

Amanda Arantes Perez

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOFENOTÍPICOS DO
CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DA MAMA PURO E ASSOCIADO
A CARCINOMA INVASOR**

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Belo Horizonte - MG
2014

Amanda Arantes Perez

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOFENOTÍPICOS DO
CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DA MAMA PURO E ASSOCIADO
A CARCINOMA INVASOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher – área de concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Gobbi

Belo Horizonte

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aspectos histopatológicos e imunofenotípicos do carcinoma ductal in situ da mama puro ou associado a carcinoma invasor

AMANDA ARANTES PEREZ

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 25 de setembro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Helenice Gobbi - Orientador
UFMG

Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes
UFMG

Prof(a). Débora Balabram
UFMG

Prof. Márcio de Almeida Salles
Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais

Prof. André Almeida Schenka
UNICAMP

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA AMANDA ARANTES PEREZ

Realizou-se, no dia 25 de setembro de 2014, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina, sala 340, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Aspectos histopatológicos e imunofenotípicos do carcinoma ductal in situ da mama puro ou associado a carcinoma invasor*, apresentada por AMANDA ARANTES PEREZ, número de registro 2011655557, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Helenice Gobbi - Orientador (UFMG), Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (UFMG), Prof(a). Débora Balabram (UFMG), Prof. Márcio de Almeida Salles (Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais), Prof. André Almeida Schenka (UNICAMP).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2014.

Prof(a). Helenice Gobbi (Doutora)

Prof(a). Cristiana Buzelin Nunes (Doutora)

Prof(a). Débora Balabram (Doutora)

Prof. Márcio de Almeida Salles (Doutor)

Prof. André Almeida Schenka (Doutor)

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

À minha mãe, Rosângela, sempre presente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades diárias de crescimento e evolução.

À Professora Helenice, pela paciência e seus ensinamentos. Durante esses anos de convivência, não aprendi apenas patologia mamária e ciência; foram muitas lições de ética, seriedade, dedicação e compromisso com o trabalho.

À Iara, pela cumplicidade. Amo você!

À Bruna, nosso pequeno anjinho, que nos enche de alegrias!

À minha família: Francisco, Vó Maria (sei que está muito feliz por mais esta conquista!), Vô Baninho, Dinda, Iago e Flávio.

Ao Leonardo, por fazer parte da minha vida.

Ao Marcio de Almeida Salles, por me proteger e estar ao meu lado nos momentos felizes e também nos mais difíceis da minha vida. Minha eterna gratidão!

Às minhas amigas, Alessandra e Fabiene, irmãs de coração.

À Débora Balabram, pela disponibilidade em sempre ajudar e pela colaboração na análise estatística.

Ao Rafael Malagoli Rocha, pela colaboração na realização das reações imuno-histoquímicas.

À Cristiana Buzelin Nunes, por me ajudar com a documentação fotográfica da tese.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG e no Departamento de Anatomia Patológica do *A.C. Camargo Cancer Center* de São Paulo, com apoio financeiro parcial do CNPq, FAPEMIG, FAPESP e CAPES.

RESUMO

Introdução: O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) da mama constitui precursor inerente, mas não obrigatório, do carcinoma invasor da mama. O entendimento de sua patogênese e evolução ainda não está completamente elucidado. Aspectos histopatológicos bem avaliados e melhor caracterização molecular do CDIS podem contribuir para condução mais adequada dos casos. Os objetivos deste estudo foram caracterizar aspectos clínicos, histopatológicos e imunofenotípicos de uma série de casos de CDIS e avaliar a concordância interobservador no diagnóstico de lesões mamárias proliferativas intraductais.

Métodos: Trata-se de estudo retrospectivo, observacional, do tipo transversal. Foram avaliados, consecutivamente, 403 casos de CDIS, puros ou associados a carcinoma invasor, identificados nos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, de 2003 a 2008. A avaliação imuno-histoquímica foi realizada em 121 casos de CDIS de alto grau, incluindo a pesquisa de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), citoqueratina 5, receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR), p16, Ki67 e ciclooxigenase-2 (COX-2). Os tumores foram classificados em cinco subgrupos de acordo com a classificação molecular: luminal A (RE+/HER2-), luminal B (RE+/HER2+), HER2 (RE-/HER2+), basal (RE-/HER2-/EGFR+ e/ou CK5+), não classificável (todos os marcadores negativos).

Resultados: O alto grau nuclear e a presença de comedonecrose foram identificados mais frequentemente em pacientes jovens e mais frequentemente correlacionados com o subtipo morfológico sólido do CDIS ($p < 0,05$). As lesões mamárias proliferativas intraductais, em especial a hiperplasia ductal atípica, o CDIS e o CDIS com microinvasão apresentaram concordância moderada na comparação dos diagnósticos histopatológicos. No CDIS puro, o imunofenótipo mais comum foi o luminal A, seguido do subtipo HER2. O imunofenótipo basal foi observado apenas no CDIS associado a carcinoma invasor, que apresentou fenótipo similar. Não houve diferença significativa nos imunofenótipos entre o CDIS puro e associado a carcinoma invasor. A expressão de p16, isolada ou em combinação com Ki67 e COX-2, associou-se ao CDIS de fenótipo basal.

Conclusões: Discordância significativa foi observada no diagnóstico das lesões mamárias proliferativas intraductais em nossa série de casos. O imunofenótipo mais frequente entre os CDIS puros e associados a carcinoma invasor foi o luminal A. O tipo basal foi detectado em pequena porcentagem dos casos de CDIS associado a carcinoma invasor com mesmo fenótipo. CDIS com alto grau nuclear e comedonecrose, foi encontrado mais frequentemente em pacientes mais jovens e estas características deveriam ser consideradas na decisão do tratamento cirúrgico. Foi observada correlação positiva entre expressão do p16, COX2, Ki67 e fenótipo basal. Esta co-expressão poderia ser incorporada na rotina para avaliação de CDIS de alto grau com maior potencial evolutivo para carcinoma invasor.

Palavras-chave: carcinoma ductal *in situ*, mama, histopatologia, imuno-histoquímica

ABSTRACT

Introduction: Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast is an inherent but not necessarily obligate tendency for progression to invasive breast cancer. The pathogenesis and evolutive aspects of DCIS are still not completely elucidated. A better morphological and molecular evaluation of DCIS would be useful for clinical decision making. The aims of this study were to determine clinical and morphological features, the immunophenotypes of a series of cases of DCIS and to evaluate the agreement about the histopathological diagnosis of intraductal proliferative breast lesions.

Methods: This is a retrospective, observational, cross-sectional study. Four hundred and three cases of DCIS, pure or associated with invasive carcinoma, were consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008. Immunohistochemistry was performed in 121 high-grade DCIS cases. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), receptor of epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin 5 (CK5), receptor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor suppressor protein p16 and nuclear antigen Ki67 were assessed. Tumors were placed into five subgroups according to their immunophenotypical profile: luminal A (ER+/HER2-), luminal B (ER+/HER2+), HER2 (ER-/HER2+), basal-like (ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+), and "not classified" (all markers negative).

Results: The high nuclear grade and the presence of comedonecrosis were identified more frequently in DCIS of younger patients and more often correlated with the solid pattern DCIS ($p < 0.05$). A moderate agreement was observed in the diagnosis of the intraductal proliferative breast lesions, especially atypical ductal hyperplasia, DCIS and DCIS with microinvasion. The most common immunophenotype of pure DCIS was luminal A, followed by HER2 phenotype. The basal-like phenotype was observed only in DCIS associated with invasive carcinoma that had a similar phenotype. No significant difference was identified between pure DCIS and IMC-associated DCIS phenotypes. We observed that p16 expression, isolated or in combination with Ki67 and COX-2, is associated with basal phenotype in high-grade DCIS.

Conclusions: A significant discrepancy in the diagnosis of intraductal proliferative breast lesions was observed in our series. The most common type of DCIS was the luminal A. The basal phenotype was less frequent and only seen when associated with basal-type invasive carcinoma. DCIS of high nuclear grade, with comedonecrosis were more often found in younger patients and these characteristics should be considered in the surgical treatment decision. P16 expression, p16+/Ki67+/COX2+ and p16+/Ki67+/COX2- co-expressions showed significant association with basal phenotype and they could be useful to guide more aggressive treatments in patients with high-grade DCIS.

Key words: ductal carcinoma in situ, breast, histopathology, immunohistochemistry

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

QUADRO 1 Guia de interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas.....	24
QUADRO 2 Avaliação imuno-histoquímica da expressão de COX-2.....	26
QUADRO 3 Avaliação imuno-histoquímica da expressão de p16.....	27

Artigo 1 – “Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients” (submetido ao periódico *Diagnostic Pathology*):

TABLE 1 Frequencies of ductal carcinoma in situ subtypes.....	48
---	----

TABLE 2 Frequencies of nuclear grade of ductal carcinoma in situ.....	48
---	----

TABLE 3 Nuclear grade and architectural patterns of ductal carcinoma in situ.....	49
---	----

TABLE 4 Comedonecrosis and architectural patterns of ductal carcinoma in situ.....	49
--	----

FIGURE 1 Ductal carcinoma in situ of the breast: different nuclear grades and comedonecrosis. A - Low grade ductal carcinoma in situ, cribriforme type, showing uniform cells with mild atypia. Hematoxylin and eosin, x100; B – Intermediate grade ductal carcinoma in situ, showing cells with mild to moderate atypia and focal necrosis. Hematoxylin and eosin, x400; C – High grade ductal

carcinoma in situ, solid type, showing severe atypical cells, without necrosis. Hematoxylin and eosin, x400; D – High grade ductal carcinoma in situ, solid type with extensive comedonecrosis. Hematoxylin and eosin, x100..... 50

Artigo 2 – “Consultoria em patologia cirúrgica mamária: variabilidade interobservador no diagnóstico de lesões proliferativas intraductais atípicas” (Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia):

TABELA 1 Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico original e após a revisão, segundo as categorias: benigno ou maligno..... 54

TABELA 2 Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico original e após a revisão, estratificando os diagnósticos específicos..... 55

FIGURA 1 A) Hiperplasia ductal atípica originalmente diagnosticada como carcinoma ductal *in situ*. Os ductos são incompletamente preenchidos pelas células atípicas. B) Carcinoma ductal *in situ* com microinvasão no diagnóstico original. A dimensão da lesão invasiva (setas), maior que 1mm, favoreceu o diagnóstico de carcinoma ductal invasor na revisão..... 55

Artigo 3 – “Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma in situ of the breast” (Clinics):

TABLE 1 Sources and dilutions of the primary antibodies..... 62

TABLE 2 Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma in situ (pure or associated with invasive mammary carcinoma)..... 62

FIGURE 1 A) High-grade ductal carcinoma in situ associated with invasive mammary carcinoma positive for estrogen receptor (100x). Arrows indicate the in situ component. B) High-grade ductal carcinoma in situ positive for HER2 (400x). C) High-grade ductal carcinoma in situ positive for cytokeratin 5 (100x). D) High-grade ductal carcinoma in situ positive for epidermal growth factor receptor (400x)..... 61

Artigo 4 – “Co-expression of p16, Ki67 and COX-2 is associated with basal phenotype in high-grade ductal carcinoma in situ” (submetido ao periódico *Histopathology*):

TABLE 1 Sources, antibodies, and dilutions of primary antibodies used in the study..... 82

TABLE 2 Expression of biomarkers in high-grade ductal carcinoma in situ (pure or associated with invasive carcinoma)..... 83

TABLE 3 Association between p16, estrogen receptor, HER2 and cytoqueratin 5 in high-grade ductal carcinoma in situ..... 84

TABLE 4 Expression of biomarkers COX-2, p16, Ki67 and molecular phenotypes in high-grade ductal carcinoma in situ..... 85

TABLE 5 High-grade ductal carcinoma in situ: association between molecular phenotypes and biomarkers COX-2, p16, Ki67..... 86

Figure 1 High-grade ductal carcinoma in situ of the breast. A: High Ki67 proliferation index (400x); B: Estrogen receptor positivity (400x); C: Cyclooxygenase-2 positivity (400x); D: p16 positivity (400x)..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CI	Carcinoma invasor
CK	Citoqueratina
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Enzima ciclooxygenase-2
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki67	Proteína expressa na proliferação celular
NA	Não se aplica
p	Nível de significância
p16	Proteína de supressão tumoral
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SISMAMA	Sistema de Informação do Controle do Câncer de Mama
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama.....	17
1.2	Classificação e graduação histológica do carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama.....	20
1.3	Diagnóstico diferencial do carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama.....	22
1.4	Marcadores moleculares no carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama.....	22
1.4.1	Receptores de estrógeno e progesterona.....	22
1.4.2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2).....	23
1.4.3	Citoqueratina 5.....	25
1.4.4	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR).....	25
1.4.5	Enzima ciclooxigenase-2 (COX2).....	26
1.4.6	p16.....	27
1.4.7	Ki67.....	28
1.5	Classificação molecular dos carcinomas mamários.....	28
1.6	Justificativa.....	32
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
5	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	ANEXOS	
	Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	100
	Anexo II – Protocolo de Pesquisa.....	101
	Anexo III – Protocolo para reação imuno-histoquímica.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma ductal *in situ* da mama

O câncer de mama representa o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e é o mais comum entre as mulheres (excetuando os carcinomas de pele), sendo responsável por elevadas taxas de mortalidade e grande morbidade. Sua incidência vem aumentando nas últimas décadas, com estimativa de 57.120 novos casos no Brasil em 2014 (BRASIL, 2014).

Com a introdução do rastreamento mamográfico nos países desenvolvidos, a partir das décadas de 1980 e 1990, a incidência de carcinoma ductal *in situ* da mama (CDIS) aumentou significativamente. Atualmente, o CDIS constitui cerca de 20% dos casos novos e 30 a 40% dos casos de câncer de mama diagnosticados mamograficamente nos Estados Unidos da América (BLEICHER, 2013; SIZIOPIKOU, 2013). No Brasil, onde não há um programa de rastreamento bem estabelecido, o rastreamento oportunístico prevalece e o câncer de mama ainda é diagnosticado em estágios avançados (BRASIL, 2014). Embora o Ministério da Saúde tenha implantado o Sistema de Informação do Controle do Câncer de Mama (SISMAMA), visando formação de base de dados de aspectos epidemiológicos e diagnósticos dos carcinomas de mama, este sistema não constitui um programa de rastreamento populacional (BRASIL, 2008). Estima-se que o CDIS represente menos de 10% dos diagnósticos de câncer de mama no Brasil (BRASIL, 2012). A partir da implantação de um programa de rastreamento de câncer efetivo no Brasil, espera-se um aumento no número de diagnósticos histopatológicos de CDIS em nosso meio.

CDIS é definido como uma proliferação de células epiteliais atípicas restrita ao sistema ducto-lobular mamário, ou seja, com crescimento limitado pela membrana basal do epitélio ductal, sem evidência de invasão do estroma (LAKHANI *et al.*, 2012). O CDIS representa um grupo heterogêneo de lesões, com diferentes características clínicas, morfológicas, imuno-histoquímicas, moleculares e genéticas (LEE *et al.*, 2012; PINDER, 2010).

Cerca de nove mil artigos relacionados ao CDIS, foram publicados no período de 1948 a 2014, na literatura internacional indexada, incluindo aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos, moleculares e genéticos, fatores preditivos e prognósticos, tratamento cirúrgico e adjuvante. Apesar do número relevante de estudos relacionados ao CDIS, o entendimento de sua patogênese e comportamento biológico ainda não está completamente elucidado. O CDIS pode apresentar evoluções clínicas distintas, algumas vezes, comportamento indolente, outras vezes agressivo, com recidiva ou progressão para carcinoma invasor (LAKHANI *et al.*, 2012).

O CDIS constitui tendência inerente, mas não obrigatória de progressão para carcinoma invasor (CI) da mama (LAKHANI *et al.*, 2012). A mortalidade específica por câncer de mama em pacientes com CDIS é extremamente baixa, sendo que 1,0 a 2,6% morrem por carcinoma invasor 8 a 10 anos após o diagnóstico de CDIS (ERNSTER *et al.*, 2000). As mortes por câncer de mama após um diagnóstico inicial de CDIS são secundárias à presença de carcinoma invasivo não diagnosticado ou reconhecido na época do diagnóstico inicial ou à recorrência após tratamento, tendo em vista que o CDIS, por si mesmo, não resulta em mortalidade (LAKHANI *et al.*, 2012). Por muitos anos, a mastectomia foi considerada o procedimento padrão para o tratamento do CDIS. Entretanto, por se tratar de uma doença não invasiva e silenciosa, o tratamento conservador é considerado, em muitos casos, suficiente. Cerca de 30% dos CDIS tratados conservadoramente sem radioterapia apresentam recorrência local ipsilateral e, aproximadamente, 50% destas recorrências são

na forma de carcinoma invasivo (LARI; KUERER, 2011). O objetivo final do tratamento do CDIS é evitar a recorrência ipsilateral invasiva.

Avaliação clínica e imaginológica ainda não são capazes de prever, efetivamente, o risco de recorrência local ou progressão para carcinoma invasor em pacientes com diagnóstico de CDIS que foram submetidas ao tratamento conservador (LARI; KUERER, 2011). Atualmente, o único biomarcador validado para uso clínico rotineiro no CDIS é o receptor de estrógeno (LAKHANI *et al.*, 2012).

Dados epidemiológicos, morfológicos e moleculares sugerem que o CDIS representa um estágio inicial no desenvolvimento do câncer invasivo da mama, no qual a maioria das alterações moleculares já estaria presente (BUERGER *et al.*, 1999a; DAMONTE *et al.*, 2008; ESPINA; LIOTTA, 2011; POLYAK, 2008; SAKR *et al.*, 2014; SENS-ABUÁZAR *et al.*, 2012; VARGAS *et al.*, 2012).

Estudos de genética molecular têm demonstrado que carcinomas ductais invasivos de baixo e alto grau histológico têm origem em diferentes vias patogênicas: os de baixo grau tendo origem em carcinomas *in situ* de baixo grau e os de alto grau em carcinomas *in situ* de alto grau (ABDEL-FATAH *et al.*, 2008; BLEICHER, 2013; BUERGER *et al.*, 1999b). No entanto, KING *et al.* observaram resultados diferentes que não suportam a hipótese de que CDIS de baixo grau e carcinoma lobular *in situ* sejam os precursores de carcinomas invasores de baixo grau (KING *et al.*, 2012).

O perfil de expressão gênica do CDIS de alto grau histológico difere das lesões de baixo grau. Observa-se boa concordância, porém incompleta, entre CDIS e carcinomas mamários invasivos sincrônicos em relação ao grau histológico, *status* do receptor hormonal, superexpressão de HER2, p53 e fator de

crescimento epidérmico 1 (AGUIAR *et al.*, 2013a; ALLRED, 2002; COWELL *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2006; SAKR *et al.*, 2014; STEINMAN *et al.*, 2007).

Estudos moleculares e genéticos recentes têm sido realizados com o objetivo de contribuir para o melhor entendimento da patogênese do CDIS e estabelecer fatores preditivos e novas terapias alvo para reduzir o risco de recorrência local e recidiva invasiva neste grupo de pacientes (BANE, 2013; ROSS; WEN; BROGI, 2013; SIZIOPIKOU, 2013). Estes avanços constituem importante parte da avaliação do CDIS, entretanto, a idade das pacientes e as características morfológicas da lesão (grau nuclear, tamanho da lesão, presença de comedonecrose e *status* da margem) permanecem como elementos prognósticos bem estabelecidos do comportamento do CDIS (LARI; KUERER, 2011; PROVENZANO *et al.*, 2004; RINGBERG *et al.*, 2000; SILVERSTEIN, 2003).

1.2 Classificação e graduação histológica do CDIS da mama

A classificação morfológica do CDIS baseia-se no padrão arquitetural de crescimento. Os padrões arquiteturais do CDIS incluem os subtipos: sólido, cribriforme, micropapilar, papilar e apócrino (LAKHANI *et al.*, 2012). O CDIS pode ser classificado como padrão único (quando mais de 90% do tumor *in situ* exibe um único padrão arquitetural) ou misto (quando o padrão arquitetural dominante constitui menos que 90% do tumor *in situ*) (ROSS; WEN; BROGI, 2013).

O termo comedonecrose refere-se à presença de necrose extensa nos ductos envolvidos pelo CDIS, de aparência similar ao comedo observado em acne cutânea (JAFFER; BLEIWEISS, 2002; SCRIPCARU; ZARDAWI, 2012). Não é

considerado um subtipo arquitetural específico do CDIS, configurando apenas um padrão de necrose (LAKHANI *et al.*, 2012).

O grau nuclear constitui o principal método para estimar o comportamento biológico intrínseco de agressividade do CDIS (WANG *et al.*, 2011; WAPNIR *et al.*, 2011). Quase todos os sistemas de graduação histológica dividem o CDIS em três categorias (alto, intermediário e baixo grau), mas diferem entre si quanto às características utilizadas na classificação (VAN DE VIJVER, 2005). A maioria dos esquemas utiliza um ou mais critérios, incluindo o grau nuclear, a presença e extensão de necrose, e a polaridade celular (LAKHANI *et al.*, 2012).

O grau nuclear é classificado como baixo, intermediário ou alto, de acordo com o tamanho nuclear, pleomorfismo, padrão de cromatina, presença de nucléolo e atividade mitótica. CDIS de baixo grau consiste em uma população de células monótonas, com núcleo ligeiramente aumentado, membranas nucleares lisas, cromatina fina, nucléolo não visível e raras mitoses. As células do CDIS de baixo grau são tipicamente polarizadas com o maior eixo axial da célula orientado perpendicularmente à membrana basal e radialmente distribuídas ao redor do lúmen extracelular neoformado. O CDIS de grau intermediário consiste em uma população de células com núcleo de tamanho intermediário, cromatina grosseira e nucléolo pouco evidente. Atividade mitótica raramente é encontrada e as células podem estar polarizadas. CDIS de alto grau consiste em células grandes (>2,5 vezes o tamanho de uma hemácia), com núcleo pleomórfico, cromatina grosseira e vesicular, nucléolo evidente e irregular. As células neoplásicas geralmente perdem a polaridade e a atividade mitótica é frequentemente detectada (LAKHANI *et al.*, 2012).

