Fernando Nalesso Aguiar

**Fatores morfológicos, moleculares e do microambiente
relacionados ao risco de invasão estromal em
carcinomas ductais *in situ* da mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Filomena Marino Carvalho

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aguiar, Fernando Nalesso

Fatores morfológicos, moleculares e do microambiente relacionados ao risco de invasão estromal em carcinomas ductais *in situ* da mama / Fernando Nalesso Aguiar. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Carcinoma *in situ* 2.Microambiente tumoral 3.Imuno-histoquímica 4.Valor preditivo dos testes 5.Neoplasias da mama 6.Queratinas

USP/FM/DBD-150/14

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, minha avó e meus familiares por todo o apoio; sem eles, eu não estaria aqui.

À **Professora Doutora Filomena Marino Carvalho**, minha incentivadora, sem a qual esta tese não existiria.

A todos os amigos e amigas que me ajudaram durante esse tempo.

Aos professores que, desde a escola até a residência médica, muito me ensinaram. Em especial ao **Professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves** e à **Professora Doutora Sheila Aparecida Coelho Siqueira**, que me deram oportunidades, pois acreditaram em mim.

A **Cinthya Santos Cirqueira, Douglas Moreira, Hermogênio Rafael de Oliveira** e a todos os que me ajudaram na execução desta tese.

Aos alunos do time de futebol da Faculdade de Medicina, com os quais tanto aprendi durante o período em que fui seu treinador, concomitantemente à elaboração da tese.

Apoio à pesquisa Fapesp: processo 2011/22993-6. *

** As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.*

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index*

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Patologia comparativa dos CDIS e carcinomas invasivos.....	15
3.2 Patologia molecular dos CDIS.....	17
3.3 Fatores envolvidos na invasão estromal.....	19
3.4 Previsão da invasão estromal dos CDIS.....	22
4. MÉTODOS.....	27
4.1 Seleção dos casos.....	29
4.2 Método anatomopatológico.....	30
4.3 Construção dos blocos de microarranjos de tecido.....	30
4.4 Método imunoistoquímico.....	32
4.5 Análise estatística.....	47
4.6 Certificação institucional.....	47
5. RESULTADOS.....	49
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÕES.....	71
8. ANEXOS.....	75
9. REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE	

Listas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AML	Actina de músculo liso
CD10	<i>Cluster of differentiation</i> 10
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
HGC	Hibridização genômica comparativa
CK5/6	Citoqueratinas 5 e 6
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HER2	Proteína do oncogene c-erbB2
Ki67	Proteína MKI67
p63	Proteína tumoral p63
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SMMHC	<i>Smooth muscle myosin heavy chain</i> , cadeia pesada da miosina de músculo liso
Vim	Vimentina
ed.	Edição
<i>et al.</i>	e colaboradores
fig.	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
OMS	Organização Mundial da Saúde
prof.	Professor
rev	Revista
TMA	<i>Tissue microarray</i> , microarranjos de tecido
TN	Triplo-negativo
USP	Universidade de São Paulo
v.	Volume
<i>vs.</i>	<i>Versus</i>

Lista de Figuras

Figura 1 – Lâmina de microarranjo de tecido corada pela hematoxilina-eosina.....	31
Figura 2 – Marcação nuclear para receptor de estrogênio.....	35
Figura 3 – Marcação nuclear para receptor de progesterona.....	35
Figura 4 – Marcação de membrana (3+) do HER2	36
Figura 5 – Marcação nuclear para Ki67	36
Figura 6 – Marcação citoplasmática em células epiteliais para CK5/6.....	37
Figura 7 – Marcação de membrana do EGFR.....	37
Figura 8 – Expressão alta de SMMHC (citoplasma/membrana).....	39
Figura 9 – Expressão baixa de SMMHC (citoplasma/membrana).....	39
Figura 10 – Expressão alta de CD10 (citoplasma/membrana)	40
Figura 11 – Expressão baixa de CD10 (citoplasma/membrana)	40
Figura 12 – Expressão alta de p63 (núcleo)	41
Figura 13 – Expressão baixa de p63 (núcleo).....	41
Figura 14 – Expressão alta de calponina (citoplasma/membrana)	42
Figura 15 – Expressão baixa de calponina (citoplasma/membrana)	42
Figura 16 – Expressão alta de AML (citoplasma/membrana).....	43
Figura 17 – Expressão baixa de AML (citoplasma/membrana).....	43
Figura 18 – Expressão alta de vimentina (citoplasma).....	44
Figura 19 – Expressão baixa de vimentina (citoplasma).....	44
Figura 20 – Expressão alta de CK5/6 nas células mioepiteliais (citoplasma).....	45
Figura 21 – Expressão baixa de CK5/6 nas células mioepiteliais (citoplasma)	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação histológica dos casos de carcinoma ductal <i>in situ</i>	30
Tabela 2 – Especificações técnicas das reações imunoistoquímicas.....	33
Tabela 3 – Categorias de expressão dos marcadores mioepiteliais nos carcinomas ductais <i>in situ</i>	38
Tabela 4 – Classificação do subtipo molecular, baseada no perfil imunoistoquímico dos carcinomas invasores	46
Tabela 5 – Classificação dos carcinomas ductais <i>in situ</i> quanto ao subtipo molecular, baseada no perfil imunoistoquímico	46
Tabela 6 – Distribuição da idade das pacientes e variáveis anatomopatológicas nos 236 casos de carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) quanto à presença de invasão	51
Tabela 7 – Associação entre os perfis moleculares e a graduação histológica dos carcinomas ductais <i>in situ</i>	52
Tabela 8 – Características anatomopatológicas entre os 156 casos de carcinoma ductal <i>in situ</i> de baixo grau quanto à presença de invasão estromal	53
Tabela 9 – Características anatomopatológicas entre os 78 casos de carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau quanto à presença de invasão estromal	54
Tabela 10 – Expressão de citoqueratinas basais CK 5/6 em células epiteliais dos carcinomas ductais <i>in situ</i> de acordo com o perfil molecular.....	55
Tabela 11 – Comparação entre as características histológicas e imunoistoquímicas dos componentes <i>in situ</i> e invasivo da mesma lesão dos 146 casos de carcinomas ductais invasivos (grupo 2)	56
Tabela 12 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais em CDIS quanto à presença de invasão estromal.....	57
Tabela 13 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS de baixo grau quanto à presença de invasão.....	58

Tabela 14 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS de alto grau quanto à presença de invasão.....	59
Tabela 15 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais dos CDIS quanto ao perfil molecular.....	60
Tabela 16 – Variáveis relacionadas à presença de invasão estromal em carcinomas ductais <i>in situ</i> após regressão logística pelo método <i>stepwise</i>	61

Resumo

Resumo

Aguiar FN. *Fatores morfológicos, moleculares e do microambiente relacionados ao risco de invasão estromal em carcinomas ductais in situ (CDIS) da mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O carcinoma ductal *in situ* da mama é o estágio final antes do carcinoma ductal invasivo (CDI) no processo de carcinogênese mamária. As semelhanças histológicas, moleculares e imunoistoquímicas do epitélio nestas duas lesões tornaram improvável que o epitélio fosse o único responsável pelo processo de invasão estromal. Ao mesmo tempo, foram identificadas importantes alterações nas características do microambiente mamário durante esta transição. As células mioepiteliais, componente do microambiente e cuja rotura determina o diagnóstico histológico do carcinoma invasivo, tem papel direto ou indireto neste processo. A fim de prever esse risco de invasão, propomos que as características das células mioepiteliais sejam investigadas em conjunto com as características intrínsecas do epitélio neoplásico. **OBJETIVOS:** Determinar os fatores morfológicos e moleculares das células epiteliais e os marcadores das células mioepiteliais do microambiente em carcinomas ductais *in situ* da mama relacionados ao risco de invasão estromal. **MÉTODOS:** Foram selecionados retrospectivamente 236 casos consecutivos com diagnóstico inicial de CDIS seguidos de ressecção cirúrgica na Divisão de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009, divididos nos grupos 1 (CDIS puro, 90 casos) e 2 (CDIS associado a carcinoma invasor, 146 casos). Blocos de microarranjos de tecido foram construídos com áreas representativas dos CDIS e CDI que foram, então, classificados nos perfis moleculares de acordo com o seu perfil imunoistoquímico. Os marcadores mioepiteliais (vimentina, AML, calponina, p63, CK5/6, SMMHC, CD10) foram avaliados de acordo com a expressão imunoistoquímica baixa ou alta. **RESULTADOS:** Os perfis moleculares dos componentes *in situ* e invasivo da mesma lesão foram semelhantes. Os CDIS de baixo grau histológico, em comparação aos CDIS de alto grau, apresentaram maior número de casos com perfil molecular luminal (143 vs. 18) e menor proporção de casos luminal/HER2-positivo (6 vs. 11), HER2 (4 vs. 27) e triplo-negativo (3 vs. 22). Os CDIS no grupo 1, em relação aos CDIS no grupo 2, tiveram maior proporção de casos com expressão de receptores hormonais (84,4% vs. 71,2%) menor expressão de HER2 (76,7% vs. 81,5%), mais perfis moleculares luminal/HER2-positivo (12,2% vs. 4,1%) e menos perfis triplo-negativos (4,4% vs. 14,4%). A expressão de CK5/6 nas células epiteliais do CDIS teve maior proporção entre o subtipo HER2 (34,5%), seguido pelo triplo-negativo (25%), luminal/HER2-negativo (15,4%) e luminal/HER2-positivo (12,5%). A expressão de CK5/6 foi maior nas células epiteliais dos CDIS do grupo 1 em relação aos CDIS do grupo 2 (30,6% vs. 11,3%). A expressão alta de SMMHC nas células mioepiteliais associou-se mais frequentemente aos CDIS do grupo 1 (88,2%) em relação aos CDIS do grupo 2 (11,8%), e esta diferença manteve-se tanto nos CDIS de baixo grau (85,7%) quanto nos de alto grau histológico (92,3%). A expressão baixa de CD10 nas células mioepiteliais associou-se mais frequentemente aos CDIS do grupo 2 (95,6%) em relação aos CDIS do grupo 1 (4,4%), e esta diferença manteve-se tanto nos CDIS de baixo grau (96,4%) quanto nos de alto grau histológico (94,1%). Não houve diferença na expressão de marcadores mioepiteliais de acordo com o perfil molecular baseado na

imunoistoquímica. CONCLUSÕES: O risco de invasão estromal em CDIS está associado ao perfil molecular triplo-negativo e à perda de expressão do marcador CD10 pelas células mioepiteliais e é inversamente proporcional à expressão de CK5/6 pelas células neoplásicas e à forte expressão do marcador SMMHC nas células mioepiteliais.

Descritores: Carcinoma *in situ*; Microambiente tumoral; Imuno-histoquímica; Valor preditivo dos testes; Neoplasias da mama; Queratinas.

Summary

Summary

Aguiar FN. *Morphologic, molecular and microenvironment factors associated with stromal invasion in breast ductal carcinoma in situ (DCIS)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUCTION: Ductal carcinoma in situ is the last step preceding invasive ductal carcinoma in breast carcinogenesis. Histologic, molecular and immunohistochemistry similarities in epithelium of these components make improbable that epithelial changes are sole responsible for the stromal invasion. At the same time important changes were identified in mammary microenvironment during this transition. Myoepithelial cells, components of microenvironment and which rupture is the histological definition of stromal invasion, have a direct or indirect role in this process. We propose an associated investigation of myoepithelial cells and intrinsic neoplastic epithelium characteristics in view of predict the risk of stromal invasion. **OBJECTIVES:** To determinate morphologic and molecular factors of epithelial cells and microenvironment myoepithelial cell markers related to stromal invasion risk in ductal carcinomas in situ of the breast. **METHODS:** 236 cases with initial diagnosis of DCIS followed by surgical resection were retrospectively selected from Division of Surgical Pathology, Faculty of Medicine, Sao Paulo University from january 2000 to december 2009, divided in groups 1 (pure DCIS, 90 cases) and 2 (DCIS associated with invasive carcinoma, 146 cases). Tissue microarrays were constructed with selected areas of DCIS and IDC and those were then classified in molecular subgroups according to its immunohistochemistry profile. Myoepithelial markers (vimentin, smooth muscle actin, calponin, p63, CK5/6, SMMHC, CD10) were avaliated according to its high or low immunohistochemistry expression. **RESULTS:** Molecular profiles of in situ and invasive components of the same tumor were similar. Low-grade DCIS showed more luminal profiles than high-grade DCIS (143 vs. 18), and less luminal/HER2-positive (6 vs. 11), HER2 (4 vs. 27) and triple-negative (3 vs. 22) profiles. Group 1 DCIS, compared to group 2 DCIS, showed more cases with hormonal receptor expression (84.4% vs. 71.2%), less expression of HER2 (76.7% vs. 81.5%), more luminal/HER2-positive (12.2% vs. 4.1%) and less triple-negative profiles (4.4% vs. 14.4%). CK5/6 expression in epithelial cells was more frequent in HER2 (34.5%) subtype followed by triple-negative (25%), luminal/HER2-negative (15.4%) and luminal/HER2-positive (12.5%). Epithelial cells in group 1 DCIS showed more CK5/6 expression than cells in group 2 DCIS (30.6% vs. 11.3%). High expression of SMMHC in myoepithelial cells was more frequent in group 1 DCIS (88.2%) than group 2 DCIS (11.8%) and this pattern was also maintained in low-grade DCIS (85.7%) and high-grade DCIS (92.3%). Low expression of CD10 in myoepithelial cells was more frequent in group 2 DCIS (95.6%) than group 1 DCIS (4.4%) and this pattern was also maintained in low-grade (96.4%) and high-grade DCIS (94.1%). There was no significant difference in expression of myoepithelial cells according to molecular profile classified by immunohistochemistry. **CONCLUSIONS:** Stromal invasion risk in DCIS is associated with triple-negative profile, CD10 expression loss in myoepithelial cells and inversely correlated with CK5/6 expression in neoplastic cells and high expression of SMMHC in myoepithelial cells.

Descriptors: Carcinoma in situ; Tumor microenvironment; Imunnohistochemistry; Predictive value of tests; Breast neoplasms; Keratins.

Introdução

Introdução

O carcinoma mamário é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com 1.7 milhão de novos casos, correspondendo a 11.9% de todos os casos de câncer, e a 522 mil mortes em 2012 ⁽¹⁾. É o mais frequente no sexo feminino, correspondendo a um em cada quatro casos de câncer em mulheres. Também é o mais comum em 140 de 184 países no mundo, incluindo o Brasil ⁽¹⁾. Em 2014, no Brasil, estimam-se 57.120 novos casos e um risco de 71/100 mil mulheres na região sudeste ⁽²⁾. Em 2011 foram registradas 13.345 mortes pelo câncer de mama no Brasil ⁽²⁾.

Com o objetivo de reduzir estes números, pesquisas e estudos são continuamente realizados envolvendo todos os processos da carcinogênese mamária, desde a fase precursora até os estágios mais avançados.

Os carcinomas mamários invasivos são classificados tradicionalmente de acordo com a sua morfologia. São divididos em tipos especiais, como lobular, mucinoso, papilífero; e tipo histológico não especial, até recentemente chamado de ductal. Este é o mais comum, correspondendo de 40% a 75% dos casos, seguido do lobular, que corresponde de 5% a 15% dos casos ⁽³⁾.

Fatores socioeconômicos ^(4, 5), etiológicos ⁽⁶⁾, comportamentais ^(7, 8) e genéticos ⁽⁹⁾ estão relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama e são alvo de estudos na busca de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no surgimento do carcinoma invasor. Esses estudos visam a compreender o aparecimento de lesões precursoras que, no último estágio de transformação, são representadas pelo carcinoma *in situ*, precursor genuíno do carcinoma invasivo da mama.

As características histopatológicas ⁽¹⁰⁻¹³⁾ e, mais recentemente, moleculares ^(12, 14, 15) dos carcinomas invasivos e *in situ* ⁽¹⁶⁻²⁰⁾ da mama foram e continuam sendo estudadas com o objetivo de melhorar o entendimento da biologia do tumor ^(21, 22) e desenvolver estratégias mais eficientes de combate a essas lesões ⁽²³⁻²⁵⁾.

A avaliação do comportamento biológico do tumor baseia-se sobretudo em características morfológicas de apresentação dos carcinomas, entre as quais os sistemas de graduação histológica têm sido os mais importantes, tanto no câncer de mama invasivo ⁽²⁶⁾ – índice de Nottingham - quanto no carcinoma *in situ* ⁽²⁷⁾ – sistema de Van Nuys.

O entendimento da biologia dos carcinomas mamários teve evolução significativa a partir da classificação genética, estabelecida após o clássico estudo de Perou *et al.* ⁽²⁸⁾ que demonstrou, por meio da técnica de microarranjos de DNA, a presença de neoplasias com diferentes expressões gênicas dentro dos carcinomas mamários ^(28, 29), como os tumores luminal A, luminal B, com superexpressão de HER2 e os basal-símile. Estas diferenças genéticas também se refletiram em diferentes comportamentos biológicos e taxas de sobrevida entre os diferentes subtipos moleculares ⁽²⁹⁾. Desde esse momento, a classificação molecular baseada no perfil genético dos carcinomas mamários passou a nortear a sua abordagem ^(30, 31) e o carcinoma invasor da mama tem sido considerado produto de diferentes processos neoplásicos que têm em comum o acometimento mamário.

Ao longo da última década, a classificação molecular foi refinada e solidificada quanto aos papéis prognóstico e preditivo ⁽³²⁻³⁶⁾. Em paralelo, mostrou-se possível a avaliação dos perfis moleculares por meio da análise imunoistoquímica pela expressão proteica ⁽³⁷⁻³⁹⁾. Este tipo de análise mostrou os mesmos valores preditivos e prognósticos

da classificação biológica por avaliação histológica e imunoistoquímica, padronizada e reprodutível ⁽⁴⁰⁻⁴⁴⁾.

Nas últimas décadas houve aumento nos diagnósticos de carcinoma *in situ*, determinado, sobretudo, pelo implemento em técnicas de rastreamento, estimando-se que, em 2014, corresponda a 21% dos carcinomas mamários detectados ⁽⁴⁵⁾. Com o maior número de casos de lesões *in situ*, ficou evidente sua caracterização como genuína precursora dos carcinomas invasores e, como nestes, sua heterogeneidade ^(21, 46-49). Consequentemente, a comparação entre perfis moleculares de lesões invasivas e *in situ* mostrou os mesmos padrões, tanto em populações gerais, quanto em grupos especiais, de mulheres jovens ⁽⁵⁰⁻⁵⁴⁾. Por outro lado, outros, como de pacientes afrodescendentes, apresentaram distribuição de tipos moleculares similares aos das mulheres caucasianas, indicando que a progressão e risco de recorrência de lesões precursoras não luminais pode não ser maior do que as luminais, ou que sua biologia depende de outros fatores ⁽⁵⁵⁾. Isto proporcionou estímulo a investigação da biologia destas lesões frente a outros fatores, como a heterogeneidade intratumoral ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾, com impacto no entendimento da carcinogênese mamária.

