

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Ginecologia e Obstetrícia**

Acurácia diagnóstica do exame imuno-histoquímico em tumores  
phyllodes da mama: painel p53 e Ki67

Luís Fernando da Rosa Rivero

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Ginecologia e Obstetrícia**

Acurácia diagnóstica do exame imuno-histoquímico em tumores  
phyllodes da mama: painel p53 e Ki67

Luís Fernando da Rosa Rivero

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Lúcia Maria Kliemann

Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor no  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia,  
Faculdade de Medicina, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Rivero, Luis Fernando da Rosa  
Acurácia diagnóstica do exame imuno-histoquímico em  
tumores phyllodes da mama: painel p53 e Ki67 / Luis  
Fernando da Rosa Rivero. -- 2019.  
93 f.  
Orientadora: Lucia Maria Kliemann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. tumor phyllodes. 2. p53. 3. ki67. 4.  
imuno-histoquímica. 5. acurácia. I. Kliemann, Lucia  
Maria, orient. II. Título.

A armadilha mais frustrante é, de longe, a falta de ferramentas adequadas para o trabalho - Zen e a Arte da Manutenção de Motocicletas – Robert Pirsig

## DEDICATÓRIA

Dedico esse estudo à minha família que soube apoiar, estimular, compreender, tolerar e ajudar, sempre nas doses exatas, e amar sempre em doses excessivas, pois não há nada que se possa fazer sozinho.

Aos meus pais Camilo e Antônia pelo exemplo de dedicação total a todos os trabalhos que a vida lhes apresentou e por sempre me fazerem sentir apoiado em absolutamente todas as situações.

À minha querida esposa Raquel pelo estímulo desde antes do início desse trabalho, durante o mesmo e até final, por vezes acreditando mais do que eu mesmo acreditava, tornando tudo possível.

À minha amada filha Isadora pelo interesse e compreensão e, sendo como é, por me ajudar a tentar ser uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, colega e amiga, Prof<sup>a</sup> Dra. Lúcia Maria Kliemann, pela presença constante e pelo exemplo de dedicação e competência em tudo o que faz. Muito obrigado por não ter desistido de me guiar ao longo dessa trajetória.

À bolsista Ana Maria Delgado, que, com a excelência e dedicação que lhe são próprias, contribuiu de forma importante nessa pesquisa.

Aos grandes amigos Eugênio Grevet e Eduardo Vitola, médicos que se divertem fazendo ciência da mais alta qualidade, pelo interesse genuíno e apoio técnico.

À arquivista Carina Henriques pela ajuda prática, e teórica, que possibilitou a realização desse estudo.

Às colegas do laboratório de imuno-histoquímica do Serviço de Patologia, Gabriela Remonato e Luciana Ferreira, pela disponibilidade e excelência no trabalho que serviu de base para as minhas análises.

Ao FIPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio financeiro para a realização dos testes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina por ter me acolhido como aluno e fornecido todas as ferramentas necessárias para a realização dessa tese.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
INTRODUÇÃO .....	14
REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA .....	17
Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	17
Marco conceitual esquemático.....	18
Tumor <i>phyllodes</i> da mama.....	19
Aspectos gerais.....	19
Diagnóstico histopatológico – critérios.....	25
Diagnóstico histopatológico - comportamento biológico.....	28
Diagnóstico histopatológico - biópsia por agulha grossa.....	32
Marcadores imuno-histoquímicos em tumor <i>phyllodes</i> .....	36
P53 – aspectos gerais .....	36
p53 – resultados reportados .....	39
Ki67 – aspectos gerais .....	46
Ki67 – resultados reportados .....	48
JUSTIFICATIVA .....	52
HIPÓTESES.....	53
OBJETIVOS.....	55
Principal.....	55
Secundários .....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ARTIGO EM INGLÊS .....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
PERSPECTIVAS .....	85
ANEXOS .....	86
Avaliação histopatológica .....	86
Avaliação imuno-histoquímica.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

HCPA -	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
WHO -	<i>World Health Organization</i>
OMS -	Organização Mundial de Saúde
GPPG –	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
PT –	<i>Phyllodes tumor</i>
TP -	Tumor <i>phyllodes</i>
HPF –	<i>high-power field</i> - campo de grande aumento microscópico
LFEC –	lesão fibroepitelial com estroma celular
TMA –	<i>tissue microarray</i>
SG -	sobrevida global
SLR –	sobrevida livre de recorrência
TP53 –	gene TP53
p53 –	expressão proteica do gene TP53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégia de busca de referências bibliográficas

Figura 2 – Marco conceitual esquemático do estudo

Figura 3 – Tumor *phyllodes* e tumores da mama

Figura 4 – Tumor *phyllodes* e tumores fibroepiteliais da mama

Figura 5 – Padrão microscópico foliáceo do tumor *phyllodes*

Figura 6 - Lâmina de controle para p53 (adenocarcinoma colo-retal).

Figura 7 - Tumor *phyllodes* benigno negativo para p53.

Figura 8 - Tumor *phyllodes* maligno positivo para p53 com intensidade moderada em cerca de 30% das células neoplásicas.

Figura 9 - Tumor *phyllodes* maligno positivo para p53 com intensidade forte em cerca de 70% das células neoplásicas.

Figura 10 - Lâmina de controle para Ki67 (centro germinativo de folículo linfóide do apêndice cecal).

Figura 11 - Tumor *phyllodes* benigno com Ki67 de 5%.

Figura 12 - Tumor *phyllodes* maligno com Ki67 de 30%.

Figura 13 - Tumor *phyllodes* maligno com Ki67 de 60%.

## RESUMO

Acurácia do p53 e do ki-67 no diagnóstico de tumor phyllodes, um modelo para aplicação prática

O diagnóstico preciso do tumor phyllodes (TP) desempenha um papel crítico para o tratamento eficaz, pois permite o manejo cirúrgico correto, evitando uma cirurgia inadequada para o TP maligno ou *borderline* ou o tratamento cirúrgico excessivo no caso de um TP benigno. TP de mama são notoriamente difíceis de diagnosticar e graduar, sendo a distinção entre um TP benigno e um *borderline* ou maligno frequentemente problemática para o patologista. Embora vários autores apontem para uma forte relação entre a expressão imunohistoquímica de p53 e Ki-67 e o grau histopatológico do TP, com potencial impacto na acurácia diagnóstica, não há consenso na literatura sobre qual ponto de corte define um teste (*index test*) como positivo. O objetivo deste estudo é estabelecer um escore de aplicação prática que permita elevar a acurácia diagnóstica do TP por meio do uso adequado desses métodos auxiliares.

### MÉTODOS:

Revisão cegada em relação ao diagnóstico original de 146 TP benignos, *borderline* e malignos, removidos cirurgicamente entre janeiro de 2000 e dezembro de 2015, buscados dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e dois outros laboratórios de patologia de Porto Alegre. O diagnóstico de revisão foi considerado o padrão ouro para análise e um bloco de parafina representativo para cada caso foi escolhido para estudo imunohistoquímico. O teste Ki-67 foi considerado positivo se >10% dos

núcleos de células neoplásicas fossem corados. O teste p53 foi considerado positivo se >10% dos núcleos de células neoplásicas fossem corados com intensidade moderada ou forte.

#### RESULTADOS:

Dos 146 casos de TP revisados, 110 foram classificados como benignos, 16 como *borderline* e 20 como malignos, a mediana de idade foi de 45 anos (16-74) e o tamanho mediano foi de 4,0cm (1-20cm). A correlação entre idade e tamanho com subgrupos benigno, *borderline* e maligno foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Foi observada significância na expressão do Ki-67 e do p53 na comparação do TP benigno, *borderline* e maligno com  $p < 0,001$  e intervalo de confiança de 95%. Ao correlacionar-se a presença de positividade em qualquer um dos dois testes com o diagnóstico de TP *borderline* ou maligno, atingimos uma sensibilidade de 100%, especificidade de 91,8%, valor preditivo positivo de 80%, valor preditivo negativo de 100% e uma acurácia de 93,8%, com  $p < 0,001$  e intervalo de confiança de 95%.