Recomenda-se que o laudo anatomopatológico do CDIS contenha o grau nuclear, o padrão arquitetural, o tipo de necrose, a extensão da neoplasia (por

estimativa), a presença de microcalcificações determinantes associadas ao CDIS e o *status* da margem cirúrgica (LAKHANI *et al.*, 2012; LESTER *et al.*, 2009).

1.3 Diagnóstico diferencial do carcinoma ductal *in situ* da mama

O diagnóstico diferencial do CDIS inclui o espectro de lesões mamárias proliferativas intraductais atípicas, em especial, a hiperplasia ductal atípica e CDIS com microinvasão, além do carcinoma invasor (LAKHANI *et al.*, 2012).

Observa-se concordância diagnóstica variável e dificuldade na reprodução dos diagnósticos histopatológicos destas lesões entre patologistas gerais e especialistas em patologia mamária (GOMES *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2011; ROSAI, 1991; SALLES *et al.*, 2008a, 2008b).

1.4 Marcadores moleculares no carcinoma ductal *in situ* da mama

1.4.1 Receptores de estrógeno e progesterona

O *status* dos receptores de estrógeno e progesterona constitui fator preditivo e prognóstico bem estabelecido no carcinoma invasor da mama. Em relação ao CDIS, apenas a avaliação do receptor de estrógeno está validada para uso clínico rotineiro (LAKHANI *et al.*, 2012).

O sistema de escore de Allred tem sido empregado na avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona no carcinoma invasor da mama, sendo considerados positivos os casos em que mais de 1% das células neoplásicas evidenciam coloração nuclear moderada ou forte (HAMMOND *et al.*, 2010). Sistema de escore semelhante tem sido indicado para avaliação dos

receptores hormonais no CDIS (LAKHANI *et al.*, 2012). Os receptores de estrógeno e progesterona expressam-se, respectivamente, em 68,7% e 59,6% dos casos de CDIS (LARI; KUERER, 2011).

A expressão de receptores de estrógeno (RE) e de receptores de progesterona (RP) correlaciona-se inversamente ao grau nuclear do CDIS, sendo maior em lesões bem diferenciadas. Observa-se ainda que a expressão dos receptores hormonais é mais comum no CDIS cribriforme em relação a outros subtipos e correlaciona-se inversamente com a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2). Alguns autores evidenciam correlação significativa entre negatividade de RE e positividade da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), enquanto esta correlação não foi estabelecida por outros autores (LARI; KUERER, 2011). Em dissertação de mestrado, demonstrou-se que a maioria dos CDIS, mesmo os de alto grau são positivos para receptores hormonais (PEREZ, 2010).

1.4.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2)

O proto oncogene *HER2/neu* ou *c-erbB2* localiza-se no cromossomo 17q21 e codifica uma proteína transmembrana da família dos receptores de crescimento epidérmico com atividade tirosina quinase, que, quando ativada, proporciona às células tumorais atividade proliferativa e capacidade anti-apoptose, importantes na patogênese e progressão do câncer de mama (GUTIERREZ; SCHIFF, 2011; KRISHNAMURTI; SILVERMAN, 2014).

A superexpressão da proteína HER2 deve ser testada em todos os casos de carcinoma invasor da mama. O Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al.*, 2013) é o mais recomendado para a interpretação do teste (Quadro 1).

Estudos demonstram que o HER2 constitui importante fator preditivo e prognóstico no carcinoma invasivo, entretanto, sua importância no CDIS ainda não está bem estabelecida (LAKHANI *et al.*, 2012).

Observa-se superexpressão do HER2 em 40,1% dos casos de CDIS e esta superexpressão correlaciona-se positiva e significativamente com o alto grau nuclear (LARI; KUERER, 2011).

QUADRO 1 - Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al.*, 2013)

Grau de interpretação	Achado microscópico
0 = negativo	Nenhuma coloração na membrana citoplasmática ou coloração de membrana fraca e incompleta em $\leq 10\%$ das células tumorais
1+ = negativo	Coloração de membrana fraca e incompleta em $> 10\%$ das células tumorais
2+ = indeterminado	Coloração de membrana incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais OU coloração de membrana forte e completa em $\leq 10\%$ das células tumorais
3+ = positivo	Coloração de membrana forte e completa em $> 10\%$ das células tumorais

1.4.3 Citoqueratina 5

Citoqueratina 5 (CK5) é uma citoqueratina de alto peso molecular expressa nas células mioepiteliais do epitélio mamário, também conhecida como citoqueratina basal (GUSTERSON *et al.*, 2005).

Apesar da utilização da CK5 como critério para classificação do subtipo molecular basal, poucos estudos têm avaliado este marcador como um indicador independente do comportamento biológico do CDIS, particularmente o risco de invasão (AGUIAR *et al.*, 2013b). Segundo Livasy e colaboradores, qualquer grau de coloração citoplasmática é considerado coloração positiva para CK5 (LIVASY *et al.*, 2007).

1.4.4 Receptor do fator de crescimento epidérmico 1

O receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR) compreende um dos quatro receptores da família de receptores de crescimento epidérmico celular que codificam uma glicoproteína transmembrana com domínio intracelular tirosina quinase e, quando ativado, inibe a apoptose, promove a angiogênese e a invasão celular. A superexpressão de EGFR associa-se a metástases e pior prognóstico em câncer de mama (MASUDA *et al.*, 2012).

Poucos estudos avaliaram as frequências de expressão do EGFR no CDIS e a relação entre sua expressão e o risco de recorrência local (LARI; KUERER, 2011). EGFR se expressa em 23,8% dos casos de CDIS e não apresenta correlação com alto grau nuclear ou Ki67 (LARI; KUERER, 2011).

De acordo com Livasy e colaboradores, qualquer grau de coloração de membrana é considerado como coloração positiva para EGFR (LIVASY *et al.*, 2007).

1.4.5 Enzima ciclooxigenase-2

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que catalisa a conversão do ácido aracônico em prostaglandinas e sua superexpressão encontra-se envolvida em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo proliferação, apoptose, angiogênese e invasão. Carcinomas mamários invasivos e CDIS podem apresentar superexpressão de COX-2, sugerindo que a expressão deste marcador constitui um evento precoce na carcinogênese mamária (LEO *et al.*, 2006).

Sua expressão é analisada através de um escore (RISTIMÄKI *et al.*, 2002), conforme descrito abaixo (Quadro 2).

QUADRO 2 – Avaliação imuno-histoquímica da expressão de COX-2 (RISTIMÄKI *et al.*, 2002)

Escore	Achado microscópico
0 = negativo	Não identificada nenhuma coloração citoplasmática
1+ = negativo	Coloração citoplasmática fraca e difusa (pode conter intensidade forte em menos que 10% das células)
2+ = positivo	Coloração citoplasmática glandular moderada a forte em 10-90% das células tumorais
3+ = positivo	Mais de 90% das células tumorais coradas com intensidade forte

A COX-2 se expressa em 62,3% dos casos de CDIS e associa-se significativamente com negatividade de receptores de estrógeno, positividade de HER2 e alta expressão de Ki67 (LARI; KUERER, 2011).

1.4.6 p16

P16 constitui uma proteína de supressão tumoral e se expressa em 33,7% dos casos de CDIS. Não se observa nenhuma associação entre a expressão de p16 e aspectos histológicos ou receptores hormonais (LARI; KUERER, 2011).

Para a avaliação da expressão de p16, utiliza-se o escore proposto por Witkiewicz e colaboradores (WITKIEWICZ *et al.*, 2011), conforme descrito a seguir (Quadro 3).

QUADRO 3 – Avaliação imuno-histoquímica da expressão de p16 (WITKIEWICZ *et al.*, 2011)

Escore	Achado microscópico
0 = negativo	Não identificada nenhuma coloração
1+ = negativo	Coloração nuclear ou citoplasmática fraca e difusa, ou menos que 25% das células tumorais apresentando coloração de forte intensidade
2+ = negativo	25 a 75% das células tumorais apresentando coloração de forte intensidade
3+ = positivo	Mais de 75% das células tumorais apresentando coloração de forte intensidade

1.4.7 Ki67

O antígeno nuclear Ki67 é comumente utilizado para estimar o índice de proliferação celular dos tumores mamários, sendo considerado elemento importante na progressão da doença.

Observam-se divergências entre os autores quanto à contagem das células marcadas (automatizada, semi-automatizada ou manual) e ao ponto de corte utilizado para definir alto ou baixo índice proliferativo utilizando o Ki67 (LARI; KUERER, 2011). De acordo com a Conferência de *St. Gallen* (2013), um índice de Ki67 menor que 20% é considerado como de baixa proliferação (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

A expressão de Ki67 é identificada em 10,9 a 15,5% dos casos de CDIS e um alto índice proliferativo é observado em lesões de alto grau nuclear e em CDIS HER2 positivo (LARI; KUERER, 2011).

1.5 Classificação molecular dos carcinomas mamários

Estudos com microarranjos de DNA identificaram subgrupos distintos de carcinomas mamários invasores com diferentes prognósticos, resultando em uma nova classificação com cinco subgrupos de acordo com o perfil molecular (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2003):

- **Luminal A:** expressam genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (positividade para receptores de estrógeno e progesterona; negatividade para HER2);
- **Luminal B:** expressam genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama e pelo grupo de tumores com

superexpressão de HER2 (positividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2);

- **Tumores com superexpressão de HER2:** superexpressão de HER2 (negatividade para receptores de estrógeno e progesterona; positividade para HER2);
- **Tipo basal:** expressam genes e proteínas característicos das células basais / mioepiteliais da mama (negatividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2; expressão de citoqueratinas basais);
- **Não classificável:** expressam genes e proteínas semelhantes aos expressos nas amostras de parênquima mamário normal e fibroadenomas (negatividade para todos os marcadores referidos acima).

O perfil gênico é considerado “padrão ouro” na avaliação molecular dos subtipos de carcinomas mamários. Entretanto, apresenta limitações, dificuldades técnicas e alto custo, impossibilitando sua utilização na prática clínica até o momento atual. Vários estudos foram realizados na tentativa de caracterizar os diferentes subtipos empregando imuno-histoquímica, revelando boa correlação entre o perfil gênico e a expressão protéica pela imuno-histoquímica (CLARK *et al.*, 2011; LIVASY *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2005; MEIJNEN *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2004; RAKHA *et al.*, 2006a, 2007b). O método imuno-histoquímico permite que a classificação molecular seja realizada em amostras de tecido conservado em parafina e apresenta custo acessível para utilização na prática clínica e em pesquisa.

Não há consenso na literatura internacional em relação aos marcadores imuno-histoquímicos que melhor definem e identificam o fenótipo basal (FADARE; TAVASSOLI, 2007).

A imunopositividade para citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK5/6, CK 14, CK17) tem sido utilizada por alguns autores para a definição do fenótipo basal (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2005; RAKHA *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b; VAN DE RIJN *et al.*, 2002). Outros marcadores têm sido utilizados como requisitos para definir os tumores basais, como EGFR (NIELSEN *et al.*, 2004), c-kit (KIM *et al.*, 2006), p63 (MATOS *et al.*, 2005), p-caderina (MATOS *et al.*, 2005) e actina de músculo liso (ABD EL-REHIM *et al.*, 2004).

Alguns autores consideram necessária a negatividade para os receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e HER2 (triplo negativos), além da expressão de marcadores mioepiteliais, para caracterizar os carcinomas basais (MATOS *et al.*, 2005). Outros autores não consideram a necessidade do tumor ser triplo negativo, mas apenas expressar marcadores basais (RAKHA *et al.*, 2007b).

Tumores basais são frequentemente triplo-negativos, isto é, apresentam negatividade para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e HER2 (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). Entretanto, os termos fenótipo basal e triplo-negativo não são sinônimos. Alguns carcinomas mamários de fenótipo basal podem apresentar superexpressão do oncogene Her2/neu, assim como alguns tumores triplo-negativos não apresentam características basais (DIAZ *et al.*, 2007; RAKHA; ELLIS, 2009; REIS-FILHO; TUTT, 2008).

Embora existam vários estudos sobre carcinomas mamários invasivos, poucos estudos avaliaram o perfil molecular do CDIS através da imuno-histoquímica. Bryan *et al.* avaliaram 66 casos de carcinomas ductais *in situ* (CDIS) de alto grau e encontraram uma frequência de 6% de fenótipo triplo-negativo. Todos

os casos triplo-negativos foram positivos para citoqueratinas basais (CK5/6, CK14, CK17), EGFR ou ambos (BRYAN; SCHNITT; COLLINS, 2006).

Dabbs e colaboradores avaliaram um grupo de mulheres abaixo de 37 anos apresentando carcinomas mamários invasores triplo-negativos (n=16) e encontraram CDIS associado em 13 casos. Todos os casos de CDIS demonstravam características morfológicas e imunofenóticas semelhantes aos carcinomas invasores (receptores para estrógeno e progesterona e HER-2 negativos e positividade para CK5/6, CK14, CK17, vimentina e EGFR) (DABBS *et al.*, 2006).

Livasy *et al.* (2007) observaram uma prevalência de 8% de CDIS de fenótipo basal (receptor de estrógeno e HER2 negativos, positividade para EGFR e/ou CK5/6) em um total de 245 casos de CDIS puros. O CDIS de fenótipo basal estava associado com variáveis de pior prognóstico, incluindo alto grau nuclear, expressão de p53 e alta marcação pelo Ki67.

Paredes e colaboradores (2007) demonstraram que aproximadamente 10% dos carcinomas ductais *in situ* são negativos para receptores de estrógeno, HER2 e expressam pelo menos um marcador basal: CK5, CK14, P-caderina, p63, EGFR ou vimentina.

Tamimi *et al.* (2008) avaliaram uma população de 2897 mulheres participantes do *Nurses' Health Study* e encontraram maior prevalência do fenótipo basal (negativos para receptores de estrógeno, progesterona e HER2 e positivos para CK5/6 e/ou EGFR) em carcinomas invasores (10,9%) em relação ao CDIS (7,7%), embora sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,15$).

Segundo Clark e colaboradores, os subtipos moleculares descritos para o carcinoma invasor também podem ser identificados no CDIS, embora com diferenças na frequência relativa ao subgrupo, principalmente nos fenótipos triplo-negativo e basal (CLARK *et al.*, 2011).

1.6 Justificativa

A literatura exposta demonstra que o CDIS representa um precursor inerente, mas não obrigatório do carcinoma invasor e constitui um espectro de lesões com diferentes características morfológicas e imuno-histoquímicas, cujo diagnóstico diferencial é, muitas vezes, difícil para os patologistas gerais. A incidência do CDIS tem aumentado progressivamente a partir dos programas de rastreamento populacional, demandando maior conhecimento de sua patogênese e dos fatores de risco que possam prever, efetivamente, o risco de recorrência local destas lesões ou sua progressão para carcinoma invasor.

Durante o mestrado, determinamos as frequências de alguns marcadores imuno-histoquímicos em uma série de casos de CDIS de alto grau, puros ou associados a carcinoma invasor, entre eles, os receptores de estrógeno e progesterona, HER2, citoqueratina 5 e EGFR. Escolhemos um subgrupo específico de carcinomas ductais *in situ* da mama, isto é, os de alto grau, devido ao maior risco de progressão para carcinoma invasor. Optamos por avaliar carcinomas ductais *in situ* puros ou associados a carcinoma invasor a fim de comparar se as frequências dos marcadores moleculares seria diferente entre os tumores puros e os associados a componente invasor, assim como avaliar a concordância entre os marcadores nos componentes *in situ* e invasor. Setenta por cento dos casos avaliados expressaram positividade no receptor de estrógeno. Identificamos, em nossa série, positividade para o HER2 em 28% dos casos de CDIS puro, frequência menor que a descrita na literatura. Encontramos positividade para citoqueratina 5 em 2,4% dos casos de CDIS puro e em 12,7% dos casos de CDIS associado a carcinoma invasor. Nenhum

caso de CDIS puro apresentou positividade para EGFR e apenas 2,5% dos casos de CDIS associado a carcinoma invasor foram positivos para este marcador. Não demonstramos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos diferentes marcadores no CDIS puro ou associado a carcinoma invasor. Observamos excelente concordância entre os componentes *in situ* e invasor em relação ao receptor de estrógeno e EGFR, e boa concordância em relação ao receptor de progesterona, HER2 e citoqueratina 5 (PEREZ, 2010).

Decidimos, no doutorado, dar continuidade à linha de pesquisa relacionada ao CDIS, caracterizando morfológica e imunofenotipicamente casos puros e associados ao carcinoma invasor. A melhor compreensão das vias moleculares envolvidas na patogênese e evolução do CDIS poderá num futuro próximo auxiliar na definição do melhor tratamento para pacientes com este diagnóstico.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- 2.1 Determinar a frequência dos diferentes subtipos morfológicos, grau nuclear e presença de comedonecrose em uma série de casos de CDIS da mama, puros ou associados a carcinoma invasor; correlacionar as características morfológicas e comparar a idade das pacientes com as características histopatológicas do CDIS.
- 2.2 Avaliar a concordância interobservador nos diagnósticos histopatológicos das lesões mamárias proliferativas intraductais entre patologistas gerais e especialista em patologia mamária, com ênfase no espectro de lesões que entram no diagnóstico diferencial do CDIS (hiperplasia ductal atípica, CDIS e CDIS com microinvasão).
- 2.3 Determinar as frequências dos diferentes imunofenótipos (luminal A, luminal B, HER2, basal e não classificável) em uma série de casos de CDIS de alto grau nuclear, puros ou associados a carcinoma invasor; comparar a frequência dos perfis imuno-histoquímicos no CDIS puro e no CDIS associado a carcinoma invasor e avaliar a concordância dos imunofenótipos entre os componentes *in situ* e invasor nos casos de CDIS associado a carcinoma invasor.
- 2.4 Avaliar a co-expressão de marcadores relacionados ao ciclo celular e COX-2 em uma série de casos de CDIS de alto grau nuclear, puros ou associados a carcinoma invasor, e sua associação com os diferentes imunofenótipos.

3 MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais, métodos, resultados e discussão serão apresentados no formato de quatro artigos científicos. Cada artigo foi redigido conforme as normas específicas do periódico ao qual foi submetido e relaciona-se com um objetivo deste trabalho. A ordem de apresentação dos artigos não configura sua ordem cronológica de publicação. Optou-se por inserir os artigos de acordo com a sequência de objetivos apresentados anteriormente.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 635/08) (ANEXO I).

O protocolo de pesquisa e o protocolo para reações imuno-histoquímicas estão descritos, respectivamente, nos anexos II e III.

3.1 ARTIGO 1

Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients

Submetido ao periódico *Diagnostic Pathology*, agosto de 2014.

- 1304015840140579 Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopatholo...

Diagnostic Pathology Editorial

Hoje em 8:59 AM

Para Mrs Helenice Gobbi, Eu, Débora Balabram, e 2 Mais...

Article title: Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients

MS ID : 1304015840140579

Authors : Amanda A Perez, Débora Balabram, Marcio A Salles and Helenice Gobbi

Journal : Diagnostic Pathology

Dear Mrs Gobbi

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.diagnosticpathology.org/imedia/1304015840140579_article.pdf (4996K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.diagnosticpathology.org/imedia/3803721701405791_comment.pdf

Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histopathological features and age of patients

Authors and institutional addresses:

Amanda Arantes Perez, Débora Balabram, Marcio de Almeida Salles, Helenice Gobbi*

Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author:

Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil:

Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, CEP: 30130-100

Email addresses:

Amanda Arantes Perez: amandaperez1408@yahoo.com.br

Débora Balabram: debalabra@gmail.com

Marcio de Almeida Salles: ma.salles@terra.com.br

Helenice Gobbi: hgobbi@medicina.ufmg.br

Abstract

Background: The histopathological subtype, nuclear grade and presence or absence of comedonecrosis are established as critical elements in the reporting of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. The aims of this study were to determine the frequencies of morphological subtypes of DCIS, nuclear grade and comedonecrosis and to compare the age of patients with the histopathological characteristics of DCIS.

Methods: We evaluated a series of 403 cases of DCIS, pure or associated with invasive mammary carcinoma, consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008.

Results: DCIS displayed a single growth pattern in most cases (55.1%) and the solid subtype was the most common morphology (42.2% of the total). High-grade DCIS was identified in 293/403 cases (72.7%) and comedonecrosis was present in 222/403 cases (55%). Among DCIS with a single architectural pattern, high grade was more common in the solid subtype (151/168 cases, 89.9%; $p < 0.001$). Only 32% of tumours with a cribriform pattern had high nuclear grade. Comedonecrosis was more common in the solid morphology than in the cribriform, papillary and micropapillary subtypes ($p < 0.001$). Patients with high-grade DCIS were younger in relation to patients with low-grade DCIS ($p = 0.027$) and patients with tumours with comedonecrosis were also younger in comparison to patients with tumours without comedonecrosis ($p = 0.003$).

Conclusions: The high nuclear grade and the presence of comedonecrosis were identified more frequently in younger patients and more often correlated with the solid pattern of DCIS.