A visão linear tradicional da carcinogênese mamária partindo das proliferações benignas, passando sequencialmente pelas etapas de hiperplasia atípica, carcinoma ductal *in situ* (CDIS) de baixo grau, CDIS de alto grau, lesões invasoras de baixo e, em seguida, de alto grau, passou a ser questionada ⁽⁵⁹⁾. As evidências sobre a existência de diferentes vias genéticas no desenvolvimento do câncer de mama e, sobretudo, as grandes diferenças genéticas observadas entre estas vias ⁽⁶⁰⁻⁶⁶⁾ enfraqueceram essa hipótese.

Os estudos comparativos entre as lesões *in situ* e as invasoras mostraram pouquíssimas alterações genéticas entre ambas ^(56, 67-70). Foi comprovado também que as

principais mudanças aconteciam entre o epitélio normal e as lesões precursoras, ainda intraductais ^(68, 71-73). Tais descobertas tornaram improvável que mudanças genéticas no epitélio fossem as principais responsáveis pela aquisição de propriedades invasoras da neoplasia, já que são em número muito pequeno em comparação às alterações que ocorreram até então. Com isso, a atenção foi voltada para a hipótese de que as principais transformações para a transição de uma lesão *in situ* para invasora estivessem no microambiente em que ela se desenvolve e prolifera ^(57, 73-77).

O microambiente, representado pelos elementos que cercam as células epiteliais e os ductulos mamários, é constituído por células mioepiteliais, membrana basal e todas as substâncias celulares e amorfas do estroma mamário. As células mioepiteliais, responsáveis pela síntese da membrana basal, cuja camada se mantém intacta desde o tecido mamário normal até o carcinoma *in situ*, tem na sua rotura o padrão-ouro como definição de carcinoma mamário invasor. As células mioepiteliais são facilmente identificadas na avaliação do tecido tanto por hematoxilina-eosina quanto por marcações por método imunoistoquímico, indicado principalmente no diagnóstico de lesões suspeitas de invasão ⁽⁷⁸⁾.

As células mioepiteliais já eram alvo de estudos que investigavam seu papel na carcinogênese mamária, apontando sua função supressora tumoral ⁽⁷⁹⁻⁸⁴⁾. Análise de expressão gênica demonstrou diferenças entre células mioepiteliais circundando CDIS, e mesmo células não neoplásicas do microambiente, mais especificamente as células miofibroblásticas, quando comparadas às correspondentes nos tecidos normais ⁽⁸⁴⁾. As células mioepiteliais apresentam hiperexpressão de genes relacionados a proteases e citocinas envolvidas na regulação da migração, crescimento e invasão celular ⁽⁸⁴⁾. Alterações epigenéticas também têm um papel importante no ambiente carcinogênico pré-invasor ^(84, 85).

Observamos progresso no entendimento sobre o funcionamento do microambiente a partir do desenvolvimento de modelos tridimensionais para o estudo da relação entre as células que o constituem, assim como maior compreensão das relações moleculares entre seus componentes, contribuindo para esclarecer seu papel na transição da lesão *in situ* para uma invasora, além de propor novos mecanismos para tal, como a sinalização para as células inflamatórias no auxílio à progressão tumoral ^(73, 86, 87).

Um dos estudos que buscou aproximar esta teoria da prática diária foi o realizado por Hilson *et al.* ⁽⁸⁸⁾, que investiga as alterações fenotípicas por meio de avaliação imunoistoquímica das células mioepiteliais de ductos e ácinos normais em comparação àquelas associadas ao carcinoma *in situ*. Mesmo considerando as diferentes sensibilidades dos marcadores imunoistoquímicos mioepiteliais, os autores mostram que há diferenças nas expressões dos marcadores entre as células mioepiteliais ao redor do tecido normal e do neoplásico ⁽⁸⁸⁾. Como os próprios autores concluem, apesar do significado biológico incerto de tal diferença, ela existe, e os patologistas devem estar atentos a ela, especialmente ao utilizarem a imunoistoquímica na avaliação da invasão estromal ⁽⁸⁸⁾. Outros pesquisadores puderam demonstrar alterações na expressão genética de alguns marcadores em células mioepiteliais, integrinas, por exemplo, como indicadores do risco de recorrência em CDIS ⁽⁸⁹⁾.

O interesse para fatores relacionados à progressão da lesão *in situ* para invasiva, assim como no risco de recorrência, sustenta-se frente aos números crescentes dos CDIS. Embora ainda não haja de critérios seguros de determinação de risco, as células mioepiteliais despontam como fator direta ou indiretamente envolvido.

Portanto, a fim de melhor compreender o processo de transformação de um carcinoma mamário *in situ* em um carcinoma invasor e, o mais importante, procurar prever este risco de invasão, propomos que as características do microambiente que

envolve as neoplasias *in situ*, melhor representado pelas células mioepiteliais, sejam investigadas junto às características intrínsecas do epitélio neoplásico.

Objetivos

Objetivos

Objetivo geral

Determinar os fatores morfológicos e moleculares das células epiteliais e os marcadores das células mioepiteliais do microambiente em carcinomas ductais *in situ* da mama relacionados ao risco de invasão estromal.

Objetivos específicos

- 1) Classificar e estabelecer as frequências dos perfis moleculares com base na expressão imunoistoquímica de receptores hormonais e da oncoproteína HER2 na apresentação dos carcinomas ductais *in situ*.
- 2) Determinar as associações entre perfis moleculares com base na imunoistoquímica e:
 - a. Graduação histológica.
 - b. Presença de invasão.
- 3) Comparar os perfis moleculares baseados na imunoistoquímica dos componentes *in situ* e invasivo da mesma lesão.
- 4) Avaliar a expressão imunoistoquímica da citoqueratina basal 5/6 em células epiteliais dos carcinomas ductais *in situ* quanto ao perfil imunoistoquímico e à presença de invasão estromal.

5) Comparar o perfil imunoistoquímico das células mioepiteliais dos carcinomas ductais *in situ* quanto a:

- a. Graduação histológica.
- b. Perfil molecular baseado na imunoistoquímica.
- c. Presença de invasão estromal.

Revisão da literatura

Revisão da literatura

3.1 Patologia comparativa dos CDIS e carcinomas invasivos

O interesse pela comparação dos carcinomas *in situ* e invasivo é antigo. Já em 1987, Erhardt e Auer ⁽⁹⁰⁾, analisando DNA em material parafinado de tumores mamários, não observaram diferenças significativas na quantidade de DNA entre lesões *in situ* e invasivas, sugerindo que a progressão tumoral não estaria associada a significante alteração no DNA celular. Na mesma linha, Ottesen *et al.* ⁽⁹¹⁾, em 1995, analisaram o DNA por citometria de fluxo em 41 casos de CDIS e observaram o mesmo padrão quando comparavam CDIS, carcinoma invasivo e também lesões com ambos os componentes, sugerindo que o padrão de ploidia do carcinoma mamário já seria definido no estágio pré-invasivo da doença.

As avaliações morfológicas também mostraram semelhanças entre os componentes *in situ* e invasivo dos carcinomas mamários. Goldstein e Murphy ⁽⁹²⁾, em 1996, estudaram as características histológicas de 150 carcinomas invasivos associados a CDIS, observando pouca variação entre o grau nuclear presente nos componentes *in situ* e invasivo numa mesma lesão. Gupta *et al.* ⁽⁹³⁾, em 1997, observaram que o mesmo padrão de diferenciação era observado no CDIS e no carcinoma invasor correspondente, sendo incorreta a ideia de um aumento da displasia no CDIS antes de este invadir o estroma.

Estudos subsequentes, utilizando novas metodologias para investigação genética e molecular, continuaram demonstrando a semelhança entre os componentes *in situ* e invasivo de uma mesma neoplasia. Em 2000, Aubele *et al.* ⁽⁹⁴⁾ utilizaram

microdissecção a laser para obtenção de células neoplásicas de CDIS, do componente microinvasivo e também as metástases linfonodais quando presentes, submetendo-as à determinação de alterações por meio da hibridização genômica comparativa (HGC). Nas três localizações os autores observaram poucas alterações em 1q, 7q, 8q, 16, 17, 19, 20q, 21q e 22q. Embora os autores tenham observado poucas alterações em carcinomas invasivos em relação ao CDIS e outras em metástases, quando comparadas ao carcinoma invasor, a maioria das alterações genéticas no carcinoma invasor já estão presentes no CDIS ⁽⁹⁴⁾. Buerger *et al.*, em 1999, e Buerger *et al.*, em 2000, ^(95, 96) utilizando, respectivamente, HGC e análise serial da expressão gênica, também mostraram semelhança genética entre CDIS e carcinoma invasor, caracterizando o CDIS como lesão precursora direta do carcinoma invasivo.

Alguns estudos passaram a comparar tecido mamário normal com os carcinomas *in situ* e invasor. Porter *et al.* ⁽⁶⁸⁾ compararam, por meio de análise serial de expressão gênica, tecido mamário normal, carcinoma *in situ*, carcinoma invasor e metástases de carcinoma mamário. Os autores buscavam identificar genes responsáveis pela progressão tumoral, tanto na invasão estromal quanto na metastatização. No entanto, o resultado que mais chamou a atenção foi a dramática alteração transcriptômica que acontece entre o tecido mamário normal e o carcinoma *in situ*. Neste trabalho os carcinomas *in situ*, invasivos e metástases não formaram agrupamentos distintos na análise. Este estudo corrobora os achados obtidos previamente em menor escala por Porter *et al.* dois anos antes ⁽⁹⁷⁾, que mostrava grande número de alterações na sinalização autócrina e parácrina no processo inicial da carcinogênese mamária. Zikan *et al.* ⁽⁹⁸⁾ compararam tecido mamário normal (65 amostras), CDIS (25 amostras) e carcinoma invasor (42 amostras) em relação à perda de heterozigidade dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, além da expressão gênica de *VEGF* e *BCL2*. As maiores

diferenças observadas foram entre o tecido normal e o CDIS, enquanto este apresentava muitas semelhanças entre CDIS e o carcinoma invasor.

As semelhanças genéticas entre CDIS e o componente invasivo da mesma lesão são constatadas em trabalho com amostras de células neoplásicas de 13 pacientes, que utilizou HGC baseada em *microarray*, sequenciamento genético e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Neste estudo os autores sugerem que modificações nas etapas *in situ* e invasora da neoplasia possam refletir seleção de clones distintos dentro da lesão ⁽⁹⁹⁾.

3.2 Patologia molecular do CDIS

Estudos moleculares para determinação da expressão gênica dos carcinomas invasivos foram replicados nos carcinomas *in situ* para melhor compreensão de sua história natural. Hannemann *et al.* ⁽⁵⁰⁾ mostraram por *microarray* de DNA que os CDIS bem diferenciados e moderadamente diferenciados podem ser agrupados e que há 43 genes diferencialmente expressos entre os CDIS deste grupo e as lesões pouco diferenciadas. Este estudo foi realizado com 40 casos de CDIS e 40 casos de carcinoma invasivo e permitiu, além dos achados acima descritos, a observação de semelhança entre os casos bem diferenciados e os classificados como moderadamente/bem diferenciados, o que ajudaria a melhorar a acurácia da classificação dos CDIS bem diferenciados.

Assim como ocorreu com os carcinomas invasores, a classificação dos subtipos genéticos nos CDIS foi seguida pela determinação dos perfis moleculares por do método imunoistoquímico. Os CDIS mostraram ao exame imunoistoquímico os mesmos subtipos moleculares identificados nos carcinomas invasivos ^(51, 53, 100).

Tamimi *et al.* ⁽⁵¹⁾, em um desses estudos, utilizaram o banco de dados do Nurses's Health Study, iniciado em 1976, com questionários respondidos por 121.700 enfermeiras até 1996. Observaram 272 casos de CDIS e 2249 casos de carcinoma invasivo, após exclusão de amostras com material insuficiente e com carcinoma lobular *in situ* (CLIS) exclusivo. Foram avaliados os subtipos moleculares em CDIS e sua prevalência foi comparada aos carcinomas ductais invasivos (CDI). O estudo foi realizado com três amostras de neoplasia com 0.6 mm de diâmetro em blocos de microarranjo de tecido (TMA). A expressão imunoistoquímica de receptores hormonais foi considerada positiva quando acontecia em, pelo menos, 1% das células, a positividade para proteína do oncogene c-erbB2 (HER2) foi considerada quando havia expressão moderada/forte na membrana de 10% ou mais das células. Casos com qualquer expressão citoplasmática e/ou de membrana para citoqueratinas 5 e 6 (CK5/6) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) também foram considerados positivos. Os critérios para classificação foram: luminal A, quando fosse positivo para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) e negativos para HER2; luminal B, quando positivo para RE e/ou RP e também para HER2; HER2, quando negativo para RE e RP e positivo para HER2; basal-símile, quando negativo para RE, RP e HER2 e positivo para CK5/6 e/ou EGFR. Casos negativos para os cinco marcadores foram classificados como nulos. Os casos de CDIS apresentaram os mesmos fenótipos expressos pelos carcinomas invasores, embora com prevalências distintas. Os autores observaram menor proporção de luminal A (62.5 vs. 73.4, $p = 0.0002$) e maior de luminal B ou HER2 (13,2 vs. 5,2 e 13,6 vs. 5.7, respectivamente, $p < 0.0001$) quando comparados aos carcinomas invasivos. O subtipo basal-símile foi mais frequente nos carcinomas invasivos. Os CDIS de baixo grau nuclear foram predominantemente do tipo luminal A (92,9 %), assim como os de grau nuclear

intermediário (luminal A 79,0% e luminal B 10,9%). Já os CDIS com alto grau nuclear mostraram maior proporção de casos HER2 (29,3%) e basal-símile (13,2%) quando comparados aos CDIS com menor grau nuclear. Os autores destacam a correlação entre o grau nuclear dos CDIS com o seu fenótipo molecular, semelhante ao observado nos carcinomas invasivos, com tumores HER2 e basal-símile apresentando maior probabilidade (84% e 67%, respectivamente) de serem de alto grau do que graus baixo ou intermediário.

Bryan *et al.*, além de demonstrarem a existência de CDIS do subtipo basal-símile por critérios imunoistoquímicos para sua identificação, sugeriram que CDIS de alto grau associados a comedonecrose e significativo infiltrado inflamatório levantariam a suspeita para este subtipo ⁽¹⁰¹⁾.

3.3 Fatores envolvidos na invasão estromal

As células epiteliais dos ductos e dútulos mamários estão separadas fisicamente do estroma circunjacente pelas células mioepiteliais e pela membrana basal. Esta separação se mantém durante o processo da carcinogênese mamária até a ruptura de ambas e consequente transição do CDIS para carcinoma invasivo. Estudos na década de 1990 já procuravam determinar os fatores envolvidos nesse processo.

Sternlicht *et al.*, em 1997, em estudo *in situ* e *in vitro*, utilizando xenotransplantes mioepiteliais humanos, identificaram várias proteínas inibidoras do crescimento tumoral, caracterizando as células mioepiteliais como supressores tumorais naturais ⁽¹⁰²⁾. Lakhani *et al.* ⁽¹⁰³⁾, em 1999, demonstraram que perdas de heterozigossidade comumente vistas nas células tumorais já estavam presentes nas células luminais e mioepiteliais morfologicamente normais. Estes achados contribuíram para o conceito de células

tronco única para as duas linhagens celulares e também para o papel da células mioepiteliais na carcinogênese. Este papel foi discutido por Lakhani e O'Hare ⁽⁸⁰⁾, em 2001, quando estes autores, em interessante revisão da literatura, concluíram pela função protetora dessas células. Polyak e Hu ⁽⁸¹⁾, também em revisão de literatura quatro anos mais tarde, chegaram às mesmas conclusões.

Recentemente, com os avanços tecnológicos dos métodos de investigação, novos fatores foram avaliados, tanto epiteliais quanto do microambiente.

Sharma *et al.* ⁽¹⁰⁴⁾ identificaram em estroma de CDIS duas assinaturas estromais, chamadas de fibroblástica e macrofágica, que haviam sido identificadas no microambiente de carcinomas invasivos. Os autores observaram que a assinatura se mantém das neoplasias *in situ* para as invasoras.

Hu *et al.* observaram alterações epigenéticas nos três elementos do tecido com a neoplasia: células epiteliais, mioepiteliais e fibroblastos, destacando a importância do microambiente na carcinogênese ⁽⁸⁵⁾.

O estudo de Allinen *et al.* ⁽⁸⁴⁾ mostrou, por meio de análise serial de expressão gênica, grandes diferenças entre as células não neoplásicas, mais especificamente as células miofibroblásticas e mioepiteliais, na comparação de tecidos normais com os carcinomas *in situ*. As células mioepiteliais apresentaram hiperexpressão de genes relacionados a proteases e citocinas envolvidas na regulação da migração, crescimento e invasão celular ⁽⁸⁴⁾.

Diversos grupos demonstraram mais especificamente, usando metodologia mais moderna, a importância das células mioepiteliais na progressão tumoral.

Hu *et al.* ⁽⁸⁷⁾ mostraram, utilizando modelo de CDIS humano, os efeitos supressores da progressão para a invasão exercidos pelas células mioepiteliais. Estes

autores descrevem perfis moleculares de células epiteliais e mioepiteliais associados com a diferenciação celular e analisam o papel de promoção da invasão estromal e do crescimento tumoral pelos fibroblastos estromais, assim como a perda da diferenciação mioepitelial como importante fator na invasão estromal.

Neste sentido, Zhang *et al.* identificaram por imunoistoquímica que células mioepiteliais de CDIS, embora morfologicamente visíveis, apresentavam em alguns casos perda da expressão imunoistoquímica de vários marcadores comumente expressos por estas células, como actina de músculo liso (AML), calponina, CD10, SMMHC, maspina, WT1, CK5, CK14 e CK17 ⁽¹⁰⁵⁾.

Man *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾ examinaram material parafinado de 220 pacientes com CDIS, 94 destes com interrupção da camada mioepitelial, totalizando 405 focos de interrupção que foram estudados. Entre eles, 350 se encontravam adjacentes a células RE-negativas à imunoistoquímica e 55 focos se encontravam adjacentes a células RE-positivas. Cinco casos foram selecionados para microdissecção e ambos os tipos de células no mesmo ducto mostraram diferentes frequências e padrões de perda de heterozigosidade e/ou instabilidade microssatélite. Os autores concluem que estas alterações potencialmente representam o sinal inicial da formação de uma variante celular mais agressiva associada a uma disfunção na camada mioepitelial promovendo progressão ou invasão estromal. Hipotetizam que esta disfunção na camada mioepitelial seria decorrência de agressões externas durante a reposição normal das células mioepiteliais, resultando num grupo de células mioepiteliais mortas. Isto atrairia um infiltrado linfocitário que por sua vez romperia fisicamente a membrana basal e aumentaria a permeabilidade local para moléculas relacionadas ao crescimento e metabolismo, facilitando a formação de clones celulares epiteliais mais agressivos.