#### CONCLUSÃO:

Propomos uma metodologia prática para obter um diagnóstico acurado de TP, com base num painel imuno-histoquímico simples, Ki-67 e p53, com pontos de corte claramente definidos e fáceis de aplicar. Concluindo, um TP positivo para qualquer um dos testes (*index test*) deve ser classificado como *borderline* ou maligno. Esperamos que essa proposta de nova abordagem possa contribuir para o desenvolvimento da padronização no uso do p53 e do Ki-67 para a graduação do TP da mama, auxiliando os patologistas no diagnóstico preciso.

Palavras-chave: *phyllodes*, imuno-histoquímica, p53, Ki-67

## ABSTRACT

Accuracy of p53 and ki-67 in the diagnosis of phyllodes tumor, a model for practical application

**Background:** The accurate diagnosis of a phyllodes tumor (PT) is critical for effective treatment as it allows correct surgical management, and avoids inadequate excision for malignant or borderline PT, or surgical overtreatment in benign PT. PTs of the breast are notoriously difficult to classify, and reliable differentiation of a benign PT from a borderline or malignant PT can be problematic for the pathologist. Although several authors acknowledge a strong relationship between the immunohistochemical expression of p53 and Ki-67 and the histopathological grade of PT—with potential impact on diagnostic accuracy—the literature lacks consensus about which cutoff defines a positive index test. The objective of this study is to establish a practical application score that increases the diagnostic accuracy of PT through the appropriate use of these auxiliary methods.

**Methods:** A blinded review of 146 consecutive PTs surgically removed between January 2000 and December 2015 were retrospectively searched from archives of three pathology laboratories from Porto Alegre. The Ki-67 test was considered positive if >10% of neoplastic cell were stained. The p53 test was considered positive if >10% of neoplastic cell were stained in a moderate or strong intensity.

**Results:** Of the 146 PT cases reviewed, 110 were classified as benign, 16 as borderline, and 20 as malignant. The correlation between age and size with benign, borderline, and malignant subgroups was statistically significant ( $p < 0.001$ ). Significance was observed in the expression of both Ki-67 and p53 in

the comparison of benign, borderline, and malignant PT with  $p < 0.001$  and a 95% confidence interval (CI). When correlating the presence of positivity in either of the two index tests with the diagnosis of borderline or malignant PT, we reached a sensitivity of 100% and a specificity of 91.8 ( $p < 0.001$ ; 95% CI).

**Conclusion:** We propose a practical methodology to achieve an accurate diagnosis of PT, based on clearly defined and easy to apply cutoffs of a simple immunohistochemical panel of Ki-67 and p53. A PT positive for either of the index tests should be graded as borderline or malignant. We hope this new approach might provide the basis for the development of standardization in using p53 and Ki-67 for grading PT with accuracy.

Keywords: phyllodes, immunohistochemistry, p53, Ki-67

## INTRODUÇÃO

Os tumores *phyllodes* (TP) são lesões bastante incomuns que correspondem a cerca de 0,3% de todos os tumores de mama e aproximadamente 2% do grupo de lesões fibroepiteliais, grupo este composto majoritariamente pelos fibroadenomas (1-3). A mediana da idade das mulheres com diagnóstico de tumor *phyllodes* é 44 anos, variando de 11 a 82 anos em diversas séries analisadas (2-5) com pico de incidência dos 45 aos 49 anos, sendo raramente encontrado em adolescentes e idosas (3, 6).

Os TP podem apresentar-se, do ponto de vista do exame clínico e em exames de imagem, como fibroadenomas, mas diferem destes por seu potencial de recidiva local e de metástase (1, 7-9). O TP da mama abrange um amplo espectro de comportamento biológico que vai desde o benigno, semelhante aos fibroadenomas, até o francamente maligno (5, 6, 10). Além da raridade, o diagnóstico anatomopatológico do tumor *phyllodes* é complicado pela natureza complexa da sua morfologia microscópica, associada ao diagnóstico diferencial com lesões morfologicamente similares e, ainda, pelo comportamento biológico variável dos seus subtipos (3, 11).

O diagnóstico histopatológico do tumor *phyllodes* tem por base uma constelação de parâmetros morfológicos microscópicos, que incluem o grau de atipia celular das células do estroma, o grau de celularidade estromal, a avaliação do índice mitótico em 10 campos de grande aumento, o grau de expansão estromal e as características das margens cirúrgicas (1, 5). O diagnóstico obtido através da análise detalhada desses parâmetros

morfológicos permite definir entidades com distintos comportamentos biológicos (benigno, *borderline* e maligno), tem elevada correlação com a sobrevida livre de recorrência (SLR), e é usado no aconselhamento e manejo clínico de pacientes diagnosticadas com TP (1, 6, 12, 13). Uma vez que três dos parâmetros morfológicos principais (atipia das células do estroma, o grau de celularidade estromal e avaliação do índice mitótico em 10 campos de grande aumento) apresentam três níveis de estratificação, há significativos desafios na busca da acurácia e reprodutibilidade diagnóstica (3, 6, 11, 13, 14).

Nesse cenário, um diagnóstico pré-operatório correto, em material de biópsia, permitiria um adequado planejamento cirúrgico, reduzindo a necessidade de reintervenção, quer seja para obter margens livres ou tratar uma recidiva local (1, 3).

A controvérsia em relação ao diagnóstico histopatológico preciso do tumor *phyllodes* tem impulsionado uma série de estudos focados em marcadores biológicos, principalmente estudos imuno-histoquímicos, na busca de indicadores prognósticos. Entre os diversos marcadores estudados, destacam-se a expressão de p53 e de Ki67, e sua relação com fatores prognósticos como a sobrevida livre de recorrência (SLR) e sobrevida global (SG) (15-24). Estudos publicados em 2017 e 2018 revelam que o TP53 é o gene mais frequentemente mutado em casos de tumor *phyllodes* maligno, tanto na doença localizada quanto na metastática (25, 26). Outro aspecto interessante é a identificação de mutações do TP53 em linhagens germinativas, ou síndromes genéticas como Li-Fraumeni, e a sua relação com o aumento significativo da frequência de tumores *phyllodes* nessas populações.

Tal associação foi identificada recentemente no Estado do Rio Grande do Sul (27).

A expressão de p53 em estudos imuno-histoquímicos apresenta correlação com a progressão tumoral, portanto tem relação direta com o índice mitótico e com o percentual de positividade para Ki67 (28), além de correlacionar-se com o grau do tumor *phylloides* (8, 23).

A subjetividade na interpretação dos achados microscópicos, a relativa sobreposição dos critérios histológicos e a correlação subótima entre a classificação histológica e o comportamento clínico, associados à ausência de um sólido painel molecular preditivo da evolução da doença, fazem com que a investigação aprofundada da patogênese desses tumores seja objeto de ativa pesquisa científica (2, 22, 24).



## REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

### Estratégia de busca de referências bibliográficas

Foi dada preferência a artigos originais, revisões, consensos e meta-análises. Relatos de casos foram incluídos quando tratavam de situação especial que tivesse relação com o objetivo específico do estudo.

Os termos de busca, *phylloides*, *p53*, *immunohistochemistry* e *Ki67*, foram combinados aos pares.

Inicialmente foram buscadas referências dos últimos 18 anos, entretanto alguns artigos da década de 90 acabaram sendo incluídos por sua relevância.

Somente artigos de tumores em mulheres foram selecionados.

Das 87 referências citadas, 82 correspondem a artigos na íntegra e 5 a resumos.