Keywords: ductal carcinoma in situ, architectural patterns, morphology, breast cancer

Background

Ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS) is defined as a neoplastic proliferation of epithelial cells confined to the mammary ductal-lobular system and characterized by subtle to marked cytological atypia and an inherent but not necessarily obligate tendency for progression to invasive breast cancer [1]. DCIS constitutes 20% of all newly diagnosed breast cancer cases and 30% to 40% of the breast cancer cases diagnosed mammographically in the United States of America [2, 3].

Currently, it is accepted that DCIS is not one entity but rather a heterogeneous group of lesions with different clinical, radiological, morphological and genetic features [4, 5].

Genetic and molecular studies have been published aiming to establish prognostic and predictive factors and new targeted therapies to reduce the risk of recurrence and progression to invasive carcinoma in patients with DCIS [2, 6–12]. These advances may become an important part of evaluating DCIS, but at this time, size, grade, comedonecrosis and margin status are established as critical elements in the reporting of DCIS [1, 13].

The purpose of this study was to determine the frequencies of DCIS subtypes, nuclear grade and comedonecrosis of a series of cases of DCIS of the breast and to compare the age of patients with the histopathological characteristics of DCIS.

Methods

Four hundred and three cases of DCIS, pure or associated with invasive carcinoma, were consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008. Histopathological sections from all cases were reviewed by two authors (HG and AAP) and data considered in the analysis was that obtained in the current slide review.

The criteria defined by World Health Organization (2012) were used for histopathological diagnosis, classification and grading of DCIS [1]. The nuclear grade of DCIS was classified as low, intermediate or high on the basis of nuclear size, pleomorphism, chromatin pattern, presence of nucleoli and mitotic activity. DCIS with low nuclear grade consists of a monotonous population of cells with slightly enlarged nuclei, smooth nuclear membranes, finely dispersed chromatin, inconspicuous nucleoli and rare mitoses. The cells of

low-grade DCIS are typically polarized with the longest axis of the cell oriented perpendicularly to the basement membrane, and radially distributed around neoformed extracellular lumina. DCIS of intermediate nuclear grade consists of a population of cells with intermediate-size nuclei with coarser chromatin and evident but still inconspicuous nucleoli. Mitotic activity may be encountered, but it is rarely high. The neoplastic cells may be polarized. DCIS of high nuclear grade consists of cells with large (>2.5 times the size of a red blood cell) and pleomorphic nuclei that show vesicular and coarse chromatin, with prominent and often multiple and irregular nucleoli. The neoplastic epithelial cells usually lack polarity, and mitotic activity is easily detected [1, 14]. The highest nuclear grade was used for the purpose of statistical analysis. The nuclear grade of DCIS was not evaluated in eleven cases (2.7%) because the slides were not available for review.

The architectural patterns of DCIS included solid, cribriform, micropapillary, papillary and apocrine [1]. DCIS was divided into single (when >90% of the in situ tumor displayed one architectural growth pattern) and mixed (when the dominant pattern constituted <90% of the in situ carcinoma) [15].

The term comedonecrosis, which is poorly defined in the literature, was applied when significant necrosis, creating an appearance similar to comedos, seen in cutaneous acne, was noted in ducts involved by DCIS [15, 16].

Because all slides from each case were not available to be reviewed, we did not analyze size of DCIS and margin status.

Pearson's asymptotic and exact chi-square tests were used to compare proportions. The t test was used to compare age means among the groups and the Bonferroni test was used to multiple comparisons between them. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (protocol ETIC 655/08).

Results

Pure DCIS was detected in 110/403 cases (27.3% of the total) and 293/403 cases (72.7% of the total) were DCIS associated with invasive carcinoma.

The mean age of patients at diagnosis was 54.1 years (standard deviation \pm 13.1). There was no significant difference in age between pure DCIS and DCIS associated with invasive carcinoma ($p=0.814$).

The frequencies of DCIS subtypes are shown in Table 1. Of the 403 cases of DCIS (pure and associated with invasive carcinoma), 222 cases (55.1%) displayed a single growth pattern and 181 cases (44.9%) showed a mixed growth pattern. Among architectural patterns, the solid subtype was the most common (170/403 cases; 42.2%). The pure micropapillary subtype was found in 13/403 cases (3.2%). The apocrine morphology was not identified among DCIS with a single architectural pattern. There was no significant difference in single or mixed growth pattern between pure DCIS and DCIS associated with invasive carcinoma ($p=0.088$).

The nuclear grade of DCIS was evaluated in 392/403 cases (97.3%; Fig. 1A-C). High-grade DCIS was identified in 293/403 cases (72.7%; Fig. 1C). There was no significant difference in nuclear grade between pure DCIS and DCIS associated with invasive carcinoma ($p=0.142$). The frequencies of different nuclear grades of DCIS and the relationship between nuclear grade and different single architectural patterns are respectively shown in Tables 2 and 3. Among DCIS with a single architectural pattern, high grade was more common in the solid subtype (151/168 cases, 89.9%; $p<0.001$). Only 32% of tumors with a cribriform pattern had high nuclear grade.

Comedonecrosis was present in 222/403 cases (55%; Fig. 1D). The frequencies of comedonecrosis in different architectural patterns are shown in Table 4. Among DCIS cases with a single growth pattern, comedonecrosis was more often in cases with a solid morphology ($p<0.001$). The cribriform, papillary and micropapillary subtypes more frequently did not present comedonecrosis ($p<0.001$).

Patients with high-grade DCIS were younger (mean age = 53 years) in relation to patients with low-grade DCIS (mean age = 58.4 years; $p=0.027$). Patients with tumours with comedonecrosis were also younger in comparison to patients with tumours without comedonecrosis ($p=0.003$).

Discussion

In the present study we evaluated morphological features of a series of DCIS pure (110 cases, 27.3% of the total) or associated with an invasive component (293 cases, 72.7% of the total) correlating them with the age of patients. Clinical and histological characteristics that may predict the risk of recurrence in women with DCIS include the age, tumour grade, presence of comedonecrosis, architectural subtype, tumor size, and width of resection margin [17, 18]. In our series we evaluated nuclear grade, comedonecrosis and age that are well established critical elements in the reporting of DCIS. Although recent genetic, molecular and immunohistochemical studies have contributed to advances in the understanding of the pathogenesis of DCIS, age and histopathological features remain the most established predictors of behavior in DCIS [1, 8, 19–25].

In our series, the majority of the cases (293 cases, 72.7% of the total) were high-grade DCIS; 15.2% of cases had an intermediate grade and 9.4% were low-grade DCIS. The classification of DCIS has been based on the architectural growth pattern. Cytonuclear differentiation of tumour cells is more important than the architectural growth pattern and various novel classifications of DCIS have been proposed. Almost all modern classifications separate DCIS into three categories (high, intermediate, and low grade), but differ in the choice of features that are used for categorization [26]. Studies have reported nuclear grade to be the most significant predictor of recurrence on both univariate and multivariate analysis [27, 28]. Therefore, cytonuclear grade has been used as the basic method for the assessment of intrinsic biological aggressiveness. Scripcaru and colleagues recognized, respectively, high-grade DCIS and intermediate nuclear grade in 45% and 41% of their cases [15]. These differences in the frequencies of grade are possibly attributed to the variation in the classification criteria, to the differences between the populations or to the detection method of the tumours (clinical or mammographically detected tumours).

We showed that comedonecrosis was significantly more often in solid morphology than in cribriform, papillary and micropapillary subtype ($p < 0.001$). Scripcaru et al. also identified a statistically significant difference between the presence of comedonecrosis in micropapillary and solid subtypes versus the cribriform morphology [15]. Comedonecrosis may be seen in association with any architectural pattern. The term “comedo DCIS” is widely used in historical series but does not confer either a specific grade or architecture to the lesion and there is no consensus in the literature regarding the amount of central necrosis required, so

reproducibility as a category of DCIS is questionable [4]. Although rates of ipsilateral breast tumour recurrence are generally higher for tumours with a component of comedonecrosis than for those without, irrespective of adjuvant therapies, the presence of necrosis might be a weaker predictor of ipsilateral breast tumor recurrence than cellular architecture and nuclear grade [29].

The architectural patterns of DCIS include solid, cribriform, micropapillary, papillary and unusual variants (apocrine, signet ring, neuroendocrine, spindled, squamous or clear cells) [1]. Some combinations of nuclear grade and architectural pattern tend to be more frequent than others but any combination can occur [7]. The current World Health Organization classification does not recognize the low-grade (monomorphic) variant of DCIS with an exclusive flat type (clinging) pattern and did not recommend this terminology [1].

Our results showed that high grade was more common in the solid subtype (89.9%; $p < 0.001$) and only 32% of tumors with a cribriform pattern had high nuclear grade. Solid DCIS is characterized by a proliferation of neoplastic cells that fill, expand, and distort a duct. Nuclear grades can range from high to low in solid DCIS, although pure solid DCIS with low nuclear grade is fairly rare. Low-grade DCIS with solid architecture sometimes raises the differential diagnosis of lobular carcinoma in situ [1, 30–32]. Cribriform DCIS is characterized by well-defined lumens lined by neoplastic cells. Such an orderly arrangement is rare in high-grade DCIS [7].

DCIS most frequently (62%) shows a mixture of architectures, which is seen almost twice as often as the second most commonly seen pattern (solid, 31.9%) [4]. In our series, 55.1% of cases displayed a single growth pattern and 44.9% showed a mixed growth pattern. Among architectural patterns, the solid subtype was more common (42.2%). Similar to our results, Scripcaru and colleagues also described that 58% of cases of DCIS displayed a single growth pattern and 42% showed a mixed growth pattern [15].

Silverstein's group showed age to be an independent prognostic factor for local recurrence, which led to incorporation of age into the Van Nuys Prognostic Index by the division of patients into three groups (≥ 61 years, 40-60 years and ≤ 39 years) [33]. Goldstein et al. examined pathologic features of DCIS in three different age groups of patients to identify differences that might explain why young patient age at the time of diagnosis is a risk for recurrence. They found that younger patients more frequently had higher nuclear grade DCIS, central necrosis, smaller initial biopsy maximum dimensions and close or positive margins [34].

In our series, patients with high grade DCIS were younger in relation to patients with low grade DCIS ($p=0.027$) and patients with tumours with comedonecrosis were also younger in comparison to patients with tumours without comedonecrosis ($p=0.003$). This group of younger patients may have an increased risk of local recurrence when treated with breast-conserving therapy due to a greater proportion of high nuclear grade DCIS and presence of comedonecrosis. In the present study, the type of treatment (radical or breast-conserving therapy) and the local recurrence were not evaluated. Maybe the association of high nuclear grade DCIS, comedonecrosis and younger patients can guide the clinicians to perform more aggressive surgical treatments, as these factors are associated with local recurrence.

Conclusions

The high nuclear grade and the presence of comedonecrosis were identified more frequently in DCIS of younger patients and more often correlated with the solid pattern DCIS. As clinical and histopathological features remain the most established predicts of behavior in DCIS, the choice of surgical treatment should be guide by them in addition to the size of DCIS and margin status.

Abbreviations

DCIS: ductal carcinoma in situ

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

APP conceived the study, participated in the review of the original slides, and drafted the manuscript. *MAS* participated in the design of the study and helped drafting the manuscript. *DB* performed the statistical analysis and helped drafting the manuscript. *HG* participated in

the design and coordination of the study, reviewed the original slides, and helped drafting the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from *Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)*, and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*.

Legend of figure

Figure 1 – Ductal carcinoma in situ of the breast: different nuclear grades and comedonecrosis

References

1. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4th edition. Lyon: *IARC*; 2012.
2. Siziopikou KP. **Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions**. *Arch Pathol Lab Med* 2013; **137**:462–466.
3. Bleicher RJ. **Ductal carcinoma in situ**. *Surg Clin North Am* 2013; **93**:393–410.
4. Pinder SE. **Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation**. *Mod Pathol* 2010; **23**:S8–13.
5. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. **Ductal carcinoma in situ of the breast**. *N Engl J Med* 2004; **350**:1430–1441.
6. Bane A. **Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why**. *Int J Breast Cancer* 2013; **2013**:914053.
7. Ross DS, Wen YH, Brogi E. **Ductal carcinoma in situ: morphology-based knowledge and molecular advances**. *Adv Anat Pathol* 2013; **20**:205–216.
8. Perez AA, Rocha RM, Balabram D, Souza AS, Gobbi H. **Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma in situ of the breast**. *Clinics* 2013; **68**:674–678.
9. Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, Hanna W. **Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review**. *Adv Anat Pathol* 2005; **12**:256–264.

10. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, Sanchez H, Jimenez C, Stewart K, Chew K, Ljung BM, Tlsty TD. **Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis.** *J Natl Cancer Inst* 2010; **102**:627–637.
11. Lari SA, Kuerer HM. **Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review.** *J Cancer* 2011; **2**:232–261.
12. Rakovitch E, Nofech-Mozes S, Hanna W, Narod S, Thiruchelvam D, Saskin R, Spayne J, Taylor C, Paszat L. **HER2/neu and Ki-67 expression predict non-invasive recurrence following breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ.** *Br J Cancer* 2012; **106**:1160–1165.
13. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Kleer C, O'Malley FP, Page DL, Smith BL, Tan LK, Weaver DL, Winer E. **Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast.** *Arch Pathol Lab Med* 2009; **133**:15–25.
14. Pinder SE, Ellis IO. **The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)--current definitions and classification.** *Breast Cancer Res* 2003; **5**:254–257.
15. Scripcaru G, Zardawi IM. **Mammary ductal carcinoma in situ: a fresh look at architectural patterns.** *Int J Surg Oncol* 2012; **2012**:979521.
16. Jaffer S, Bleiweiss JJ. **Histologic classification of ductal carcinoma in situ.** *Microsc Res Tech* 2002; **59**:92–101.
17. Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. **Histological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast: an Australian population-based study.** *Pathology* 2004; **36**:221–229.
18. Ringberg A, Idvall I, Fernö M, Anderson H, Anagnostaki L, Boiesen P, Bondenson L, Holm E, Johanson S, Lindholm K, Ljungberg O, Ostberg G. **Ipsilateral local recurrence in relation to therapy and morphological characteristics in patients with ductal carcinoma in situ of the breast.** *Eur J Surg Oncol* 2000; **26**:444–451.
19. Clark SE, Warwick J, Carpenter R, Bowen RL, Duffy SW, Jones JL. **Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease.** *Br J Cancer* 2011; **104**:120–127.
20. Gomes DS, Porto SS, Rocha RM, Gobbi H. **Usefulness and limitations of E-cadherin and β -catenin in the classification of breast carcinomas in situ with mixed pattern.** *Diagn Pathol* 2013; **8**:114.
21. Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. **Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer.** *Mod Pathol* 2006; **19**:617–621.
22. Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. **Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile.** *Mod Pathol* 2006; **19**:1506–1511.

23. Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Maia D, Jackson S, Tse CK, Nyante S, Millikan RC. **Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ.** *Hum Pathol* 2007; **38**:197–204.
24. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. **P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ.** *Virchows Arch* 2007; **450**:73–80.
25. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, Deitz AC, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA, Collins LC. **Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2008; **10**:R67.
26. Van de Vijver MJ. **Biological variables and prognosis of DCIS.** *Breast* 2005; **14**:509–519.
27. Wang S-Y, Shamliyan T, Virnig BA, Kane R. **Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis.** *Breast Cancer Res Treat* 2011; **127**:1–14.
28. Wapnir IL, Dignam JJ, Fisher B, Mamounas EP, Anderson SJ, Julian TB, Land SR, Margolese RG, Swain SM, Constantino JP, Wolmark N. **Long-term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS.** *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**:478–488.
29. Benson JR, Wishart GC. **Predictors of recurrence for ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery.** *Lancet Oncol* 2013; **14**:348–357.
30. Gomes DS, Porto SS, Balabram D, Gobbi H. **Inter-observer variability between general pathologists and a specialist in breast pathology in the diagnosis of lobular neoplasia, columnar cell lesions, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast.** *Diagn Pathol* 2014; **9**:121.
31. Salles M de A, Sanches FSF, Perez AA, Gobbi H. **Importance of a second opinion in breast surgical pathology and therapeutic implications.** *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; **30**:602–608.
32. Perez AA, Balabram D, Salles M de A, Gobbi H. **Consultation in breast surgical pathology: interobserver diagnostic variability of atypical intraductal proliferative lesions.** *Rev Bras Ginecol Obstet* 2013; **35**:164–170.
33. Silverstein MJ. **The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast.** *Am J Surg* 2003; **186**:337–343.
34. Goldstein NS, Kestin L, Vicini F. **Intraductal carcinoma of the breast: pathologic features associated with local recurrence in patients treated with breast-conserving therapy.** *Am J Surg Pathol* 2000; **24**:1058–1067.

Table 1: Frequencies of ductal carcinoma in situ subtypes

Architectural pattern	N	%
Solid*	170	42.2
Cribriform*	27	6.7
Papillary*	12	3.0
Micropapillary*	13	3.2
Apocrine*	00	00
Mixed	181	44.9
Total	403	100

* Single growth pattern

Table 2: Frequencies of nuclear grade of ductal carcinoma in situ

Nuclear grade	N	%
Low grade	38	9.4
Intermediate grade	61	15.2
High grade	293	72.7
Missing	11	2.7
Total	403	100

Table 3: Nuclear grade and architectural patterns of ductal carcinoma in situ

Nuclear grade	Architectural pattern*				Total
	Solid N (%)	Cribriform N (%)	Papillary N (%)	Micropapillary N (%)	
Low	08 (4.8)	08 (32.0)	02 (16.7)	02 (16.7)	20 (9.2)
Intermediate	09 (5.3)	09 (36.0)	01 (8.3)	01 (8.3)	20 (9.2)
High	151 (89.9)	08 (32.0)	09 (75.0)	09 (75.0)	177 (81.6)
Total	168 (100)	25 (100)	12 (100)	12 (100)	217 (100)
Missing	02	02	00	01	

p<0.001

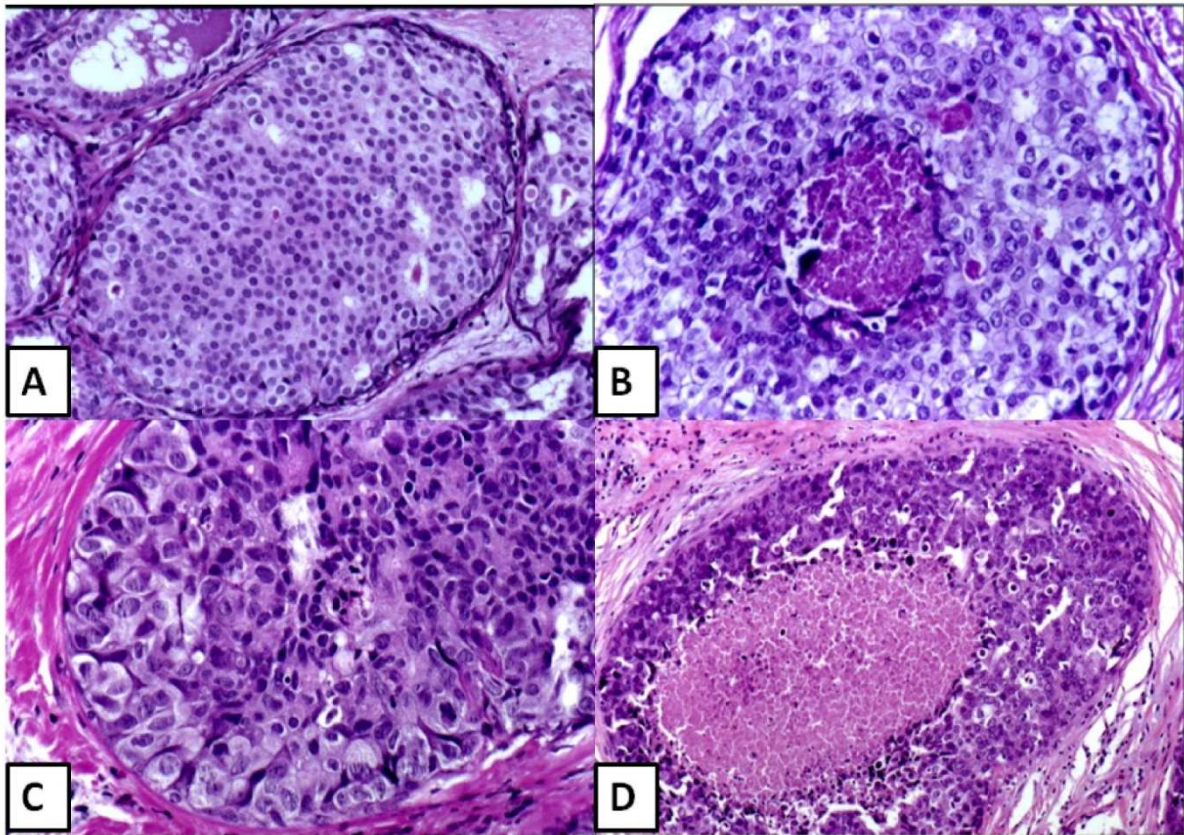
* Single growth pattern; p = significance level

Table 4: Comedonecrosis and architectural patterns of ductal carcinoma in situ

Comedonecrosis	Architectural pattern*				Total
	Solid N (%)	Cribriform N (%)	Papillary N (%)	Micropapillary N (%)	
Absent	36 (21.2)	21 (77.8)	09 (75.0)	08 (61.5)	74 (33.3)
Present	134 (78.8)	06 (22.2)	03 (25.0)	05 (38.5)	148 (66.7)
Total	170 (100)	27 (100)	12 (100)	13 (100)	222 (100)

p<0.001

* Single growth pattern; p = significance level



A - Low grade ductal carcinoma in situ, cribriform type, showing uniform cells with mild atypia. Hematoxylin and eosin, x100; B - Intermediate grade ductal carcinoma in situ, showing cells with mild to moderate atypia and focal necrosis. Hematoxylin and eosin, x400; C - High grade ductal carcinoma in situ, solid type, showing severe atypical cells, without necrosis. Hematoxylin and eosin, x400; D - High grade ductal carcinoma in situ, solid type with extensive comedonecrosis. Hematoxylin and eosin, x100