Hilson *et al.* ⁽⁸⁸⁾ identificaram alterações fenotípicas por imunoistoquímica nas células mioepiteliais do CDIS. Foram estudados 101 casos de CDIS, sendo 56 sem invasão e 45 com carcinoma invasor associado. Foram avaliadas as expressões imunoistoquímicas dos seguintes marcadores mioepiteliais: actina de músculo liso (AML), SMMHC (*smooth muscle myosin heavy chain*), calponina, proteína tumoral p63 (p63), CK5/6, CD10 e p75. Em cada caso a expressão nos CDIS foi classificada pela distribuição e pela intensidade, comparando à expressão dos mesmos nas células mioepiteliais nos ductulos normais circunjacentes. Em 85 casos (84,2%), as células mioepiteliais mostraram algum nível de redução de expressão. A proporção de redução foi de 76,5% para SMMHC, 34% para CD10, 30,2% para CK5/6, 17,4% para calponina, 12,6% para p63, 4,2% para p75 e 1% para AML. A redução de SMMHC foi significativamente mais frequente nos CDIS de alto grau do que nos de baixo grau (84,8% vs. 61,5%, $p=0,01$).

3.4 Previsão da invasão estromal dos CDIS

Os estudos sobre fatores preditores de invasão estromal eram baseados principalmente na análise de critérios morfológicos. Moriya e Silverberg ⁽¹⁰⁷⁾ analisaram a associação entre CDIS do tipo comedo e a presença de invasão estromal. Concluíram que o tipo arquitetural sólido e o alto grau nuclear são os fatores preditivos mais importantes para a progressão para carcinoma invasivo. Badve *et al.* ⁽¹⁰⁸⁾ estudaram cinco diferentes classificações histológicas a fim de predizerem o risco de recorrência da doença após excisão local. Não foi encontrada associação entre os diferentes padrões arquiteturais, com ou sem necrose, e risco de recidiva. Sue *et al.* ⁽¹⁰⁹⁾, em estudo retrospectivo com 205 pacientes consecutivas com diagnóstico de CDIS ou CDIS

associado a microinvasão estromal (presente em 24.9% das pacientes), identificaram os seguintes fatores relacionados à microinvasão: maior área de CDIS e alto grau do tipo sólido e comedo com microcalcificações. Porém, na análise multivariada, nenhum desses fatores foram preditores independentes de microinvasão. O seguimento médio de 8,5 anos não mostrou diferenças nas taxas de recidiva ou sobrevida entre os grupos com e sem microinvasão.

Os avanços tecnológicos proporcionaram novas maneiras de tentar prever o risco de transformação do CDIS em carcinoma invasivo. Nofech-Mozes *et al.* ⁽¹⁴⁾ comentam a necessidade de identificar biomarcadores que forneçam dados prognósticos que sejam mais precisos que o índice de Van Nuys para prever a possibilidade de recidiva invasora. Concluem que, apesar da existência de inúmeros fatores, alguns estabelecidos, como RE, RP, HER2, e de fatores investigativos envolvidos na proliferação celular, regulação do ciclo celular, moléculas extracelulares, fatores envolvidos na degradação da matriz e angiogênese, controvérsias ainda existem em relação a seu valor prognóstico, suas interrelações e suas vantagens sobre a avaliação morfológica. Muggerud *et al.* ⁽¹¹⁰⁾ estudaram o perfil de expressão gênica de 31 casos de CDIS puros, 36 casos de carcinomas invasivos puros e 42 casos com ambos os componentes. Estes foram classificados por seus subtipos moleculares. Foram identificados genes relacionados à reorganização do microambiente como preditores de maior agressividade do CDIS e que se mostraram independentes do *status* do RE, RP e HER2.

Castro *et al.* ⁽⁷¹⁾ estudaram por técnica de *microarray* de DNA 41 amostras de tecido mamário, 4 delas não neoplásicas, 5 provenientes de CDIS puro, 22 de CDIS associado a invasão e 10 carcinomas invasivos. Os autores identificaram 147 genes diferencialmente expressos entre células neoplásicas de CDIS provenientes de

neoplasias puras e associadas a invasão e que potencialmente seriam preditores de invasão.

Estudos também avaliaram a influência do perfil molecular na invasão estromal. Zhou *et al.* ⁽¹¹¹⁾ estudaram 381 casos de CDIS divididos nos subtipos moleculares por imunoistoquímica pelos critérios de St. Gallen, observando recidiva em 102 casos. A recidiva foi invasiva em 58 casos. Em dez anos de seguimento, nenhum subtipo molecular mostrou pior prognóstico. Após dez anos, o subtipo triplo-negativo apontou maior risco de recidiva. Lazzeroni *et al.* ⁽¹¹²⁾ propõem a análise do Ki67 como fator prognóstico e preditivo em neoplasias intraepiteliais ductais. A partir de análise multivariada em um modelo de regressão, foram estudados 1.171 pacientes tratados cirurgicamente por diagnóstico de neoplasias intraepiteliais ductais. A radioterapia mostrou proteção apenas no grupo com $Ki67 \geq 14\%$, independentemente do grau nuclear e presença de necrose. Também mostrou benefício paralelo ao índice de Ki67 até a marca de 30%. A terapia hormonal foi efetiva tanto no grupo luminal A (RE e/ou RP positivos, $Ki67 < 14\%$ e HER2 negativo) quanto luminal B/HER2-negativo (RE e/ou RP positivos, $Ki67 \geq 14\%$).

Outros trabalhos investigaram fatores morfológicos e imaginológicos. Park *et al.* ⁽¹¹³⁾ desenvolveram um nomograma preditor de invasão em biópsias com diagnóstico de CDIS. Analisando 340 pacientes divididos em grupos de treinamento e validação, um nomograma foi montado valorizando os seguintes dados: massa palpável, presença de massa e calcificação à ultrassonografia, o tipo de biópsia (pistola automática) e a suspeita de microinvasão. Han *et al.* ⁽¹¹⁴⁾ estudaram 255 casos com diagnóstico de CDIS. Observaram presença de invasão após cirurgia em 26% dos casos. Os fatores

associados à presença de invasão foram microcalcificações extensas à mamografia, lesões sólidas à imagem ou lesões palpáveis e CDIS de padrão sólido.

Métodos

Métodos

4.1 Seleção dos casos

O estudo foi retrospectivo com seleção de casos consecutivos com diagnóstico histológico de CDIS de mama nos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009.

Para a seleção dos casos foram incluídos:

1. Casos com blocos existentes no arquivo.
2. Diagnóstico histológico de CDIS por biópsia percutânea ou cirúrgica, desde que o material da ressecção cirúrgica subsequente estivesse disponível.

Os casos excluídos foram:

1. Material insuficiente para realização de exame imunoistoquímico.
2. Material com acentuado grau de autólise.
3. Pacientes no ciclo gravídico-puerperal.

Foram identificados 321 casos com diagnóstico inicial de CDIS e material de ressecção subsequente. Houve 85 exclusões, 59 por material insuficiente de carcinoma, *in situ* e/ou invasivo, durante a análise morfológica inicial; 20 por desgaste das áreas de carcinoma durante procedimento para análise imunoistoquímica, e 6 por autólise do material.

4.2 Método anatomopatológico

Todos os tecidos foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e incluídos em parafina. As lâminas foram revisadas pelo autor para confirmação do diagnóstico histológico de CDIS, classificação das neoplasias *in situ* e invasiva e seleção das áreas para construção dos blocos de TMA. Os carcinomas invasores foram classificados segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) ⁽¹¹⁵⁾ e graduados segundo critérios de Elston e Ellis ⁽²⁶⁾.

Os CDIS foram inicialmente classificados segundo critérios de Silverstein em graus baixo, intermediário e alto ⁽²⁷⁾. Para fins de análise estatística, os grupos de graus baixo e intermediário foram reunidos na categoria denominada baixo grau, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação histológica dos casos de carcinoma ductal *in situ*

Critério de Silverstein ⁽²⁷⁾	Reagrupamento	Grau nuclear	Necrose
Grau baixo	Grau baixo	1 ou 2	Ausente
Grau intermediário		1 ou 2	Presente
Grau alto	Grau alto	3	Presente ou ausente

Durante a revisão foram selecionadas áreas representativas dos componentes *in situ* e invasivo para construção de blocos de microarranjos de tecido (TMA) e exame imunoistoquímico.

4.3 Construção dos blocos de microarranjos de tecido

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas em Patologia Hepática – LIM/14.

Foram retirados cilindros de 2,0 mm de diâmetro das áreas selecionadas do tecido (pelo menos uma área do componente *in situ* e uma área do componente invasor) do bloco de parafina doador. Estes cilindros foram enxertados em um bloco de parafina receptor em linhas e colunas com intervalos de 1,0 mm entre cada cilindro, obedecendo à orientação de um mapa de planejamento. Foi utilizado um instrumento de precisão para construção de microarranjos de tecido (TMA) do fabricante *Beecher Instruments, Silver Spring, MD*, posicionado em bancada fixa para trabalho. Após finalização dos blocos receptores, estes foram aquecidos por dez minutos na temperatura de 60°C e selados para obtenção dos cortes histológicos. Foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura em micrótomo convencional, utilizando lâminas apropriadas da marca *StarFrost*®, com técnica padronizada.

Os primeiros cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina, conforme exemplo ilustrado na figura 1, e verificadas eventuais perdas.

Figura 1 – Lâmina de microarranjo de tecido corada pela hematoxilina-eosina (200x).

4.4 Método imunoistoquímico

A seguir foram realizados os cortes histológicos para realizar as reações imunoistoquímicas para receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), proteína do oncogene c-erbB2 (HER2), proteína MKI67 (Ki67), citoqueratinas basais 5 e 6 (CK5/6), produto do fator de crescimento epidérmico (EGFR), vimentina, calponina, proteína tumoral p63 (p63), *cluster of differentiation* 10 (CD10), actina de músculo liso (AML) e SMMHC (cadeia pesada da miosina de músculo liso, *smooth muscle myosin heavy chain*).

As lâminas foram submetidas à reação imunoistoquímica com sistema de detecção *Envision FLEX* (DAKO). Este sistema detecta anticorpos primários de coelho e camundongo e a reação é visualizada por *Envision FLEX DAB* mais cromógeno de acordo com o procedimento descrito a seguir: 1. O passo inicial foi realizado em PTLINK (DAKO), equipamento responsável pela desparafinização e recuperação antigênica de tecidos parafinados, em tampão de pH alto ou baixo, de acordo com os anticorpos utilizados subsequentemente. O equipamento foi programado para realizar a desparafinização a 65°C por vinte minutos, seguida da recuperação antigênica a 97°C por vinte minutos; 2. As lâminas foram retiradas do equipamento depois de resfriadas a 65°C e incubadas em solução de lavagem (*Envision Flex Wash Buffer* – solução salina tamponada com, Tris contendo Tween 20, pH 7.6) por cinco minutos; 3. Após o bloqueio da peroxidase por cinco minutos em solução *Envision Flex peroxidase block*, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos *overnight*; 4. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas em solução de lavagem por cinco minutos, seguindo-se incubação com polímero por vinte minutos (*Envision Flex/HRP – dextran* acoplado com moléculas de peroxidase e anticorpo secundário direcionado contra imunoglobulinas de coelho e camundongo); 5. Depois da incubação das lâminas em

solução de lavagem por cinco minutos, a reação imunoistoquímica foi revelada com DAB mais cromógeno (*Envision Flex Substrate Working Solution – DAB* mais solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio) por dez minutos; 6. Finalmente, as lâminas foram submetidas a solução de lavagem por cinco minutos e contracoradas com hematoxilina de Meyer. A desidratação foi realizada em três banhos de xilol (dois minutos cada) e as lâminas montadas em meio de montagem permanente (DAKO CS703).

As especificações dos anticorpos primários utilizados estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Especificações técnicas das reações imunoistoquímicas

Marcador	Clonalidade	Marca	Diluição	pH da recuperação antigênica	Tempo de recuperação antigênica
RE (receptor de estrogênio)	SP1	Cell Marque	1:750	Tris-EDTA pH 9.0	40 min a 97°C
RP (receptor de progesterona)	PgR 636	Dako	1:750	Tris-EDTA pH 9.0	30 min a 97°C
HER2	SP3	Cell Marque	1:400	Tris-EDTA pH 9.0	40 min a 97°C
Ki67	MIB-1	Dako	1:1000	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico)	31G7	Zymed	1:100	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
Citoqueratinas basais CK5/6	D5/16B4	Dako	1:04	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Vimentina	V9	Dako	1:200	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
AML (actina de músculo liso)	1A4	Dako	1:600	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
CD10	56C6	Dako	1:2	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
p63	4A4	DBS	1:1200	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Calponina	calp	Neomarkers	1:1800	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
SMMHC (cadeia pesada da miosina de músculo liso)	SMMS-1	Dako	1:250	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C

Interpretação imunoistoquímica

Controles positivos e negativos externos foram utilizados em todas as reações e controles internos foram utilizados nos casos cabíveis.

Positividade nuclear foi considerada para RE, RP, Ki67 e p63; na membrana para EGFR e HER2, e citoplasmática para CK5/6, vimentina, AML, CD10, calponina e SMMHC.

A interpretação dos marcadores foi feita da seguinte maneira:

- RE e RP: Tumores com, pelo menos, 1% de células coradas foram considerados positivos. Para fins de análise estatística, trabalhamos com as categorias positivo e negativo e com linha de corte arbitrária de 50% para classificação de baixa e alta expressão em CDIS.
- HER2 e EGFR: Consideramos positivos os casos com escore 3+, segundo critérios recomendados pela ASCO/CAP (43).
- Ki67: Valores expressos em porcentagem de células positivas no componente invasor das neoplasias.
- CK5/6: Foram considerados positivos os casos com, pelo menos, 1% de células marcadas.

Exemplos dos marcadores são ilustrados nas figuras 2 a 7.

Figura 2 – Marcação nuclear para receptor de estrogênio (200x)

Figura 3 – Marcação nuclear para receptor de progesterona (200x)

Figura 4 – Marcação de membrana (3+) do HER2 (200x)

Figura 5 – Marcação nuclear para Ki67 (200x)

Figura 6 – Marcação citoplasmática em células epiteliais para CK5/6 (200x)

Figura 7 – Marcação de membrana do EGFR (200x)

Marcadores mioepiteliais (vimentina, AML, CD10, p63, calponina e SMMHC): Foram aplicados critérios de classificação com escore variando de 0 a 3, conforme utilizado por Hilson *et al.* ⁽⁸⁸⁾. Neste sistema os níveis de expressão são avaliados em categorias variando de 0 (fraco) a 3 (intenso), subjetivamente, considerando-se avaliação semiquantitativa subjetiva do número de células coradas, continuidade no revestimento dos ductos envolvidos, comparação de número e intensidade com o tecido mamário normal, e uniformidade de padrão entre os diferentes marcadores. Para fins de análise estatística os escores foram agrupados para criação de categorias dicotômicas, denominadas expressão baixa e expressão alta, conforme apresentado na Tabela 3 e ilustrado nas figuras 8 a 21.

Tabela 3 – Categorias de expressão dos marcadores mioepiteliais nos carcinomas ductais *in situ*

Marcador	Expressão baixa	Expressão alta
SMMHC	0 ou 1	2 ou 3
CD10	0 ou 1	2 ou 3
Calponina	0, 1 ou 2	3
p63	0, 1 ou 2	3
Vimentina	0, 1 ou 2	3
CK 5/6	0 ou 1	2 ou 3
AML	0, 1 ou 2	3

Figura 8 – Expressão alta de SMMHC (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 9 – Expressão alta de SMMHC (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 10 – Expressão alta de CD10 (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 11– Expressão baixa de CD10 (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 12 – Expressão alta de p63 (núcleo) (200x)

Figura 13 – Expressão baixa de p63 (núcleo) (200x)

Figura 14 – Expressão alta de calponina (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 15 – Expressão baixa de calponina (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 16 – Expressão alta de AML (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 17 – Expressão baixa de AML (citoplasma/membrana) (200x)

Figura 18 – Expressão alta de vimentina (citoplasma) (200x)

Figura 19 – Expressão baixa de vimentina (citoplasma) (200x)

Figura 20 – Expressão alta de CK5/6 nas células mioepiteliais (citoplasma) (200x)

Figura 21 – Expressão baixa de CK5/6 nas células mioepiteliais (citoplasma) (200x)

Os carcinomas invasores foram categorizados nos subtipos moleculares com base no perfil imunoistoquímico, segundo os critérios de Nielsen *et al.* (37) e Cheang *et al.* (39), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação do subtipo molecular, baseada no perfil imunoistoquímico dos carcinomas invasores

Marcador Perfil molecular	RE e/ou RP	HER2	Ki67	CK5/6 e/ou EGFR
Luminal A	Positivo	Negativo	<14%	Qualquer
Luminal B, HER2 negativo	Positivo	Negativo	$\geq 14\%$	Qualquer
Luminal B, HER2-positivo	Positivo	Positivo	Qualquer	Qualquer
HER2	Negativo	Positivo	Qualquer	Qualquer
Triplo negativo, subtipo não determinado	Negativo	Negativo	Qualquer	Negativo
Triplo negativo, subtipo basal	Negativo	Negativo	Qualquer	Positivo

Os CDIS foram classificados em subtipos moleculares com base no perfil imunoistoquímico segundo critérios apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Classificação dos carcinomas ductais *in situ* quanto ao subtipo molecular, baseada no perfil imunoistoquímico

Marcador Perfil molecular	RE e/ou RP	HER2	Ki67	CK5/6 e/ou EGFR
Luminal A	Positivo $\geq 50\%$	Negativo	Qualquer	Qualquer
Luminal B, HER2-negativo	Positivo < 50%	Negativo	Qualquer	Qualquer
Luminal B, HER2-positivo	Positivo $\geq 1\%$	Positivo	Qualquer	Qualquer
HER2	Negativo	Positivo	Qualquer	Qualquer
Triplo negativo, subtipo não determinado	Negativo	Negativo	Qualquer	Negativo
Triplo negativo, subtipo basal	Negativo	Negativo	Qualquer	Positivo

4.5 Análise estatística

O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para comparar a idade dos pacientes dos grupos 1 (CDIS puro) e 2 (CDIS associado a invasão).

A correlação entre as características dos componentes *in situ* e invasivo da mesma lesão foi feita pelo método de correlação de Sperman.

As variáveis categóricas foram incluídas em tabelas de contingências e avaliadas pelo teste do qui-quadrado de Pearson nos grupos de interesse (graduação histológica, perfil molecular e presença de invasão). *Odds ratio* (razão de chance) com intervalo de confiança de 95% foi calculado para essas variáveis.

As variáveis selecionadas desses resultados foram submetidas à análise multivariada por meio de regressão logística, utilizando o método *stepwise* para previsão de invasão estromal.

Análise estatística foi realizada, utilizando o software IBM SPSS, versão 22.0 e o valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

4.6 Certificação institucional

Projeto aprovado pelo Comitê Científico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas, do Instituto do Câncer de São Paulo e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo 0276/10, vide anexo A).

