

## Instruções de utilização – Microarranjo MammaPrint FFPE

### **Introdução**

O teste MammaPrint é um perfil de expressão genética que tem como objetivo prever o resultado clínico de doentes com cancro da mama. Foi desenvolvido com base no princípio de que a história natural de um tumor é determinada pelas suas vias genéticas reguladoras subjacentes e, portanto, os perfis de expressão genética, para além da patologia clínica padrão, podem prever com maior precisão o prognóstico e a resposta ao tratamento.

Utilizando uma abordagem imparcial, a assinatura genética MammaPrint foi determinada com base na execução de uma análise pangenómica de 25 000 genes em amostras de tumores mamários primários não tratados, assim como na comparação dos perfis de atividade genética entre doentes que apresentaram e não apresentaram metástases distantes dentro de 5 anos. Tal resultou num perfil de 70 genes que conseguia distinguir os doentes em alto risco de desenvolverem metástases daqueles cujo risco de metástases distantes a longo prazo era suficientemente baixo para que a terapia sistémica proporcionasse pouco ou nenhum benefício clínico absoluto.  
(1,2)

*Risco de recidiva* – O teste MammaPrint analisa a expressão de 70 genes específicos numa amostra de tecido ao testar o RNA isolado das amostras de tumores mamários em lâminas de microarranjo de vidro personalizadas. O perfil de expressão é então utilizado num algoritmo patenteado para classificar categoricamente o doente como sendo de alto ou baixo risco de recidiva do cancro da mama.

### ***Utilização prevista***

---

MammaPrint® FFPE é um teste de diagnóstico in vitro qualitativo e não automatizado, o qual é realizado no Laboratório do Serviço de Diagnóstico da Agendia, que utiliza o perfil de expressão genética obtido a partir de amostras de tecido de cancro da mama fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE, Formalin-fixed paraffin embedded) para avaliar o risco de metástase distante de um doente dentro de 5 anos.

O MammaPrint fornece informações de prognóstico relativamente ao risco de metástases à distância e à previsão da magnitude do benefício da terapia sistémica para orientar as decisões de tratamento em doentes com cancro da mama.

Os genes do MammaPrint medem as características do desenvolvimento em vários passos das células do cancro da mama para sobreviverem, proliferarem, se disseminarem e metastizarem, conforme descoberto nos marcos do cancro<sup>(3)</sup>.

O teste é realizado para doentes com cancro da mama do sexo feminino com doença em Estádio I ou Estádio II, com gânglios linfáticos negativos ou gânglios linfáticos positivos com até 3 gânglios positivos, com tumor de tamanho ≤ 5,0 cm, e para doentes com doença em Estádio III. O resultado do MammaPrint® FFPE é indicado para ser utilizado pelos médicos e deve ser interpretado juntamente com outros fatores clínico-patológicos.

### ***Utilizador pretendido***

---

O microarranjo MammaPrint FFPE destina-se a ser solicitado pelos prestadores de cuidados de saúde dos doentes com cancro da mama. Ao encomendar o teste de microarranjo MammaPrint FFPE, o prestador de cuidados de saúde solicita à Agendia a execução do teste na sua amostra no Laboratório do Serviço de Diagnóstico da Agendia.

### ***Princípio do teste***

---

A análise baseia-se em vários processos não automatizados: isolamento de RNA das secções de tecido FFPE do cancro da mama; transcrição reversa do RNA resultando no cDNA; amplificação e rotulagem do cDNA; hibridização do cDNA amplificado e rotulado para o microarranjo de diagnóstico; lavagem e leitura do microarranjo de diagnóstico e aquisição de dados (extração de características); cálculo e determinação do risco de recidiva (MammaPrint).

A análise MammaPrint foi concebida para determinar a atividade genética de genes específicos numa amostra de tecido. O resultado é um perfil de expressão, ou "impressão digital", da amostra. Através deste perfil de expressão, calcula-se o índice MammaPrint e determina-se o perfil molecular da amostra (baixo risco, alto risco).

### ***Avisos e precauções***

---

A identificação do doente no formulário de pedido tem de corresponder corretamente à identificação da amostra no sistema LIMS, que cria um identificador interno que deve corresponder corretamente à amostra no processo laboratorial.

Preencha o formulário de pedido do teste com a informação adequada.

A amostra selecionada para o teste MammaPrint deve corresponder às características da população à qual se destina, como (mas não apenas) cancro da mama feminino, estágio inicial e célula tumoral de, pelo menos, 30%.

Os resultados MammaPrint são indicados para serem utilizados pelos médicos como perfil de expressão, para além dos fatores clínico-patológicos padrão. O teste não pretende determinar o desfecho da doença.