Figure 1

3.2 ARTIGO 2

Consultoria em patologia cirúrgica mamária: variabilidade interobservador no diagnóstico de lesões proliferativas intraductais atípicas

AMANDA ARANTES PEREZ¹
 DÉBORA BALABRAM²
 MARCIO DE ALMEIDA SALLES³
 HELENICE GOBBI⁴

Consultoria em patologia cirúrgica mamária: variabilidade interobservador no diagnóstico de lesões proliferativas intraductais atípicas

Consultation in breast surgical pathology: interobserver diagnostic variability of atypical intraductal proliferative lesions

Artigo Original

Palavras-chave

Mama/patologia
 Diagnóstico histopatológico,
 Variabilidade interobservador
 Hiperplasia/diagnóstico
 Carcinoma intraductal infiltrante/diagnóstico

Keywords

Breast/pathology
 Histopathological diagnosis,
 Interobserver variability
 Hyperplasia/diagnosis
 Carcinoma, Intraductal, Noninfiltrating/diagnosis

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a concordância nos diagnósticos histopatológicos de lesões mamárias proliferativas intraductais entre patologistas gerais e especialistas em patologia mamária. **MÉTODOS:** Trata-se de estudo observacional e transversal, com análise de 209 lesões encaminhadas ao Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para consultoria, no período de 2007 a 2011, comparando os diagnósticos originais com os após a revisão. Foram incluídos apenas os casos com solicitação formal de revisão e que apresentavam diagnóstico histopatológico no laudo original ou de revisão de lesões proliferativas, carcinoma ductal *in situ* puro, carcinoma ductal *in situ* com microinvasão ou associado a carcinoma invasor. A concordância percentual e o índice kappa foram utilizados para a análise estatística. **RESULTADOS:** Observamos moderada concordância nos diagnósticos originais de benignidade ou malignidade versus os diagnósticos de revisão (kappa=0,5; concordância percentual=83%). Após a revisão, o diagnóstico de malignidade foi confirmado em 140/163 casos (86%) e o diagnóstico de benignidade foi confirmado em 34/46 casos (74%). Quanto aos diagnósticos específicos, observamos concordância moderada entre o laudo original e de revisão (136/209 casos; kappa=0,5; concordância percentual=65%). A maior discordância foi observada nos casos de carcinoma ductal *in situ* com microinvasão (6/6 casos; 100%). Grande discordância foi observada nos casos de hiperplasia ductal atípica (16/30 casos; 53%) e carcinoma ductal *in situ* (25/75 casos; 33%). Em relação ao grau histológico do carcinoma ductal *in situ*, observou-se boa concordância entre os laudos originais e de revisão (29/39 casos; kappa=0,6; concordância percentual=74%). **CONCLUSÃO:** Nossos dados confirmam que as lesões mamárias proliferativas intraductais, em especial as hiperplasias ductais atípicas, o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma ductal *in situ* com microinvasão apresentam relevantes discordâncias nos diagnósticos histopatológicos, que podem induzir o clínico a erros nas decisões terapêuticas.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the agreement about the histopathological diagnosis of intraductal proliferative breast lesions between general pathologists and a specialist in breast pathology. **METHODS:** This was an observational, cross-sectional study of 209 lesions received in consultation at the Breast Pathology Laboratory of the School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, from 2007 to 2011, comparing the original diagnosis and the review. We included only cases with a formal request for review and cases in which the original diagnosis or reviewer's diagnosis showed proliferative lesions, pure ductal carcinoma *in situ*, ductal carcinoma *in situ* associated with microinvasion or associated with invasive carcinoma. The kappa index and percent concordance were used in the statistical analyses. **RESULTS:** A moderate agreement was observed between the original histopathological diagnosis and the second opinion (kappa=0.5; percentual concordance=83%). After the review, the diagnosis of malignancy was confirmed in 140/163 cases (86%) and the diagnosis of benign lesions was confirmed in 34/46 cases (74%). Regarding specific diagnosis, we observed moderate agreement between the original diagnosis and the reviewer's diagnosis (136/209 cases; kappa=0.5; percent concordance=65%). The highest disagreement was observed in cases of ductal carcinoma *in situ* with microinvasion (6/6 cases; 100%). Important discordance was observed in cases of atypical ductal hyperplasia (16/30 cases; 53%) and ductal carcinoma *in situ* (25/75 cases; 33%). Regarding the histological grade of ductal carcinoma *in situ*, we observed good agreement between the original diagnosis and the review (29/39 cases; kappa=0.6, percent agreement=74%). **CONCLUSION:** Our data confirm that intraductal proliferative breast lesions, especially atypical ductal hyperplasia, ductal carcinoma *in situ* and ductal carcinoma *in situ* with microinvasion show relevant discrepancies in the histopathological diagnoses, which may induce errors in therapeutic decisions.

Correspondência

Helenice Gobbi
 Avenida Prof. Alfredo Balena, 190 – Santa Efigênia
 CEP: 30130-100
 Belo Horizonte (MG), Brasil

Recebido:

25/03/2013

Aceito com modificações:

09/04/2013

Trabalho realizado no laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

³Hospital Vila da Serra – Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁴Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Conflito de interesse: não há.

Introdução

A frequência de lesões proliferativas intraductais atípicas e do carcinoma ductal *in situ* da mama (CDIS) apresentou aumento significativo nos últimos 20 anos, principalmente após a introdução de programas de rastreamento utilizando a mamografia^{1,2}. Ginecologistas e mastologistas têm-se deparado com estes diagnósticos de forma crescente também em nosso meio. A conduta terapêutica varia de acordo com o tipo de lesão proliferativa e o risco relativo para evolução para carcinoma invasor associado a elas.

Em anatomia patológica, a baixa variação interobservador geralmente funciona como um substituto para a avaliação da acurácia, e os erros são classificados em “maior” ou “menor” conforme a repercussão no tratamento ou no prognóstico da doença. “Erro maior” constitui erro que tenha efeito maior na terapia ou que possa alterar o prognóstico da doença; “erro menor” compreende erro sem efeito maior na terapia ou no prognóstico da doença³.

O diagnóstico diferencial entre as lesões mamárias proliferativas intraductais atípicas CDIS e CDIS com microinvasão pode, algumas vezes, ser difícil para os patologistas gerais e o tratamento modifica-se significativamente com base no diagnóstico final do patologista. Tais lesões têm sido objeto de estudos que mostram concordância diagnóstica variável e dificuldade na reprodução dos diagnósticos histopatológicos entre patologistas da comunidade e especialistas em patologia mamária⁴⁻⁹.

Estudo anterior de nosso grupo avaliou uma série de casos de lesões mamárias recebidos para revisão no período de 1999 a 2006. Observamos maior dificuldade e maior discordância no diagnóstico do CDIS e das lesões proliferativas intraductais, comparado aos diagnósticos de carcinomas invasores, para os quais há ótima concordância diagnóstica⁸.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a concordância nos diagnósticos histopatológicos de lesões mamárias proliferativas intraductais entre patologistas gerais e especialistas em patologia mamária, em casos recebidos em consultoria, com ênfase nos casos de hiperplasia ductal atípica (HDA), CDIS e CDIS com microinvasão, em um período de abrangência cinco anos posterior ao primeiro estudo.

Métodos

Trata-se de estudo observacional do tipo transversal, com análise de casos recebidos em consultoria no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais no período de 2007 a 2011 para obtenção de segunda opinião.

Os critérios de inclusão no estudo foram: casos encaminhados para consultoria em patologia mamária contendo solicitação formal de revisão e cópia do laudo

anatomopatológico original; diagnóstico histopatológico de lesões proliferativas intraductais (hiperplasia ductal usual, lesão de células colunares, atipia plana, HDA), CDIS puro, CDIS com microinvasão ou CDIS associado a carcinoma invasor nos laudos anatomopatológicos originais ou de revisão; casos em que a revisão foi realizada por única patologista (HG), especialista em patologia cirúrgica mamária e responsável pelo Serviço de Consultoria em Patologia Mamária há 24 anos. Os critérios de exclusão foram: casos de solicitação informal de revisão anatomopatológica, ou seja, que não apresentavam pedido formal de revisão; ausência de cópia do laudo anatomopatológico original; casos em que a revisão foi realizada por outro patologista do serviço; casos com diagnóstico original de neoplasia lobular *in situ* (NLIS), tumores fibroepiteliais (fibroadenomas, tumores *phylloides*, hamartomas), proliferações epiteliais benignas (adenose esclerosante, adenose apócrina, adenose microglandular, cicatriz radial, adenoma tubular, adenoma da lactação, adenoma apócrino, adenoma ductal), lesões papilares sem atipias ou neoplasia invasora pura (não associada a CDIS).

Foram selecionados inicialmente 388 casos com requisição formal de revisão e cópia dos laudos anatomopatológicos originais, avaliados por única patologista (HG). Destes, foram excluídos 62 casos com diagnóstico original de lesão benigna, incluindo tumores fibroepiteliais, proliferações epiteliais benignas, lesões papilares sem atipias e NLIS. Também foram excluídos 117 casos com diagnóstico original de carcinoma invasor puro (não associado a CDIS). Foram avaliados, portanto, 209 casos que apresentavam lesão proliferativa intraductal, CDIS puro, CDIS com microinvasão ou CDIS associado a carcinoma invasor como diagnóstico histopatológico no laudo original ou de revisão.

Avaliamos a procedência geográfica do material original, o tipo do espécime analisado e o solicitante da segunda opinião, sendo este categorizado como paciente/familiar ou médico assistente segundo a especialidade (Mastologista, Oncologista ou Patologista). Os casos não classificados nas categorias descritas anteriormente foram categorizados como “outros solicitantes”.

Aplicando-se estes critérios, a amostra em estudo ficou constituída por pacientes com idades variando de 20 a 86 anos (média de 51,7 anos; desvio padrão=11,4 anos). As solicitações de revisão anatomopatológica procederam, em sua maioria, de Belo Horizonte (170/209 casos; 81,4%), seguida do interior de Minas Gerais (31/209 casos; 14,8%) e de outros estados (08/209 casos; 3,8%). Os espécimes recebidos foram provenientes de setorectomias (174/209 casos; 83,3%), *core biopsy* ou biópsias incisionais (27/209 casos; 12,9%) e mastectomias (08/209 casos; 3,8%). Os mastologistas foram responsáveis por 84,7% das requisições (177/209 casos), seguidos dos patologistas

(15/209 casos; 7,1%) e oncologistas (14/209 casos; 6,7%). Apenas uma revisão foi solicitada pelo paciente ou familiar (0,5%) e duas requisições foram encaminhadas por outros solicitantes (1%).

Os diagnósticos originais e de revisão foram inicialmente classificados como benignos ou malignos. Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde¹⁰, as lesões foram agrupadas conforme o diagnóstico histopatológico específico: lesões benignas, incluindo tumores fibroepiteliais, proliferações epiteliais benignas e lesões papilares sem atipias; lesões proliferativas intraductais, incluindo hiperplasia ductal usual, lesão de células colunares e atipia plana; HDA; NLIS; CDIS; CDIS com microinvasão e carcinoma invasor. O grau histológico também foi avaliado nos casos de CDIS¹⁰.

Os critérios de Page e Anderson (1987)¹¹ foram utilizados pela consultora (HG) para classificação da HDA e do CDIS. Hiperplasia ductal atípica foi caracterizada pela proliferação de células monofórmicas, com distribuição regular, formando lumens secundários regulares, arredondados e uniformes. As lesões são pequenas e as células envolvem parcialmente dois ductos ou “espaços”, ou medem menos que dois milímetros. O CDIS é definido como proliferação epitelial de células atípicas, que envolve completamente dois “espaços” ou ductos, ou mede em conjunto mais de dois milímetros¹¹. Para o diagnóstico de CDIS com microinvasão foram utilizados os critérios de Ellis et al. (1998)¹². O diagnóstico de microinvasão compreende CDIS predominantemente e infiltração de células neoplásicas além da membrana basal no tecido conjuntivo não especializado ou extralobular até um milímetro na maior dimensão. Para o diagnóstico da NLIS foram utilizados os critérios propostos pela OMS¹⁰. O grau histológico do CDIS foi determinado utilizando os critérios de Scott et al.¹³, considerando o grau de atipia nuclear, a presença e a extensão da necrose.

A concordância percentual e o índice kappa foram utilizados para a análise da variação interobservador (diagnóstico original *versus* diagnóstico de revisão), sendo considerados os seguintes valores: <0,2 (ruim); 0,2–0,39 (fraca); 0,4–0,59 (moderada); 0,6–0,79 (boa); 0,8–1,00 (excelente)⁹.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (parecer ETIC 655/08).

Resultados

Dos 209 casos avaliados, 163 lesões foram classificadas como malignas (78% da amostra) e 46 lesões (22% da amostra) foram consideradas benignas no diagnóstico original. Após a revisão, o diagnóstico de malignidade foi confirmado em 140/163 casos (86%) e o diagnóstico de benignidade, em 34/46 casos (74%). Vinte e três lesões

caracterizadas inicialmente como malignas (23/163 casos; 14%) foram consideradas benignas pela consultora e 12/46 lesões (26%) originalmente classificadas como benignas foram consideradas malignas após a revisão. Observou-se moderada concordância nos diagnósticos originais de benignidade ou malignidade *versus* os diagnósticos de revisão (kappa=0,5; concordância percentual global=83%; Tabela 1).

Quanto aos diagnósticos específicos, também observamos concordância moderada entre o laudo original e de revisão (136/209 casos; kappa=0,5; concordância percentual=65%; Tabela 2). Houve discordância diagnóstica em 73/209 casos (35%). Com o diagnóstico de revisão, possível mudança terapêutica ocorreria em 27% dos casos (56/209 casos). Doze pacientes não teriam sido submetidas a tratamento oncológico (12/209 casos com diagnóstico original de lesão benigna, classificadas como lesão maligna após a revisão; 5,7%). Ao contrário, 23/209 casos (11%) classificados originalmente como malignos foram considerados benignos após a revisão. Treze pacientes (6,2%) teriam sido submetidas à abordagem axilar desnecessária e cinco pacientes (2,4%) não teriam sido submetidas à abordagem axilar após a revisão histopatológica.

Discordância importante foi observada nos diagnósticos de HDA (16/30 casos; 53%). Após a revisão, quatro lesões classificadas originalmente como HDA foram consideradas CDIS e uma lesão foi classificada como carcinoma invasor. Também observamos grande discordância nos diagnósticos de CDIS (25/75 casos; 33%) e CDIS com microinvasão (6/6 casos; 100%). Dos 75 casos com diagnóstico original de CDIS, 20 casos foram classificados como lesão benigna após a revisão (27%), duas lesões foram avaliadas como CDIS com microinvasão e três lesões foram reclassificadas como carcinoma invasor. Dos seis casos classificados originalmente como CDIS com microinvasão, três casos foram considerados CDIS sem microinvasão e três casos foram reclassificados como carcinoma invasor (Figura 1).

Em relação ao grau histológico do CDIS, observou-se boa concordância entre os laudos originais e de revisão (29/39 casos; índice de kappa=0,6; concordância percentual=74%). Em 11 casos o grau histológico do CDIS não foi descrito no laudo original, impossibilitando a comparação com o laudo de revisão. O alto grau histológico no

Tabela 1. Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico original e após a revisão, segundo as categorias: benigno ou maligno

Diagnóstico original	Diagnóstico após revisão		
	Benigno	Maligno	Total
Benigno	34	12	46
Maligno	23	140	163
Total	57	152	209

Índice de kappa: 0,55; concordância percentual global: 83%.

diagnóstico original foi confirmado em todos os casos após a revisão (14/39 casos). Dos 15 casos que apresentavam baixo grau histológico no diagnóstico original, nenhum foi reclassificado como alto grau após a revisão. Dois casos foram considerados de grau intermediário após a revisão.

Discussão

Estudos anteriores evidenciaram que as lesões proliferativas intraductais, em especial as hiperplasias ductais atípicas, o CDIS e o CDIS com microinvasão, apresentam dificuldades de diagnóstico histopatológico e concordância inter e intraobservador variável na literatura⁴⁻⁹. A conduta ou decisão terapêutica proposta pelo médico assistente depende, intrinsecamente, do diagnóstico emitido pelo patologista no laudo histopatológico. Portanto, um diagnóstico errôneo de uma lesão proliferativa intraductal pode acarretar em erro maior ou menor no processo de cuidado do paciente.

No presente estudo, observamos concordância moderada entre os diagnósticos de malignidade e benignidade nos

laudos originais e de revisão. Divergências diagnósticas entre lesões benignas *versus* malignas configuraram erros diagnósticos maiores, com repercussão no tratamento e/ou prognóstico dos pacientes. Lesões malignas classificadas erroneamente como benignas impossibilitam o tratamento oncológico adequado, acarretando prejuízos graves ao paciente. Por outro lado, lesões benignas classificadas erroneamente como malignas resultam em tratamentos cirúrgicos e oncológicos desnecessários, com aumento da morbidade. Estudo anterior de nosso grupo avaliando o diagnóstico de lesões mamárias em geral evidenciou boa concordância entre os diagnósticos originais e de revisão quanto à classificação benigno *versus* maligno⁸. O maior índice de concordância observado no estudo anterior pode, provavelmente, ser explicado pela inclusão de casos de lesões benignas não proliferativas e neoplasias invasivas puras. No estudo atual focalizamos nossa avaliação nas lesões que são consideradas na literatura de maior dificuldade no diagnóstico diferencial e referidas por alguns autores como lesões *borderline*^{4,5,9}.

Com relação à comparação dos diagnósticos específicos (originais *versus* de revisão), também observamos, no presente estudo, moderada concordância, semelhante à observada no estudo anterior de nosso grupo⁸. Após a revisão, possível mudança terapêutica ocorreria em 27% dos casos, com prejuízos relevantes, por subtratamento ou tratamentos desnecessários e excessivos. Sabe-se que o treinamento e uso de critérios padronizados aprimoram o diagnóstico das lesões mamárias *borderline* e melhoram a concordância interobservador^{5,7}.

Nossos resultados mostraram maior discordância no diagnóstico de CDIS com microinvasão. As alterações responsáveis por erros na interpretação diagnóstica foram: presença de denso infiltrado inflamatório, neoformação vascular e extensão da neoplasia para unidades lobulares (referido como cancerização de lóbulos). Em estudo anterior, também observamos maior discordância diagnóstica nos casos de CDIS com microinvasão⁸.

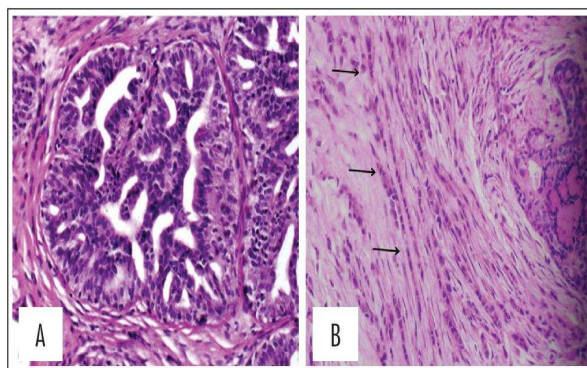


Figura 1. (A) Hiperplasia ductal atípica originalmente diagnosticada como carcinoma ductal *in situ*. Os dois ductos são incompletamente preenchidos pelas células atípicas. (B) Carcinoma ductal *in situ* com microinvasão no diagnóstico original. A dimensão da lesão invasiva (setas), maior que 1 mm, favoreceu o diagnóstico de carcinoma ductal invasor na revisão.

Tabela 2. Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico original e após a revisão, estratificando os diagnósticos específicos

Diagnóstico original	Diagnóstico após revisão							Total
	LB	LP	HDA	NLIS	CDIS	MIC	CI	
LB	0	0	2	0	2	0	0	4
LP	1	3	3	0	3	0	0	10
HDA	1	7	14	3	4	0	1	30
NLIS	0	0	0	1	2	0	0	3
CDIS	0	9	9	2	50	2	3	75
MIC	0	0	0	0	3	0	3	6
CI	0	2	1	0	7	3	68	81
Total	2	21	29	6	71	5	75	209

LB: lesão benigna (tumores fibroepiteliais, proliferações epiteliais benignas, lesões papilares sem atipias); LP: lesão proliferativa intraductal (hiperplasia ductal usual, lesão de células colunares, atipia plana); HDA: hiperplasia ductal atípica; NLIS: neoplasia lobular *in situ*; CDIS: carcinoma ductal *in situ*; MIC: carcinoma ductal *in situ* com microinvasão; CI: carcinoma invasor. Números em negrito indicam discordâncias diagnósticas (73/209 casos; 35%). Números sublinhados indicam possíveis mudanças terapêuticas (56/209 casos; 27%). Índice de kappa: 0,5; concordância percentual global: 65%.

No presente estudo, discordância relevante foi observada no diagnóstico de HDA, com mudança substancial no tratamento em cinco casos (17%). Concordância moderada entre os diagnósticos original e de revisão nos casos de HDA também foi observada em nosso estudo anterior ($\kappa=0,5$)⁸. Apesar deste tópico ser abordado em várias publicações, o diagnóstico diferencial entre HDA e CDIS de baixo grau e, algumas vezes, HDA versus hiperplasia ductal usual permanece um desafio para os patologistas. A HDA é definida como uma entidade que apresenta algumas, porém não todas as características do CDIS. As características morfológicas e as medidas quantitativas para definição do diagnóstico de HDA são subjetivas e ainda não há consenso sobre os critérios que deveriam ser utilizados para o diagnóstico¹⁴. Jain et al.⁹ observaram fraca concordância interobservador no diagnóstico de 81 lesões proliferativas avaliadas por nove patologistas diferentes ($\kappa=0,3$), com melhora significativa desta concordância após a realização de estudo imuno-histoquímico ($\kappa=0,5$; $p=0,015$).