Resultados

Resultados

Foram estudados 236 casos de CDIS, distribuídos em dois grupos: 90 casos de CDIS puro (grupo 1) e 146 de CDIS associados a carcinoma invasor (grupo 2). As características de idade, variáveis anatomopatológicas e perfil molecular dos grupos 1 e 2 estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição da idade das pacientes e variáveis anatomopatológicas nos 236 casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) quanto à presença de invasão

Variáveis		Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS com invasão)	<i>p</i> *	OR** (IC95%)
Número (n)		90	146		
Idade (média)		58,45	58,53		
Grau	Baixo	63 (70%)	93/144 (64,6%)	0,47	1,3 (0,7-2,2)
	Alto	27 (30%)	51/144 (35,4%)		
RE e/ou RP	Positivo 180 casos	76 (84,4%)	104 (71,2%)	0,03	0,4561 (0,2326-0,8944)
	Negativo 56 casos	14 (15,6%)	42 (28,8%)		
HER2	Negativo (0/1+) 188 casos	69 (76,7%)	119 (81,5%)	0,46	1,34 (0,705-2,55)
	Positivo (3+) 48 casos	21 (23,3%)	27 (18,5%)		
Perfil molecular	Luminal, HER2-negativo 163 casos	65 (72,2%)	98 (67,1%)	0,01	3,6 (1,2-10,9)***
	Luminal, HER2-positivo 17 casos	11 (12,2%)	6 (4,1%)		
	HER2 31 casos	10 (11,1%)	21 (14,4%)		
	Tripla negativo 25 casos	4 (4,4%)	21 (14,4%)		
CK 5/6	Positivo	26/85(30,6%)	15/133 (11,3%)	0,0007	0,2885 (0,1421-0,5857)
	Negativo	59/85 (69,4%)	118/133 (88,7%)		
EGFR	Positivo	9/85 (10,6%)	16/116 (13,8%)	0,64	1,3511 (0,5664-3,2231)
	Negativo	76/85 (89,4%)	100/116 (86,2%)		

* Teste do chi-quadrado; ** OR: *odds ratio*; *** OR para invasão estromal em relação ao perfil triplo-negativo

O perfil molecular associa-se ao grau histológico dos CDIS, conforme se observa na tabela 7.

Tabela 7 – Associação entre os perfis moleculares e a graduação histológica dos carcinomas ductais *in situ*

Perfil molecular	Baixo grau	Alto grau	TOTAL
Luminal/HER2-negativo	143	18	161
Luminal/HER2-positivo	6	11	17
HER2	4	27	31
Triplo-negativo	3	22	25
TOTAL	156	78	234

Chi-quadrado 117,03; $p < 0,0001$

As tabelas 8 e 9 mostram as características de idade e perfil imunoistoquímico nos grupos 1 e 2 quando os CDIS são divididos em baixo e alto grau, respectivamente.

Tabela 8 – Características anatomopatológicas entre os 156 casos de carcinoma ductal *in situ* de baixo grau quanto à presença de invasão estromal

Variáveis		Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS + CDI)	<i>p</i>	OR*** (IC95%)
Número (n)		63	93		
Idade (média)		58,45	58,53		
RE e/ou RP	Positivo	62 (98,4%)	87 (93,5%)	0,24*	4,3 (0,5-36,4)
	Negativo	1 (1,6%)	6 (6,5%)		
HER2	Negativo (0/1+)	60 (95,2%)	86 (92,5%)	0,74*	1,6 (0,4-6,5)
	Positivo (3+)	3 (4,8%)	7 (7,5%)		
Perfil molecular	Luminal	60 (95,2%)	83 (89,2%)	0,44**	4,2 (0,5-36,4)#
	Híbrido	2 (3,2%)	4 (4,3%)		
	HER2	1 (1,6%)	3 (3,2%)		
	Tripla negativo	0	0 (0%)		
CK 5/6	Positivo	17/59 (28,8%)	7/86 (8,1%)	0,002**	4,5 (1,7-11,9)
	Negativo	42/59 (71,2%)	79/86 (91,9%)		
EGFR	Positivo	2/58 (3,4%)	3/76 (3,9%)	1*	1,1 (0,2-7,1)
	Negativo	56/58 (96,6%)	73/76 (96,1%)		

* Fisher; ** Chi-quadrado; *** OR: *odds ratio*; # OR para invasão estromal nas lesões RE-negativas (HER2 e TN)

Tabela 9 – Características anatomopatológicas entre os 78 casos de carcinoma ductal *in situ* de alto grau quanto à presença de invasão estromal

Variáveis		Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS + CDI)	<i>p</i> *	OR (IC95%)
Número (n)		27	51		
Idade (média)		55,86	58,53		
RE e/ou RP	Positivo	14 (51,8%)	15 (29,4%)	0,09	2,5 (0,9-6,8)
	Negativo	13 (48,2%)	36 (70,6%)		
HER2	Negativo (0/1+)	9 (33,3%)	31 (60,8%)	0,04	3,1 (1,2-8,2)
	Positivo (3+)	18 (66,7%)	20 (39,2%)		
Perfil molecular	Luminal	5 (18,5%)	13 (25,5%)	0,003	0,09 (0,02-0,3)**
	Híbrido	9 (33,3%)	4 (4,3%)		
	HER2	9 (33,3%)	2 (3,9%)		
	Tripla negativo	4 (14,8%)	18 (35,3%)		
CK 5/6	Positivo	9/26 (34,6%)	8/47 (17%)	0,16	2,5 (0,8-7,8)
	Negativo	17/26 (65,4%)	39/47 (83%)		
EGFR	Positivo	7 (25,9%)	13/40 (32,5%)	0,76	0,7 (0,2-2,1)
	Negativo	20 (74,1%)	27/40 (67,5%)		

* Fisher; **OR para invasão estromal nas lesões HER2-positivas (luminal B/HER2 e HER2)

A tabela 10 mostra a expressão de CK 5/6 nos grupos 1 e 2 de acordo com o perfil molecular nos CDIS. Houve maior expressão de CK5/6 nos tumores HER2, seguido dos TN. O chi-quadrado na comparação entre todos os tipos moleculares quanto à expressão de CK5/6 foi 6,79 ($p=0,08$). Na comparação entre tumores RE-positivos (luminal e luminalB/HER2) e RE-negativos (HER2 e TN), o chi-quadrado foi 4,99 ($p=0,02$), indicando maior frequência de expressão de CK5/6 nesses tumores.

Tabela 10 – Expressão de citoqueratinas basais CK 5/6 em células epiteliais dos carcinomas ductais *in situ* de acordo com o perfil molecular

Perfil molecular (CDIS)	Citoqueratina CK5/6		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Luminal	23 (15,4%)	126 (84,6%)	149
Híbrido	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16
HER2	10 (34,5%)	19 (65,5%)	29
TN	6 (25%)	18 (75%)	24
TOTAL	41	177	218

A tabela 11 mostra a associação das características histológicas e imunoistoquímicas entre os componentes *in situ* e invasivo das neoplasias do grupo 2. Houve correlação significativa entre grau nuclear ($p<0,0001$), expressão de RE/RP ($p<0,0001$), superexpressão de HER2 ($p<0,0001$) e perfil molecular ($p<0,0001$) entre os componentes *in situ* e invasivo. O valor do coeficiente de correlação variou de 0,918 (HER2) a 0,967 (perfil molecular).

Tabela 11 – Comparação entre as características histológicas e imunoistoquímicas dos componentes *in situ* e invasivo da mesma lesão dos 146 casos de carcinomas ductais invasivos (grupo 2)

Variáveis		Componente <i>in situ</i>	Componente invasivo
Grau	Baixo	95	92
	Alto	51	54
RE e/ou RP	Positivo	104	106
	Negativo	42	40
HER2	Positivo	27	26
	Negativo	119	120
CK 5/6	Positivo	15	14
	Negativo	118	132
	Não avaliável	13	0
EGFR	Positivo	16	22
	Negativo	100	107
	Não avaliável	30	17
Perfil imunoistoquímico	Luminais, HER2-negativo	98	98
	Luminal B, HER2-positivo	6	8
	HER2	21	18
	Triplo-negativo	21	22
Triplo-negativos	Basal-símile	10	15
	Não basal	6	7
	Não avaliável	5	0

A expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS nos grupos 1 e 2 está descrita na tabela 12. Os CDIS associados a invasão mostraram redução na expressão dos marcadores, mas esta atingiu níveis de significância somente com SMMHC, CD10 e vimentina. Calponina, p63 e CK5/6 ficaram no limite de significância.

Tabela 12 - Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais em CDIS quanto à presença de invasão estromal

Marcador	Nível de expressão (escores)	Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS com invasão)	TOTAL	p	OR**
SMMHC	Baixo (0/1)	55 (30,4%)	126 (69,6%)	181 (100%)	<0,0001	17,1 (5,8-51,1)
	Alto (2/3)	30 (88,2%)	4 (11,8%)	34 (100%)		
CD10	Baixo (0/1)	2 (4,4%)	43 (95,6%)	45 (100%)	<0,0001	21,0 (4,9-89,4)
	Alto (2/3)	86 (49,4%)	88 (50,6%)	174 (100%)		
Calponina	Baixo (0/1/2)	23 (31,5%)	50 (68,5%)	73 (100%)	0,06	1,7 (0,97-3,1)
	Alto (3)	66 (44,6%)	82 (55,4%)	148 (100%)		
p63	Baixo (0/1/2)	38 (35,2%)	70 (64,8%)	108 (100%)	0,055	1,7 (0,98-2,9)
	Alto (3)	51 (48,1%)	55 (51,9%)	106 (100%)		
Vimentina	Baixo (2)	5 (17,2%)	24 (82,8%)	29 (100%)	0,01	3,7 (1,3-10,1)
	Alto (3)	83 (43,5%)	108 (66,5%)	191 (100%)		
CK5/6	Baixo (0/1)	30 (32,6%)	62 (67,4%)	92 (100%)	0,054	1,7 (0,9-3)
	Alto (2/3)	54 (47,8%)	64 (51,2%)	118 (100%)		
AML	Baixo (0/1/2)	4 (40%)	6 (60%)	10 (100%)	0,87	1,1 (0,3-4,0)
	Alto (3)	85 (42,5%)	115 (57,5%)	200 (100%)		

Os resultados da expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS de baixo grau e alto grau estão sumarizados nas tabelas 13 e 14, respectivamente. Os marcadores SMMHC e CD10 mostraram redução significativa de expressão no grupo dos CDIS com invasão nos dois grupos (alto e baixo grau). No grupo de baixo grau, observou-se redução significativa na expressão de p63, enquanto nas neoplasias de alto grau houve redução na expressão de CK5/6.

Tabela 13 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS de baixo grau quanto à presença de invasão

Marcador	Nível de expressão (escores)	Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS com invasão)	<i>p</i>	OR (IC95%)
SMMHC	Baixo (0/1) 122 casos	41 (33,6%)	81 (66,4%)	<0,0001	11,8 (3,3-42,6)
	Alto (2/3) 21 casos	18 (85,7%)	3 (14,3%)		
CD10	Baixo (0/1) 28 casos	1 (3,6%)	27 (96,4%)	<0,0001	27,4 (3,6-208,6)
	Alto (2/3) 119 casos	60 (50,4%)	59 (49,6%)		
Calponina	Baixo (0/1/2) 38 casos	16 (42,1%)	22 (57,9%)	0,93	1,1 (0,5-2,3)
	Alto (3) 103 casos	46 (44,7%)	57 (55,3%)		
p63	Baixo (0/1/2) 72 casos	27 (37,5%)	45 (62,5%)	0,001	3,6 (1,7-7,8)
	Alto (3) 51 casos	35 (68,6%)	16 (31,4%)		
Vimentina	Baixo (2) 20 casos	5(25%)	15 (75%)	0,15	2,4 (0,8-7,1)
	Alto (3) 125 casos	56 (44,8%)	69 (55,2%)		
CK5/6	Baixo (0/1) 71 casos	26 (36,6%)	45 (63,4%)	0,35	1,4 (0,7-2,8)
	Alto (2/3) 70 casos	32 (45,7%)	38 (54,3%)		
AML	Baixo (0/1/2) 12 casos	3(25%)	9 (75%)	0,41	2,1 (0,5-8,2)
	Alto (3) 144 casos	60 (41,7%)	84 (58,3%)		

Tabela 14 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS de alto grau quanto à presença de invasão

Marcador	Nível de expressão	Grupo 1 (CDIS puro)	Grupo 2 (CDIS com invasão)	<i>p</i>	OR (IC95%)
SMMHC	Baixo (0/1) 59 casos	14 (23,7%)	45 (76,3%)	0,0008	38,6 (4,6-323,4)
	Alto (2/3) 13 casos	12 (92,3%)	1 (7,7%)		
CD10	Baixo (0/1) 17 casos	1 (5,9%)	16 (94,1%)	0,01	14,3 (1,7-115,8)
	Alto (2/3) 55 casos	26 (47,3%)	29 (52,7%)		
Calponina	Baixo (0/1/2) 28 casos	7 (25%)	21 (75%)	0,09	2,4 (0,8-6,8)
	Alto (3) 45 casos	20 (44,4%)	25 (55,6%)		
p63	Baixo (0/1/2) 27 casos	11 (40,7%)	16 (59,3%)	0,34	1,6 (0,6-4,7)
	Alto (3) 30 casos	16 (53,3%)	14 (47,6%)		
Vimentina	Baixo (2) 9 casos	0 (0%)	9 (100%)	0,08	13,2 (0,7-236,9)
	Alto (3) 66 casos	27 (40,9%)	39 (59,1%)		
CK5/6	Baixo (0/1) 21 casos	4 (19%)	17 (81%)	0,04	3,6 (1,0-12,3)
	Alto (2/3) 48 casos	22 (45,8%)	26 (54,2%)		
AML	Baixo (0/1/2) 6 casos	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0,30	3,1 (0,3-28,7)
	Alto (3) 67 casos	26 (38,8%)	41 (61,2%)		

A expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais em relação ao perfil molecular por imunoistoquímica nos CDIS está apresentada na tabela 15. Nenhum dos marcadores apresentou associação significativa com o perfil molecular.

Tabela 15 – Expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais dos CDIS quanto ao perfil molecular

Marcador	Níveis de expressão	Luminal A e luminal B/HER2-negativo	Luminal B/HER2-positivo	HER2	Triplo-negativo	<i>p</i> *
SMMHC	Baixo (0/1) 181 casos	124	13	24	20	0,80
	Alto (2/3) 34 casos	23	4	3	4	
CD10	Baixo (0/1) 88 casos	59	4	11	14	0,24
	Alto (2/3) 131 casos	91	13	17	10	
Calponina	Baixo (0/1/2) 73 casos	45	4	12	12	0,06
	Alto (3) 148 casos	105	13	18	12	
p63	Baixo (0/1/2) 108 casos	76	6	12	14	0,94
	Alto (3) 106 casos	70	11	16	9	
Vimentina	Baixo (2) 29 casos	20	0	3	6	0,52
	Alto (3) 191 casos	129	17	27	18	
CK5/6	Baixo (0/1) 92 casos	69	5	7	11	0,27
	Alto (2/3) 118 casos	75	11	19	13	
AML	Baixo (0/1/2) 18 casos	12	0	2	4	0,49
	Alto (3) 200 casos	137	17	26	20	

*chi-quadrado, comparando os perfis com receptor de estrogênio positivo (luminais, com e sem HER2-positivo) com os negativos (HER2 e triplo-negativos)

Selecionamos as variáveis grau, perfil molecular, CK5/6 no epitélio, e os marcadores mioepiteliais SMMHC e CD10 para criar o modelo de regressão logística pelo método *stepwise* que prevê invasão estromal nos CDIS. Os resultados estão sumarizados na tabela 16. Este modelo antecipa corretamente o desfecho de 75,73% do total dos casos. A previsão de invasão estromal é de 94,4%, enquanto que o de sua ausência soma 46,9% dos casos.

Tabela 16 – Variáveis relacionadas à presença de invasão estromal em carcinomas ductais *in situ* após regressão logística pelo método *stepwise*

Variável	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Perfil molecular triplo-negativo	5,41 (1,36-21,47)	0,02
Expressão de CK5/6 no epitélio neoplásico	0,37 (0,15-0,92)	0,03
Alta expressão de SMMHC em células mioepiteliais	0,08 (0,02-0,28)	0,0001
Baixa expressão de CD10 em células mioepiteliais	6,27 (2,87-13,69)	<0,0001

Discussão

Discussão

A transição do carcinoma *in situ* para o carcinoma invasivo é o passo fundamental no processo da carcinogênese mamária, implicando risco de morte da paciente. Ao mesmo tempo, buscam-se melhores parâmetros de tratamento para lesões precursoras a fim de evitar procedimentos desnecessários, como biópsia do linfonodo sentinela ou a realização de radioterapia em lesões com baixo risco de invasão estromal.

Em nosso estudo buscamos avaliar melhor a agressividade dos CDIS, associando características que são, potencialmente, as maiores definidoras de seu comportamento: o perfil molecular da neoplasia ^(50, 51, 69, 101) e sua interação com o microambiente circunjacente ^(84, 87, 88), esta refletida na provável disfunção nas células mioepiteliais e sua expressão imunoistoquímica reduzida.

De antemão podemos citar como limitações do estudo a análise retrospectiva dos casos, a avaliação de parte das lesões por TMA, substituindo a análise da lesão inteira, com possível perda de áreas heterogêneas com maior ou menor agressividade ^(116, 117). Sabemos também que os parâmetros anatomopatológicos são passíveis de subjetividade em sua avaliação, tanto na graduação histológica quanto na interpretação imunoistoquímica, especialmente em critérios não estabelecidos como os níveis de expressão dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais nos CDIS. O grande número de parâmetros para avaliação, como grau nuclear, perfil molecular e marcadores mioepiteliais com diferentes níveis de expressão diminuem o poder estatístico dos achados pela redução do número de casos em cada subgrupo avaliado.

Porém, como vantagens do estudo podemos citar a média de idade muito semelhante entre os grupos, parâmetros histológicos ^(26, 27) e imunoistoquímicos ^(43, 44, 88)

de avaliação com critérios previamente estabelecidos e definidos, incorporados à rotina, além de avaliação dos casos pelo mesmo observador. Também citamos a utilização de métodos anatomopatológicos reprodutíveis, que já estão inseridos na rotina, como avaliação histológica e imunoistoquímica. Esta última utilizada, também, para classificar os perfis moleculares por meio de método de menor custo e mais reprodutível em larga escala que métodos moleculares ^(33, 118-121). A casuística tem grande número de CDIS puros e associados a carcinoma invasivo. E, finalmente, a avaliação de casos foi realizada exatamente como na prática clínica, com o diagnóstico inicial determinando a conduta subsequente.

O estudo em amostras de TMA, apesar do risco de viés devido à heterogeneidade tumoral, é custo-efetivo e permite a avaliação de grande número de amostras, aumentando o poder estatístico dos resultados e compensando riscos. Nos CDIS outros autores, como Tamimi *et al.*, também o utilizaram e alguns de seus resultados, sobretudo os comparativos entre estas lesões e os carcinomas invasores, foram semelhantes aos nossos ⁽⁵¹⁾. Pensando em risco de falhas de representatividade Quintayo *et al.* desenvolveram, inclusive, um módulo de criação virtual de amostras de TMA para determinação do número ideal de cores e validação de escores de RE, RP e HER2 em CDIS ⁽¹²²⁾.