Um resultado MammaPrint de baixo risco não garante que a recidiva distante não ocorrerá dentro de cinco anos. Do mesmo modo, um resultado de alto risco não garante que ocorrerá uma recidiva distante. Os resultados do teste devem ser utilizados em conjunto com fatores clínico-patológicos.

### ***Procedimento***

---

#### ***a) Seleção de doentes***

Os doentes são elegíveis se forem do sexo feminino e diagnosticados com cancro da mama em Estádio I, Estádio II ou Estádio III com gânglio linfático negativo e gânglio linfático positivo (até 3 gânglios positivos), com tumor de tamanho  $\leq 5,0$  cm, independentemente do estado do recetor de estrogénio (ER+/-).

#### ***b) Recolha, registo e envio de amostras.***

As condições de recolha, manuseamento e preparação da amostra são fornecidas ao cliente através de IFU: MKT-067. Este kit inclui o seguinte:

- 10 lâminas microscópicas
- 2 porta-lâminas para cinco lâminas
- Sacos de plástico pequeno e grande com fecho
- Instruções de recolha de amostras
- Formulário de pedido do teste

- Folha de etiquetas com código de barras
- Materiais de envio

O registo das amostras tem início com a notificação do prestador de cuidados de saúde que fez o pedido. Esta notificação (formulário de pedido do teste – TRF, Test Request Form) pode ser feita através do portal de cliente online ou de outro canal de comunicação onde a Agendia regista todas as informações relacionadas com as amostras e os doentes. O TRF só deve referir-se a um único doente. A amostra é enviada diretamente para o Laboratório do Serviço de Diagnóstico da Agendia pelo prestador de cuidados de saúde que fez o pedido, à temperatura ambiente, utilizando os materiais de transporte fornecidos pelo correio.

### ***c) Análise de amostras na Agendia***

São utilizadas secções de tecido FFPE fornecidas pelo cliente em lâminas de vidro ou feitas a partir de blocos tumorais FFPE utilizando um micrótomo padrão. O RNA total é extraído das secções de tecido utilizando um kit de isolamento comum disponível comercialmente. A amostra de RNA é purificada, amplificada e rotulada com um corante fluorescente de cianina-CTP/dUTP.

A amostra de RNA/cDNA é hibridizada num microarranjo de diagnóstico especificamente concebido (pacote de 8 unidades, Agilent Technologies). É utilizado um scanner de microarranjo da Agilent para a leitura do microarranjo de diagnóstico, resultando num ficheiro de análise (TIFF). Este ficheiro é utilizado pelo software de extração de características da Agilent. O software de extração de características verifica o ficheiro de análise (TIFF) determinando as intensidades fluorescentes relativas das características individuais por oposição ao ficheiro de conceção do chip do microarranjo de diagnóstico como um modelo, de modo a identificar as características de controlo, as características de normalização e as características do gene repórter. As intensidades fluorescentes das características constituem uma medida para a expressão de genes particulares.

### ***d) Análise de dados***

A análise de dados é realizada de acordo com o algoritmo MammaPrint, que calcula o índice MammaPrint e determina o perfil molecular da amostra (baixo risco, alto risco). As amostras com um valor de índice MammaPrint superior a 0 são classificadas como sendo de baixo risco e as amostras com um valor inferior ou igual a 0 são classificadas como sendo de alto risco.

O índice MammaPrint de uma amostra pode situar-se numa área predefinida em torno do limiar de classificação entre um MPI de  $> -0,05$  e  $< 0,05$ , em que o resultado MammaPrint tem uma precisão de classificação  $< 90\%$ , mas não inferior a  $50\%$  (ou seja, amostra limítrofe).

São implementados Controlos de Qualidade extensivos ( $>25$ ) a fim de assegurar o resultado analítico correto. Os CQ, juntamente com o resultado, são revistos e aprovados internamente pelo Diretor do Laboratório.

### ***e) Relatórios***

O prestador de cuidados de saúde que fez o pedido recebe um Relatório do Doente, assim como um Resumo dos Resultados para cada teste de microarranjo MammaPrint FFPE pedido. No que diz respeito aos dados pessoais dos doentes, consulte os nossos termos de tratamento de dados na Política de Privacidade da Agendia.

### ***Limitações do procedimento***

---

O MammaPrint foi validado para ser utilizado apenas com tecido tumoral do cancro da mama feminino. Os testes de outros tipos de amostra podem resultar em resultados incorretos ou na ausência de resultados. Os resultados fiáveis dependem dos procedimentos adequados de recolha e transporte de amostras.

O MammaPrint foi especificamente validado para tumores que são carcinomas ductais ou carcinomas lobulares invasivos. Os testes de outros tipos de amostra (por exemplo, gânglios linfáticos) não foram avaliados.