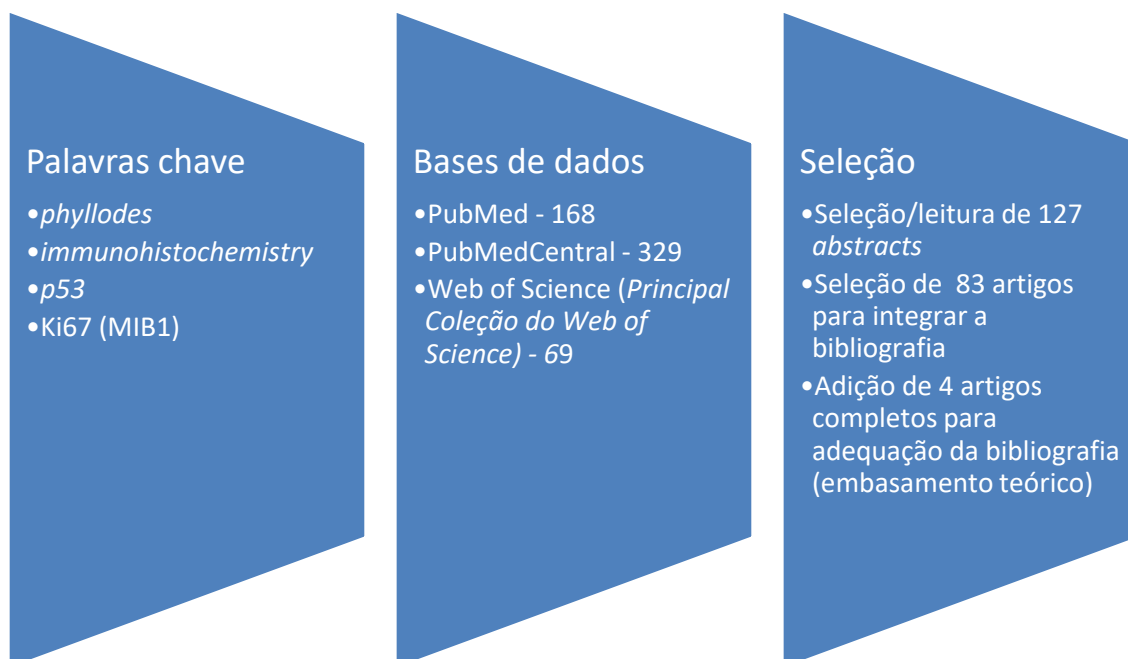


Figura 1 – Revisão sistemática da literatura

## Marco conceitual esquemático

A escolha do tema surge da necessidade de encontrar-se um marcador biológico que contribua para o aumento da acurácia diagnóstica do tumor *phyllodes* da mama, permitindo um planeamento cirúrgico adequado.

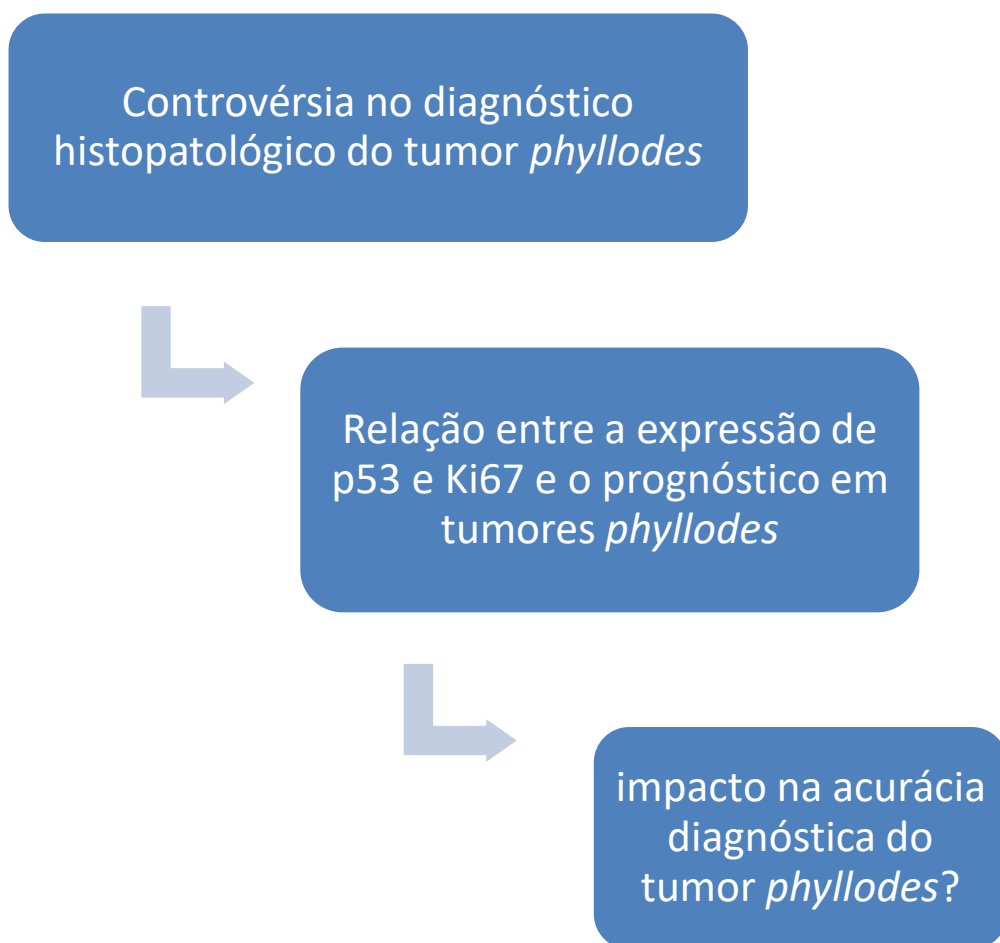


Figura 2 – Marco conceitual esquemático

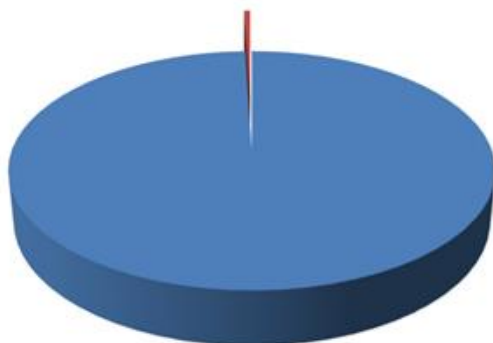
## Tumor *phyllodes* da mama

### Aspectos gerais

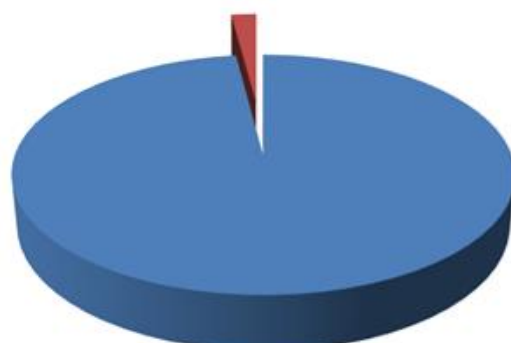
Os tumores fibroepiteliais da mama, fibroadenoma e tumor *phyllodes*, representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias, que do ponto de vista histopatológico, correspondem a lesões bifásicas compostas por proporções variáveis de células epiteliais, componente não-neoplásico da lesão, e células do estroma, componente neoplásico do tumor (2, 5). O primeiro relato de uma lesão com as características do tumor *phyllodes* data de 1827 e foi feito do Chelius (3), sendo que Johannes Muller (1838) foi o primeiro a utilizar o termo *cystosarcoma phyllodes* para descrever essa entidade. Até 1943 acreditava-se ser um tumor benigno, quando Cooper e Ackerman relataram o seu potencial maligno (3, 29). A classificação da OMS de tumores da mama (*World Health Organization classification of tumours of the breast*) de 1982 considerou o termo atualmente utilizado, tumor *phyllodes*, como sendo o mais adequado entre dezenas de outros sinônimos usados até então (30). Essa mesma publicação adotou a subclassificação proposta por Rosen, definindo o TP em graus benigno, *borderline* e maligno, baseada em critérios histológicos (3, 30). A mais recente classificação da OMS, na sua 4ª edição de 2012, atualmente a classificação histopatológica hegemônica de tumores da mama, persiste com a divisão dos TP em graus benigno, *borderline* e maligno (5, 6).

Os TP são lesões bastante incomuns que correspondem de 0,3% a 0,5% de todos os tumores de mama (figura 3) e cerca de 2% a 3% do grupo de lesões fibroepiteliais da mama (figura 4), grupo este composto majoritariamente

pelos fibroadenomas (1-3). Os TP ocorrem tipicamente em mulheres entre 35-55 anos de idade (1, 3, 6), com pico de incidência dos 45 aos 49 anos, sendo raramente encontrado em adolescentes e mulheres idosas (3, 6).



**Figura 3**



**figura 4**

Figura 3 - Frequência relativa do TP na classificação dos tumores da mama.