Observamos semelhança entre o componente *in situ* e o componente invasor de uma mesma lesão, tanto sob o ponto de vista histológico (grau nuclear), quanto imunoistoquímico (expressão de RE/RP, HER2) e do perfil molecular, consoante com dados de literatura ^(53, 100, 123).

Na comparação entre os CDIS puros (grupo 1) e os associados a carcinoma invasor (grupo 2), notamos maior expressão de receptores hormonais, conforme esperado, pois são lesões de menor grau e menor agressividade ^(54, 124). Utilizando a mesma linha de

raciocínio, seria esperada maior expressão de HER2 no grupo 2, isto é, nas lesões mais agressivas, com invasão estromal. No entanto, isto não foi observado, pois o número de CDIS com superexpressão de HER2 foi maior no grupo 1 que no grupo 2, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa em nossa casuística. Tamimi *et al.* também encontraram maior prevalência da expressão de HER2 nos CDIS, discutiram seu achado, constatando que era consistente com o observado em outros estudos; a seguir, sugeriram hipóteses: alguns CDIS perderiam a expressão de HER2 ao progredirem para doença invasiva; carcinomas invasivos se originariam mais frequentemente de CDIS HER2-negativos que de CDIS HER2-positivos; ou, ainda, poderia haver um viés por maior detecção mamográfica de CDIS HER2-positivos, já que são associados a comedonecrose e, conseqüentemente, a calcificações mais suspeitas, portanto mais biopsiados. Voltando a nossos achados, a superexpressão de HER2 foi dividida entre os casos associados à expressão de receptores hormonais (luminal B/HER2) e os enriquecidos (HER2). Observamos que não havia diferença entre os grupos 1 e 2 no subtipo HER2, mas no subtipo luminal B/HER2, com menor ocorrência de invasão estromal neste. Nossos resultados estão concordes com a literatura ⁽⁵¹⁾ e mesmo na prática clínica, aonde nos deparamos com casos de CDIS extensos do subtipo luminal B/HER2 em que não se identifica invasão estromal.

Um achado interessante foi a menor propensão da presença de invasão estromal nos CDIS com expressão de citoqueratina 5/6. Esse fato ocorreu em todos os subtipos avaliados, à exceção dos CDIS triplo-negativos. Neste subtipo, a expressão de CK5/6 não esteve associada a menor probabilidade de invasão. Trask *et al.* ⁽¹²⁵⁾ mostravam, já em 1990, que a expressão reduzida de CK5/6 estaria relacionada à progressão tumoral. Porém, os relatos subsequentes referem-se apenas a seu papel na definição morfológica de lesões pré-malignas da mama, como no diagnóstico diferencial com proliferações

benignas ^(126, 127), ou como na identificação do subtipo basal-símile nos carcinomas mamários a partir de imunoistoquímica, tanto dos carcinomas invasivos quanto dos CDIS, mostrando relação com pior prognóstico ^(53, 100, 128). Novos estudos prospectivos, com maior tempo de seguimento e análise sistemática dos parâmetros anatomopatológicos são necessários para validar esses achados.

Notamos forte associação da redução na expressão imunoistoquímica dos marcadores mioepiteliais SMMHC e CD10 com a probabilidade de invasão estromal. Como modelo de exemplo prático, em um caso de CDIS de qualquer perfil molecular diagnosticado inicialmente e que tenha alta expressão (níveis 2 ou 3 de expressão) do marcador SMMHC há apenas 11,3% de chance de existir invasão estromal após análise do material retirado subsequentemente. Se, no mesmo caso de CDIS, o marcador CD10 apresentar baixa expressão (níveis 0 ou 1 de expressão), a probabilidade da presença um carcinoma invasor no espécime cirúrgico subsequente será 95,6%.

É possível melhorar mais o nível de predição de comportamento da lesão. Por exemplo, em um caso de CDIS de alto grau histológico e que mostre expressão alta (níveis 2 ou 3 de expressão) do marcador SMMHC, há 7,7% de probabilidade de associação com carcinoma invasor no espécime cirúrgico subsequente. Mais interessante ainda é o fato que a invasão só esteve associada, nesse subgrupo de alto grau, ao subtipo molecular triplo-negativo, com ausência de invasão estromal nos demais subtipos (luminal, luminal/HER2-positivo e HER2). Isto é, em 100% dos casos de CDIS de alto grau com perfil molecular luminal, luminal/HER2-positivo ou HER2 por nós avaliados, não houve invasão estromal se o tumor apresentasse alta expressão de SMMHC, mesmo após ressecção cirúrgica da lesão. O total de nove casos nesta situação é baixo, mas certamente a identificação de qualquer subgrupo passível de melhor previsão sobre a invasão estromal é válida, mesmo com baixa prevalência.

Outros exemplos de CDIS que mostraram 100% de predição de seu comportamento em relação à invasão estromal foram aqueles com baixa expressão (níveis 0 ou 1) de CD10. Todos os CDIS de alto grau não triplo-negativos, assim como todos os CDIS com grau nuclear 2 ou 3, apresentaram invasão estromal associada na análise do material cirúrgico subsequente, totalizando 21 casos.

Portanto, apesar de não prever a absoluta certeza de presença, ou não, de invasão estromal associada aos CDIS em todos os subtipos, certamente a avaliação dos marcadores mioepiteliais associada à avaliação quantitativa dos marcadores mioepiteliais pode ajudar a estimar o risco de invasão estromal e aprimorar o planejamento terapêutico para a paciente. Para os CDIS de baixo grau, mostramos a menor associação de invasão estromal quando da expressão de CK5/6 por suas células epiteliais. Já nos CDIS de alto grau, os marcadores SMMHC e CD10 podem majorar a predição do risco de invasão estromal, talvez em 100% de acurácia nos perfis moleculares não triplo-negativos. Estudos prospectivos subsequentes confirmarão ou demonstrarão os reais níveis de acurácia desses achados.

Conclusões

Conclusões

O risco de invasão estromal em carcinomas ductal *in situ* (CDIS) está associado, principalmente, ao perfil molecular triplo-negativo e à perda da expressão do marcador CD10 pelas células mioepiteliais, e é inversamente proporcional à expressão de citoqueratinas basais CK5/6 pelas células epiteliais neoplásicas e à forte expressão do marcador SMMHC em células mioepiteliais.

Baseando-se na expressão imunoistoquímica de receptores hormonais e da oncoproteína HER2, perfis moleculares são encontrados nos CDIS à semelhança dos carcinomas invasivos, nas seguintes frequências: luminal/HER2-negativo (69,1%), luminal/HER2-positivo (7,2%), HER2 (13,1%) e triplo-negativo (10,6%).

O perfil molecular luminal se associa a lesões de baixo grau, enquanto as lesões de alto grau tendem a apresentar os perfis moleculares HER2 e triplo-negativo.

O perfil triplo-negativo esteve mais associado com invasão estromal. No grupo de carcinomas ductal *in situ* de baixo grau, o perfil molecular não mostrou associação significativa com invasão estromal. No grupo de alto grau, os perfis com expressão de HER2 (luminal/HER2 e HER2) foram mais frequentes nas neoplasias não invasoras.

Os perfis moleculares dos componentes *in situ* e invasivo de mesma lesão foram semelhantes.

A expressão da citoqueratina basal 5/6 nos CDIS esteve associada a menor probabilidade de invasão estromal, especialmente nos CDIS de baixo grau. Entretanto, a frequência de expressão deste marcador foi maior nos perfis moleculares RE-negativos (HER2 e triplo-negativo).

A expressão imunoistoquímica dos marcadores mioepiteliais nas células mioepiteliais mostrou-se reduzida e associada à invasão estromal especialmente com os marcadores SMMHC e CD10. Esta associação aconteceu tanto nos CDIS de baixo quanto de alto grau.

Não houve associação significativa entre a expressão de marcadores mioepiteliais e o perfil molecular, com base na imunoistoquímica.

Anexos

Anexos

Anexo A: Aprovação pela Comissão de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/05/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0276/10**, intitulada: **FATORES MORFOLÓGICOS, MOLECULARES E DO MICROAMBIENTE RELACIONADOS AO RISCO DE INVASÃO ESTROMAL EM CARCINOMAS DUCTAIS "IN SITU" DA MAMÁ** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, as relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Filomena Marino Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Fernando Nalesso Aguiar**

CAPPesq, 26 de Maio de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua
Dúvidas Pires de Campos, 225, 6º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3089 6442 Fax: 011
3089 6462 e-mail: cappesq@hnet.usp.br / secretaria@cappesq2@hnet.usp.br

Referências

Referências

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativas de Câncer para 2014 http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014: Brasil; 2013.
3. Lakhani SR, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of the breast. Fourth ed. Lyon: IARC International Agency for Research on Cancer, 2012. 240 p.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55(2):74-108.
5. Pruitt SL, Shim MJ, Mullen PD, Vernon SW, Amick BC, 3rd. Association of area socioeconomic status and breast, cervical, and colorectal cancer screening: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(10):2579-99.
6. Collins LC, Achacoso N, Nekhlyudov L, Fletcher SW, Haque R, Quesenberry CP, Jr., et al. Relationship between clinical and pathologic features of ductal carcinoma in situ and patient age: an analysis of 657 patients. Am J Surg Pathol. 2009; 33(12): 1802-8.
7. Thomson CA, Thompson PA. Dietary patterns, risk and prognosis of breast cancer. Future Oncol. 2009;5(8):1257-69.
8. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. Lancet. 2009;373(9673):1463-79.

9. van der Groep P, van Diest PJ, Menko FH, Bart J, de Vries EG, van der Wall E. Molecular profile of ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *J Clin Pathol*. 2009;62(10):926-30.
10. Collins LC, Tamimi RM, Baer HJ, Connolly JL, Colditz GA, Schnitt SJ. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer*. 2005;103(9):1778-84.
11. Fadare O, Clement NF, Ghofrani M. High and intermediate grade ductal carcinoma in-situ of the breast: a comparison of pathologic features in core biopsies and excisions and an evaluation of core biopsy features that may predict a close or positive margin in the excision. *Diagn Pathol*. 2009;4:26.
12. Altintas S, Lambein K, Huizing MT, Braems G, Asjoe FT, Hellemans H, et al. Prognostic significance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a clinicopathologic study. *Breast J*. 2009;15(2):120-32.
13. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3153-8.
14. Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, Hanna W. Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review. *Adv Anat Pathol*. 2005;12(5):256-64.
15. Cheang MC, van de Rijn M, Nielsen TO. Gene expression profiling of breast cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:67-97.
16. Morrow M, Strom EA, Bassett LW, Dershaw DD, Fowble B, Harris J, et al. Standard for the management of ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS). *CA Cancer J Clin*. 2002;52(5):256-76.
17. Harris JR, Morrow M. Clinical dilemma of ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol*. 2009;27(32):5303-5.

18. Leonard GD, Swain SM. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(12):906-20.
19. Tang P, Hajdu SI, Lyman GH. Ductal carcinoma in situ: a review of recent advances. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19(1):63-7.
20. Virnig BA, Tuttle TM, Shamliyan T, Kane RL. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(3):170-8.
21. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Reis-Filho JS, Lee AH, Ellis IO. 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. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(4):513-23.
22. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother? *J Pathol.* 2008;216(4):394-8.
23. Simpson JF. Update on atypical epithelial hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *Pathology.* 2009;41(1):36-9.
24. Tan DS, Reis-Filho JS. Comparative genomic hybridisation arrays: high-throughput tools to determine targeted therapy in breast cancer. *Pathobiology.* 2008;75(2):63-74.
25. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65.
26. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.

27. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, Colburn WJ, Barth A, Gierson ED, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet*. 1995;345(8958):1154-7.
28. 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(6797):747-52.
29. 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 U S A*. 2001;98(19):10869-74.
30. Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology*. 2008;75(2):104-11.
31. Rakha E, Reis-Filho JS. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(6):860-8.
32. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology*. 2008;75(2):95-103.
33. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220(2):263-80.
34. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(4):262-72.
35. Ross JS. Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(4):204-15.
36. Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(5):303-13.

37. 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.
38. Bhargava R, Beriwal S, Striebel JM, Dabbs DJ. Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expression of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(2):113-8.
39. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
40. Webster LR, Lee SF, Ringland C, Morey AL, Hanby AM, Morgan G, et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6625-33.
41. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol*. 2008;21(10):1255-61.
42. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1515-38.
43. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43.
44. 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 (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72.

45. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
46. Arpino G, Laucirica R, Elledge RM. Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2005;143(6):446-57.
47. Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathol Res Pract*. 2005;201(11):713-25.
48. Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Larsen J, Baldetorp B, Linden T, et al. Carcinoma in situ of the breast: correlation of histopathology to immunohistochemical markers and DNA ploidy. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;60(3):219-26.
49. Sherman ME, Mies C, Gierach GL. Opportunities for molecular epidemiological research on ductal carcinoma in-situ and breast carcinogenesis: Interdisciplinary approaches. *Breast Dis*. 2013 Nov.
50. Hannemann J, Velds A, Halfwerk JB, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):R61.
51. 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.
52. Balleine RL, Webster LR, Davis S, Salisbury EL, Palazzo JP, Schwartz GF, et al. Molecular grading of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8244-52.
53. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, van de Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer*. 2008;98(1):137-42.

54. VandenBussche CJ, Elwood H, Cimino-Mathews A, Bittar Z, Illei PB, Warzecha HN. Clinicopathologic features of ductal carcinoma in situ in young women with an emphasis on molecular subtype. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2487-93.
55. Sharaf Aldeen B, Feng J, Wu Y, Nassar Warzecha H. Molecular subtypes of ductal carcinoma in situ in African American and Caucasian American women: distribution and correlation with pathological features and outcome. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(4):474-8.
56. Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):370-8.
57. Sgroi DC. Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:193-221.
58. Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Marchio C, Tan DS, Vatcheva R, et al. Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: Evidence for progression in tumors with a luminal phenotype? *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(4):351-65.
59. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*. 1999;187(3):272-8.
60. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):791-9.
61. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C, Diallo R, et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*. 1999;189(4):521-6.
62. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, Ellis IA, van Diest PJ, Sinn HP, et al. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol*. 2001;195(4):415-21.

63. Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.* 2000;60(14):3884-92.
64. Farabegoli F, Champeme MH, Bieche I, Santini D, Ceccarelli C, Derenzini M, et al. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *J Pathol.* 2002;196(3):280-6.
65. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol.* 2005;205(2):248-54.
66. Yao J, Weremowicz S, Feng B, Gentleman RC, Marks JR, Gelman R, et al. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res.* 2006;66(8):4065-78.
67. Schnitt SJ. The transition from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: the other side of the coin. *Breast Cancer Res.* 2009;11(1):101.
68. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res.* 2003;1(5):362-75.
69. Okumura Y, Yamamoto Y, Zhang Z, Toyama T, Kawasoe T, Ibusuki M, et al. Identification of biomarkers in ductal carcinoma in situ of the breast with microinvasion. *BMC Cancer.* 2008;8:287.
70. Kuerer HM, Albarracin CT, Yang WT, Cardiff RD, Brewster AM, Symmans WF, et al. Ductal carcinoma in situ: state of the science and roadmap to advance the field. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):279-88.
71. Castro NP, Osorio CA, Torres C, Bastos EP, Mourao-Neto M, Soares FA, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R87.

72. Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5974-9.
73. Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R7.
74. Carpenter PM, Chen WP, Mendez A, McLaren CE, Su MY. Angiogenesis in the progression of breast ductal proliferations. *Int J Surg Pathol*. 2011;19(3):335-41.
75. Chivukula M, Domfeh A, Carter G, Tseng G, Dabbs DJ. Characterization of high-grade ductal carcinoma in situ with and without regressive changes: diagnostic and biologic implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17(6):495-9.
76. Holliday DL, Brouillette KT, Markert A, Gordon LA, Jones JL. Novel multicellular organotypic models of normal and malignant breast: tools for dissecting the role of the microenvironment in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R3.
77. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008;75(2):75-84.
78. Lee AH. Use of immunohistochemistry in the diagnosis of problematic breast lesions. *J Clin Pathol*. 2013;66(6):471-7.
79. Barsky SH, Karlin NJ. Mechanisms of disease: breast tumor pathogenesis and the role of the myoepithelial cell. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(3):138-51.
80. Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res*. 2001;3(1):1-4.

81. Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3):231-47.
82. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):190-7.
83. Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res*. 2002;4(6):224-30.
84. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004;6(1):17-32.
85. Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*. 2005;37(8):899-905.
86. Weigelt B, Bissell MJ. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(5):311-21.
87. Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell*. 2008;13(5):394-406.
88. Hilson JB, Schnitt SJ, Collins LC. Phenotypic alterations in ductal carcinoma in situ-associated myoepithelial cells: biologic and diagnostic implications. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(2):227-32.
89. Allen MD, Thomas GJ, Clark S, Dawoud MM, Vallath S, Payne SJ, et al. Altered microenvironment promotes progression of preinvasive breast cancer: myoepithelial expression of $\alpha\beta 6$ integrin in DCIS identifies high-risk patients and predicts recurrence. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):344-57.

90. Erhardt K, Auer GU. Mammary carcinoma. Comparison of nuclear DNA content from in situ and infiltrative components. *Anal Quant Cytol Histol*. 1987;9(3):263-7.
91. Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Hansen B, Andersen AJ. Flow cytometric DNA analysis of breast cancers with predominance of carcinoma in situ: a comparison of the premalignant and malignant components. *Clin Cancer Res*. 1995;1(8):881-8.
92. Goldstein NS, Murphy T. Intraductal carcinoma associated with invasive carcinoma of the breast. A comparison of the two lesions with implications for intraductal carcinoma classification systems. *Am J Clin Pathol*. 1996;106(3):312-8.
93. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer*. 1997;80(9):1740-5.
94. Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Welzl G, et al. Extensive ductal carcinoma In situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer*. 2000;85(1):82-6.
95. Buerger H, Simon R, Schafer KL, Diallo R, Littmann R, Poremba C, et al. Genetic relation of lobular carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ, and associated invasive carcinoma of the breast. *Mol Pathol*. 2000;53(3):118-21.
96. 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.
97. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, et al. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res*. 2001;61(15):5697-702.

98. Zikan M, Bohm J, Pavlista D, Cibula D. Comparative analysis of loss of heterozygosity and expression profile in normal tissue, DCIS and invasive breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(9):652-5.
99. Hernandez L, Wilkerson PM, Lambros MB, Campion-Flora A, Rodrigues DN, Gauthier A, et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J Pathol*. 2012;227(1):42-52.
100. 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. *Human Pathol*. 2007;38(2):197-204.
101. 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.
102. Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res*. 1997;3(11):1949-58.
103. Lakhani SR, Chaggar R, Davies S, Jones C, Collins N, Odel C, et al. Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. *J Pathol*. 1999;189(4):496-503.
104. Sharma M, Beck AH, Webster JA, Espinosa I, Montgomery K, Varma S, et al. Analysis of stromal signatures in the tumor microenvironment of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(2):397-404.
105. Zhang RR, Man YG, Vang R, Saenger JS, Barner R, Wheeler DT, et al. A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers. *Breast Cancer Res*. 2003;5(5):R151-6.