### **Valores previstos**

---

O resultado MammaPrint é fornecido como um resultado binário e é classificado como sendo de "baixo risco" ou "alto risco" de recidiva. O perfil molecular de uma amostra é determinado pelo cálculo do índice MammaPrint (MPI) numa escala de -1000 a +1000.

Tal como acontece em qualquer outro teste, o nosso teste também possui um limiar de classificação estabelecido. No caso do MammaPrint, o limiar de baixo e alto risco foi fixado em zero para atingir a maior sensibilidade possível, sendo que os valores  $> 0,000$  são classificados como sendo de baixo risco e os valores  $\leq 0,000$  são classificados como sendo de alto risco. A precisão média global do MPI é de 98,5%, com pontuações  $< 0,1685$  ou  $> 0,168$  com uma precisão  $> 99\%$ .

#### Valores "limítrofes" de MPI

Embora a precisão técnica do MammaPrint seja extremamente elevada, as amostras com um valor de MPI muito próximo do limiar zero têm uma percentagem de precisão ligeiramente inferior à das amostras mais afastadas do limiar. Especificamente, em torno do limiar zero, entre um MPI de  $> -0,05$  e  $< 0,05$ , também referido como região limítrofe, a precisão do teste diminui para menos de 90%. Por exemplo, num MPI de 0,04, há uma certeza de 86% de que o resultado MP está no intervalo positivo (baixo risco) e uma possibilidade de 14% de estar no intervalo negativo (alto risco). É importante salientar que as amostras com valores de MPI fora da região "limítrofe" têm uma precisão média  $> 99\%$ .

### **Características de desempenho**

---

As características de desempenho investigadas para o MammaPrint incluem: precisão e reprodutibilidade, intervalo notificável e limiar de classificação, especificidade analítica e limite de detecção.

#### Desempenho analítico

A concordância dos resultados dos tecidos frescos e FFPE foi avaliada em dois estudos, nos quais se verificou ser de 91,5% (n=221) e 94,3% (n=345), sem parcialidade nos resultados MammaPrint entre ambos os tipos de tecidos. O MammaPrint também é estável entre diferentes isolamentos, nos quais não foi observada uma diferença significativa ( $p=0,994/p=0,290$ ), diferentes locais, diferentes scanners, e mostra alta precisão (97,3%), reprodutibilidade (96%) e repetibilidade (97,8%)<sup>(4)</sup>.

Além disso, para a matriz FG, não foi detetada qualquer diferença entre os resultados de isolamentos repetidos de RNA, a precisão (98,47%), a reprodutibilidade (97,73%) e a repetibilidade (98,74%) e verificou-se que a concordância entre os resultados de 8pack e da matriz FG de dois conjuntos de dados separados foi de 98,52% (n=135) e 94,27% (n=698).

O intervalo notificável do índice MammaPrint está definido para abranger valores de -1,00 a + 1,00 e o limiar de classificação do índice MammaPrint (MPI) está definido para +0,0. Um MPI abaixo e igual a 0,0 é determinado como de alto risco, um MPI acima de 0,0 é considerado como de baixo risco <sup>(1, 2, 4)</sup>.

Foi realizado um estudo de interferência na matriz do genoma completo (matriz FG) para avaliar se quatro substâncias relevantes interferem com os resultados do MammaPrint FFPE. Os resultados demonstraram contaminação de DNA até 2,5 vezes os níveis de base e picos de proteína durante o isolamento de RNA, bem como contaminação por transferência de etanol e contas AMPure XP durante a purificação do cDNA que não afetaram os resultados MammaPrint. De um modo geral, os componentes tecidulares interferentes não influenciaram o índice MammaPrint, uma vez que a série tumoral original foi representativa de amostras de cancro da mama e aqui, também, os outros componentes tecidulares foram distribuídos aleatoriamente e não estiveram relacionados com um desfecho da doença <sup>(1)</sup>.

Para avaliar o limite de deteção, os resultados do MammaPrint FFPE foram comparados ao longo das diferentes diluições e apresentaram resultados bastante estáveis mesmo com introduções muito baixas de cDNA na matriz. Com base nos resultados, o limite de deteção da introdução de cDNA é de 900 ng. Além disso, verificou-se que o limite de deteção (LoD) para a introdução de RNA, derivado de um estudo separado, foi de 8,24 ng.

#### Validação clínica

Os resultados baseiam-se em dados previamente publicados relativamente ao perfil molecular de 70 genes <sup>(1)</sup> em tumores mamários. Os doentes com bons resultados são classificados como sendo de baixo risco (ou seja, sem metástases distantes dentro de, pelo menos, 5 anos). Os doentes com resultados desfavoráveis são classificados como sendo de alto risco (ou seja, maior probabilidade de metástases distantes dentro de 5 anos). O valor numérico do índice MammaPrint é fornecido.