Figura 4 – Frequência relativa do TP no grupo dos tumores fibroepiteliais.

Os TP podem apresentar-se, do ponto de vista do exame clínico e em exames de imagem, como fibroadenomas, mas diferem destes por seu potencial de recidiva local e de metástase (1, 7-9). Os critérios para a realização do diagnóstico anatomopatológico e graduação histológica dos TP da mama, que permitem a determinação do provável comportamento biológico de uma lesão e, por consequência, a definição da terapêutica mais adequada, atualmente, estão bem estabelecidos na literatura (2, 5, 6, 31).

O TP da mama abrange um amplo espectro de comportamento biológico que vai desde o benigno, semelhante aos fibroadenomas, até o francamente maligno (5, 6, 10). Essas categorias são definidas tendo por base uma

constelação de parâmetros morfológicos microscópicos, que incluem o grau de atipia celular das células do estroma, o grau de celularidade estromal, a avaliação do índice mitótico em 10 *HPF* (campos de grande aumento ao microscópio), grau de expansão estromal e as características das margens cirúrgicas (1, 5). O diagnóstico obtido através da análise detalhada desses parâmetros morfológicos, observados no espécime de ressecção completa da lesão, permite definir entidades com distintos comportamentos biológicos (benigno, *borderline* e maligno), tem elevada correlação com a SLR, e é usado no aconselhamento e manejo clínico de pacientes diagnosticadas com tumor *phyllodes* (1, 6, 12, 13).

Baseados nos critérios histológicos citados acima, o TP é historicamente mais comum em mulheres com idade mais elevada do que a da população onde são encontrados os fibroadenomas (6). A mediana da idade das mulheres com diagnóstico de TP é 44 anos, variando de entre 11 e 82 anos em diversas séries analisadas (2-5). Os TP também são, de um modo geral, maiores que os fibroadenomas. O tamanho médio, em diversas séries, é de cerca de 8,0 centímetros, com mediana de 6,5 cm, variando entre 1,5 cm e 29,0 cm de diâmetro (2, 3, 5, 31, 32). Outro aspecto relacionado ao tamanho, é que os TP malignos são, em média, maiores do que os *borderline*, que por sua vez são maiores do que os TP benignos (2, 32). A frequência relativa dos 3 graus, benigno, *borderline* e maligno, varia bastante na literatura. Em absolutamente todas as séries analisadas, o TP benigno é o mais prevalente entre os três graus, variando entre 65% e 75% de todos os casos diagnosticados. Existe relativa controvérsia na literatura em relação à frequência relativa dos tumores

malignos e *borderline*, que correspondem a aproximadamente 10% e 20%, respectivamente (2, 4, 6, 32, 33).

Uma vez que cada um dos três dos parâmetros morfológicos principais (atipia das células do estroma, o grau de celularidade estromal e avaliação do índice mitótico em 10 campos de grande aumento) apresenta três níveis de estratificação, há significativos desafios na busca da acurácia e reprodutibilidade diagnóstica (3, 6, 11, 13, 14). Além das dificuldades relacionadas à graduação, o tumor *phyllodes* benigno mostra características anatomopatológicas que muitas vezes se sobrepõem àquelas do fibroadenoma celular (11). No outro extremo do espectro, o tumor *phyllodes* maligno pode ser confundido com um sarcoma primário da mama ou mesmo um carcinoma metaplásico da mama (2, 15, 34, 35). A distinção entre tumor *phyllodes* benigno e fibroadenoma do tipo celular é especialmente problemática. De fato, uma paciente com diagnóstico de lesão fibroepitelial com estroma celular (LFEC) diagnosticada por biópsia é frequentemente submetida à ressecção cirúrgica completa do nódulo. O objetivo desta conduta, além da busca da definição diagnóstica é a obtenção de uma margem cirúrgica de segurança, no caso do diagnóstico final corresponder a um tumor *phyllodes*. Embora essa estratégia seja usual, não há um consenso na literatura que a justifique (36-38).

Estudo publicado na *Modern Pathology* em 2007 demonstra que os tumores *phyllodes* podem ser segregados em 2 grupos baseado em critérios genéticos. Uma série de 30 casos demonstrou desequilíbrios cromossômicos em 55%, 91% e 100% dos tumores *phyllodes* graduados como benigno, *borderline* e maligno, respectivamente. A análise permitiu uma distinção

significativa ( $p < 0.01$ ) entre benigno de um lado e *borderline* e maligno de outro (39). Outro artigo publicado em 2017 segrega tumores *phyllodes* malignos e *borderline* num grupo genético e tumores *phyllodes* benignos e fibroadenomas em outro (7). Apesar da similaridade genética entre os fibroadenomas e os tumores *phyllodes* benignos, apontada por esses e por alguns outros estudos, (7, 40, 41), a progressão do primeiro para o último é um evento bastante raro em relatos da literatura (2, 42). Igualmente incomum é a transformação de um caso bem documentado, do ponto de vista histopatológico, de tumor *phyllodes* benigno em um tumor *phyllodes* maligno (29).

Na maior série publicada sobre tumores *phyllodes* originados de uma única instituição, Tan, P.H analisa o papel prognóstico dos parâmetros morfológicos em tumores de 355 mulheres asiáticas com diagnóstico de tumor *phyllodes*. Nessa análise, a distribuição dos graus benigno 74,6%, *borderline* 16,1% e maligno 9,3%, mostrou-se similar aos dados publicados no ocidente (10, 32).

A transformação maligna do componente epitelial, não-neoplásico, do tumor *phyllodes* é um evento extremamente incomum com raros relatos na literatura (43, 44). Por outro lado, a ocorrência de carcinomas infiltrantes, dos tipos ductal e lobular, ou ainda carcinoma *in situ*, associados ao tumor *phyllodes*, é descrita de várias formas. Pode-se encontrar um carcinoma em meio ao tumor *phyllodes*, ou em um nódulo separado na mesma mama, ou ainda, na mama contralateral. A detecção de um carcinoma na mama ipsilateral constitui-se na quase totalidade dos relatos, em um achado ocasional durante

exame anatomopatológico da peça cirúrgica ressecada em função do diagnóstico de tumor *phyllodes* (43, 44).

O diagnóstico exato e a classificação dos tumores *phyllodes* são importantes para o manejo e prognóstico do paciente, pois o grau histológico correlaciona-se amplamente com o aumento do risco de recorrência local, sendo que apenas os tumores malignos apresentam significativo comportamento metastático (45-47). Nesse cenário, um diagnóstico pré-operatório correto, em material de biópsia, permite um adequado planejamento cirúrgico, reduzindo a necessidade de reintervenção cirúrgica, quer seja para a obtenção de margens livres ou para tratar uma recidiva local (1, 3).

Os tumores *phyllodes* da mama são enigmáticos do ponto de vista de diagnóstico e manejo terapêutico, o que gera a necessidade de marcadores que auxiliem na determinação do seu potencial comportamento clínico (48). A controvérsia em relação ao diagnóstico histopatológico preciso do tumor *phyllodes* tem impulsionado uma série de estudos focados em marcadores biológicos, em especial estudos imuno-histoquímicos, na busca de achados que tenham relação com a sobrevida livre de recorrência (SLR) e SG (15-24).



### Diagnóstico histopatológico – critérios

Além da raridade, o diagnóstico é dificultado pela natureza complexa da morfologia microscópica, associada ao diagnóstico diferencial com lesões morfológicamente similares e pelo comportamento biológico variável dos seus subtipos (3, 11).

Diferentemente do carcinoma mamário, o tumor *phyllodes* não se origina dos lóbulos e ductos da mama, mas sim da proliferação neoplásica do tecido conjuntivo que circunda essas estruturas (3, 5, 31). Ao englobar essas estruturas epiteliais residuais, não-neoplásicas, o tumor *phyllodes* adquire uma característica bifásica semelhante ao fibroadenoma com estroma hiper celular (3-5). Com o crescimento exagerado do estroma neoplásico observam-se a formação de fendas, cistos e um padrão papilar ou foliáceo (figura 5) característico, observado nesses espaços revestidos por epitélio (4). O estroma neoplásico do tumor *phyllodes* pode ser morfológicamente brando e lembrar o do fibroadenoma, ou pode ser atípico como o de um sarcoma de tecidos moles, ou ainda intermediário entre esses dois extremos, lembrando um sarcoma de baixo grau (4, 11).