106. Man YG, Tai L, Barner R, Vang R, Saenger JS, Shekitka KM, et al. Cell clusters overlying focally disrupted mammary myoepithelial cell layers and adjacent cells within the same duct display different immunohistochemical and genetic features: implications for tumor progression and invasion. *Breast Cancer Res.* 2003;5(6):R231-41.
107. Moriya T, Silverberg SG. Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ) of the breast. A comparison of pure noninvasive tumors with those including different proportions of infiltrating carcinoma. *Cancer.* 1994;74(11):2972-8.
108. Badve S, A'Hern RP, Ward AM, Millis RR, Pinder SE, Ellis IO, et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. *Hum Pathol.* 1998;29(9):915-23.
109. Sue GR, Lannin DR, Killelea B, Chagpar AB. Predictors of microinvasion and its prognostic role in ductal carcinoma in situ. *Am J Surg.* 2013;206(4):478-81.
110. Muggerud AA, Hallett M, Johnsen H, Kleivi K, Zhou W, Tahmasebpour S, et al. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. *Mol Oncol.* 2010;4(4):357-68.
111. Zhou W, Jirstrom K, Amini RM, Fjallskog ML, Sollie T, Lindman H, et al. Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. *BMC Cancer.* 2013;13:512.
112. Lazzeroni M, Guerrieri-Gonzaga A, Botteri E, Leonardi MC, Rotmensz N, Serrano D, et al. Tailoring treatment for ductal intraepithelial neoplasia of the breast according to Ki-67 and molecular phenotype. *Br J Cancer.* 2013;108(8):1593-601.
113. Park HS, Kim HY, Park S, Kim EK, Kim SI, Park BW. A nomogram for predicting underestimation of invasiveness in ductal carcinoma in situ diagnosed by preoperative needle biopsy. *Breast.* 2013;22(5):869-73.

114. Han JS, Molberg KH, Sarode V. Predictors of invasion and axillary lymph node metastasis in patients with a core biopsy diagnosis of ductal carcinoma in situ: an analysis of 255 cases. *Breast J.* 2011;17(3):223-9.
115. Tavassoli FA, Devilee P, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Third ed. Lyon: IAPS Press, 2003. 432 p.
116. Warnberg F, Amini RM, Goldman M, Jirstrom K. Quality aspects of the tissue microarray technique in a population-based cohort with ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology.* 2008;53(6):642-9.
117. Lin Y, Hatem J, Wang J, Quinn A, Hicks D, Tang P. Tissue microarray-based immunohistochemical study can significantly underestimate the expression of HER2 and progesterone receptor in ductal carcinoma in situ of the breast. *Biotech Histochem.* 2011;86(5):345-50.
118. Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(8):662-73.
119. Sorlie T. Introducing molecular subtyping of breast cancer into the clinic? *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1153-4.
120. Tavassoli FA. Challenges in breast pathology: new twists on old problems. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(6):852-4.
121. Simon R. Lost in translation: problems and pitfalls in translating laboratory observations to clinical utility. *Eur J Cancer.* 2008;44(18):2707-13.
122. Quintayo MA, Starczynski J, Yan FJ, Wedad H, Nofech-Mozes S, Rakovitch E, et al. Virtual tissue micro-arrays: A novel and viable approach to optimising tissue micro-arrays for biomarker research applied to Ductal Carcinoma in Situ (DCIS). *Histopathology.* 2013 Nov 25.

123. Aguiar FN, Mendes HN, Bacchi CE, Carvalho FM. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2013;35(3):97-102.
124. Kim JY, Han W, Moon HG, Park IA, Ahn SK, Kim J, et al. Grade of ductal carcinoma in situ accompanying infiltrating ductal carcinoma as an independent prognostic factor. *Clin Breast Cancer.* 2013;13(5):385-91.
125. Trask DK, Band V, Zajchowski DA, Yaswen P, Suh T, Sager R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2319-23.
126. Bocker W. Preneoplasia of the breast. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1997;81:502-13.
127. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, Decker T, Krech R, Boecker W. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology.* 2000;37(3):232-40.
128. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1991-6.

Apêndices

Apêndices

Trabalho publicado: Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ. Aguiar FN, Mendes HN, Cirqueira CS, Bacchi CE, Carvalho FM. Clinics (Sao Paulo). 2013 May;68(5):638-43. doi: 10.6061/clinics/2013(05)010. PMID: 23778411.

CLINICS

CLINICAL SCIENCE

Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma in situ

Fernando N. Aguiar,^{I,II} Henrique N. Mendes,^I Cinthya S. Cirqueira,^{III} Carlos E. Bacchi,^{IV} Filomena M. Carvalho^I

^IFaculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Department of Pathology, São Paulo/SP, Brazil. ^{II}Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Pathology Laboratory, São Paulo/SP, Brazil. ^{III}Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratory of Medical Investigation (LIM) - 14, São Paulo/SP, Brazil. ^{IV}Consultoria em Patologia, Botucatu/SP, Brazil.

OBJECTIVES: Biological markers that predict the development of invasive breast cancer are needed to improve personalized therapy for patients diagnosed with ductal carcinoma *in situ*. We investigated the role of basal cytokeratin 5/6 in the risk of invasion in breast ductal carcinoma *in situ*.

METHODS: We constructed tissue microarrays using 236 ductal carcinoma *in situ* samples: 90 pure samples (group 1) and 146 samples associated with invasive carcinoma (group 2). Both groups had similar nuclear grades and were obtained from patients of similar ages. The groups were compared in terms of estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) status, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression, cytokeratin 5/6 immunostaining, human epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) membrane staining and molecular subtype, as indicated by their immunohistochemistry profiles.

RESULTS: ER/PR-negative status was predictive of invasion, whereas HER2 superexpression and cytokeratin 5/6-positive status were negatively associated with invasion. Among the high-grade ductal carcinoma *in situ* cases, a triple-positive profile (positive for estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2) and cytokeratin 5/6 expression by neoplastic cells were negatively associated with invasion. In the low-grade ductal carcinoma *in situ* subgroup, only cytokeratin 5/6 expression exhibited a negative association with the probability of invasion.

CONCLUSION: The immunohistochemical expression of cytokeratin 5/6 by ductal carcinoma *in situ* epithelial cells may provide clinically useful information regarding the risk of progression to invasive disease.

KEYWORDS: Breast Cancer; Ductal Carcinoma *In Situ*; Immunohistochemistry; Prognosis; Basal Cytokeratin.

Aguiar FN, Mendes HN, Cirqueira CS, Bacchi CE, Carvalho FM. Basal cytokeratin as a potential marker of low risk of invasion in ductal carcinoma *in situ*. Clinics. 2013;68(5):638-43.

Received for publication on December 9, 2012; First review completed on December 29, 2012; Accepted for publication on January 17, 2013

E-mail: filomena@uip.br

Tel.: 55 11 3061-7234

■ INTRODUCTION

Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) consists of a group of precursor lesions of invasive breast cancer (1). The prevalence of DCIS has been increasing over the last several decades, which is likely due to improvements in screening programs; DCIS now accounts for approximately 20-25% of all breast cancer diagnoses (2). Experience with this increasing number of DCIS diagnoses has revealed the heterogeneity of this group, particularly in terms of the risk of associated invasive disease and risk of recurrence, with most recurrences appearing as invasive cancer (3-5).

Although wide surgical margins substantially reduce the risk of recurrence, the safe omission of radiotherapy in certain patient subgroups has not yet been incorporated into practical clinical use (6,7). The appropriate criteria for sentinel lymph node biopsy in DCIS, which are based on the risk of discovering invasive disease according to the final pathology report, are another source of controversy. Although a consensus is lacking, young age, the presence of palpable tumors, lesion size and histological grade are used as guidelines for sentinel lymph node biopsy (8). There is a recognized need for individualized treatment of all patients with breast cancer, including those with preinvasive lesions, who would particularly benefit from the discovery of markers of invasive risk.

The expression of basal cytokeratins (CKs) determined using immunohistochemistry, together with human epidermal growth factor receptor 1 (EGFR or HER1) expression, defines the basal-like subgroup of triple-negative (TN) invasive ductal carcinomas (9), which are correlated with a poor prognosis (10,11). The same invasive carcinoma

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: 10.6061/clinics/2013(05)010

molecular profiles have been identified in DCIS cases, albeit with a lower incidence of the basal-like phenotype (12). Although the expression of certain basal CKs, such as CK 5/6 and EGFR, has been used to define the molecular basal-like subtype of DCIS, CK 5/6 has not been explored as an independent indicator of biological behavior, particularly the risk of invasion. In this study, we compared the immunorepression of basal CK 5/6 and other classic prognostic histological variables in DCIS samples with and without invasive components.

MATERIALS AND METHODS

Patient selection and clinicopathological parameters

This retrospective study was approved by the Scientific Committee of the Department of Pathology of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and by the Ethics Committee for Research Projects of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESq, process 2011/14741-7). Because the study was retrospective, informed patient consent was waived, and all patient identifiers were removed. Breast samples with confirmed diagnoses of DCIS of the breast, with and without an invasive carcinoma (IC) component, were obtained from the files of the Division of Surgical Pathology of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo between 2000 and 2009. All of the tissues had been fixed in 10% buffered formaldehyde and were embedded in paraffin. The slides were rigorously reviewed and classified by a single pathologist (FNA) with expertise in breast pathology. For cases with interpretations that differed from the original reports, a consensus was reached (by FNA and FMC) by a simultaneous examination under a dual-head microscope. Nuclear grades 1 and 2 were grouped into the low-grade category, and nuclear grade 3 was defined as the high-grade category. We selected representative areas of DCIS and invasive components for tissue microarray (TMA) construction and immunohistochemical analysis. Samples with nonductal histology, insufficient material for immunohistochemical evaluation or signs of tissue autolysis, as well as those from pregnant patients, were excluded from the study. We obtained 236 samples; 90 (38.1%) represented cases of DCIS not associated with invasive carcinoma, and 146 (61.9%) represented cases of DCIS associated with invasive carcinoma.

Tissue microarray construction

The TMA was constructed at the Laboratory of Medical Investigation (LIM-14) of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Representative areas were identified on hematoxylin- and eosin-stained slides and were marked on paraffin blocks. Cylindrical tissues 2.0 mm in diameter were punched from regions of DCIS and IC (at least one sample from each case) in the donor paraffin block and were mounted onto the recipient block with 1.0-mm intervals between the cores using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) positioned on a fixed sideboard. The cores were organized in rows and columns, with renal tissue placed in position 1A for orientation. After the final configuration of the recipient blocks, the cores were heated to 60°C for 10 minutes and were sealed for sectioning with the Paraffin Tape-Transfer System (Instrumedics, St. Louis, MO, USA). We used

silanized slides (StarPro®) and a microtome for sectioning at 3-µm intervals (Leica Instruments, Wetzlar, Germany). The first histological sections were stained with hematoxylin-eosin to identify the eventual losses of tissue.

Immunohistochemistry

The immunohistochemical detection of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2 protein, basal CK 5/6 and EGFR was performed on the slides from the TMA blocks. We applied the following antibodies and dilutions: SP1 1:500 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), PgR636 1:1000 (Dako, Carpinteria, CA, USA), SP3 1:100 (Thermo Scientific), D5/16B4 1:100 (Dako) and 31G7 1:200 (Zymed, San Francisco, CA, USA). The appropriate epitope retrieval method for each specific antibody was used (a pressure cooker for ER, PR and HER2; a microwave oven for CK 5/6; and 0.1% pronase for EGFR). Bound antibodies were detected using Novolink® (Leica, Bannockburn, IL, USA). Nuclear positivity was assessed for ER and PR, membranous positivity for HER2 and EGFR and membranous-cytoplasmic positivity for CK 5/6. Tumors with staining in at least 1% of the cells were considered positive for ER, PR or CK 5/6 expression. We employed external positive and negative controls, as well as internal positive controls. We considered samples positive for HER2 and EGFR only if they scored 3+ according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the College of American Pathologists (CAP) (13).

The DCIS samples were classified into molecular subtypes according to the following surrogate criteria: luminal A samples exhibited HER2-negative lesions with at least 50% ER- and/or PR-positive neoplastic cells; luminal B samples exhibited HER2-negative lesions with less than 50% ER- and/or PR-positive cells; triple-positive samples were HER2-positive and ER- and/or PR-positive; HER2-enriched samples were HER2-positive and ER- and/or PR-negative; and TN samples were ER-, PR- and HER2-negative. The luminal A and B subtypes were later combined into a single category, "luminal", because only three cases expressed less than 50% of the evaluated hormonal receptors.

Statistical analysis

A t-test was used to compare the ages of the patients in group 1 (DCIS without invasion) and group 2 (DCIS with invasion) after the normal distribution of the data was confirmed using the Kolmogorov-Smirnov test. A chi-square test was used to evaluate the relationship between the presence of invasion and the categorical variables (i.e., nuclear grade, ER/PR status, HER2 expression, molecular profile, CK 5/6 expression and EGFR expression). Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were calculated for these variables. For the multivariate analysis, the variables that were significant in the univariate evaluation were analyzed with logistic regression using the stepwise method. The statistical analyses were performed using MedCalc software for Windows (version 11.5.0.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), and p-values smaller than 0.05 were considered significant.

RESULTS

The distributions of age and the morphological and immunohistochemical characteristics of group 1 (DCIS without invasion) and group 2 (DCIS with IBC) are

summarized in Table 1. There were no significant differences regarding age, nuclear grade or EGFR expression between the two groups. A larger number of TN cases were identified in group 2 (14.4%) compared with group 1 (4.4%) ($p=0.01$). In contrast, group 1 exhibited more ER/PR-positive lesions (84.4% vs. 71.2%, $p=0.03$) and more cases with CK 5/6 expression (30.6% vs. 11.3%; $p=0.0007$). According to the multivariate analysis, ER/PR-negative status ($p=0.001$) was a predictor of associated invasive carcinoma, whereas HER2-positive status ($p=0.33$) and CK 5/6-positive status were negatively associated with the presence of invasion ($p=0.0001$) (Table 2).

The pathological characteristics of high-grade DCIS are described in Table 3. The presence of invasion was associated with negative ER, PR and HER2 expression. The TN phenotype was more common in group 2 (35.3% vs. 14.8%), but the most striking difference in molecular profiles was the lower frequency of triple-positive cases observed in group 2 (3.9% vs. 33.3%) ($p=0.003$). Although CK 5/6 expression (Figure 1) was lower in group 2 than in group 1 (17% vs. 34.6%) ($p=0.09$), this difference did not reach statistical significance.

The characteristics of low-grade DCIS are presented in Table 4. In this subgroup, CK 5/6 expression was the only characteristic that differed between the cases with and without invasion (8.1% and 28.8%, respectively, $p=0.002$) (Figure 1).

DISCUSSION

Basal CKs are intermediate filaments present in the myoepithelial and basal epithelial cells of the mammary gland (14) and are recognized by the monoclonal antibody CK 5/6. Basal CKs have been described in many types of cancer, including breast tumors (15); along with other CKs, they have been studied in the breast since the 1980s, either to characterize normal histology or to evaluate the prognosis of cancer (16-19). However, interest in basal CKs increased after a study by Perou et al. (20) identified a "basal-like" subgroup of breast carcinomas characterized by a more aggressive phenotype and by the expression of genes that are normally active in the basal/myoepithelial cells of the

Table 2 - Results of a multivariate analysis of the pathological characteristics associated with invasion in ductal carcinoma *in situ* (DCIS).

DCIS	Variable	OR	95% CI	Coefficient	SE	p-value
Total	ER/PR-negative	4.67	1.87-11.70	1.54	0.47	0.0010
	HER2-positive	0.39	0.17-0.93	-0.93	0.44	0.0333
	CK 5/6-positive	0.22	0.10-0.48	-1.5	0.39	0.0001
Low-grade	CK 5/6-positive	0.22	0.09-0.57	-1.5	0.49	0.0019
High-grade	Triple-positive	0.09	0.02-0.51	-2.37	0.87	0.006
	CK 5/6-positive	0.28	0.09-0.93	-1.24	0.59	0.04

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor 2; CK 5/6: cytokeratin 5/6; OR: odds ratio; SE: standard error.

breast (14). Since then, numerous studies have described surrogate immunohistochemical markers for characterizing molecular subgroups, including a marker recognized by the antibody CK 5/6 (9,21-23). Nielsen et al. defined the basal-like subtype as a combination of the TN phenotype and positive CK 5/6 and/or EGFR expression. The use of this gene expression signature as the gold standard for identifying the basal-like subtype was associated with 76% sensitivity and 100% specificity (22). The same criteria have been extended to the identification of a basal-like profile in DCIS cases (12,24). Livasy et al. (12) identified the basal-like phenotype in 19 of 245 (8%) patients with pure DCIS; furthermore, all of their TN cases exhibited CK 5/6 and/or EGFR expression. Among our cases, not all of the TN lesions were basal-like. Among the 236 DCIS samples that we examined, 25 (10.6%) cases were classified as the TN subtype, and only 18 of these (72% of the TN cases and 7.6% of all the DCIS cases) also exhibited the basal-like phenotype. The remaining 7 TN DCIS cases were also negative for both CK 5/6 and EGFR. Although Livasy et al. (12) reported no basal-like phenotypes among their low-grade DCIS cases, we noted three cases with TN profiles in the low-grade group, all of which were associated with invasive carcinoma and two of which exhibited a basal-like phenotype. Bryan et al. (24) observed the TN phenotype in 4 of 66 (6%) cases of high-grade DCIS, all of which exhibited a basal-like phenotype. In that study, the expression of basal

Table 1 - Distributions of age and morphological variables among 236 cases of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) classified as group 1 (pure DCIS without invasive carcinoma) and group 2 (DCIS with invasive breast carcinoma, a.k.a. DCIS+IBC).

Variable		Group 1 (pure DCIS)	Group 2 (DCIS+IBC)	p-value	OR (95% CI)
n		90	146		
Patient's age	(mean $\pm$ SD)	58.45	58.53	NS	-
Nuclear grade					
	1-2	63 (70%)	93/144 (64.6%)	0.47*	1.28
	3	27 (30%)	51/144 (35.4%)		(0.73-2.25)
ER/PR					
	Positive	76 (84.4%)	104 (71.2%)	0.03*	0.45
	Negative	14 (15.6%)	42 (28.8%)		(0.23-0.89)
HER2					
	Negative (0/+)	69 (76.7%)	119 (81.5%)	0.46*	1.34
	Positive (3+)	21 (23.3%)	27 (18.5%)		(0.70-2.55)
Molecular profile					
	Luminal (A+B)	65 (72.2%)	98 (67.1%)	0.01*	-
	TP	11 (12.2%)	6 (4.1%)		
	HER2	10 (11.1%)	21 (14.4%)		
	TN	4 (4.4%)	21 (14.4%)		
CK 5/6					
	Positive	26/85 (30.6%)	15/133 (11.3%)	0.0007*	0.29
	Negative	59/85 (69.4%)	118/133 (88.7%)		(0.14-0.58)
EGFR					
	Positive	9/85 (10.6%)	16/116 (13.8%)	0.64*	1.35
	Negative	76/85 (89.4%)	100/116 (86.2%)		(0.57-3.22)

*Chi-square; IBC: invasive breast cancer; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor 2; CK 5/6: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor (human epidermal growth factor 1); TP: triple-positive (ER/PR/HER2-positive); TN: triple-negative (ER/PR/HER2-negative).