Neste estudo, após a revisão, observamos discordância diagnóstica em 33% dos casos de CDIS, acarretando, em alguns casos, mudanças significativas no tratamento cirúrgico e adjuvante e, em outros, contraindicando tratamentos cirúrgicos agressivos, radioterapia e/ou hormonioterapia desnecessários. Em estudo anterior, observamos concordância interobservador desprezível ou mínima entre especialista internacional e cinco patologistas gerais da comunidade ($\kappa=0,09$ a $0,39$) no diagnóstico de CDIS⁶. A diferença de resultados entre o estudo atual e o anterior pode ser explicada pelos critérios de seleção. No presente estudo, selecionamos casos consecutivos encaminhados para consultoria em patologia cirúrgica mamária, com diagnóstico histopatológico de lesão proliferativa intraductal, com ou sem atipia, CDIS puro, CDIS com microinvasão ou associado a carcinoma invasor no laudo original ou de revisão. No estudo anterior, foram selecionados apenas casos que apresentavam divergências no diagnóstico de CDIS entre patologistas da comunidade e a consultora (HG). Os casos incluídos no estudo prévio foram reavaliados por especialista internacional (David L. Page, da Vanderbilt University, EUA), que foi considerado o diagnóstico de referência ou padrão-ouro nas comparações. Além disto, todos os casos incluídos eram de difícil diagnóstico, o que justificava a maior variação interobservador. Ainda na mesma linha de pesquisa, em trabalho posterior, avaliamos casos consecutivos encaminhados para consultoria em patologia mamária e observamos percentual de discordância no diagnóstico de CDIS semelhante ao descrito no presente estudo (percentual de discordância=36%)⁸. Se considerarmos que o estudo atual analisou casos diagnosticados em

um período de cinco anos após nosso primeiro estudo, podemos afirmar que a dificuldade diagnóstica das lesões avaliadas persiste em nosso meio.

O grau histológico é considerado preditor do comportamento biológico do CDIS, especialmente por sua associação com o risco de desenvolvimento de carcinoma invasor¹⁵. Poucos estudos avaliaram a concordância interobservador e a reprodutibilidade dos critérios de classificação do grau histológico do CDIS. No presente estudo, observamos boa concordância na avaliação do grau histológico do CDIS. O alto grau histológico no diagnóstico original foi confirmado em todos os casos após a revisão. Em estudo prévio, observamos concordância moderada ($\kappa=0,5$; concordância percentual=68,8%) na avaliação do grau nuclear do CDIS, não sendo avaliado o grau histológico das lesões⁸. Douglas-Jones et al.¹⁶ relataram moderada concordância interobservador entre patologistas não especialistas em patologia mamária em relação à avaliação do grau histológico do CDIS, com melhor concordância para a avaliação de necrose em relação ao grau nuclear.

Na classificação mais recente de tumores mamários da OMS (2012), as lesões mamárias são classificadas como tumores epiteliais, incluindo o carcinoma microinvasor e os carcinomas invasores; lesões precursoras (CDIS, NLIS); lesões proliferativas intraductais (hiperplasia ductal usual, lesão de células colunares, atipia plana, HDA); lesões papilares; proliferações epiteliais benignas (adenose esclerosante, adenose apócrina, adenose microglandular, adenomas, cicatriz radial) e tumores fibroepiteliais (fibroadenomas, tumores *phyllodes* e hamartomas)¹⁰. Para Masood e Rosa¹⁴, os critérios propostos por Dupont e Page (1985)¹⁷, considerando o risco para o desenvolvimento de câncer de mama, representam a maneira mais adequada de classificar as lesões *borderline* da mama, considerando-se lesões mamárias não proliferativas (cistos, hiperplasias leves), lesões proliferativas sem atipias (fibroadenoma complexo, hiperplasia moderada florida, adenose esclerosante, papiloma intraductal) e lesões proliferativas com atipias (HDA, HLA)¹⁴. No presente estudo, optamos por agrupar as lesões mamárias conforme a classificação mais recente proposta pela OMS. Para facilitar a análise, as lesões papilares sem atipias, as proliferações epiteliais benignas e as lesões proliferativas intraductais, excluindo a HDA, foram agrupadas sob o termo “lesões benignas”. Com o objetivo de enfatizar e discriminar a variabilidade interobservador especificamente nos diagnósticos de HDA, NLIS e CDIS, tais lesões foram analisadas separadamente. O diagnóstico de HDA em biópsia de mama significa aumento do risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama em aproximadamente 4 a 5 vezes, diferente dos diagnósticos de hiperplasia ductal usual, lesão de células colunares ou

atipia plana, considerados de risco leve (1,2 a 2 vezes). Dentro das lesões precursoras, a NLIS é considerada um fator de risco e um precursor não obrigatório para o câncer de mama; a conduta pode variar desde apenas acompanhamento clínico até a realização de mastectomia profilática e uso de hormonioterapia¹⁴. O tratamento do CDIS é definido considerando o potencial de evolução e recorrência da lesão; pode variar de uma ressecção segmentar isolada ou associada à radioterapia, até a realização de mastectomia¹⁸.

No presente estudo, apenas os casos encaminhados para consultoria em patologia mamária contendo solicitação formal de revisão e cópia do laudo anatomopatológico original foram incluídos, tendo em vista que a ausência da cópia do laudo original impossibilitaria a comparação dos diagnósticos original e final. Casos de solicitação informal de revisão, trazidos por colegas patologistas foram recebidos com maior frequência no Laboratório de Patologia Mamária, mas não foram incluídos no estudo. Optamos por não incluir os casos com diagnóstico original de NLIS, tumores fibroepiteliais, lesões papilares sem atipias ou neoplasia invasora pura, com o objetivo de enfatizar especificamente o diagnóstico histopatológico de lesões proliferativas intraductais, principalmente os casos de HDA, CDIS e CDIS com microinvasão.

Patologistas foram responsáveis por apenas 7,1% das solicitações formais de revisão. Recorrer formalmente a interconsultas com especialistas não é prática comum entre os patologistas em nosso meio. Muitos preferem realizar consultas informais, solicitadas como “gentileza” aos colegas especialistas, sem registrar no laudo que houve discussão do caso com outros colegas ou que seria importante a obtenção de

segunda opinião¹⁹. Ao contrário do Brasil, nos Estados Unidos a solicitação de segunda opinião em patologia é prática comum e muitos pedidos de segunda opinião são solicitados pelos próprios patologistas. Através de interconsultas, os médicos americanos procuram se resguardar de possíveis processos contra “má prática” ou erro médico, cuja consequência legal pode afetar todos os profissionais envolvidos no diagnóstico e tratamento do paciente²⁰⁻²².

Em conclusão, nossos dados confirmam que as lesões mamárias proliferativas intraductais, em especial as hiperplasias ductais atípicas, o CDIS e o CDIS com microinvasão, apresentam relevantes discordâncias nos diagnósticos histopatológicos, que podem induzir o clínico a erros maiores na conduta terapêutica. Com o uso crescente da mamografia de rastreamento e maior detecção das lesões proliferativas intraductais, torna-se necessário melhor treinamento dos patologistas da comunidade no reconhecimento dessas lesões, resultando, assim, em melhor acurácia diagnóstica. Baseado em nossos resultados, consideramos que a solicitação formal de segunda opinião em lesões mamárias precursoras e *borderline* deva ser estimulada em nosso meio, principalmente entre os patologistas, com o objetivo de diminuir erros diagnósticos, assegurar a conduta terapêutica adequada e garantir a segurança do paciente.

Agradecimentos

Este estudo teve suporte de recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1430-41.
- O'Sullivan MJ, Morrow M. Ductal carcinoma in situ: current management. *Surg Clin North Am*. 2007;87(2):333-51.
- Sirota RL. Defining error in anatomic pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(5):604-6.
- Rosai J. Borderline epithelial lesions of the breast. *Am J Surg Pathol*. 1991;15(3):209-21.
- Schnitt SJ, Connolly JL, Tavassoli FA, Fechner RE, Kempson RL, Gelman R, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(12):1133-43.
- Salles MA, Matias MARF, Resende LMP, Gobbi H. [Interobserver variation of the histopathologic diagnosis of ductal carcinoma in situ of the breast]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(1):1-6.
- Salles MA, Gouvêa AP, Savi D, Figueiredo MA, Tavares Neto R, Paula RA, et al. [Training and standardized criteria improve the diagnosis of premalignant breast lesions]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(11):550-5. Portuguese.
- Salles Mde A, Sanches FS, Perez AA, Gobbi H. [Importance of a second opinion in breast surgical pathology and therapeutic implications]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(12):602-8. Portuguese.
- Jain RK, Mehta R, Dimitrov R, Larsson LG, Musto PM, Hodges KB, et al. Atypical ductal hyperplasia: interobserver and intraobserver variability. *Mod Pathol*. 2011;24(7):917-23.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO classification of tumours of the breast. 4th ed. Lyon: IARC; 2012.
- Page DL, Anderson TJ. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987.

12. Ellis IO, Elston CW, Poller DN. Ductal carcinoma in situ. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998. p. 249-82.
13. Scott MA, Lagios MD, Axelsson K, Rogers LW, Anderson TJ, Page DL. Ductal carcinoma in situ of the breast: reproducibility of histological subtype analysis. *Hum Pathol*. 1997;28(8):967-73.
14. Masood S, Rosa M. Borderline breast lesions: diagnostic challenges and clinical implications. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(3):190-8.
15. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20(8):1319-29.
16. Douglas-Jones AG, Morgan JM, Appleton MA, Attanoos RL, Caslin A, Champ CS, et al. Consistency in the observation of features used to classify duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *J Clin Pathol*. 2000;53(8):596-602.
17. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*. 1985;312(3):146-51.
18. Schuh F, Biazús JV, Resetskova E, Benfica CZ, Edelweiss MIA. Reproducibility of tree classification systems of ductal carcinoma in situ of the breast using a web-based survey. *Pathol Res Pract*. 2010;206(10):705-11.
19. Cooper K. Errors and error rates in surgical pathology: an Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology survey. *Arch Pathol Med Lab*. 2006;130(5):607-9.
20. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Consultations in surgical pathology. *Am J Surg Pathol*. 1993;17(7):743-5.
21. Gupta D, Layfield LJ. Prevalence of inter-institutional anatomic pathology slide review: a survey of current practice. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(2):280-4.
22. Tomaszewski JE, Bear HD, Connally JA, Epstein JI, Feldman M, Foucar K, et al. Consensus conference on second opinions in diagnostic anatomic pathology. Who, What, and When. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):329-35.

3.3 ARTIGO 3

Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma in situ of the breast

Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma *in situ* of the breast

Amanda Arantes Perez,¹ Rafael Malagoli Rocha,¹¹ Débora Balabram,¹ Átila da Silva Souza,¹ Helenice Gobbi¹

¹ Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Breast Pathology Laboratory, Belo Horizonte/MG, Brazil. ¹¹ A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo/SP, Brazil.

OBJECTIVE: To determine the frequency of the immunohistochemical profiles of a series of high-grade ductal carcinoma *in situ* of the breast.

METHODS: One hundred and twenty-one cases of high-grade ductal carcinoma *in situ*, pure or associated with invasive mammary carcinoma, were identified from 2003 to 2008 and examined with immunohistochemistry for estrogen receptor, human epidermal growth factor receptor 2, cytokeratin 5, and epidermal growth factor receptor. The tumors were placed into five subgroups: luminal A, luminal B, HER2, basal-like, and "not classified".

RESULTS: The frequencies of the immunophenotypes of pure ductal carcinoma *in situ* were the following: luminal A (24/42 cases; 57.1%), luminal B (05/42 cases; 11.9%), HER2 (07/42 cases; 16.7%), basal-like phenotype (00/42 cases; 0%), and "not classified" (06/42 cases; 14.3%). The immunophenotypes of ductal carcinoma *in situ* associated with invasive carcinoma were the following: luminal A (46/79 cases; 58.2%), luminal B (10/79 cases; 12.7%), HER2 (06/79 cases; 7.6%), basal-like (06/79 cases; 7.6%), and "not classified" (11/79 cases; 13.9%). There was no significant difference in the immunophenotype frequencies between pure ductal carcinoma *in situ* and ductal carcinoma *in situ* associated with invasive carcinoma ($p > 0.05$). High agreement was observed in immunophenotypes between both components ($\kappa = 0.867$).

CONCLUSION: The most common immunophenotype of pure ductal carcinoma *in situ* was luminal A, followed by HER2. The basal-like phenotype was observed only in ductal carcinoma *in situ* associated with invasive carcinoma, which had a similar phenotype.

KEYWORDS: Ductal Carcinoma *in situ*; Molecular Profile; Immunoprofile; Molecular Phenotype.

Perez AA, Rocha RM, Balabram D, Souza AS, Gobbi H. Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma *in situ* of the breast. Clinics. 2013;68(5):1-5.

Received for publication on December 21, 2012; First review completed on January 4, 2013; Accepted for publication on February 4, 2013

E-mail: hgobbi@medicina.ufmg.br

Tel.: 55 31 34099118

INTRODUCTION

Breast cancer has a heterogeneous natural history and varying morphological and immunohistochemical profiles and prognoses. Until recently, the classification and therapeutic decisions regarding breast carcinoma were based on histological features and classical prognostic and predictive factors.

Recent cDNA microarray studies have identified distinct groups of tumors with disparate prognoses, resulting in a new classification of invasive breast carcinomas. Breast tumors are categorized into five subgroups based on their molecular profile: luminal A, luminal B, HER2, basal-like,

and normal breast-like (1–3). Gene expression signatures and protein expression profiles through immunohistochemistry correlate well in invasive breast cancers (4–8).

The basal-like subtype has attracted the attention of researchers and physicians because it has been associated with poor clinical outcomes. These outcomes likely reflect this subtype's high proliferative capacity and the lack of directed therapies, as basal-like tumors do not typically express estrogen receptor or overexpress HER2 (2–3). The basal-like phenotype is more frequent among invasive tumors that have a high histological grade (9–11).

Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) represents a precursor lesion to invasive breast cancer, in which most molecular alterations are already present (12). Based on this model, basal-like invasive ductal carcinomas, which are primarily high grade, arise from high-grade DCIS.

Many studies have evaluated invasive mammary carcinomas (IMCs), but few studies have examined the molecular profile of DCIS of the breast through immunohistochemistry. Assuming that DCIS is a precursor of invasive carcinoma, we expect that the molecular phenotypes

Copyright © 2013 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

DOI:

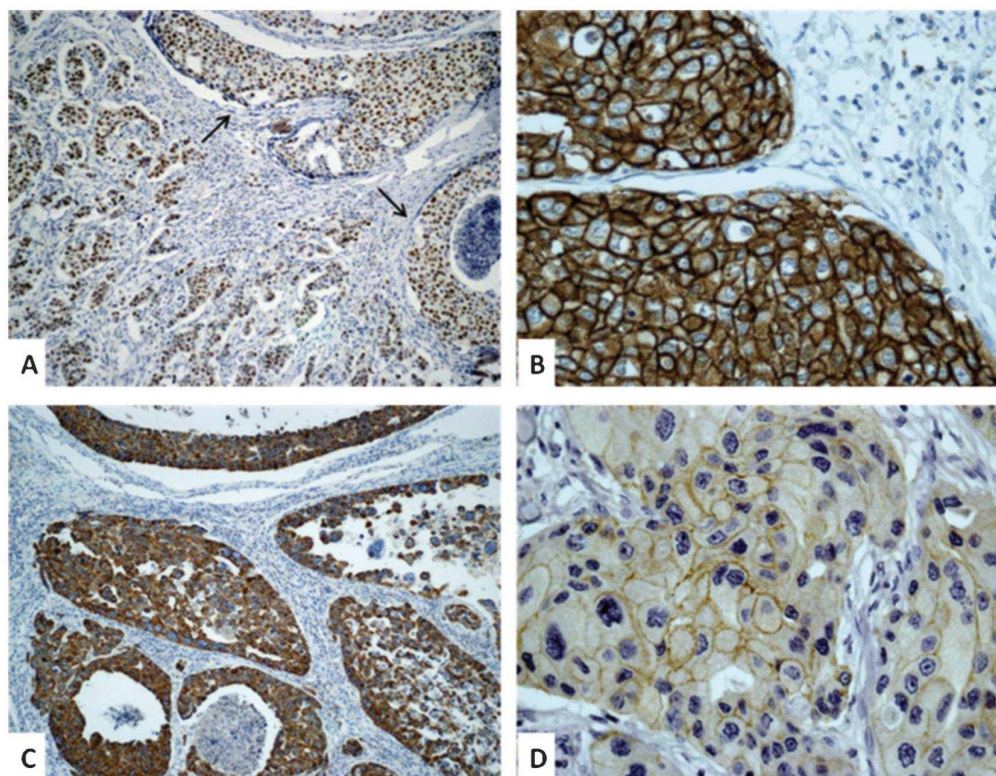


Figure 1 - A) High-grade ductal carcinoma *in situ* associated with invasive mammary carcinoma positive for estrogen receptor (100x). Arrows indicate the *in situ* component. **B)** High-grade ductal carcinoma *in situ* positive for HER2 (400x). **C)** High-grade ductal carcinoma *in situ* positive for cytokeratin 5 (100x). **D)** High-grade ductal carcinoma *in situ* positive for epidermal growth factor receptor (400x).

previously described for IMC will also be identified among cases of DCIS.

The purpose of this study was to determine the frequency of the basal-like phenotype and other immunophenotypes in a series of cases of high-grade DCIS of the breast, either pure or associated with invasive carcinoma, to compare the frequency of immunohistochemical profiles in pure or IMC-associated DCIS cases and to assess the agreement of immunophenotypes between *in situ* and invasive components in DCIS cases that are associated with invasive components. We chose a specific subset of high-grade DCIS because the basal-like phenotype is more frequent among invasive tumors that have a high histological grade (9–11). By identifying basal-like DCIS, these tumors can be treated more aggressively than other DCIS subtypes to improve the prognosis.

■ MATERIALS AND METHODS

Specimen selection

In total, 202 cases of high-grade DCIS, pure or associated with invasive carcinoma, were consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008. Seventy-one cases (35%) were excluded: 14 cases showed autolysis (7%), 32 cases received neoadjuvant chemotherapy (16%), 11 cases were a local recurrence following breast-conserving surgery (5%), and 14 cases had insufficient tumor tissue for sectioning (7%). The original hematoxylin and eosin-stained sections from 131

cases were reviewed to confirm the diagnosis of high-grade DCIS and select a representative block for immunostaining. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were not found in 10 cases (5% of the total). Thus, immunohistochemistry was performed in 121 high-grade DCIS cases (60% of the total).

The criteria defined by the World Health Organization (2012) were used for the histopathological diagnosis of DCIS (13). The DCIS histological grade was determined using the criteria of Scott et al., 1997 (14).

Clinical, tumor, and treatment features

The age at diagnosis, menopausal status, tumor size, primary surgical treatment, and adjuvant therapy were retrospectively evaluated.

Menopausal status was defined based upon in-person interview data.

Immunohistochemistry

Estrogen receptor (ER), HER2 overexpression, cytokeratin 5 (CK5), and epidermal growth factor receptor (EGFR) were assessed. The reactions were performed with automated equipment (BenchMark XT/LT™ – Ventana, USA) using the UltraView Universal REF 760–500 DAB kit (Ventana, USA) according to the manufacturer's instructions. The sources and dilutions of the primary antibodies are listed in Table 1.

Allred's scoring system was used to evaluate estrogen receptor status; cases were considered positive when at least

**Table 1** - Sources and dilutions of the primary antibodies.

Antibody	Clone	Dilution	Manufacturer, Country
ER	SP1	Ready to use	DAKO, USA
HER2	CB11	1/1000	NovoCastr, UK
CK5	XM26	1/50	NeomarkKers, USA
EGFR	31G7	1/25	Zymed, USA

1% of neoplastic cells showed moderate or strong nuclear staining (15). HER2 overexpression was analyzed according to the American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists (16). Any degree of cytoplasmic staining for CK5 and any degree of distinct membranous staining for EGFR were considered positive expression (17).

Immunohistochemical profile

The tumors were divided into five subgroups according to their immunohistochemical profile: luminal A (ER+/HER2-), luminal B (ER+/HER2+), HER2 (ER-/HER2+), basal-like (ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+), and "not classified" (all markers negative) (17,18). The basal-like phenotype was defined according to Nielsen's criteria (6).

Statistical analysis

Pearson's asymptotic and exact chi-square tests were used to compare proportions. The Mann-Whitney test was used to compare medians. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. The kappa test was used to assess the concordance between phenotypes. Kappa values greater than 0.80 demonstrated excellent agreement (19). This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (protocol 655/08).

RESULTS

Pure DCIS was detected in 46/131 cases (35% of the total), and 85/131 cases (65% of the total) were DCIS associated with invasive carcinoma. Immunohistochemistry was performed for 121 cases, including 42 cases of pure DCIS (35% of the total) and 79 cases of DCIS associated with invasive carcinoma (65% of the total).

The median age at diagnosis was 51 years (standard deviation \pm 14 years) among cases of pure DCIS and 53 years (standard deviation \pm 19 years) among cases of IMC-associated DCIS (p = 0.913). The median DCIS size was 13 mm. There was no significant difference in menopausal status (p = 0.779) or median tumor size (p = 0.836) between pure and IMC-associated DCIS cases. There was a significant difference in primary surgical treatment and adjuvant therapy between pure and IMC-associated DCIS cases (p < 0.05). Cases with DCIS associated with IMC were treated with more extensive surgery and more often received adjuvant therapy.