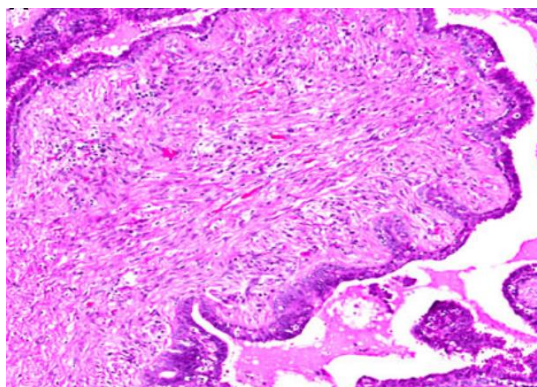


Figura 5 – Padrão foliáceo do tumor *phyllodes* – Adaptado de Tan, B e colaboradores (2016).

O TP é distinguido primariamente do fibroadenoma através da análise microscópica, devido ao característico padrão foliáceo produzido pela proliferação estromal intracanalicular exagerada que envolve os ductos (8, 14). Somam-se fatores adicionais como hiper celularidade estromal e índice mitótico elevado. Macroscopicamente, os TP lembram o fibroadenoma em função da aparente circunscrição, crescimento nodular e coloração amarelo-acinzentada (3, 4, 8, 49). Lesões maiores podem apresentar hemorragia e necrose, sendo que os TP malignos podem ter superfície amolecida, lembrando um sarcoma de tecidos moles (8, 47).

Segundo a classificação da OMS de tumores da mama, publicada em 2012 (5), a estratificação dos TP em benigno, *borderline* e maligno, é baseada na aplicação combinada de 5 critérios histológicos, grau de atipia celular estromal, grau de hiper celularidade, índice mitótico, supercrescimento estromal e característica da borda tumoral. Portanto, de uma forma geral, um TP é diagnosticado quando a arquitetura fibroepitelial da lesão apresenta um padrão intracanalicular exagerado com formação de estruturas foliáceas que protraem em cavidades císticas, acompanhada de hiper celularidade estromal. A graduação destes e dos demais critérios permite a estratificação dos TP em benigno, *borderline* e maligno (8).

Interessante estudo publicado em 2018 por Chang et al (6), analisa o impacto da classificação OMS de 2012 na frequência relativa dos diagnósticos de TP e fibroadenoma. A análise retrospectiva baseia-se nos diagnósticos anatomopatológicos dessas entidades, realizados no período de 2007-2017. Ao analisar 305 espécimes de ressecção, não foram observadas diferenças

significativas em relação à idade média, etnia e apresentação clínica, nos casos diagnosticados antes e depois de 2012. Entretanto, observou-se um aumento dos diagnósticos de tumor *phyllodes* benigno após 2012 e uma relativa redução dos diagnósticos de fibroadenomas, supostamente em função da aplicação mais metódica dos critérios morfológicos descritos na classificação da OMS (6). Apesar disso, ocasionalmente um fibroadenoma pode apresentar moderada celularidade, mimetizando um tumor *phyllodes*, bem como um tumor *phyllodes*, por sua característica heterogênea, pode apresentar áreas similares as de um fibroadenoma (3, 8).

O diagnóstico e graduação acurados, e reprodutíveis, tem sido um desafio na literatura, que historicamente levou à criação de múltiplos parâmetros histológicos para serem analisados. A variação interobservador na avaliação desses parâmetros é uma controvérsia importante e que aguarda uma solução definitiva (2, 11, 13). Segundo Chan, Y.J et al é frequentemente difícil prever o comportamento biológico dos tumores *phyllodes*, baseado puramente em aspectos histológicos, em casos individuais (50). Embora, segundo Yang et al (8), alguns marcadores imuno-histoquímicos possam auxiliar no diagnóstico diferencial, a avaliação histopatológica persiste como o *gold standart* (padrão ouro) na definição do diagnóstico e graduação precisos (8, 51).

### Diagnóstico histopatológico - comportamento biológico

Pacientes com diagnóstico de tumor *phyllodes* tem, em média, de 10 a 20 anos a mais do que as pacientes com diagnóstico de fibroadenoma, sendo o tumor *phyllodes* frequentemente maior que os fibroadenomas (8, 52).

Ao estudar retrospectivamente 106 pacientes com atenção aos aspectos terapêuticos e prognósticos, os autores observaram índices de SG e SLR significativamente superiores naquelas pacientes submetidas a mastectomia radical, comparada a ressecção local, quando o diagnóstico era de tumor *phyllodes* maligno. A idade média das pacientes (39,5 anos), o tamanho médio das lesões (8,3 cm), e a subdivisões em benigno (cerca de 60%), *borderline* (cerca de 15%) e maligno (cerca de 25%), eram algo similares a outras séries publicadas na literatura, que mostram os tumores *borderline* ora como mais frequentes que os malignos, ora como menos frequentes (3, 4, 53). Em análise univariada, os aspectos histológicos, como atipia citológica, índice mitótico e status das margens, mostraram ter valor prognóstico significativo, e a cirurgia radical foi considerada o procedimento de escolha para o tratamento dos tumores *phyllodes* malignos (53). Embora a recorrência local possa ocorrer em todos os graus de tumor *phyllodes*, dependendo do status das margens cirúrgicas, ela é mais frequente no tumores graduados como *borderline* e maligno, sendo que somente esses 2 graus estão associados a recorrência sistêmica (2-4, 31, 37, 54). Em estudo que avaliou a SG e a SLR em 41 pacientes tratados por cirurgia de ressecção completa com limites cirúrgicos livres de doença, em acompanhamento médio de 42 meses, observou-se

recorrência sistêmica em 9 casos, todos diagnosticados como tumores *phyllodes* maligno (54).

A classificação histopatológica é o fator prognóstico mais importante em tumores *phyllodes*. A conclusão baseou-se na análise de 33 pacientes com tumor *phyllodes*, de um universo de 5270 pacientes com neoplasias primárias da mama, o que corresponde a cerca de 0,63% de todos os tumores. O acompanhamento clínico revelou recorrência local em 50% dos tumores *phyllodes* graduados como maligno, 20% dos *borderline* e apenas 8% dos benignos. A ocorrência de metástase, em 3 pacientes (9%), restringiu-se aos tumores malignos (55).

Em 2012, no mesmo ano em que foi publicada a classificação da OMS de tumores da mama (5), que consolida a estratificação dos tumores *phyllodes* em benigno, *borderline* e maligno, baseada na aplicação combinada de 5 critérios histológicos, atipia celular estromal, hiper celularidade, índice mitótico, supercrescimento estromal e característica da borda tumoral (33), estudo liderado por Tan (56) propôs a utilização de um nomograma, chamado de AMOS, para a predição do risco de SLR. O nomograma baseia-se em alguns, mas não todos os critérios clássicos adotados pela OMS (5, 53, 55, 57) e acrescenta o status das margens cirúrgicas. A série do estudo era composta por 605 tumores, 72,7% benignos, 18,4% *borderline* e 8,9% malignos. Num período de acompanhamento de 1, 3, 5 e 10 anos ocorreram 12 mortes (2%). A conclusão dos pesquisadores é que a aplicação do nomograma AMOS (composto por atipia celular, índice mitótico, supercrescimento estromal e status das margens cirúrgicas) pode prever com mais precisão a SLR em um

paciente com diagnóstico de tumor *phyllodes* e deve ser usada como uma ferramenta auxiliar no manejo clínico (56).