Table 3 - Pathological characteristics of the high-grade ductal carcinoma *in situ* (DCIS) cases (78 cases) according to the presence or absence of associated invasive carcinoma (invasive breast carcinoma).

Variable		Group 1 (pure DCIS)	Group 2 (DCIS+IBC)	Total	p-value	OR (95% CI)
n		27	51	78		
ER/PR	Positive	14 (51.8%)	15 (29.4%)	29	0.05	0.38 (0.14-1.01)
	Negative	13 (48.2%)	36 (70.6%)	49		
HER2	Positive (3+)	18 (66.7%)	20 (39.2%)	38	0.02	0.32 (0.12-0.86)
	Negative (0/1-2)	9 (33.3%)	31 (60.8%)	40		
Molecular profile	Luminal (A+B)	5 (27.8%)	13 (25.5%)	18	0.003	-
	Triple-positive	9 (33.3%)	2 (3.9%)	11		
	HER2	9 (33.3%)	18 (35.3%)	27		
	Triple-negative	4 (14.8%)	18 (35.3%)	22		
CK 5/6	Positive	9/26 (34.6%)	8/47 (17%)	17	0.09	0.38 (0.13-1.17)
	Negative	17/26 (65.4%)	39/47 (83%)	56		
EGFR	Positive	7 (25.9%)	13/40 (32.5%)	20	0.56	1.37 (0.46-4.07)
	Negative	20 (74.1%)	27/40 (67.5%)	47		

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor 2; CK 5/6: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor (human epidermal growth factor 1).

CK was also observed among in a subset of the non-TN lesions. CK 5/6 was expressed in 16 of their 66 (24%) high-grade DCIS cases. Besides, we observed the TN phenotype in 22 of our 78 (28.2%) high-grade DCIS cases. Among these cases, 17 exhibited the basal-like phenotype (CK 5/6- and/or EGFR-positive), and most of them (15 cases) were CK 5/6-negative but EGFR-positive. Besides, CK 5/6 expression was identified in 17 of our 78 (21.8%) high-grade DCIS cases, most of which were non-TN. Different from the conclusion of Bryan et al., our results suggest that CK 5/6 expression in DCIS cases is not correlated with basal-like invasive carcinoma. In fact, the most striking feature of the neoplastic epithelial DCIS cells examined here was their expression of basal CK 5/6, which indicates a low probability of invasive disease, in both the low-grade and high-grade groups. In addition, our results support a negative association between CK 5/6 expression and the TN phenotype; the latter was associated with more invasive

cases and higher-grade tumors. Interestingly, Steinman et al. (25) observed a discordance between the CK marker expression and ER/PR/EGFR status in cases of high-grade DCIS and DCIS associated with invasive carcinoma (25). The authors considered the hypotheses that pure DCIS lesions correspond to earlier lesions than DCIS/IC that lack some of the genetic changes necessary for progression to IBC or that some pure DCIS cases are genetically programmed to not progress to IBC. Among our cases, both invasive and *in situ* components of the same lesion presented the same morphological and immunohistochemical profile (data not shown). Based on this finding, it is possible that basal CKs (identified by CK 5/6 staining) play different roles in *in situ* neoplasms and invasive carcinomas, particularly those of the basal-like TN subtype.

Zhou et al. (26) compared the risk of local recurrence/invasive cancer between basal-like DCIS cases and DCIS cases belonging to the other molecular subgroups (26). Although basal-like DCIS was associated with a worse prognosis, this difference was not significant. In the same study, the TN phenotype and nuclear grade showed weak power for stratifying the cases according to prognosis. However, the authors did not explore the influence of basal CK expression, which might partly explain their results.

Our findings suggest a possible utility of basal CK 5/6 for selecting patients with low-grade DCIS who can be spared radiation treatment without increasing the risk of invasive disease. Radiation therapy following lumpectomy significantly reduces the risk of local recurrence; however, there are ongoing efforts to identify the subset of patients with low-risk DCIS who may safely forgo radiation. Such a finding would alter the paradigm of the necessity of radiation treatment in all cases (27-31).

Another source of debate concerns the appropriate indications for sentinel lymph node biopsy in patients with pure DCIS (32-34). Most studies agree that sentinel lymph node biopsy should be considered only in cases of DCIS with a risk of invasive disease (32). The challenge is to identify this subset of patients after a biopsy results in a DCIS diagnosis. The features generally considered to indicate lymph node biopsy are extensive DCIS, areas of suspected microinvasion, irregular mass lesions and planned mastectomy (34,35). Immunohistochemical markers have been correlated with the risk of recurrence, but there has been minimal research analyzing these markers as

Figure 1 - High-grade ductal carcinoma *in situ* (DCIS) (A) showing positive membranous-cytoplasmic immunostaining for basal cytokeratin (CK 5/6) (B); and low-grade DCIS (C) showing positive membranous-cytoplasmic immunostaining for CK 5/6 (D) (original magnification 100X).

Table 4 - Pathological characteristics of the low-grade ductal carcinoma in situ (DCIS) cases (156 cases) according to the presence or absence of associated invasive carcinoma (invasive breast carcinoma).

Variable	Group 1 (pure DCIS)	Group 2 (DCIS+IBC)	p-value	OR (95% CI)
n	63	93		
Age (average)	58.45	58.53		
ER/PR			0.18	0.23 (0.02-1.99)
HER2			0.49	1.63 (0.40-6.5)
Molecular profile			0.44	-
CK 5/6			0.002	0.21 (0.08-0.57)
EGFR			0.88	1.15 (0.18-7.12)

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor 2; CK 5/6: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor (human epidermal growth factor 1).

indicators of the risk of invasion. In this regard, our results yield some interesting data. We could speculate that the low-grade DCIS patients who would benefit the most from conservative approaches might be those with positive CK 5/6 expression, regardless of their molecular profile, because this group did not demonstrate evidence of an influence of hormonal status or HER2 expression. In contrast, high-grade DCIS cases with a triple-positive phenotype (ER/PR/HER2) and positive CK 5/6 expression might correspond to less aggressive lesions. Our study had some limitations due to its retrospective design. Additional investigations to confirm and extend our findings would be valuable.

Another interesting issue is the role of HER2 overexpression in DCIS. In this study, we observed that the proportions of both HER2 positivity and HER2-enriched profiles were similar between the pure DCIS and DCIS/IC cases. However, triple-positive profile was predominant in the high-grade pure DCIS group compared with the high-grade DCIS/IBC group (33.3% vs. 3.9%, $p=0.003$). This difference remained after a multivariate analysis, with an OR of 0.09 (CI 0.02-0.51) for predicting invasion. A comparison of our results with the published data would be difficult because HER2 overexpression is mainly found in high-grade DCIS cases. In addition, HER2 overexpression is generally analyzed independently of ER/PR co-expression, except when the focus is determining its predictive value for therapeutic response (36). However, we found support for our results in a study by Rakovitch et al. (37), who identified a combination of HER2 overexpression and Ki-67 expression as an independent profile predictor of noninvasive recurrence following breast-conserving therapy. This result is interesting because it does not deny the more aggressive nature and greater risk of recurrence associated with HER2-positive DCIS, but it shows that recurrence is more common in *in situ* disease. Han et al. (38) reported high rates (40% and 38%) of local recurrence among DCIS cases with either co-expression of ER/PR or HER2 enrichment, respectively. However, although those authors observed a trend toward higher rates of invasive recurrence in HER-positive cases, they did not analyze cases of invasive and *in situ* recurrence separately (38). In contrast, Harada et al. (39) identified the ER/PR/HER2-positive phenotype as exhibiting the highest risk of progression to invasive disease. The influence of the co-expression of ER/PR in HER2-positive neoplasms is far from clear.

At this point, the challenge is to investigate which basal CKs, such as those recognized by CK 5/6, can be combined with other biomarkers to define a low-risk DCIS subgroup. Larger studies involving systematic evaluations of pathological and molecular parameters, longer follow-ups, adjustments for treatment effects and validation are needed to improve risk stratification and treatment planning for women with DCIS.

According to our results, the immunoreexpression of basal CK 5/6 in both high-grade and low-grade DCIS lesions indicates a lower risk of invasive carcinoma.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation), process number 2011/14741-7.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Aguilar FN and Carvalho FM conceived the study and drafted the manuscript. Mendes HN contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data. Cirqueira CS constructed the TMA and contributed to the data analysis. Bacchi CE conducted the immunohistochemical analyses and contributed to the intellectual content of the manuscript. All of the authors reviewed the manuscript for intellectual content and approved the final version for publication.

REFERENCES

- Tavassoli F, Devilee P. World Health Organization of Tumors: Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. IARC: WHO Classification of Tumours (Book 4); 2003.
- Ernst V, Ballard-Barbash R, Bawol WE, Zheng Y, Weaver DL, Catter G, et al. Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(20):1546-54.
- Olsen GL, Christensen JJ, Larsen JK, Larsen J, Baldeirao R, Lindén T, et al. Carcinoma in situ of the breast: correlation of histopathology to immunohistochemical markers and DNA ploidy. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;60(3):219-26. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006433420088>.
- Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):370-8. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1127>.
- Sgroi DC. Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:193-221. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092306>.
- Radloff U, Bongi E, Reiner AS, Goldberg JL, Brockway JP, Wynnen CA, et al. The influence of margin width and volume of disease near margin on benefit of radiation therapy for women with DCIS treated with breast-conserving therapy. *Ann Surg*. 2010;251(4):583-91. <http://dx.doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181b6931e>.

7. Bijker N, van Tienhoven G. Local and systemic outcomes in DCIS based on tumor and patient characteristics: the radiation oncologist's perspective. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):178-80. <http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/igq025>.
8. Yen TW, Hunt KK, Ross MI, Mirza NQ, Babiera GV, Meric-Bernsten F, et al. Predictors of invasive breast cancer in patients with an initial diagnosis of ductal carcinoma in situ: a guide to selective use of sentinel lymph node biopsy in management of ductal carcinoma in situ. *J Am Coll Surg*. 2005;200(4):516-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.11.012>.
9. Livasy CA, Konecny G, Nanda R, Trevisan M, 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.2006.08>.
10. Thike AA, Iqbal J, Cheek PY, Chong AP, Tse QM, Tan B, et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(7):956-64.
11. Liu ZB, Wu J, Peng B, Feng LQ, Di GH, Lu JS, et al. Basal cytokeratin expression in relation to immunohistochemical and clinical characterization in breast cancer patients with triple negative phenotype. *Tumori*. 2009;95(1):53-62.
12. 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>.
13. 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.
14. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratin and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4):143-8. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr1041>.
15. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol*. 2002;15(1):6-10. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.380483>.
16. Moll R, Krepler R, Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation*. 1983;23(3):256-69.
17. Wetzel RH, Holland R, van Haeck UJ, Lane EB, Leigh IM, Ramaekers FC. Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol*. 1989;134(3):571-9.
18. Daisuke SH, Mayall BH, Smith HS, Hackitt AJ. Monoclonal marker that predicts early recurrence of breast cancer. *Lancet*. 1987;1(8531):514.
19. Malinche K, Miles M, Thomas M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinoma. *Virchows Arch*. 1998;433(2):119-29. <http://dx.doi.org/10.1007/s004280030226>.
20. 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>.
21. Cheung MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Luong S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):796-50.
22. Nielsen TO, Hsu RD, Jensen K, Cheung M, Konecny 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>.
23. Bhargava R, Striabel J, Bertwal S, Rickinger JC, Onisko A, Ahmadi G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(5):444-55.
24. Bryan BB, Schmitt 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.380050>.
25. Steinman S, Wang J, Bourne P, Yang Q, Tang P. Expression of cytokinin 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. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37(2):27-34.
26. Zhou W, Jostrom K, Johansson C, Amini RM, Blomqvist C, Aghajani O, et al. Long-term survival of women with basal-like ductal carcinoma in situ of the breast: a population-based cohort study. *BMC Cancer*. 2010;10:653. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-653>.
27. Solin LJ. The impact of adding radiation treatment after breast conservation surgery for ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):187-92. <http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/igq020>.
28. Lari SA, Kauer HM. Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review. *J Cancer*. 2012;2:32-61. <http://dx.doi.org/10.1071/jca.2.232>.
29. Wang SY, Shamsiyan T, Vinnig 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). <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1387-4>.
30. Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):134-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/igq035>.
31. Schmitt SJ. Local outcomes in ductal carcinoma in situ based on patient and tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):158-61. <http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/igq031>.
32. Veronesi P, Intini M, Verito AR, Naminato P, Caldarella P, Paganelli G, et al. Sentinel lymph node biopsy for localized ductal carcinoma in situ? *Breast*. 2005;14(6):520-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2005.08.007>.
33. Son BK, Bang JG, Park SH, Jeong YJ. Ductal carcinoma in situ and sentinel lymph node biopsy. *J Breast Cancer*. 2011;14(4):301-7. <http://dx.doi.org/10.4048/jbc.2011.14.4.301>.
34. Smith BL. Clinical applications of breast pathology: management of in situ breast carcinomas and sentinel node biopsy issues. *Mod Pathol*. 2010;23 Suppl 2:S33-5. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.53>.
35. Collado MV, Ruiz-Tovar J, Garcia-Villanueva A, Rojo R, Latorre L, Rojo ME, et al. Sentinel lymph node biopsy in selected cases of ductal carcinoma in situ. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(7):499-502. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-010-0543-3>.
36. Collins LC, Schmitt SJ. HER2 protein overexpression in estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ of the breast: frequency and implications for tamoxifen therapy. *Mod Pathol*. 2005;18(5):615-20. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800360>.
37. Rakovitch E, Nofech-Mozes S, Hanna W, Narod S, Thindachyan D, Sackin 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(6):1160-5. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.41>.
38. Han K, Nofech-Mozes S, Narod S, Hanna W, Vespini D, Sackin R, et al. Expression of HER2/neu in ductal carcinoma in situ is associated with local recurrence. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(3):183-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2011.09.008>.
39. Harada S, Mick R, Rosen RE, Graves H, Niu H, Sharma A, et al. The significance of HER-2/neu receptor positivity and immunophenotype in ductal carcinoma in situ with early invasive disease. *J Surg Oncol*. 2011;104(5):458-65. <http://dx.doi.org/10.1002/jso.21973>.

Trabalho publicado: Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features *in situ* and invasive components of ductal carcinoma of breast. Aguiar FN, Mendes HN, Bacchi CE, Carvalho FM. Rev Bras Ginecol Obstet. 2013 Mar;35(3):97-102. PMID: 23538467

<p>FERNANDO NALISSO AGUIAR¹ HENRIQUE NOGUEIRA MENDES² CARLOS E. BACCHI³ FELICIANA MARINO CARVALHO⁴</p> <p>Artigo Original</p>	<h2>Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features <i>in situ</i> and invasive components of ductal carcinoma of breast</h2> <p><i>Comparação do grau nuclear e perfil imunoistoquímico nos componentes in situ e invasivo de carcinoma mamário</i></p>
<p>Keywords</p> <p>Breast neoplasms/chemistry Carcinoma, ductal, breast/chemistry Immunoenzyme techniques Receptor, estrogen/analysis Receptor, erbB-2/analysis keratin-5/analysis keratin-6/analysis Ki-67 antigen/analysis Tumor markers, biological</p> <p>Palavras-chave</p> <p>Neoplasias da mama/química Carcinoma ductal de mama/química Técnicas imunoenzimáticas Receptores estrógenos/análise Receptor, erbB-2/análise Queratina-5/análise Queratina-6/análise Antígeno Ki-67/análise Marcadores biológicos de tumor</p>	<p>Abstract</p> <p>PURPOSE: To compare the prognostic and predictive features between <i>in situ</i> and invasive components of ductal breast carcinomas. METHODS: We selected 146 consecutive breast samples with ductal carcinoma <i>in situ</i> (DCIS) associated with adjacent invasive breast carcinoma (IBC). We evaluated nuclear grade and immunohistochemical expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin 5/6 (CK5/6), and epidermal growth factor receptor (EGFR) in both components, <i>in situ</i> and invasive, and the Ki-67 percentage of cells in the invasive part. The DCIS and IBC were classified in molecular surrogate types determined by the immunohistochemical profile as luminal (RE/PR-positive/HER2-negative), triple-positive (RE/PR/HER2-positive), HER2-enriched (ER/PR-negative/HER2-positive), and triple-negative (RE/PR/HER2-negative). Discrimination between luminal A and luminal B was not performed due to statistical purposes. Correlations between the categories in the two groups were made using the Spearman correlation method. RESULTS: There was a significant correlation between nuclear grade ($p < 0.0001$), expression of RE/PR ($p < 0.0001$), overexpression of HER2 ($p < 0.0001$), expression of EGFR ($p < 0.0001$), and molecular profile ($p < 0.0001$) between components <i>in situ</i> and IBC. CK 5/6 showed different distribution in DCIS and IBC, presenting a significant association with the triple-negative phenotype in IBC, but a negative association among DCIS. CONCLUSIONS: Our results suggest that classical prognostic and predictive features of IBC are already determined in the preinvasive stage of the disease. However the role of CK5/6 in invasive carcinoma may be different from the precursor lesions.</p> <p>Resumo</p> <p>OBJETIVO: Comparar características prognósticas e preditivas entre os componentes <i>in situ</i> e invasivo de carcinomas ductais da mama. MÉTODOS: Selecionamos 146 amostras mamárias consecutivas com carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) associado com carcinoma invasivo (CI) adjacente. Avaliamos grau nuclear e a expressão imunoistoquímica da receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), citokeratina 5/6 (CK5/6) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em ambos componentes, <i>in situ</i> e invasor, e a porcentagem de células marcadas pelo Ki-67 no componente invasivo. CDIS e CI foram classificados nos tipos moleculares, determinados pelo perfil imunoistoquímico, como luminal (RE/RP-positivo/HER2-negativo), triplo-positivo (RE/RP/HER2-positivo), HER2-puro (RE/RP-negativo/HER2-positivo) e triplo-negativo (RE/RP/HER2-negativo). A discriminação entre luminal A e luminal B não foi feita por motivos estatísticos. Correlações entre as categorias dos dois grupos foram feitas pelo método de correlação de Spearman. RESULTADOS: Houve significante associação entre grau nuclear ($p < 0,0001$), expressão de RE/RP ($p < 0,0001$), superexpressão de HER2 ($p < 0,0001$), expressão de EGFR ($p < 0,0001$) e perfil molecular ($p < 0,0001$) entre os componentes <i>in situ</i> e invasivo. CK5/6 mostrou distribuição distinta em CDIS e CI, apresentando significante associação com o fenótipo triplo-negativo em CI, mas uma associação negativa entre os CDIS. CONCLUSÕES: Nossos resultados sugerem que as características prognósticas e preditivas clássicas dos CI estão já determinadas no estágio pré-invasivo da doença. Entretanto, o papel da CK5/6 no carcinoma invasivo pode ser diferente daquela das lesões precursoras.</p>
<p>Correspondence</p> <p>Feliciano Marino Carvalho Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia Avenida Doutor Arnaldo, 455, sala 1149 Zip code: 05146-903 São Paulo (SP), Brazil</p> <p>Received</p> <p>01/11/2013</p> <p>Accepted with modifications</p> <p>02/01/2013</p>	<p>Study carried out at the Pathology Department, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil. ¹Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP – São Paulo (SP), Brazil; Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil. ²Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil. ³Consultancy in Pathology – Botucatu (SP), Brazil. ⁴Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil.</p>

Introduction

Ductal carcinomas *in situ* (DCIS) are immediate precursors of most breast cancer, but they are heterogeneous regarding morphology and invasiveness risk¹. The prevalence of DCIS has been rising in the last decades, probably due to better screening programs and now accounts for approximately 20–25% of all breast cancer diagnoses². The formerly accepted linear multi-step process of breast carcinogenesis, from hyperplasia, atypical hyperplasia, and carcinoma *in situ*, to invasive and metastatic carcinoma, changed to a more complex process involving a series of stochastic genetic events that lead to distinct and divergent pathways towards invasive carcinoma^{3,7}. Although the progression of DCIS to invasive breast carcinoma (IBC) is believed to be an important aspect feature of tumor aggressiveness, identification of biomarkers and molecular profiles of IBC and DCIS is yet far to be fully elucidated^{4,8,9}. Previous studies indicate that DCIS may be classified in a similar manner to invasive breast cancer^{10–15}. The understanding of the transition between the preinvasive and invasive stages in breast carcinomas is the key to more efficient strategies for early diagnosis and treatment, as well as it expands the knowledge about the complex mechanisms of carcinogenesis. In this study our aim was to compare the prognostic and predictive pathological features between the *in situ* and invasive components of ductal breast carcinoma.

