updated historical perspective. *Seminars in oncology*, 47(6), 341–352. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2020.09.001>

Moreno, V., Smith, E. A., & Piña-Oviedo, S. (2022). Fluorescent Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2422, 131–146. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_9

Tarantino, P., Gandini, S., Nicolò, E., Trillo, P., Giugliano, F., Zagami, P., Vivinet, G., Bellerba, F., Trapani, D., Marra, A., Esposito, A., Criscitiello, C., Viale, G., & Curigliano, G. (2022). Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 163, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.12.022>

Wolff, A. C. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 147, n. 9, p. 993–1000, 7 jun. 2023.

Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research: BCR*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

Zhang, Y. N., Xia, K. R., Li, C. Y., Wei, B. L., & Zhang, B. (2021). Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. *BioMed research international*, 2021, 1994764. <https://doi.org/10.1155/2021/1994764>