Tumores *phyllodes* malignos, se inadequadamente tratados, tem propensão para crescimento rápido e disseminação metastática (3, 31, 47, 58). No entanto, não há um consenso em relação ao que deve ser considerada uma margem de segurança adequada para o tratamento dos tumores *phyllodes* borderline e malignos (38, 46). No caso dos tumores *phyllodes* malignos, e ocasionalmente nos *borderline*, ao analisarmos microscopicamente o componente metastático, observamos que é representado exclusivamente pelo estroma sarcomatoso, estando ausente o componente epitelial, sendo os pulmões, ossos, coração e fígado os locais mais frequentes de disseminação metastática (58). Esse comportamento contrasta com o tumor *phyllodes* benigno, que do ponto de vista clínico e radiológico pode ser indistinguível do fibroadenoma e é curável com cirurgia local. Com o aumento da adoção do manejo não-cirúrgico dos fibroadenomas, essa distinção aumenta sua importância (3, 59). Inclusive, segundo Ouyang et al (59), a necessidade de reintervenção cirúrgica para a obtenção de margens cirúrgicas de segurança em tumores *phyllodes* diagnosticados como benignos é um procedimento questionável e precisaria de mais estudos prospectivos para avaliar a sua real necessidade e eficácia quando comparado apenas ao acompanhamento pós-biópsia. Estudo publicado em 2017 analisou as diferenças em relação ao tratamento cirúrgico complementar escolhido para os casos de tumores *phyllodes* benignos ressecados, mas com laudo anatomopatológico informando que a lesão estava presente junto às margens cirúrgicas (45). A análise não

revelou diferença significativa em relação ao risco de recorrência local, entre as pacientes que realizaram cirurgia de ampliação de margens e aquelas em que se optou apenas por observação. A conclusão dos autores é que nesses casos deve ser adotada uma conduta conservadora, uma vez que a reintervenção cirúrgica não teve impacto significativo no desfecho (45). Uma ampla revisão sobre o assunto, publicada no mesmo ano, e que incluiu 12 estudos totalizando 1702 pacientes, chegou a conclusões similares (38). Embora uma margem de 1,0 cm seja tradicionalmente referida como adequada para todos os tumores *phyllodes* (37, 38, 45), a análise dos estudos não demonstrou diferença significativa em relação à recorrência dos tumores *phyllodes* benignos, quando a margem era entre 0,1 cm e 1,0 cm. Este fato levou à conclusão, por parte dos pesquisadores, de que uma margem de 0,1 cm é adequada para o tratamento do tumor *phyllodes* benigno (38). Estudo retrospectivo canadense que analisou os resultados do tratamento cirúrgico de 142 pacientes, com diagnóstico de tumor *phyllodes* benigno, *borderline* e maligno, realizado em centro de referência para o tratamento de câncer de mama, também concluiu que uma margem cirúrgica livre, de pelo menos 0,1 cm, é adequada para prevenir recorrência da lesão (37).

### Diagnóstico histopatológico - biópsia por agulha grossa

A biópsia por agulha grossa pré-operatória tem se tornado um procedimento essencial para o adequado manejo clínico das pacientes com lesões mamárias de diversas naturezas (8, 60). Em termos gerais, a biópsia por agulha grossa apresenta elevado valor preditivo positivo e negativo para o diagnóstico de neoplasias epiteliais (36, 60), entretanto um diagnóstico acurado em neoplasias fibroepiteliais é frequentemente um desafio, devido a heterogeneidade típica desse tipo de tumor (8, 11, 61).

A proposta de realizar-se o diagnóstico pré-operatório em biópsias por agulha grossa tem por finalidade determinar as opções de manejo da paciente (9, 60), sendo que a necessidade em distinguir-se o tumor *phyllodes* do fibroadenoma reside no fato de que o primeiro necessita de ressecção cirúrgica com margens livres, enquanto que o fibroadenoma pode ser simplesmente enucleado, ou conservadoramente observado (9, 32, 62).

Em amostras limitadas, como biópsias por agulha grossa, dilemas diagnósticos podem ocorrer entre tumores benignos ou mesmo tumores *borderline* e fibroadenomas (8, 60, 63). Além do padrão intracanalicular e leve a moderada celularidade estromal, que podem estar presentes tanto em fibroadenomas como em tumores *phyllodes*, as margens circunscritas e um leve grau de atipia de células estromais também são aspectos morfológicos compartilhados pelos *phyllodes* e ocasionais fibroadenomas (63). Portanto, uma biópsia por agulha grossa de lesão nodular da mama com achados de lesão bifásica com hiper celularidade estromal e alguma atipia citológica, pode corresponder a um subtipo de fibroadenoma conhecido como fibroadenoma



celular ou a um tumor *phyllodes*. Nesses casos, muitos autores recomendam que o termo lesão fibroepitelial com estroma celular (LFEC) seja usado no diagnóstico da biópsia, relegando o diagnóstico conclusivo para a análise do espécime de ressecção cirúrgica (9, 62). Em estudo que analisou retrospectivamente os casos com diagnóstico indefinido de LFEC ao longo de 5 anos (63), observou-se que cerca de dois terços das pacientes acabaram sendo submetidas a ressecção cirúrgica da lesão. Os diagnósticos foram fibroadenoma (62,5%), tumor *phyllodes* benigno (29,2%) e tumor *phyllodes* borderline (8,3%). Nenhum tumor *phyllodes* maligno foi encontrado entre os casos.

Um diagnóstico pré-operatório indefinido pode levar a consequências estéticas indesejáveis, resultantes de um tratamento desnecessariamente agressivo para um fibroadenoma, como também pode resultar em ressecção incompleta de um tumor *phyllodes* com consequente risco de recidiva local ou necessidade de reintervenção cirúrgica (9, 63).

Fibroadenomas são usualmente diagnosticados com facilidade em biópsias por agulha grossa, segundo Jacobs *et al.* (62). Entretanto, o diagnóstico diferencial das chamadas lesões fibroepiteliais com estroma celular, inclui o fibroadenoma celular e o tumor *phyllodes*. A análise que tentou identificar fatores que poderiam prever o diagnóstico definitivo observado nos espécimes de ressecção, consistiu de 29 biópsias com diagnóstico de lesão fibroepitelial com estroma celular, incluindo diagnósticos como fibroadenoma celular, fibroadenoma com hiper celularidade estromal, lesão fibroepitelial com estroma celular e tumor *phyllodes*. A correlação do diagnóstico por biópsia,

revisada por 2 patologistas, foi realizada com os achados histológicos do espécime de ressecção. O grau de celularidade e o índice mitótico, analisados em biópsias por agulha grossa, mostraram-se úteis na distinção entre fibroadenoma e tumor *phyllodes* nesse estudo (62). Outro estudo que buscou identificar quais aspectos histológicos estariam mais fortemente relacionados ao diagnóstico posterior de tumor *phyllodes* nos espécimes de ressecção, focou-se em biópsias por agulha grossa com diagnóstico de lesão fibroepitelial, nas quais a possibilidade de tratar-se de um tumor *phyllodes* não podia ser descartada. Os critérios histológicos estudados que apresentaram correlação estatística foram, a característica das bordas da lesão ( $p < 0.001$ ), a celularidade estromal ( $p = 0.001$ ), a expansão estromal ( $p < 0.001$ ), a atipia nuclear de células estromais ( $p < 0.001$ ) e o índice mitótico ( $p < 0.001$ ) avaliados em 261 espécimes de biópsia por agulha grossa (9). No mesmo ano, Morgan, J.M. et al publica uma série de 112 biópsias por agulha grossa com o objetivo de analisar quais variáveis histológicas tem maior relação com o diagnóstico final de tumor *phyllodes* em espécimes de ressecção (57). Em 95% dos casos a categorização baseada nos achados presentes no espécime de biópsia foi correta, sendo que as variáveis mais relevantes foram índice mitótico e expansão estromal. Os autores comentam que outras variáveis não morfológicas devem também ser levadas em consideração, em caráter multidisciplinar, ao tomar-se a decisão em relação ao manejo clínico mais adequado em lesões cujo diagnóstico é duvidoso, tais como história de crescimento recente da lesão, tamanho e características radiológicas consideradas suspeitas (57). Em relação ao aspecto clínico-radiológico, um estudo multidisciplinar testou a hipótese do tamanho da lesão, maior que 3,0

cm, como critério para a indicação de ressecção cirúrgica (64). Os achados do estudo refutaram a hipótese de que lesões fibroepiteliais com mais de 3,0 cm não seriam adequadamente avaliadas pela biópsia de agulha grossa. A conclusão dos autores ao revisar os aspectos clínicos, radiológicos e histopatológicos de 290 espécimes de ressecção com diagnóstico prévio por biópsia de fibroadenoma, é de que o tamanho da lesão, isoladamente, não justifica a indicação de ressecção (64).