The frequencies of the molecular immunophenotypes of DCIS are shown in Table 2 and Figure 1. Among samples of pure DCIS, the luminal A phenotype was the most common (24/42 cases; 57.1%), followed by the HER2 phenotype (07/42 cases; 16.7%), the "not classified" phenotype (06/42 cases; 14.3%), and the luminal B phenotype (5/42 cases; 11.9%). The basal-like phenotype was not identified among the pure DCIS cases. The immunophenotypes of DCIS associated with invasive carcinoma were the following: luminal A (46/79 cases; 58.2%), luminal B (10/79 cases;

Table 2 - Immunohistochemical profile of high-grade DCIS (pure or associated with invasive mammary carcinoma).

Phenotype	Pure DCIS	DCIS + IMC	p -value*
	N (%)	N (%)	
Luminal A	24 (57.1%)	46 (58.2%)	0.264
Luminal B	05 (11.9%)	10 (12.7%)	
HER2	07 (16.7%)	06 (7.6%)	
Basal-like	00 (0%)	06 (7.6%)	
"Not classified"	06 (14.3%)	11 (13.9%)	
TOTAL	42 (100%)	79 (100%)	

DCIS = ductal carcinoma *in situ*; IMC = invasive mammary carcinoma
Luminal A: ER+/HER2-; Luminal B: ER+/HER2+; HER2: ER-/HER2+; Basal: ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+; "Not classified": ER-/HER2-/EGFR-/CK5-.
 p = significance level.

* = Exact Pearson's chi-square test; refers to *in situ* component (pure or associated with invasive carcinoma).

12.7%), HER2 (06/79 cases; 7.6%), basal-like (06/79 cases; 7.6%), and "not classified" (11/79 cases; 13.9%).

There was no significant difference in frequency between immunophenotypes in pure and IMC-associated DCIS samples (p > 0.05). Excellent agreement was observed between *in situ* and invasive components with regard to immunophenotypes (κ = 0.867).

DISCUSSION

Breast cancer comprises a heterogeneous group of diseases with regard to presentation, morphology, biological characteristics, clinical behavior, and response to therapy (6,9,20). In the past 20 years, concomitant with the wide use of screening mammography, the DCIS incidence has risen dramatically (21-22). The understanding of the biology and clinical behavior of DCIS is currently limited. Molecular profiling through gene array studies is likely to have a major impact on breast cancer classification and management, and it is important that similar approaches are taken to advance the understanding of DCIS.

The immunohistochemical staining of paraffin sections using antibody panels has been shown to be a reliable surrogate for the molecular classification of invasive breast cancers through gene expression profiling studies. Antibodies against estrogen receptor, progesterone receptor, HER2, cytokeratin 5/6, and EGFR have been particularly useful for this purpose (4-8). In fact, this approach to molecular classification (that is, using immunostaining as a surrogate for expression profiling) is arguably the most practical approach to phenotyping a large number of archived specimens for which fresh tissue is not available for expression array analysis.

Recent advances have led to an emerging molecular classification for invasive breast cancer based on the biological characteristics of the tumor rather than being limited to morphological analysis. Much less attention has been focused on dissecting the biological subtypes of DCIS, the immediate precursor to invasive breast cancer. There have been discrepancies in the results of those studies. There have also been discrepancies in the relative frequency of subtypes between *in situ* and invasive disease (17,20,23-26).

In our series, we showed that DCIS can be classified into the five immunophenotypes that have been described for



invasive breast carcinomas using a panel of four markers. Molecular classification improves the current morphological classification and provides insight into the biology underlying DCIS heterogeneity.

Previous studies have evaluated the immunoprofiles of DCIS independently of histological grade (17,20,23). Bryan et al. restricted their study to high-nuclear-grade DCIS lesions because basal-like invasive carcinomas are poorly differentiated tumors in histopathological studies (24). In our study, we chose a specific subset of high-grade DCIS of the breast to determine the frequency of the basal-like phenotype because this subtype is more frequent among invasive tumors that have a high histological grade (9–11,24).

Basal-like tumors have attracted the attention of pathologists, surgeons, and oncologists and constitute a prognostic group of breast cancers with aggressive behavior. These tumors affect younger patients, are more prevalent in African-American women, and exist more often as interval cancers (18). Basal-like tumors are candidates for specific targeted therapy. By identifying basal-like DCIS, surgeons and oncologists can likely treat these tumors more aggressively to improve the prognosis.

There is no consensus regarding markers that define basal-like tumors by immunohistochemistry (11). Some groups have suggested that basal-like tumors are triple negative, i.e., negative for estrogen and progesterone receptors and HER2. However, the triple-negative phenotype is not synonymous with the basal-like phenotype (9,27). Other authors consider the basal-like phenotype as showing positivity for basal cytokeratins, regardless of the expression of other markers (5). EGFR positivity, which is associated with positivity for basal cytokeratins and negativity for estrogen receptor and HER2, defines basal-like breast cancers for other authors (6,17–18). EGFR gene amplification and/or high EGFR expression are biological predictors of poor prognosis in breast carcinomas. EGFR has also been used as a marker of the basal phenotype and has been investigated as a potential target therapy for human breast cancer (17–18). In our study, we classified the basal-like phenotype according to Nielsen's criteria (6), which includes EGFR evaluation.

Our data demonstrated good agreement between the molecular profile of DCIS and synchronous IMC with regard to immunohistochemical phenotypes. Contemporary models suggest that high- and low-grade invasive ductal cancers arise through disparate pathways: high-grade IMC develops directly from poorly differentiated DCIS rather than low-grade IMC or low-grade DCIS. DCIS represents a stage in the development of breast cancer in which most molecular alterations are already present [12,28]. Based on this model, basal-like invasive ductal carcinomas, which are primarily high grade, arise from high-grade DCIS. Until recently, however, a basal-like *in situ* component was not known to exist.

Livasy et al., Paredes et al., Bryan et al., and Clark et al. observed the following frequencies of the basal phenotype in pure DCIS: 8%, 10.1%, 6%, and 4.2%, respectively (17,23–24,26). In our study, the basal-like phenotype was not identified among pure DCIS. We identified the basal phenotype in 7.6% of IMC-associated DCIS cases. Tamimi et al. observed a similar frequency (7.7%) of the basal phenotype for the *in situ* component (20). This difference in frequencies might be related to the criteria used to classify

tumors as well as variables from the preanalytical and analytical phases of immunohistochemical reactions, such as the choice of primary antibodies. According to the tumor type-specific evolution from DCIS to invasive carcinoma (28), another possible interpretation of these differences in frequencies is that the DCIS lesions in the cited papers were diagnosed at different stages of progression.

Our data showed an increased frequency of the HER2 phenotype in pure high-grade DCIS, which is consistent with previous studies demonstrating a higher prevalence of HER2 protein overexpression and gene amplification among DCIS in comparison to invasive breast cancers and suggesting that HER2/neu gene amplification is inversely related to invasive progression in DCIS patients (28–29).

We did not observe a significant difference in the frequencies of molecular phenotypes in pure or IMC-associated DCIS. Tamimi et al. showed differences in the frequencies of luminal A, luminal B, and HER2 phenotypes in pure DCIS *versus* invasive breast cancers, but there was no difference in the basal-like phenotype and “not classified” cases (20).

We did not observe the basal-like phenotype in pure DCIS, despite the presence of this profile in IMC-associated DCIS cases. Based on the tumor type-dependent model of breast cancer progression from DCIS to invasive cancer, triple-negative cancers may progress much faster than the other three tumor types, suggesting that some unrecognized mechanisms or features might help these tumors progress. At the time of breast tumor diagnosis, more aggressive types will have fewer DCIS lesions in comparison to the less aggressive types, with more tumors still in the DCIS phase. With regard to the speed of becoming invasive breast cancers, the fastest are the triple-negative lesions, while pure HER2-positive tumors are almost three times slower. Luminal A and luminal B DCIS are two tumor types that show intermediate probabilities of progression to invasive carcinoma (28). Therefore, our results are in agreement with the tumor type-dependent model of breast cancer progression from DCIS to invasive cancer.

In conclusion, immunophenotypes that were previously identified among invasive mammary carcinomas were also observed among cases of DCIS. The most common immunophenotype of pure DCIS was luminal A, followed by the HER2 phenotype. The basal-like phenotype was observed only in DCIS associated with invasive carcinoma, which had a similar phenotype. No significant difference was identified between pure DCIS and IMC-associated DCIS phenotypes. There is a critical need for prospective analyses of new and known breast cancer molecular markers in large cohorts of patients with DCIS to differentiate indolent from aggressive DCIS and better tailor the need and extent of current therapies.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Sandra J. Olson, MBs, for editing the manuscript for language. This work was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

■ AUTHOR CONTRIBUTIONS

Perez AA conceived the study, participated in the review of the original slides and analysis of the immunohistochemical reactions, and drafted the manuscript. Rocha RM performed the immunohistochemical reactions.



Balabram D performed the statistical analysis. Souza AS separated the original slides and blocks for immunohistochemistry. Gobbi H participated in the design and coordination of the study, review of original slides, and analysis of the immunohistochemical reactions and helped drafting the manuscript. All of the authors have read and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406(6797):747-52, <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-74, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8418-23, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0932692100>.
- Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*. 2006;208(4):495-506, <http://dx.doi.org/10.1002/path.1916>.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007;50(4):434-38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02638.x>.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264-71, <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800528>.
- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005;447(4):688-94, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-005-0010-7>.
- Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumors: a critical review. *Histopathology*. 2008;52(1):108-18.
- Silva F, Carvalho S, Milanezi F, Schmitt FC. Basal-like carcinoma of the breast. *Acta Med Port*. 2008;21(4):373-78.
- Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(5):358-73, <http://dx.doi.org/10.1097/PAP.0b013e31814b26fe>.
- Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast – evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol*. 1999;187(4):396-402, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199903\)187:4<396::AID-PATH286>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199903)187:4<396::AID-PATH286>3.0.CO;2-L).
- Schnitt SJ, Allred C, Britton P, Ellis IO, Lakhani SR, Morrow M, et al. Ductal carcinoma in situ. In: Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. IARC: Lyon; 2012.
- Scott MA, Lagios MD, Axelsson K, Rogers LW, Anderson TJ, Page DL. Ductal carcinoma in situ of the breast: reproducibility of histological subtype analysis. *Hum Pathol*. 1997;28(8):967-73, [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(97\)90013-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(97)90013-7).
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):907-22.
- 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. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45.
- Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Maia D, Jackson S, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2007;38(2):197-204, <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2006.08.017>.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74, <http://dx.doi.org/10.2307/2529310>.
- Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R67, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2128>.
- Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1430-41.
- O'Sullivan MJ, Morrow M. Ductal carcinoma in situ – current management. *Surg Clin N Am*. 2007;87(2):333-51.
- Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch*. 2007;450(1):73-80, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-006-0334-y>.
- Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2006;19(5):617-21, <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800570>.
- Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Mod Pathol*. 2006;19(11):1506-11.
- Clark SE, Warwick J, Carpenter R, Bowen RL, Duffy SW, Jones JL. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *Br J Cancer*. 2011;104(1):120-27, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6606021>.
- Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PPC, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics*. 2010;65(10):1033-36, <http://dx.doi.org/10.1590/S1807-59322010001000019>.
- Kurbel S. In search of triple-negative DCIS: tumor-type dependent model of breast cancer progression from DCIS to the invasive cancer. *Tumor Biol*. 2012. Dec 4. [Epub ahead of print].
- Allred DC, Clark GM, Molina R, Andon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 1992;23(9):974-79, [http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90257-4](http://dx.doi.org/10.1016/0046-8177(92)90257-4).

3.4 ARTIGO 4

Co-expression of p16, Ki67 and COX-2 is associated with basal phenotype in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast

Submetido ao periódico *Histopathology*, agosto de 2014

- Histopathology - Manuscript ID HISTOP-08-14-0531

• HISedoffice@wiley.com

Ago 23 em 2:32 PM

Para Eu, Eu, debalabra@gmail.com, e 3 Mais...

23-Aug-2014

Dear Mr Amanda Perez,

Your manuscript entitled "Co-expression of p16, Ki67 and COX-2 is associated with basal phenotype in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Histopathology*.

Your manuscript ID is HISTOP-08-14-0531.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/histop> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/histop>.

Thank you for submitting your manuscript to *Histopathology*.

Yours sincerely,

Ms Liz McLaren
Editorial Assistant
Histopathology

Histopathology



Co-expression of p16, Ki67 and COX-2 is associated with basal phenotype in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast

Journal:	<i>Histopathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Perez, Amanda; Federal University of Minas Gerais, Breast Pathology Laboratory Balabram, Débora; Federal University of Minas Gerais, Breast Pathology Laboratory Rocha, Rafael; A.C Camargo Cancer Hospital, Souza, Átila; Federal University of Minas Gerais, Breast Pathology Laboratory Gobbi, Helenice; Federal University of Minas Gerais, Breast Pathology Laboratory
Keywords:	biological markers, biomarkers, ductal carcinoma in situ, breast cancer

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: Co-expression of p16, Ki67 and COX-2 is associated with basal phenotype in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast

Short running title: p16, Ki67 and COX-2 expression in high-grade DCIS

Authors and institutional addresses:

Amanda Arantes Perez¹, Débora Balabram¹, Rafael Malagoli Rocha², Átila da Silva Souza¹, Helenice Gobbi¹

¹ Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil

² A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Helenice Gobbi

Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil

Postal address: Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, CEP: 30130-100

Telephone number: +55 31 3409-9118

Email address: hgobbi@medicina.ufmg.br

Competing interests: None to declare.

Word count: 2423 words

Abstract

Aim: To evaluate the co-expression of cell cycle related biomarkers in a series of cases of high-grade DCIS, pure or associated with invasive carcinoma, and their association with the different immunoprofiles of DCIS.

Methods: We evaluated 121 cases of high-grade DCIS, pure or associated with invasive carcinoma, consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008. Estrogen receptor, progesterone receptor, HER2 overexpression, cytokeratin 5, epidermal growth factor receptor 1, cyclooxygenase-2, p16 and Ki67 were assessed. Tumours were placed into five subgroups according to their immunohistochemical profile: luminal A, luminal B, HER2, basal-like and “not classified”.

Results: Basal phenotype was associated with higher frequency of p16 positive cases (83%) and luminal A phenotype showed higher frequency of p16 negative cases (93%; $p=0.000$). The association of biomarkers p16+/Ki67+/COX2+ was expressed in 02/06 cases (33.3%) of the basal phenotype but only in 01/70 cases (1.4%) of the luminal A phenotype ($p=0.01$). The co-expression of p16+/Ki67+/COX2- was associated with basal phenotype ($p=0.004$).

Conclusion: p16 expression, p16+/Ki67+/COX2+ and p16+/Ki67+/COX2- co-expressions showed significant association with basal phenotype and they could be useful to guide more aggressive treatments in patients with high-grade DCIS.

Keywords: biological markers, biomarkers, ductal carcinoma in situ, breast cancer

Introduction

Ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS) is a heterogeneous group of preinvasive lesions characterized by varying degrees of risk for transformation into invasive carcinoma. With the introduction of screening mammography programs in developed countries, the incidence of DCIS has increased in recent years^{1,2}. DCIS constitutes 20% of all newly diagnosed breast cancer cases and 30% to 40% of breast cancers diagnosed mammographically in the United States of America³. In Brazil, where there was no well-established screening program during the period of this study, the opportunistic screening prevails and breast cancer is still diagnosed in advanced stages. It is estimated that DCIS represents less than 10% of diagnoses of breast cancer in Brazil^{4,5}.

In order to investigate risk factors associated with progression from DCIS to invasive carcinoma, genetic and molecular studies have been conducted^{3,6}. However, we are still unable to predict an individual patient's risk of developing invasive breast cancer.

A biomarker is a molecular feature that is objectively measured and serves as an indicator of a normal biological response, a pathogenic process, or the likelihood of response to an existing or novel pharmacologic therapy⁷. For DCIS, the perfect biomarker or combination of biomarkers would establish which cases were highly associated with progression to invasive breast cancer and thus determine which patients needed further therapy⁷.

Currently, estrogen receptor is the only biomarker validated for routine clinical use in DCIS⁸. There is a controversy regarding whether routine progesterone receptor testing is necessary in DCIS. Other biomarkers expressed in invasive breast cancers have been

evaluated in DCIS, although the prevalence of expression of these markers differs in invasive carcinoma and DCIS⁹⁻¹⁴. Furthermore, all of the molecular subtypes found in invasive cancer, i.e., luminal A, luminal B, HER2 and basal-like are identified in DCIS⁸.

High grade DCIS has been associated with an increased risk of recurrence and progression to invasive carcinoma⁸. However, current management strategies are based only on conventional histopathological, host factors, and estrogen receptor status. Additional molecular characterization of high grade DCIS would provide more information about both prognosis and benefit from adjuvant treatments.

The purpose of this study is to evaluate the co-expression of cell cycle related biomarkers in a series of cases of high-grade ductal carcinoma in situ, pure or associated with invasive carcinoma, and their association with the different immunoprofiles of DCIS.

Material and methods

Specimen selection

We evaluated 121 cases of high-grade DCIS, pure or associated with invasive mammary carcinoma (IMC), consecutively identified from the histopathology files of the Breast Pathology Laboratory, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil, from 2003 to 2008. The original hematoxylin and eosin-stained sections were reviewed to confirm the diagnosis of high-grade DCIS and select a representative block for additional immunostaining. The criteria defined by the World Health Organization were used for the histopathological diagnosis and grading of DCIS⁸.

Immunohistochemistry

Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), epidermal growth factor receptor 2 overexpression (HER2), cytokeratin 5 (CK5), epidermal growth factor receptor 1 (EGFR), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor suppressor protein p16 and nuclear antigen Ki67 were assessed. The reactions were performed in an automated equipment (BenchMark XT / LT™ – Ventana, USA) using the UltraView Universal REF 760-500 DAB kit (Ventana, USA) according to the manufacturer's instructions. The sources and dilutions of the primary antibodies are listed in Table 1.

Allred's scoring system was used to evaluate estrogen and progesterone receptor status; cases were considered positive when more than 1% of neoplastic cells showed moderate or strong nuclear staining¹⁵. HER2 overexpression was analyzed according to the American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists recommendations; circumferential membrane staining complete, intense, and within more than 10% of tumour cells was considered HER2-positive status¹⁶. Any degree of cytoplasmic staining for CK5 and any degree of distinct membranous staining for EGFR were considered positive expression¹³. The COX-2 expression was evaluated according to the criteria described by Ristimäki et al.: 0, no staining; 1+, weak diffuse cytoplasmic staining (may contain stronger intensity in less than 10% of the cancer cells); 2+, moderate to strong granular cytoplasmic staining in 10-90% of cancer cells; 3+, over 90% of the tumour cells stained with strong intensity. Scores 2+ and 3+ were considered COX-2 positive¹⁷. For p16 the staining was graded as 0 (no cells staining), 1+ (diffuse weak nuclear or cytoplasmic blush or <25% cell showing strong staining), 2+ (25% to 75% of cells with strong staining), and 3+ (>75% cells showing strong staining). Score 3+ was considered high p16 expression¹⁸. The Ki67 labeling index was

determined by counting ≥ 500 nuclei in areas of the section with the highest labeling rates and a threshold of $\geq 20\%$ was indicative of a high proliferation index¹⁹.

Immunohistochemical profile

Both components (in situ and invasive) of tumours were placed into five subgroups according to their immunohistochemical profile: luminal A (ER+/HER2-), luminal B (ER+/HER2+), HER2 (ER-/HER2+), basal-like (ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+), and “not classified” (all markers negative)^{13,20,21}.

Statistical analysis

The Pearson's chi-square test and Fisher's exact test were used to evaluate the expression of the molecular markers. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (protocol 655/08).

Results

The mean age at diagnosis was 53.4 years (standard deviation ± 11.9 years). Pure DCIS was detected in 42/121 cases (35% of the total), whereas 79/121 cases (65% of the total) cases were associated with invasive mammary carcinoma.

The frequencies of the expression of biomarkers of high-grade DCIS are shown in Table 2. We identified high Ki67 proliferation index (28/40 cases, 70% for pure DCIS and 51/71 cases, 71.8% for IMC-associated DCIS; Fig. 1A) and high ER positivity (29/42 cases, 69% for pure DCIS and 56/79 cases, 70.9% for IMC-associated DCIS; Fig. 1B)

in the majority of cases. There was no significant difference in frequency between biomarkers in pure and IMC-associated DCIS samples ($p>0.05$).

The cyclooxygenase-2 was evaluated in 118/121 cases (97.5% of the total). DCIS was absent in three slides stained for COX-2 (2.5% of the total). The COX-2 was negative in 80/118 cases (68%) and positive in 38/118 cases (32%; Fig. 1C; Table 2). The COX2 was positive in 23% of ER-positive (27/118 cases), 11% of HER-positive (12/109 cases), 2% of CK5-positive cases (02/118 cases) and 21% of cases with high Ki67 expression (23/110 cases). There was no significant association between COX-2 expression and the biomarkers ER, HER2, Ki67 and CK5 ($p>0.05$; data not shown).

Ki67 was evaluated in 111/121 cases (92% of the total). DCIS was absent in ten slides stained for Ki67 (8% of the total). High proliferative activity was identified in 48% of ER-positive cases (53/111 cases), 20% of HER2-positive cases (21/103 cases) and 7% of CK5-positive cases (08/111 cases). There was no significant association between proliferative index and the expression of ER, HER2 and CK5 ($p>0.05$; data not shown).