O MammaPrint foi desenvolvido com recurso a doentes maioritariamente europeus com gânglios linfáticos negativos não tratados adjuvantes para captar a biologia do tumor primário num perfil de expressão genética. <sup>(1,2)</sup> Em janeiro de 2013, foram publicados os resultados de 5 anos do estudo prospetivo observacional RASTER <sup>(4)</sup>. Este estudo de impacto constituiu um ensaio centrado em biomarcadores inédito, no qual foi realizado o ensaio MammaPrint Fresh, tendo reportado 427 doentes com cancro da mama em estágio inicial, com idades compreendidas entre 18 e 61 anos, pT1 e pT2, gânglio linfático negativo, ER+/-, HER2 +/- antes da decisão entre médico e doente para a terapia adjuvante. Os doentes foram tratados de acordo com as diretrizes de prática padrão, tendo em conta todos os fatores clínico-patológicos relevantes, assim como os resultados da assinatura MammaPrint.

Posteriormente, o MammaPrint foi também realizado no tecido FFPE dos doentes RASTER. Os resultados do MammaPrint foram comparados com recurso a 345 amostras RASTER frescas e FFPE emparelhadas com dados de resultados aos 5 anos. Sem considerar quaisquer covariáveis para além do resultado de teste MammaPrint do doente, os doentes classificados como sendo de "baixo risco" pelo MammaPrint FFPE (71 tratados de forma adjuvante e 108 não tratados de forma adjuvante) demonstraram uma probabilidade de 1,3% (IC de 95% 0 – 3,1) de recidiva do cancro dentro de 5 anos <sup>(6)</sup>.

Os doentes classificados como sendo de "alto risco" pelo MammaPrint FFPE (145 tratados de forma adjuvante e 21 não tratados de forma adjuvante) demonstraram uma probabilidade de 11,7% (IC de 95% 6,6 – 16,8) de recidiva do cancro dentro de 5 anos <sup>(6)</sup>.

O MammaPrint foi validado independentemente em estudos em mais de 75 000 doentes com cancro da mama, com resultados publicados em importantes revistas médicas e científicas revistas pelos pares a nível internacional, e revelaram prestar informação independente da avaliação de risco clínico-patológico <sup>(6,7)</sup>.

### ***Pedido do teste***

---

Será fornecido um kit de recolha de amostras pela pessoa de contacto da Agendia. Utilizando o kit, adicione a amostra do tumor às lâminas de acordo com as instruções ou prepare um bloco FFPE. Faça o seu pedido através do nosso portal online ou preencha o formulário de pedido do teste que encontra no kit de recolha de amostra. Encontra todos os detalhes nas IFU deste kit.

Se necessitar de apoio ou informação adicional, entre em contacto connosco através de [Customerservice@agendia.com](mailto:Customerservice@agendia.com) ou +31 (0)20 462 1510.

### ***Referências***

---

1. van 't Veer et al. Nature 2002; 415(31): 530-536
2. van de Vijver et al. New Engl J Med 2002; 347(25): 1999-2009
3. Haan et. Al. Genes Chromosomes Cancer 2021; (61):148-160
4. Sapino et al. J Mol Diagnostics 2014; 16: 190-197
5. Drukker et al. Int J Cancer 2013; 133(4): 929-936
6. Beumer et al. Breast Cancer Res Treat 2016; DOI 10.1007/s10549-016-3764-5
7. Piccart et al. Lancet Oncol. 2021;22(4):476-488

### **Nota de aviso:**

Comunique qualquer incidente grave relacionado com o MammaPrint FFPE ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro. O fabricante comunicará o incidente grave à autoridade competente do Estado-Membro em que o utilizador/doente está estabelecido.

### **Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)**

Certificados de acreditação: Agendia, Inc.:  
05D1089250

### **Detalhes de fabrico**



Agendia NV Endereço do Laboratório do Serviço de Diagnóstico (Diagnostic Service Laboratory) da Agendia  
Radarweg 60  
1043 NT Amesterdão, Países Baixos  
Telefone: +31 (0)20 462 1510  
E-mail: [customerservice@agendia.com](mailto:customerservice@agendia.com)

Agendia, Inc.:  
22 Morgan,  
Irvine, CA 92618, EUA  
Telefone: +1 888 321 2732  
Fax: +1 866 756 7548  
[www.agendia.com](http://www.agendia.com)

**UDI-DI básico: 0850024841MammaPrintK9**



© 2021 Agendia, NV. Todos os direitos reservados. Agendia, o logótipo da Agendia e MammaPrint são marcas registadas da Agendia, NV.

MKT-517-V2

Data de publicação: Fevereiro de 2025

**Modificações à versão anterior**

Versão 2 - Desenvolvimento da utilização prevista, atualização do desempenho analítico, secção de referências, avisos e precauções

Publicação inicial – 03 de novembro de 2022