Methods

This study was approved by the Department of Pathology Scientific Committee of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and by the Ethical Committee for Research Projects of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, process 2011/14741-7). As the study was retrospective, informed patient consent was waived and any form of patient identification was abolished.

We selected breast samples from patients with confirmed diagnosis of IBC after an initial sample represented by DCIS only. Cases were obtained from the files of the Division of Surgical Pathology of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo in the period from 2000 to 2009. All tissues had been fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. The slides were rigorously reviewed and classified by the same pathologist with expertise in breast pathology (FNA). For cases with discordant interpretation in relation to original report, a consensus was determined by simultaneous examination under a dual-head microscope (FNA and FMC). We included only carcinomas of non-special type according criteria of the histological classification of tumors of World Health Organization,

2012¹⁴. Carcinomas of special types and cases with insufficient material to immunohistochemistry evaluation, signs of tissue autolysis and from pregnant patients were excluded from the study. We obtained 146 breast samples that met the criteria of inclusion. The age of the patients ranged from 29 to 87 years (median = 59 years). Nuclear grades 1 (G1) and 2 (G2) were grouped as low-grade category, while nuclear grade 3 (G3) was defined as high-grade category (Figure 1). Immunohistochemistry was performed on 3 µm-thick histological sections containing *in situ* and invasive neoplasia. The source and dilutions of the antibodies and epitope retrieval methods used are listed in Table 1. Novolink[®] was used as the detection system (Leica, Bannockburn, IL, USA). Nuclear positivity was considered specific for estrogen receptor (ER) (Figure 1B and 1E), progesterone receptor (PR) and Ki-67; membranous positivity for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Figure 2) and epidermal growth factor receptor (EGFR), and cytoplasmic, for cytokeratin 5/6 (CK5/6) (Figure 1). Lesions with at least 10% of cells stained were considered positive for ER and PR. For CK5/6 expression we considered any positivity above 1% of epithelial cells. For HER2 and EGFR we only considered samples positive if they scored 3+ according to American Society of Clinical Oncology (ASCO) and College of American Pathologists (CAP) recommendations¹⁵.

An approximation of breast cancer molecular subtypes was used according to the following immunohistochemical surrogate criteria modified from St. Gallen consensus¹⁶: Luminal A (ER/PR-positive and Ki-67 <14%), Luminal B (ER/PR-positive, HER2-negative and Ki-67 ≥14%), triple-positive (ER/PR/HER2 positive), HER2-enriched (ER/PR-negative and HER2-positive), and triple-negative (ER/PR/HER2-negative) (TN). For DCIS we considered luminal A as being the lesions with at least 50% of ER and/or PR positive neoplastic cells, and HER2 negative; Luminal B as being the lesions with less than

Table 1. Source, dilutions of the antibodies and epitope retrieval methods used

Antigen	Clone	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer
ER	SP1	1:500	PC, 9 min with citric acid pH 6.0	ThermoScientific
PR	PgR36	1:1000	PC, 9 min with citric acid pH 6.0	Dako
HER2	SP3	1:100	PC, 15 min with citric acid pH 6.0	ThermoScientific
Ki-67	MIB1	1:600	PC, 8 min with citric acid pH 6.0	Dako
CK 5/6	D5/1684	1:100	MO, 3.3 min with citric acid pH 6.0	Dako
EGFR	3167	1:200	0.1% Ponceau, 15 min	Zymed

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; CK: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor; PC: pressure cooker; MO: microwave oven.

50% of ER and/or PR positive cells, and HER2 negative; Triple-positive as being ER and/or PR positive associated with HER2 positivity; HER2-enriched as being ER and/or PR negative and HER2 positive, and TN as being negative for ER, PR and HER2. The subgroups luminal A and B were grouped as luminal category, as only three cases expressed less than 50% of hormonal receptors.

Associations between CK5/6 with the TN phenotype were determined by chi-square test and *Odds Ratio* with 95% confidence interval was calculated for the DCIS and IBC. Correlations between the categories of DCIS and IBC were made using the Spearman correlation method. Statistical analyses were performed using MedCalc for Windows (version 11.5.0.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), and a p-value less than 0.05 was considered significant.

Results

The distribution of the variables among *in situ* and invasive components of our cases of breast carcinoma is summarized in Table 2. Three cases of IBC G3 were associated with DCIS G2. All DCIS cases revealing G3 were associated with G3 in the invasive component as well. Two ER-negative DCIS cases showed invasive component ER-positive. Only one case of DCIS HER2-positive was associated with IBC HER2-negative. This was a 46 years-old patient with a luminal B tumor presenting with ER-negative, PR-positive and 30% cell proliferation index by Ki-67 immunostaining. Fifteen DCIS cases expressed CK5/6, but only 5/15 expressed this cytokeratin in the invasive component. On the other hand, of the 14 IBC with expression of CK5/6, 7 expressed it also in the DCIS.

The expression of CK5/6 was associated with the triple-negative phenotype in IBC (OR = 7.8; 95%CI 2.4–25.3; $p=0.0006$). Oppositely, the expression of CK5/6 was negatively associated with TN phenotype among DCIS (OR = 0.2; 95%CI 2.4–25.3; $p=0.02$). Only 2 cases out of 16 DCIS-EGFR-positive were negative for this marker in the IBC. Among the 100 cases of DCIS without expression of EGFR, only 5 had an invasive component positive for this growth factor. All TN DCIS were associated with TN IBC. Only one TN breast cancer had a luminal DCIS component characterized by G3 and presence of ER/PR in 10% of the tumor cells. The basal-like profile defined by ER/PR/HER2 negative and CK5/6 and/or EGFR positive was identified in 10 cases of DCIS, all of them with the same profile in the invasive component. There were 2 cases of IBC TN basal-like with an unknown status of the DCIS component, and 3 cases with a TN non-basal DCIS. Six cases of TN DCIS with non-basal-like phenotype were associated with 3 basal-like and 3 non-basal-like phenotypes in the invasive components.

Figure 1. Upper row shows a low grade DCIS (A), ER-positive (B) and CK 5/6-positive (C). The second row presents a high grade DCIS (D), ER-positive (E) and CK5/6-positive (F).

Figure 2. HER2 score 3+ in DCIS (A) and invasive carcinoma (B), both components nuclear grade 3.

Table 2. Comparison of pathological and immunohistochemical features in situ and invasive components of 146 ductal carcinomas

Variables		Carcinoma in situ	Invasive carcinoma
Nuclear grade	G1 or G2 (low grade)	95	92
	G3 (high grade)	51	54
ER/PR	Positive	104	106
	Negative	42	40
HER2	Positive (score 3)	27	26
	Negative (score 0 or 1)	119	120
CK 5/6	Positive	15	14
	Negative	118	132
	Nonavailable	13	0
EGFR	Positive	16	22
	Negative	100	107
	Nonavailable	30	17
Immunohistochemical profile	Luminal (A+B)	98	98
	Triple-positive	6	8
	HER2-enriched	21	18
	Triple-negative	21	22
Triple-negative	Basal-like profile	10	15
	Non-basal-like profile	6	7
	Nonavailable	5	0

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; CK: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor.

Table 3. Correlation between pathological and immunohistochemical features of ductal carcinoma *in situ* and adjacent invasive carcinoma (n=146)

Variables		p-value	Rho*	95%CI for Rho
Nuclear grade	Low (G1 or G2)	<0.0001	0.96	0.94-0.97
	High (G3)			
ER/PR	Positive	<0.0001	0.93	0.91-0.95
	Negative			
HER2	Positive	<0.0001	0.91	0.88-0.94
	Negative			
EGFR	Positive	<0.0001	0.76	0.68-0.83
	Negative			
Molecular profile	Luminal (A+B)	<0.0001	0.96	0.95-0.97
	Triple-positive			
	HER2			
	Triple-negative			

*Spearman correlation method; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; CK: cytokeratin 5/6; EGFR: epidermal growth factor receptor.

There was a significant correlation between nuclear grade ($p < 0.0001$), expression of ER/PR ($p < 0.0001$), overexpression of HER2 ($p < 0.0001$) and molecular profile ($p < 0.0001$) between components *in situ* and invasive. The value of the correlation coefficient ranged from 0.918 (HER2) to 0.967 (molecular profile) (Table 3).

Discussion

In this study we observed similar distribution of the nuclear grade and immunohistochemical variables in DCIS and the correspondent invasive component. This observation suggests that these classical prognostic and predictive factors may be predetermined in the preinvasive stage of the disease.

The management of breast cancer is largely based on some clinical and pathological parameters, including age of patient, size of tumor, nodal status, histologic and nuclear grade, and immunohistochemical evaluation of ER, PR, HER2, and Ki-67, either as individual information, or as panel of markers to approximate the molecular subtyping classification¹⁶. DCIS are genuine precursors of breast cancer, but the mechanisms involved in this transition are mostly unknown. DCIS is a very heterogeneous disease with variable risk of invasion as well of recurrence, not to mention that one half of all recurrences occur as invasive cancer^{17,18}.

According to our results the phenotype of IBC is very similar to the *in situ* component, suggesting that the classical prognostic and predictive factors are determined previously to the invasive capacity of the precursors. Similar results have been presented in

the literature^{10,11,19,20}. Ottesen found similar morphology, immunohistochemistry, and DNA ploidy both in DCIS and the invasive component¹⁹. Park et al.²⁰ compared HER2 status between *in situ* and invasive component of 270 breast carcinomas and found a high concordance of 98.5 and 99.3%, respectively by FISH and immunohistochemistry. Steinman et al.²¹ studied ER, PR, HER2, EGFR and several cytokeratins, including CK5/6, in 96 cases of DCIS with co-existing invasive carcinoma and they found a high rate of concordance ranging from 92.3% for ER to 100% for HER2 and EGFR. Our findings support the evidence that molecular changes implicated in the progression from *in situ* status to invasive one occur before morphological manifestation of invasiveness. Interestingly, among these classical parameters, nuclear grade is one of the most powerful prognostic and predictive factors and it is associated with distinct genetic changes²²⁻²³. According to some studies, it is possible that even molecular changes described in DCIS, although could be related to grade, are not determinant of invasion. Moelans et al.²⁴ compared copy numbers changes in 21 breast cancer related genes and the methylation status of 25 breast cancer-related genes²⁷ between laser-microdissected ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and adjacent invasive ductal cancer (IDC) lesions. These authors did not observe significant differences between DCIS and adjacent IBC, suggesting that DCIS is genetically as advanced as its invasive counterpart. In an elegant study, Muggenud et al.¹² analyzed gene expressions patterns of 31 pure DCIS, 36 pure invasive cancers and 42 cases of DCIS with invasive cancer. The authors found a DCIS signature associated to gene expression characteristics more similar to advanced tumors. This set of genes was independent of grade, ER-status, and HER2-status, and it was suggestive of several processes related to the re-organization of the microenvironment¹². In our opinion one of the most promising way to investigate the tendency of breast carcinoma to invade the stroma is to try to understand the factors related to interaction of the tumor cells with the microenvironment.

Although nuclear grade is considered the most important parameter to classify DCIS together with tumor size and margins status, it becomes evident that it is not a good predictor of invasive potential. Holmes et al.²⁸ studied 141 patients who underwent conservative surgery with clear margins for DCIS. They observed 60 recurrences occurred with a median follow-up of 191 months. After multivariate analysis, HER2 score 3+ was associated with reduced time to recurrence. However, no pathological or immunohistochemical characteristic was predictive of recurrence. The comprehensive systematic review conducted by Lari and Kuerer²⁹ to identify the

role of biological markers in DCIS, including steroid receptors, proliferation markers, cell cycle regulation and apoptotic markers, angiogenesis-related proteins, epidermal growth factor receptor family receptors, extracellular matrix-related proteins, and COX-2, failed to find any useful marker.

After the molecular classification of breast into intrinsic subtypes luminal A, Luminal B, HER2 and basal-like³⁰ and the demonstration of immunohistochemical surrogates³¹, several groups dedicated to investigate the role of the same profiles in DCIS^{10,15,32}. Our results show a similar distribution of the molecular subtypes between *in situ* and invasive carcinomas. The more controversial subtype is the basal-like. According Nielsen et al.³¹, the better determination of the basal-like subgroup

is based on TN phenotype associated to expression of CK5/6 and/or EGFR. We studied a substantial number of TN DCIS (21 cases), all of them were associated with TN in the invasive component. However, our results indicate that the significance of basal cytokeratin 5/6 in DCIS may be different of that in invasive carcinomas. In fact, CK5/6 was negatively associated with the TN phenotype and more prevalent in the other subtypes. Further studies are needed to clarify the role of this cytokeratin in DCIS.

Acknowledgement

This study was supported by grants from FAPESP (São Paulo Research Founding), process number 2011/14741-7.

References

- Lee S, Stewart S, Nagleopal I, Luo J, Wu Y, Colditz G, et al. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2012;72(17):4574-86.
- Ernstler VL, Ballard-Barbash R, Barlow WE, Zheng Y, Weaver DL, Cutter G, et al. Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(20):1546-54.
- Buenger H, Otterbach F, Simon R, Schäfer KL, Poremba C, Dittler R, et al. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*. 1999;189(4):521-6.
- Hernandez I, Wilkerson PM, Lambros MB, Campion-Flora A, Rodrigues DN, Gauthier A, et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J Pathol*. 2012;227(1):42-52.
- Johnson CE, Goringe KL, Thompson ER, Opskin K, Boyle SE, Wang Y, et al. Identification of copy number alterations associated with the progression of DCIS to invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(3):889-98.
- Zikan M, Böhm J, Pavlista D, Cibula D. Comparative analysis of loss of heterozygosity and expression profile in normal tissue, DCIS and invasive breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(9):652-5.
- Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Trikli M, Marchis C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010;57(2):171-92.
- Porter D, Lahiri-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*. 2003;1(5):362-75.
- Haaphy CM, Bisoffi M, Joshi NE, Baumgartner KB, Baumgartner RN, Griffith JK. Genomic instability demonstrates similarity between DCIS and invasive carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(1):17-24.
- 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):120-7.
- Steinman S, Wang J, Bourne P, Yang Q, Tang P. 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. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37(2):127-34.
- Muggerud AA, Hollett M, Johnsen H, Kleivi K, Zhou W, Tahmasebpour S, et al. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. *Mol Oncol*. 2010;4(4):357-68.
- Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Muta D, Jackson S, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2007;38(2):197-204.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of tumours of the breast. Lyon: IARC; 2012.
- 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.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.
- Collins LC, Tamimi RM, Boer HJ, Connolly JL, Colditz GA, Schnitt SJ. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer*. 2005;103(9):1778-84.
- Cuzick J. Treatment of DCIS—results from clinical trials. *Surg Oncol*. 2003;12(4):213-9.
- Ottosen GL. Carcinoma in situ of the female breast. A clinicopathological, immunohistological, and DNA ploidy study. *APMIS Suppl*. 2003;108:1-67.
- Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. 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*. 2006;48(6):702-7.

21. Steinman S, Wang J, Bourne P, Yang Q, Tang P. Expression of cytokeratin markers, ER- α , 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. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37(2):127-34.
22. Song WJ, Kim KI, Park SH, Kwon MS, Lee TH, Park HK, et al. The risk factors influencing between the early and late recurrence in systemic recurrent breast cancer. *J Breast Cancer*. 2012;15(2):218-23.
23. Ishikawa T, Shimizu D, Yamada A, Sasaki T, Morita S, Tanabe M, et al. Impacts and predictors of cytotoxic anticancer agents in different breast cancer subtypes. *Oncol Res*. 2012;20(2-3):71-9.
24. Sinha S, Singh RK, Bhattacharya N, Mukherjee N, Ghosh S, Alam N, et al. Frequent alterations of LOH11CR2A, PIG8 and CHEK1 genes at chromosomal 11q24.1-24.2 region in breast carcinoma: clinical and prognostic implications. *Mol Oncol*. 2011;5(5):454-64.
25. Takunaga E, Okada S, Yamashita N, Aktyoshi S, Kitao H, Morita M, et al. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*. 2012;19(2):161-9.
26. Moelans CB, de Wegers RA, Monsieurs HN, Maess AH, van Diest PJ. Molecular differences between ductal carcinoma in situ and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(5):475-82.
27. Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol*. 2011;225(2):222-31.
28. Holmes P, Lloyd J, Chervoneva I, Pequinot E, Cornfield DB, Schwartz GF, et al. Prognostic markers and long-term outcomes in ductal carcinoma in situ of the breast treated with excision alone. *Cancer*. 2011;117(16):3650-7.
29. Lari SA, Kuerer HM. Biological Markers in DCIS and risk of breast recurrence: a systematic review. *J Cancer*. 2011;2:232-61.
30. Perou CM, Sæviik T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
31. 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.
32. Yu KD, Wu LM, Liu GY, Wu J, Di GH, Shen ZZ, et al. Different distribution of breast cancer subtypes in breast ductal carcinoma in situ (DCIS), DCIS with microinvasion, and DCIS with invasion component. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(5):1342-8.