P16 was evaluated in 119/121 cases (98% of the total). DCIS was absent in two slides stained for p16 (2% of the cases). P16 was positive (Fig. 1D) in 76/119 (64%) of ER-negative cases but only in 08/119 (7%) of ER-positive cases ($p=0.040$; Table 3). P16 was positive in 07/119 (6%) of CK5-positive cases and only in 04/119 (3%) of CK5-negative cases ($p=0.000$; Table 3).

Basal phenotype was associated with higher expression of p16 (83%) and luminal A phenotype was associated with negativity for p16 (93%; $p=0.000$; Table 4).

The associations between molecular subtypes and the co-expression of biomarkers COX-2, p16 and Ki67 are shown in Table 5. The co-expression of biomarkers was not evaluated in eleven cases because of the absence of tumour in the immunostained slide for one of the markers. P16 was positive in 05/06 cases (83%) of basal phenotype but only in 05/70 cases (7%) of luminal A phenotype ($p=0.0004$; Table 5). The association of biomarkers p16+/Ki67+/COX2+ was expressed in 02/06 cases (33.3%) of basal phenotype but only in 01/70 cases (1.4%) of luminal A phenotype ($p=0.01$; Table 5). The co-expression of p16+/Ki67+/COX2- was associated with basal phenotype (03/06 cases, 50%, $p=0.004$; Table 5).

Discussion

Aiming to contribute to a better understanding of molecular features of DCIS, we determined the frequencies of cell cycle related biomarkers in a series of cases of high-grade DCIS, pure or associated with invasive carcinoma. We also evaluated the co-expression of these markers and their association with the different molecular profiles of DCIS. We selected a specific subset of high-grade DCIS of the breast because it has a higher risk of local recurrence and progression to invasive carcinoma⁸. In our series, we evaluated pure and IMC-associated DCIS samples and we did not observe a significant difference in the frequency of each biomarker in pure or IMC-associated DCIS subgroups ($p>0.05$).

Previous studies have been conducted to identify important biomarkers associated with DCIS and candidate biomarkers associated with increased risk of ipsilateral recurrence after a diagnosis of DCIS^{6,9,22–27}. For DCIS, the optimal biomarker or combination of biomarkers would provide additional prognostic information beyond that provided by

other clinical and pathologic factors established in the field as risk factors for local recurrence, such as DCIS grade and size, patient's age, margin status, and use versus nonuse of adjuvant radiation and endocrine therapies ⁷.

Although our series was composed of high grade DCIS, we found positivity for ER in 69% of pure DCIS cases and 70.9% of IMC-associated DCIS, frequencies that are in accordance with the literature (range: 49 to 96.6%, mean: 68.7%) ⁷. A previous study revealed ER expression to be inversely related to the nuclear grade of DCIS: ER expression was higher in well-differentiated lesions than in poorly differentiated lesions ⁷. Estrogen receptor is the only biomarker validated for routine clinical use in DCIS ⁸. ER status in patients with breast cancer predicts response to endocrine therapy and there is an association between ER-negative DCIS and higher risk of local recurrence²⁸.

Our data showed a lower frequency of COX-2 positivity in high grade DCIS (32%) in comparison with the few studies of the literature that evaluated this marker (mean: 62.4%) ⁷. This difference could partly be attributable to different scoring systems and cut-offs used for COX-2 immunoreactivity. According to our data, COX-2 alone did not show a significant association with the expression of other biomarkers or different molecular phenotypes. Cyclooxygenase-2 is a cytoplasmic enzyme involved in prostaglandin synthesis and prostaglandins are pro-angiogenic molecules ²⁴. COX-2 overexpression has been shown to be upregulated in neoplastic and preneoplastic lesions of the breast and its expression has been associated with higher nuclear grade, high Ki67 expression, ER negativity, HER2 positivity and risk of local-regional recurrence in DCIS ⁷. There are evidences suggesting that COX-2 inhibitors may function as chemopreventive agents in breast cancer and DCIS lesions^{29,30}.

We identified a high Ki67 proliferation index in the majority of cases of our series (70% for pure DCIS and 71.8% for IMC-associated DCIS). The Ki67 expression rate in our series is likely higher than the mean rate described in other studies (10.9 – 15.5%), which included DCIS of different grades⁷. Tumour proliferation rate may be evaluated by measuring the S phase fraction by flow cytometry but this method is rarely applied in routine evaluation of tumours. Ki67 expression correlates with the S, G1, G2 and M phases, but is nonexistent in G0 phase³¹. Mitotic count correlates with grade and high proliferative activity is associated with high-grade DCIS lesions^{7,24}. No standard evaluation score or generally accepted cut-off definition for Ki67 exists³¹. In this study, we used the criteria proposed by the 2013's St. Gallen Consensus, i.e., a threshold of $\geq 20\%$ was indicative of a high proliferation index¹⁹. In our series, there was no significant association between Ki67 positivity and the expression of ER, HER2 and CK5 ($p > 0.05$). The tumour proliferation rate is an important prognostic factor in invasive breast cancer. Although Ki67 has been frequently studied in DCIS, it is not validated as a prognostic factor independent of the tumour grade^{7,24}.

Our results identified a lower frequency of p16 positivity (10% in pure DCIS and 16.5% in IMC-associated DCIS) in comparison with the literature data (range: 28 to 39.3%)⁷. Possibly, different criteria used to evaluate the expression of this biomarker could justify this difference. We found a significant association among p16 positivity, CK5-positivity and ER-negative cases. P16 is a tumour suppressor protein that regulates cellular proliferation, growth and is also associated with local recurrence and progression to invasive cancer. Thus, we believe that p16 expression in high-grade DCIS would help clinicians to treat patients with p16 expression more aggressively.

In our series, basal phenotype was associated with a higher frequency of p16 positive cases (83%) and luminal A phenotype showed a higher frequency of p16 negative cases (93%). It is known that luminal A phenotype has the best prognosis and the basal-like phenotype usually has a poor prognosis in invasive breast cancer^{32,33}.

In the present study, the co-expression of p16, Ki67 and COX-2 (triple positive, p16+/Ki67+/COX2+) was more frequently associated with basal phenotype than with luminal A DCIS (33.3% versus 1.4%; $p=0.01$). We also identified a significant association between the pattern p16+/Ki67+/COX2- and the basal phenotype ($p=0.004$). Kerlikowske and colleagues demonstrated that women with DCIS that were p16, Ki67 and COX-2 positive (p16+/Ki67+/COX2+) presented an eight-year risk of subsequent invasive cancer significantly higher than women who were p16, Ki67 and COX-2 negative (hazard ratio = 2.2; 95% confidence interval = 1.1 to 4.5)²⁵. They also showed a higher eight-year risk of subsequent DCIS for women with p16+/Ki67+/COX2- status (hazard ratio = 3.7; 95% confidence interval = 1.7 to 7.9)²⁵.

In our series, we did not perform the follow-up of patients due to the short time span after the initial diagnosis and the need for at least 8 to 10 years for evaluation of local recurrence of DCIS. Moreover, the follow-up evaluation would require a larger number of pure DCIS cases.

In conclusion, the p16 expression, isolated or in combination with Ki67 and COX-2, is associated with basal phenotype in high-grade DCIS. Maybe these biomarkers could be incorporated into the routine clinical practice of DCIS evaluation and this "triple test" could be useful to guide more aggressive treatments in patients with high-grade DCIS

and/or to develop new targeted therapies in chemoprevention. It would be interesting to follow-up these cases to confirm the value of p16, Ki67, COX-2 and to validate these co-expressions as prognostic and/or predictive factors in DCIS of the breast.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from *Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)*, and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*.

References

1. O'Sullivan MJ, Morrow M. Ductal carcinoma in situ--current management. *Surg Clin North Am.* 2007; 87; 333–351.
2. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* 2004; 350; 1430–1441.
3. Siziopikou KP. Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137; 462–466.
4. Brazil. National Cancer Institute. Breast Cancer; [Accessed Aug 23, 2014]: Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>.
5. Brazil. National Cancer Institute. Informativo Vigilância do Câncer. Perfil da morbimortalidade brasileira do câncer de mama; [Accessed Aug 23, 2014]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/controler_cancer.
6. Ross DS, Wen YH, Brogi E. Ductal carcinoma in situ: morphology-based knowledge and molecular advances. *Adv Anat Pathol.* 2013; 20; 205–216.
7. Lari SA, Kuerer HM. Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review. *J Cancer.* 2011; 2; 232–261.

8. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan P, van de Vijver M, editors. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. *IARC*. Lyon; 2012.
9. Perez AA, Rocha RM, Balabram D, Souza Á da S, Gobbi H. Immunohistochemical profile of high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Clinics*. 2013; 68; 674–678.
10. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008; 10; R67.
11. Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2006; 19; 617–621.
12. Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Mod Pathol*. 2006; 19; 1506–1511.
13. Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Maia D, Jackson S, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2007; 38; 197–204.
14. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch*. 2007; 450; 73–80.
15. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*. 2010; 6; 195–197.
16. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013; 31; 3997–4013.
17. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002; 62; 632–635.
18. Witkiewicz AK, Rivadeneira DB, Ertel A, Kline J, Hyslop T, Schwartz GF, et al. Association of RB/p16-pathway perturbations with DCIS recurrence: dependence on tumor versus tissue microenvironment. *Am J Pathol*. 2011; 179; 1171–1178.
19. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013; 24; 2206–2223.

20. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295; 2492–2502.
21. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10; 5367–5374.
22. Benson JR, Wishart GC. Predictors of recurrence for ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. *Lancet Oncol*. 2013; 14; 348–357.
23. Wang S-Y, Shamliyan T, Virnig BA, Kane R. Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 127; 1–14.
24. Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, Hanna W. Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review. *Adv Anat Pathol*. 2005; 12; 256–264.
25. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102; 627–637.
26. Rakovitch E, Nofech-Mozes S, Hanna W, Narod S, Thiruchelvam D, Saskin R, et al. HER2/neu and Ki-67 expression predict non-invasive recurrence following breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer*. 2012; 106; 1160–1165.
27. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010; 57; 171–192.
28. Provenzano E, Hopper JL, Giles GG, Marr G, Venter DJ, Armes JE. Biological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer*. 2003; 39; 622–630.
29. Leo C, Faber S, Hentschel B, Höckel M, Horn L-C. The status of cyclooxygenase-2 expression in ductal carcinoma in situ lesions and invasive breast cancer correlates to cyclooxygenase-2 expression in normal breast tissue. *Ann Diagn Pathol*. 2006; 10; 327–332.
30. Generali D, Buffa FM, Deb S, Cummings M, Reid LE, Taylor M, et al. COX-2 expression is predictive for early relapse and aromatase inhibitor resistance in patients with ductal carcinoma in situ of the breast, and is a target for treatment. *Br J Cancer*. 2014; 111; 46–54.
31. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 139; 539–552.

32. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406; 747–752.
33. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100; 8418–8423.

Legend

Figure 1: High-grade ductal carcinoma in situ of the breast. A: High Ki67 proliferation index (400x); B: Estrogen receptor positivity (400x); C: Cyclooxygenase-2 positivity (400x); D: p16 positivity (400x).

Authors' contributions:

Amanda Arantes Perez conceived the study, participated in the review of the original slides, analyzed the immunohistochemical reactions, and drafted the manuscript. Rafael Malagoli Rocha performed the immunohistochemical reactions. Débora Balabram helped in the statistical analysis and helped drafting the manuscript. Átila da Silva Souza retrieved the original slides and blocks for immunohistochemistry. Helenice Gobbi participated in the design and coordination of the study, reviewed the original slides, analyzed the immunohistochemical reactions and helped drafting the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Tables

Table 1: Sources, antibodies, and dilutions of primary antibodies used in the study

Antibody	Clone	Dilution	Manufacturer / Country
ER	SP1	Ready to use	DAKO, USA
PR	PgR636	Ready to use	DAKO, USA
HER2	CB11	1/1000	Novocastra, UK
CK5	XM26	1/50	NeomarKers, USA
EGFR	31G7	1/25	Zymed, USA
COX-2	CX294	1/100	DAKO, USA
p16	INK4a	1/25	Zymed, USA
Ki67	MIB-1	1/75	DAKO, USA

ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; HER2 = epidermal growth factor receptor 2; CK5 = cytokeratin 5; EGFR = epidermal growth factor receptor 1; COX-2 = cyclooxygenase-2; p16 = tumor suppressor protein p16; Ki67 = nuclear antigen Ki67

Table 2: Expression of biomarkers in high-grade ductal carcinoma in situ (pure or associated with invasive carcinoma)

<i>Biomarker</i>	<i>Diagnosis (%)</i>				<i>p-value</i>
	<i>DCIS</i>	<i>%</i>	<i>DCIS* + IMC</i>	<i>%</i>	
ER^a					0.837
Negative	13	31.0%	23	29.1%	
Positive	29	69.0%	56	70.9%	
PR^a					0.256
Negative	25	59.5%	38	48.1%	
Positive	17	40.5%	41	51.9%	
HER2^a					0.362
Negative	27	69.2%	57	78.1%	
Positive	12	30.8%	16	21.9%	
CK5^b					0.095
Negative	41	97.6%	69	87.3%	
Positive	01	2.4%	10	12.7%	
EGFR^b					0.543
Negative	42	100.0%	77	97.5%	
Positive	00	0.0%	02	2.5%	
COX-2^a					0.208
Negative	23	59.0%	57	72.2%	
Positive	16	41.0%	22	27.8%	
p16^a					0.416
Negative	36	90.0%	66	83.5%	
Positive	04	10.0%	13	16.5%	
Ki67^a					1.000
Low proliferation index	12	30.0%	20	28.2%	
High proliferation index	28	70.0%	51	71.8%	

DCIS = ductal carcinoma in situ; IMC = invasive mammary carcinoma

ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; HER2 = epidermal growth factor receptor 2; CK5 = cytokeratin 5; EGFR = epidermal growth factor receptor 1; COX-2 = cyclooxygenase-2; p16 = tumor suppressor protein p16; Ki67 = nuclear antigen Ki67

p = significance level; a = Pearson's chi-square test; b = Fisher's exact test

*: numbers refer to the "in situ" component

Table 3: Association between p16, estrogen receptor, HER2 and cytokeratin 5 in high-grade ductal carcinoma in situ

Biomarker	p16				Total		p-value
	Negative		Positive		N	%	
	N	%	N	%			
ER^a							
Negative	26	21%	76	64%	102	85%	
Positive	09	8%	08	7%	17	15%	
Total	35	29%	84	71%	119	100%	0.040
HER2^b							
Negative	71	64%	23	21%	94	85%	
Positive	11	10%	05	5%	16	15%	
Total	82	74%	28	26%	110	100%	0.757
CK5^b							
Negative	98	82%	04	3%	102	85%	
Positive	10	9%	07	6%	17	15%	
Total	108	91%	11	9%	119	100%	0.000

ER = estrogen receptor; HER2 = epidermal growth factor receptor 2; CK5 = cytokeratin 5;

p16 = tumor suppressor protein p16

p = significance level; a = Pearson's chi-square test; b = Fisher's exact test

Table 4: Expression of biomarkers COX-2, p16, Ki67 and molecular phenotypes in high-grade ductal carcinoma in situ

<i>Biomarkers</i>	<i>Molecular phenotypes</i>										<i>p-value</i>
	<i>Luminal A</i>		<i>Luminal B</i>		<i>HER2</i>		<i>Basal</i>		<i>“Not classified”</i>		
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
COX-2^a											0.475
Negative	49	72%	07	47%	09	69%	04	67%	11	69%	
Positive	19	28%	08	53%	04	31%	02	33%	05	31%	
Total	68	100%	15	100%	13	100%	06	100%	16	100%	
p16^a											0.000
Negative	64	93%	12	80%	11	85%	01	17%	14	88%	
Positive	05	7%	03	20%	02	15%	05	83%	02	12%	
Total	69	100%	15	100%	13	100%	06	100%	16	100%	
Ki67^a											0.274
Low proliferation index	22	34%	04	27%	01	9%	00	0%	05	31%	
High proliferation index	42	66%	11	73%	10	91%	05	100%	11	69%	
Total	64	100%	15	100%	11	100%	05	100%	16	100%	

COX-2 = cyclooxygenase-2; p16 = tumor suppressor protein p16; Ki67 = nuclear antigen Ki67

Luminal A: ER+/HER2-; Luminal B: ER+/HER2+; HER2: ER-/HER2+; Basal: ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+; “Not classified”: ER-/HER2-/EGFR-/CK5-

p = significance level; a = Pearson’s chi-square test

Table 5: High-grade ductal carcinoma in situ: association between molecular phenotypes and biomarkers COX-2, p16, Ki67

Co-expression of biomarkers	Luminal A (n=70)	Luminal B (n=15)	HER2 (n=13)	Basal (n=6)	“Not classified” (n=17)	p-value ^a
COX2+	19(27%)	08(53%)	04(31%)	02(33%)	05(29%)	0.4634
Ki67+	42(60%)	11(73%)	10 (77%)	05(83%)	11(65%)	0.3192
p16+	05(7%)	03(20%)	02(15%)	05(83%)	02(12%)	0.0004
COX2-/p16-/Ki67-	12 (17.1%)	02(13.3%)	00 (0%)	00(0%)	02(11.8%)	0.6483
COX2+/p16+/Ki67-	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	*
COX2-/p16-/Ki67+	30 (42.9%)	04(26.7%)	06(46.2%)	00 (0%)	07(41.2%)	0.1679
COX2+/Ki67+/p16-	09 (12.9%)	04(26.7%)	02(15.4%)	00 (0%)	01(5.9%)	0.5536
COX2-/Ki67-/p16+	02 (2.9%)	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	*
p16+/Ki67+/COX2+	01 (1.4%)	02(13.3%)	01(7.7%)	02(33.3%)	01(5.9%)	0.0106
p16+/Ki67+/COX2-	02 (2.9%)	01(6.7%)	01(7.7%)	03(50%)	01(5.9%)	0.0049
p16-/Ki67-/ COX2+	08 (11.4%)	02(13.3%)	01(7.7%)	00 (0%)	03(17.6%)	0.8721

COX2 = cyclooxygenase-2; Ki67 = nuclear antigen Ki67; p16 = tumor suppressor protein p16

Luminal A: ER+/HER2-; Luminal B: ER+/HER2+; HER2: ER-/HER2+; Basal: ER-/HER2-/EGFR+ and/or CK5+; “Not classified”: ER-/HER2-/EGFR-/CK5-

p = significance level; a = Exact Fisher’s test; * = test not performed due low frequency of biomarker

Note: eleven cases were not evaluated because there was no available information about one of the biomarkers

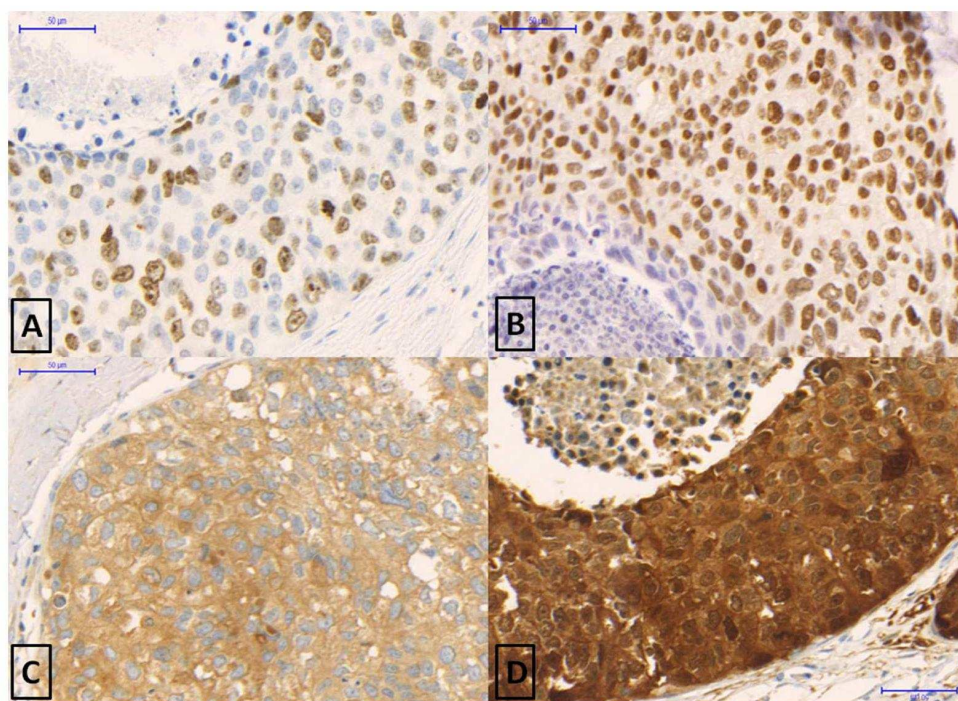


Figure 1: High-grade ductal carcinoma in situ of the breast. A: High Ki67 proliferation index (400x); B: Estrogen receptor positivity (400x); C: Cyclooxygenase-2 positivity (400x); D: p16 positivity (400x). 254x190mm (96 x 96 DPI)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de contribuir para um melhor entendimento da patogênese do CDIS e determinar possíveis características que possam auxiliar mastologistas e oncologistas na definição do melhor tratamento para pacientes com este diagnóstico, decidimos caracterizar morfológica e imunofenotipicamente uma série de casos de CDIS da mama.

Neste estudo, determinamos as frequências dos subtipos morfológicos do CDIS, grau nuclear e comedonecrose, e comparamos com a idade das pacientes. O alto grau nuclear e a presença de comedonecrose foram identificados mais frequentemente em pacientes jovens e mais frequentemente correlacionados com o subtipo morfológico sólido do CDIS ($p < 0,05$). Características clínicas e histopatológicas permanecem como fatores prognósticos bem estabelecidos para o CDIS e a escolha do tratamento cirúrgico tem sido definida por essas características (LAKHANI *et al.*, 2012). Talvez a associação de CDIS de alto grau nuclear com comedonecrose em pacientes mais jovens possa direcionar a tratamentos cirúrgicos mais agressivos, com o objetivo de evitar recorrência local neste subgrupo de pacientes.