Ao comparar o resultado cirúrgico de 51 casos de lesão mamária categorizada radiologicamente como BI-RADS 3 em exame de imagem e diagnosticadas como tumor *phyllodes* em biópsia por agulha grossa, os autores concluíram que a biópsia por agulha grossa é uma ferramenta valiosa na análise pré-operatória do tumor *phyllodes* (61). O estudo mostrou que em 76,5% dos casos a ressecção cirúrgica confirmou o diagnóstico da biópsia de tumor *phyllodes*, sendo que os 23,5% restantes correspondiam a fibroadenomas. Entre os 39 casos diagnosticados como tumor *phyllodes* havia 30 benignos, 4 borderline e 5 malignos. Entretanto, os autores ressaltaram que ocasionalmente a biópsia por agulha grossa não permite um diagnóstico diferencial acurado entre um fibroadenoma e um tumor *phyllodes* benigno, e pode ser muito difícil distinguir um tumor *phyllodes* benigno de um *borderline* (61).

## Marcadores imuno-histoquímicos em tumor *phyllodes*

### P53 – aspectos gerais

A transformação de uma célula normal em neoplásica é um processo complexo, acompanhado de múltiplos passos de alterações genéticas e epigenéticas, que conferem vantagens seletivas às células alteradas. Tais alterações subjacentes da tumorigênese são consideradas como capazes de contribuir na evolução do tumor, como autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais anti-crescimento, evasão da morte celular programada, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada e capacidade para invadir os tecidos circunjacentes e metastatizar (65). Apesar da gigantesca diversidade de genes implicados na tumorigênese, o fator de transcrição p53, codificado no gene *TP53*, destaca-se como o principal supressor tumoral e regulador de várias vias de sinalização envolvidas nesse processo (65, 66). O *TP53* é considerado um gene supressor tumoral que expressa a proteína p53 a qual, diante de danos ao DNA, interrompe a progressão do ciclo celular e causa apoptose (67). A inativação funcional do gene supressor tumoral *TP53* é um evento muito frequente na carcinogênese e, na maioria dos casos, a alteração do gene *TP53* corresponde a uma mutação, dando origem a uma proteína mutante estável cujo acúmulo é considerado como uma característica das células neoplásicas. O gene *TP53* mutante não só perde as suas atividades supressoras tumorais, mas muitas vezes ganha funções oncogênicas adicionais que conferem vantagens relacionadas ao crescimento e sobrevivência da célula neoplásica (65, 66).

A mutação do gene *TP53* é a alteração molecular mais comum e a mais frequentemente estudada entre todos os tipos de cânceres. Muitos estudos têm investigado a sua importância no diagnóstico, prognóstico, e no tratamento de tumores de vários tipos e de diferentes órgãos. Por exemplo, a presença de mutação no gene *TP53* em tumores do tipo colorretal, do pulmão, da próstata, do endométrio e nos carcinomas mamários tem sido demonstrada como sendo um fator de mau prognóstico (66-68). Estudos publicados em 2017 e 2018 revelam que o *TP53* é o gene mais frequentemente mutado em casos de tumor *phylloides* maligno, tanto na doença localizada quanto na metastática (25, 26).

Apesar de o sequenciamento de nucleotídeos ser considerado a técnica mais confiável para detectar a mutação, trata-se de exame bastante trabalhoso, que consome muito tempo e tem alto custo, o que limita a sua aplicação prática no diagnóstico assistencial, fora do ambiente de pesquisa. A análise imuno-histoquímica da expressão da proteína p53 é, portanto, comumente usada como substituta para a pesquisa da mutação do *TP53*. Tem sido universalmente aceito que a proteína p53 de fenótipo selvagem é relativamente instável e tem uma meia-vida curta, o que faz com que seja praticamente indetectável por exame imuno-histoquímico (48, 69). Em contraste, a proteína p53 mutante tem uma meia-vida muito mais longa, criando um alvo estável para detecção imuno-histoquímica (65, 70). O princípio da detecção imuno-histoquímica para a p53 baseia-se na suposição de que a proteína anormal não consegue agir como fator de transcrição e portanto acumula-se no núcleo da célula tumoral (48, 69). Estima-se que cerca de 95% das mutações envolvendo o *TP53* apresentem positividade para a p53 ao exame imuno-histoquímico,

entretanto padrões de mutação menos frequentes do *TP53* podem mostrar-se negativos ao exame imuno-histoquímico, bem como a positividade de intensidade fraca pode estar relacionada aos outros fatores que não a mutação, como a estabilização da p53 tipo selvagem por fatores citoplasmáticos (71-73).

Outro aspecto interessante é a identificação de mutações do *TP53* em linhagens germinativas, ou síndromes genéticas como Li-Fraumeni, e a sua relação com o aumento significativo da frequência de tumores *phyllodes* nessas populações. Tal associação foi identificada recentemente no Estado do Rio Grande do Sul (27). A síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome de câncer familiar que predispõe a um amplo espectro de tumores, como sarcomas, tumores cerebrais, adrenocorticais e mamários, além de diversos outros tipos. O diagnóstico baseia-se na análise de critérios clínicos somados à detecção da mutação do *TP53* em linhagem germinativa. Uma associação entre tumor *phyllodes* e síndrome de Li-Fraumeni tem sido proposta por diversos autores (27, 72, 74-76).

### p53 – resultados reportados

A expressão de p53 está associada a fatores prognósticos adversos já conhecidos, mas não parece ser útil da determinação do risco de recorrência do tumor ou da sobrevida a longo prazo (73). Essa foi a conclusão do autor do artigo, Dr. R M Feakins, patologista do Royal London Hospital, ao testar a expressão imuno-histoquímica de p53 (clone DO7) em 57 tumores *phyllodes*, divididos entre malignos, *borderline* e benignos. Entretanto, foi observada uma associação direta entre a expressão de p53 e a graduação do tumor. Essa associação, estatisticamente significativa, também foi verificada ao analisarem-se os critérios que compõem o grau, como atipia celular, índice mitótico, expansão estromal e margens infiltrativas (73). Em artigo publicado 6 anos antes, Kim, C.J. e Kim, W.H. relatam uma grande associação entre a expressão imuno-histoquímica, usando-se o anticorpo p53 (clone DO7) e o diagnóstico diferencial entre 7 tumores *phyllodes* malignos, com positividade ainda que focal nas células estromais, e 8 tumores *phyllodes* benignos, negativos para o marcador. A associação mostrou-se estatisticamente significativa, com  $p < 0,005$ . Os autores sugerem que o teste possa ser usado como um adjunto ao diagnóstico de tumores *phyllodes* (77). Assim como no artigo de Feakins, os autores coreanos observaram que a positividade estava restrita às células estromais do tumor *phyllodes* (73, 77). Em artigo publicado na *Histopathology*, os autores relatam que a positividade imuno-histoquímica para a p53 em células estromais do tumor estava restrita aos tumores *phyllodes* malignos. Essa conclusão baseou-se na análise de 6 tumores *phyllodes* malignos, 9 benignos e 20 fibroadenomas. Concluem afirmando que esse padrão

característico de expressão imuno-histoquímica, utilizando o clone DO7, pode ter valor diagnóstico e sugerem um estudo com um grupo maior de casos para avaliar a sua utilidade (78). Baseados na relação observada em sarcomas de partes moles de que a expressão de p53 relaciona-se com o fenótipo agressivo e com a evolução clínica, em artigo publicado na revista *Cancer* (68), pesquisadores americanos tentaram identificar se a mesma relação poderia ser encontrada nos tumores *phylloides* (79). No artigo publicado em 2001 na revista *Pathology Research and Practice*, esses autores oriundos de 5 diferentes departamentos de Patologia americanos afirmam que a expressão imuno-histoquímica para a p53, associada ao índice proliferativo elevado, só é observada em tumores *phylloides* malignos (79). Neste estudo foram avaliados 25 tumores *phylloides*, 12 classificados como malignos e 13 como benignos. A reação imuno-histoquímica, realizada em sistema automatizado Ventana Medical Systems, também utilizou o anticorpo monoclonal DO7. A análise e os escores foram realizados por 2 patologistas, de forma independente. A diferença na expressão da p53 mostrou-se estatisticamente significativa entre tumores benignos e malignos, com  $p=0.002$  utilizando-se o teste qui-quadrado. O único caso de tumor *phylloides* benigno em que foi observada expressão de p53, a positividade restringiu-se a 1% das células estromais neoplásicas. Diferentemente do estudo que evidencia a relação entre a expressão de p53 em sarcomas de tecidos moles e a evolução clínica (68), o estudo de Gatalica (79), bem como o de Feakins (73), encontra a associação apenas com a graduação e com o fenótipo de malignidade, mas não com a evolução clínica, frequência de recidiva local ou ocorrência de metástase. A explicação, segundo os autores, é multifatorial. É notório que os tumores *phylloides* raramente