Avaliamos também a concordância interobservador nos diagnósticos histopatológicos do espectro de lesões mamárias proliferativas intraductais entre patologistas gerais e especialista em patologia mamária, em casos recebidos em consultoria. Estudamos especialmente os casos de CDIS e outras lesões que entram no diagnóstico diferencial do CDIS (hiperplasia ductal atípica e CDIS com microinvasão). Nossos dados confirmam que as lesões mamárias proliferativas intraductais, em especial as hiperplasias ductais atípicas, o CDIS e o CDIS com microinvasão são de difícil diagnóstico entre patologistas generalistas. Observamos relevantes discordâncias nos

diagnósticos histopatológicos, que podem induzir o clínico a erros maiores na conduta terapêutica. Com o uso crescente da mamografia de rastreamento e maior detecção das lesões proliferativas intraductais, torna-se necessário melhor treinamento dos patologistas da comunidade no reconhecimento dessas lesões, resultando, assim, em melhor acurácia diagnóstica. Baseado em nossos resultados, consideramos que a solicitação formal de segunda opinião em lesões mamárias precursoras e *borderlines* deva ser estimulada em nosso meio, principalmente entre os patologistas generalistas, com o objetivo de diminuir erros diagnósticos e assegurar a conduta terapêutica mais adequada.

No presente estudo determinamos ainda a frequência dos diferentes imunofenótipos em uma série de casos de CDIS de alto grau, puros ou associados a carcinoma invasor. Determinamos as frequências dos perfis imuno-histoquímicos no CDIS puro *versus* CDIS associado a carcinoma invasor e avaliamos a concordância dos imunofenótipos entre os componentes *in situ* e invasor nos casos de CDIS associado a carcinoma invasor. Os imunofenótipos identificados previamente entre os carcinomas mamários invasivos também foram observados nos casos de CDIS de nosso estudo. Nos CDIS puros de nossa série, o fenótipo mais comum foi o luminal A, seguido do subgrupo HER2. O fenótipo basal foi observado apenas no CDIS associado a carcinoma invasor, que apresentou fenótipo similar. Não encontramos diferença significativa nos imunofenótipos entre o CDIS puro e associado a carcinoma invasor. Tumores basais têm atraído a atenção de patologistas, cirurgiões e oncologistas, já que constituem um subgrupo de carcinomas mamários com pior prognóstico (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008). A identificação de CDIS de fenótipo basal deveria conduzir a tratamentos mais agressivos em comparação a carcinomas ductais *in situ* com outros imunofenótipos ou à busca de componente invasor pelo patologista.

Em nosso trabalho avaliamos também a co-expressão de marcadores relacionados ao ciclo celular e COX-2 nos casos de CDIS de alto grau, puros ou associados a carcinoma invasor, e sua associação com os diferentes imunofenótipos. Observamos que a expressão de p16, isolada ou em combinação com Ki67 e COX-2, associa-se ao CDIS de fenótipo basal. Talvez estes biomarcadores possam ser incorporados à rotina clínica de avaliação do CDIS e este “triplo teste” possa ser útil para guiar tratamentos mais agressivos em pacientes com CDIS de alto grau e/ou desenvolvimento de novas terapias alvo para quimioprevenção. Seria interessante ainda prosseguir nossos estudos e determinar o seguimento destes casos para confirmar o valor do p16, Ki67, COX-2 e validar estas co-expressões como marcadores prognósticos e/ou preditivos no CDIS da mama. Dados recentes da literatura indicam que os inibidores da COX-2 podem funcionar como agentes de quimioprevenção no carcinoma invasor e no CDIS (GENERALI *et al.*, 2014; LEO *et al.*, 2006).

Por se tratar de estudo retrospectivo, algumas limitações podem ser apontadas em nosso trabalho, principalmente relacionadas a não obtenção e análise de informações clínicas à época do diagnóstico e ao seguimento das pacientes. Nossas fontes documentais para obtenção de dados clínicos e mamográficos foram as requisições de exames anatomopatológicos arquivadas no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, muitas delas com informações incompletas, justificando a ausência de dados clínicos em nossa casuística. Embora tenhamos feito revisão dos prontuários clínicos das pacientes dos casos de CDIS puro, a maioria tinha dados incompletos, limitando a análise e a correlação com a expressão dos marcadores estudados. O seguimento das pacientes não foi realizado devido ao curto tempo entre o diagnóstico inicial e a realização do estudo. São necessários pelo menos 8 a 10 anos para avaliação mais adequada de recidiva local do CDIS. Ademais, para a obtenção de dados específicos de seguimento do CDIS, seria necessário avaliar um número maior de casos de CDIS puros.

A despeito da ausência de análise de características clínicas e seguimento das pacientes, acreditamos que nossos resultados contribuem para o melhor entendimento do CDIS e sua melhor caracterização imunofenotípica, especialmente no subgrupo de carcinomas ductais *in situ* de alto grau.

Baseado em nossos resultados da análise da concordância diagnóstica entre patologistas da comunidade e especialista em patologia mamária, acreditamos que a abordagem adequada de pacientes com diagnóstico de CDIS de baixo grau e com diagnóstico de CDIS alto grau com micro-invasão requer, inicialmente, a confirmação diagnóstica por especialista em patologia mamária.

A associação de algumas características histopatológicas do CDIS, em especial, o alto grau nuclear e a presença de comedonecrose, além da idade das pacientes, deveria ser considerada na decisão do tratamento cirúrgico. A avaliação imuno-histoquímica através do receptor de estrógeno, HER2, citoqueratina 5, EGFR, p16, Ki67 e COX-2 poderia contribuir para uma melhor caracterização do CDIS, principalmente na identificação do fenótipo basal, que apresenta comportamento mais agressivo e pior prognóstico.

Estudos prospectivos adicionais poderiam avaliar a utilidade clínica destes biomarcadores no CDIS, assim como a possibilidade de desenvolvimento de terapias alvo para uma abordagem individual de pacientes com diagnóstico de CDIS da mama.

5 CONCLUSÕES

5.1 O CDIS com padrão de crescimento único foi identificado na maioria dos casos avaliados. O subtipo sólido foi o mais comum, seguido dos subtipos cribriforme, micropapilar puro e papilar. Alto grau nuclear foi identificado em 72,7% dos casos e comedonecrose em 55% dos casos. Alto grau foi mais comum no CDIS de subtipo sólido e menos frequente no CDIS cribriforme. Comedonecrose foi mais identificada no subtipo sólido em comparação aos subtipos cribriforme, papilar e micropapilar. CDIS de alto grau, com comedonecrose, foram mais frequentes em pacientes mais jovens em comparação com pacientes que apresentavam CDIS de baixo grau.

5.2 Concordância diagnóstica moderada foi observada entre diagnósticos feitos por patologistas da comunidade e especialista em patologia mamária em biópsias mamárias recebidas para revisão. A maior discordância foi observada nos casos de carcinoma ductal *in situ* com microinvasão (100% dos casos), hiperplasia ductal atípica (53%) e carcinoma ductal *in situ* (33%).

5.3 Os imunofenótipos do CDIS puro mais frequentes foram: luminal A e HER2, bem como entre os casos associados a carcinoma invasor. CDIS de fenótipo basal foi encontrado apenas quando associado a componente invasor. Não houve diferença significativa nas frequências dos imunofenótipos entre os casos de CDIS puro e CDIS associado a carcinoma invasor e observou-se excelente concordância de imunofenótipos entre os dois componentes (*in situ* e invasor).

5.4 Nos CDIS de alto grau, a expressão de p16 e as co-expressões p16+/Ki67+/COX2+ e p16+/Ki67+/COX2- apresentaram associação positiva e significativa com o fenótipo basal.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-REHIM, D. M. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 661–71, jun. 2004.
- ABD EL-REHIM, D. M. et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 3, p. 340–50, set. 2005.
- ABDEL-FATAH, T. M. A. et al. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, n. 4, p. 513–23, abr. 2008.
- AGUIAR, F. N. et al. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 3, p. 97–102, mar. 2013a.
- AGUIAR, F. N. et al. Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ. **Clinics**, v. 68, n. 5, p. 638–43, mai. 2013b.
- ALLRED, D. Biologic characteristics of ductal carcinoma in situ. In: SILVERSTEIN, M. (Ed.). **Ductal carcinoma in situ of the breast**. 2nd. ed. Philadelphia: [s.n.]. p. 37–48.
- BANE, A. Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2013, p. 914053, jan. 2013.
- BLEICHER, R. J. Ductal carcinoma in situ. **The Surgical Clinics of North America**, v. 93, n. 2, p. 393–410, abr. 2013.
- BRASIL. **Portaria Ministério da Saúde n. 779, de 31/12/2008**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2008/PT-779.htm>>. Acesso em: 24 ago. 2014.
- BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de mama**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 26 jul. 2014a.
- BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Informativo Vigilância do Câncer. Perfil da morbimortalidade brasileira do câncer de mama**.

Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer>. Acesso em: 26 jul. 2014b.

BRYAN, B. B.; SCHNITT, S. J.; COLLINS, L. C. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. **Modern Pathology**, v. 19, n. 5, p. 617–21, mai. 2006.

BUERGER, H. et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. **The Journal of Pathology**, v. 187, n. 4, p. 396–402, mar. 1999a.

BUERGER, H. et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 4, p. 521–6, dez. 1999b.

CLARK, S. E. et al. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 1, p. 120–7, 4 jan. 2011.

COWELL, C. F. et al. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 5, p. 859–69, out. 2013.

DABBS, D. J. et al. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. **Modern Pathology**, v. 19, n. 11, p. 1506–11, nov. 2006.

DAMONTE, P. et al. Mammary carcinoma behavior is programmed in the precancer stem cell. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. R50, jan. 2008.

DIAZ, L. K. et al. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 6, p. 419–30, nov. 2007.

ERNSTER, V. L. et al. Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the population-based surveillance, epidemiology and end results program. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 7, p. 953–8, 10 abr. 2000.

ESPINA, V.; LIOTTA, L. A. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 68–75, jan. 2011.

FADARE, O.; TAVASSOLI, F. A. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 5, p. 358–73, set. 2007.

GENERALI, D. et al. COX-2 expression is predictive for early relapse and aromatase inhibitor resistance in patients with ductal carcinoma in situ of the breast, and is a target for treatment. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 1, p. 46–54, 1 jul. 2014.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–23, 1 set. 2013.

GOMES, D. S. et al. Inter-observer variability between general pathologists and a specialist in breast pathology in the diagnosis of lobular neoplasia, columnar cell lesions, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast. **Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 121, jan. 2014.

GUSTERSON, B. A. et al. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 4, p. 143–8, jan. 2005.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 1, p. 55–62, jan. 2011.

HAMMOND, M. E. H. et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Journal of Oncology Practice / American Society of Clinical Oncology**, v. 6, n. 4, p. 195–7, jul. 2010.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Histologic classification of ductal carcinoma in situ. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 2, p. 92–101, 15 out. 2002.

JAIN, R. K. et al. Atypical ductal hyperplasia: interobserver and intraobserver variability. **Modern Pathology**, v. 24, n. 7, p. 917–23, jul. 2011.

KIM, M.-J. et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Human Pathology**, v. 37, n. 9, p. 1217–26, set. 2006.

KING, T. A. et al. Is there a low-grade precursor pathway in breast cancer? **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 4, p. 1115–21, abr. 2012.

KRISHNAMURTI, U.; SILVERMAN, J. F. HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 21, n. 2, p. 100–7, mar. 2014.

LAKHANI, S. et al. (EDS.). WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th. ed. Lyon: **IARC**, 2012.

LARI, S. A.; KUERER, H. M. Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review. **Journal of Cancer**, v. 2, p. 232–61, jan. 2011.

LEE, R. J. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2012, p. 123549, jan. 2012.

LEO, C. et al. The status of cyclooxygenase-2 expression in ductal carcinoma in situ lesions and invasive breast cancer correlates to cyclooxygenase-2 expression in normal breast tissue. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 6, p. 327–32, dez. 2006.

LESTER, S. C. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with ductal carcinoma in situ of the breast. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 1, p. 15–25, jan. 2009.

LIVASY, C. A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Modern Pathology**, v. 19, n. 2, p. 264–71, fev. 2006.

LIVASY, C. A. et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. **Human Pathology**, v. 38, n. 2, p. 197–204, fev. 2007.

MARTINS, D. et al. Molecular phenotypes of matched in situ and invasive components of breast carcinomas. **Human Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1438–46, out. 2011.

MASUDA, H. et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 2, p. 331–45, nov. 2012.

MATOS, I. et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archives**, v. 447, n. 4, p. 688–94, out. 2005.

MEIJNEN, P. et al. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 1, p. 137–42, jan. 2008.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5367–74, ago. 2004.

PARK, K. et al. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. **Histopathology**, v. 48, n. 6, p. 702–7, mai. 2006.

PEREZ, A. **Perfil molecular dos carcinomas ductais in situ de alto grau da mama puros ou associados a carcinoma invasor: detecção por imunofenotipagem molecular.** [s.l.] UFMG, 2010.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–52, 17 ago. 2000.

PINDER, S. E. Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. **Modern Pathology**, v. 23 Suppl 2, p. S8–13, mai. 2010.

POLYAK, K. Is breast tumor progression really linear? **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 339–41, jan. 2008.

PROVENZANO, E. et al. Histological markers that predict clinical recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast: an Australian population-based study. **Pathology**, v. 36, n. 3, p. 221–9, jul. 2004.

RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **The Journal of Pathology**, v. 208, n. 4, p. 495–506, mar. 2006a.

RAKHA, E. A. et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3149–56, dez. 2006b.

RAKHA, E. A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p. 25–32, 1 jan. 2007a.

RAKHA, E. A. et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology**, v. 50, n. 4, p. 434–8, mar. 2007b.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 40–7, jan. 2009.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 15, p. 2568–81, 20 mai. 2008.

REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108–18, jan. 2008.

RINGBERG, A. et al. Ipsilateral local recurrence in relation to therapy and morphological characteristics in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 26, n. 5, p. 444–51, ago. 2000.

RISTIMÄKI, A. et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Research**, v. 62, n. 3, p. 632–5, fev. 2002.

ROSAI, J. Borderline epithelial lesions of the breast. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 15, n. 3, p. 209–21, mar. 1991.

ROSS, D. S.; WEN, Y. H.; BROGI, E. Ductal carcinoma in situ: morphology-based knowledge and molecular advances. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 20, n. 4, p. 205–16, jul. 2013.

SAKR, R. A. et al. PI3K pathway activation in high-grade ductal carcinoma in situ--implications for progression to invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer research**, v. 20, n. 9, p. 2326–37, 1 mai. 2014.

SALLES, M. DE A. et al. Training and standardized criteria improve the diagnosis of premalignant breast lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 11, p. 550–5, nov. 2008a.

SALLES, M. DE A. et al. Importance of a second opinion in breast surgical pathology and therapeutic implications. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 12, p. 602–8, dez. 2008b.

SCRIPCARU, G.; ZARDAWI, I. M. Mammary ductal carcinoma in situ: a fresh look at architectural patterns. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2012, p. 979521, jan. 2012.

SENS-ABUÁZAR, C. et al. Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: Early Events in the Progression of Preinvasive Ductal Carcinoma of the Breast. **Translational Oncology**, v. 5, n. 2, p. 113–23, abr. 2012.

SILVERSTEIN, M. J. The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. **American Journal of Surgery**, v. 186, n. 4, p. 337–43, out. 2003.

SIZIOPIKOU, K. P. Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 4, p. 462–6, abr. 2013.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418–23, 8 jul. 2003.

STEINMAN, S. et al. Expression of cytokeratin markers, ER-alpha, PR, HER-2/neu, and EGFR in pure ductal carcinoma in situ (DCIS) and DCIS with co-existing invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 37, n. 2, p. 127–34, jan. 2007.

VAN DE RIJN, M. et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 1991–6, dez. 2002.

VAN DE VIJVER, M. J. Biological variables and prognosis of DCIS. **Breast**, v. 14, n. 6, p. 509–19, dez. 2005.

VARGAS, A. C. et al. Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 1, p. 153–65, ago. 2012.

WANG, S.-Y. et al. Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 127, n. 1, p. 1–14, mai. 2011.

WAPNIR, I. L. et al. Long-term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 6, p. 478–88, 16 mar. 2011.

WITKIEWICZ, A. K. et al. Association of RB/p16-pathway perturbations with DCIS recurrence: dependence on tumor versus tissue microenvironment. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 3, p. 1171–8, set. 2011.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 1 nov. 2013.

ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 635/08

Interessado(a): Profa. Helenice Gobbi
Depto. de Anatomia Patológica e Medicina Legal
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de fevereiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Carcinoma ductal *in situ* da mama tipo basal: detecção por imunofenotipagem molecular**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II: PROTOCOLO DE PESQUISA - PERFIL MORFOLÓGICO E MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN SITU* DA MAMA

N: _____ Data: __/__/__

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Registro: _____ Idade: _____ anos

Cor: (1) branca (2) negra (3) parda (4) amarela

Estado menopausal: (1) pré (2) pós

2. CLÍNICA

Alteração clínica: (1) nódulo (2) derrame mamilar (4) inversão mamilar
(8) alteração pele (88) sem alteração clínica (99) sem informação

Tamanho lesão clínica: (1) $\leq 2\text{cm}$ (2) 2,1-5cm (3) $>5\text{cm}$
(88) sem alteração clínica (99) sem informação

Alteração mamográfica: (1) microcalcificações (2) nódulo
(4) assimetria focal (8) distorção arquitetural
(88) sem alteração MMG (99) sem informação

BI-RADS: (1) Cat 1 (2) Cat 2 (3) Cat 3 (4) Cat 4 (5) Cat 5 (6) Cat 6
(7) Cat 0 (88) sem alteração MMG (99) sem informação

3. TRATAMENTO CIRÚRGICO

(1) setorectomia / quadrantectomia (4) mastectomia + BLS
(2) setorectomia / quadrantectomia + BLS (5) mastectomia + EA
(3) setorectomia / quadrantectomia + EA

4. ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Nº biópsia: _____ Ano biópsia: _____

Lateralidade: (1) esquerda (2) direita (3) bilateral **Lat bio:** (1) E (2) D

Diagnóstico patológico: (1) CDIS puro (2) CDIS + invasor

Classificação morfológica do CDIS: (1) comedo (2) sólido (4) cribriforme
(8) papilar (16) micropapilar (32) apócrino (64) outro

Tamanho CDIS: _____ mm

Extensão CDIS: (1) foco único (2) multifocal (3) multicêntrico

Tamanho da menor margem cirúrgica em relação ao CDIS: _____ mm

Necrose: (1) ausente (2) presente focal (3) presente extensa

Grau nuclear: (1) baixo (2) intermediário (3) alto

Graduação histológica CDIS: (1) baixo (2) intermediário (3) alto

Microinvasão: (1) sim (2) não

Classificação histológica do componente invasor associado:

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| (1) carcinoma ductal invasor SOE | (6) carcinoma papilífero |
| (2) carcinoma medular típico | (7) carcinoma metaplásico |
| (3) carcinoma medular atípico | (8) carcinoma inflamatório |
| (4) carcinoma tubular | (9) carcinoma lobular invasor |
| (5) carcinoma colóide | (88) NA |

Tamanho do componente invasor: _____ mm

Extensão do componente invasor: (1) foco único (2) multifocal (3) multicêntrico

Tamanho da menor margem cirúrgica em relação ao componente invasor: ____ mm

Graduação histológica do componente invasor:

- (1) baixo grau (2) grau intermediário (3) alto grau

Estadiamento TNM: (1) estadio 0 (2) estadio I (3) estadio II

- (4) estágio III (5) estágio IV

5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

CDIS: RE: (0) negativo (1) positivo

RP: (0) negativo (1) positivo

HER2: (0) negativo (1) positivo

CK5: (0) negativo (1) positivo

EGFR: (0) negativo (1) positivo

COX-2: (0) negativo (1) positivo

P16: (0) negativo (1) positivo

Ki67: (0) negativo (1) positivo

COMPONENTE INVASOR: RE: (0) negativo (1) positivo (88) NA

RP: (0) negativo (1) positivo (88) NA

HER2: (0) negativo (1) positivo (88) NA

CK5: (0) negativo (1) positivo (88) NA

CK14: (0) negativo (1) positivo (88) NA

EGFR: (0) negativo (1) positivo (88) NA

COX-2: (0) negativo (1) positivo (88) NA

P16: (0) negativo (1) positivo (88) NA

Ki67: (0) negativo (1) positivo (88) NA

ANEXO III: PROTOCOLO PARA REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

PROTOCOLO ENVISION FLEX/HRP

- 1- Desparafinização e recuperação antigênica por calor em solução FLEX pH alto (DAKO)
- 2- Lavagem em tampão de lavagem (*Wash buffer*- DAKO)
- 3- Bloqueio peroxidase endógena (água oxigenada 10 V)
- 4- Lavagem em tampão
- 5- Aplicação do anticorpo primário 30 minutos, temperatura ambiente
- 6- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 7- Aplicação *Envision FLEX+ Mouse (Linker)* 20 minutos, temperatura ambiente
- 8- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 9- Aplicação *Envision FLEX/HRP*. 20 minutos, temperatura ambiente
- 10- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 11- Aplicação DAB (*Substrate Working Solution mix*), 5 minutos
- 12- Lavagem em água corrente 5 minutos
- 13- Contra-coloração em hematoxilina de Harris, 2 minutos
- 14- Lavagem em água corrente, 5 minutos
- 15- Desidratação, montagem