metastatizam, o que dificultou a análise dos dados, que precisa de acompanhamento clínico muito longo, bem como grandes séries de pacientes. Já a recorrência local está, no caso dos tumores *phyllodes* da mama, intimamente relacionada ao status das margens cirúrgicas, e menos à agressividade histológica do tumor (73, 79). Estudo publicado por Niezabitowski *et al* analisou diversas variáveis potencialmente prognósticas em uma série de 118 casos de tumores *phyllodes* (28). A expressão de p53 por imuno-histoquímica foi estudada em 52 tumores *phyllodes* benignos, 24 *borderline* e 42 malignos. Todas as pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico. A recorrência local da doença foi observada em 17 pacientes com tempo médio de 23 meses, e cerca de 70% dos casos ocorrendo nos primeiros 3 anos após a cirurgia. Das treze pacientes que faleceram em decorrência da doença, 12 tinham tumores *phyllodes* malignos e uma tinha tumor *phyllodes borderline*. A expressão de p53 apresentou correlação direta com o índice mitótico e com o percentual de positividade imuno-histoquímica para Ki67, além de mostrar-se um fator prognóstico independente para SLR, num período médio de observação de 60 meses. Essa relação prognóstica depende de uma análise que leva em conta o percentual de células positivas e a intensidade da reação (28). A intensidade média da reação imuno-histoquímica para a p53 aumenta progressivamente nos tumores *phyllodes*, desde benignos, passando por *borderline*, até malignos. Essa conclusão de Tse *et al* (80) ao analisar uma série de 143 casos confirma estudos anteriores (73, 77-79) que correlacionam a expressão de p53 ao fenótipo maligno de tumor *phyllodes*. Os autores desse estudo publicado na revista *Modern Pathology* revisaram 87 tumores *phyllodes* benignos, 37 *borderline* e 19 malignos, usando o estudo imuno-histoquímico

para detectar a expressão de p53 de forma semi-quantitativa. A análise semi-quantitativa utilizada é similar ao escore empregado em estudo publicado do ano anterior (28), e baseia-se na intensidade da reação e no percentual de células tumorais positivas. O escore varia de 0 a 3, sendo que no escore 0 não é observada reação positiva. Os escores de 1 a 3 apresentam positividade com intensidade e percentual de expressão crescentes. O clone de p53 utilizado foi o mesmo de estudos anteriores, o DO-7. O estudo analisa a relação da expressão de p53 e os parâmetros morfológicos que estabelecem o diagnóstico de tumor *phyllodes*, além do papel da positividade para p53 no diagnóstico de malignidade (80). A população era formada majoritariamente por pacientes chineses, mas também por caucasianos, que apresentaram, como grupo, parâmetros clínicos e epidemiológicos similares a estudos anteriores (28, 79, 81). Quando analisados os escores, nenhum dos 87 tumores *phyllodes* benignos teve escore 3, embora 47% tenham pontuado zero, 43% pontuado 1 e 10% tenham obtido escore 2. A distribuição dos escores de 0 a 3 nos 37 tumores *phyllodes borderline* foi 43%, 38%, 16% e 3%, respectivamente. Dentre os 19 tumores malignos, 3 (16%) pontuaram zero, 4 (21%) receberam escore 1, 3 (16%) pontuaram 2 e 9 (47%) alcançaram escore 3. Usando ANOVA, os escores mostraram diferença significativa entre os 3 grupos (benigno, *borderline* e maligno), ao comparar-se o diagnóstico histopatológico com o escore de p53, com  $p < 0.0001$ . Quando correlacionado com as variáveis histológicas que estabelecem o diagnóstico de tumor *phyllodes*, a expressão de p53 não se mostrou estatisticamente significativa (80). A expressão de p53 correlaciona-se com o grau histológico, segundo Chan Y.J, em estudo que testou 13 tumores *phyllodes* malignos e 50 benignos (50). Os resultados

mostraram que 9 dos 13 tumores malignos expressaram p53 em mais de 10% das células neoplásicas. A mesma situação ocorreu em apenas 5 dos 50 tumores benignos. O teste exato de Fischer mostrou  $p < 0.005$ , quando aplicado às duas situações (50). Estudo realizado em espécimes de biópsia por agulha grossa tentou identificar fatores que poderiam prever o diagnóstico definitivo observado nos espécimes de ressecção (62). A população estudada consistiu de 29 biópsias com diagnóstico de lesão fibroepitelial com estroma celular (LFEC). Nessa categoria foram incluídos fibroadenoma celular, fibroadenoma com hiperplasia estromal, lesão fibroepitelial com estroma celular e tumor *phyllodes*. A correlação, revisada por 2 patologistas, foi realizada com os achados histológicos do espécime de ressecção e a expressão de p53. O diagnóstico original da biópsia, o diagnóstico definitivo e a expressão de p53 foram analisados cegamente. A correlação não demonstrou associação entre a expressão de p53 e o diagnóstico final (62). No terceiro artigo publicado no mesmo ano, a respeito das características morfológicas e imuno-histoquímicas de uma série de 355 tumores *phyllodes* de uma mesma instituição, Tan, P.H et al analisa a relação entre a expressão imuno-histoquímica de p53 e o prognóstico (82). A análise foi realizada a partir de áreas representativas das lesões. A expressão de p53, avaliando-se o percentual e a intensidade da reação, mostrou relação com o grau histológico, com  $p < 0.05$ , mas não se associou com o risco de recidiva. O autor conclui que, embora a expressão de p53 não tenha um papel preditivo de comportamento biológico, ela é útil ao corroborar o diagnóstico de malignidade, conforme apontado por estudos anteriores (50, 73, 82, 83). Diferentemente dos achados de estudos anteriores (50, 73, 80, 82, 84), que não encontraram associação entre o prognóstico do

paciente e a expressão de p53 por imuno-histoquímica, Yonemori, K. publicou uma série de 41 pacientes com relação direta entre positividade para p53 e SG e SLR (54). A positividade para p53 foi observada em apenas 1 de 20 tumores *phylloides* benignos, em nenhum *borderline* e em 9 de 16 malignos. A correlação entre a positividade para p53 e o diagnóstico de tumor *phylloides* maligno é similar à observada em estudos anteriores (73, 80, 82). A associação significativa entre o status do p53 e a SG e SLR levou os autores a recomendar que os pacientes cujos tumores apresentem positividade para p53 devam ter um acompanhamento pós-operatório mais cuidadoso (54).

A variabilidade inter observador, ao analisar a positividade para p53 por imuno-histoquímica usando escores percentuais, demonstrou concordância substancial entre quatro patologistas. O estudo avaliou a expressão percentual em carcinomas colorretais e o grau de concordância inter observador foi avaliado usando o coeficiente Kappa e o coeficiente de correlação *intraclass*. A conclusão dos autores é de que a elevada reprodutibilidade dos achados favorece o uso do marcador como fator prognóstico (69).

Embora a expressão imuno-histoquímica de p53 tenha se correlacionado com o tamanho tumoral e com o grau histológico, não foi útil na distinção entre casos considerados como de diagnóstico difícil, como alguns tumores *borderline* e malignos. Essa foi uma das conclusões que autores relataram após a análise de 76 tumores *phylloides* (24). Conclusão foi similar em estudo publicado em 2013 por Kukuc *et al* ao analisarem o impacto dos achados imuno-histoquímicos para p53, Ki67, receptores hormonais de estrógeno e progesterona e HER2. Entretanto os achados quantitativos de Ki67 e p53

correlacionaram-se com o grau do tumor *phyllodes* (8, 23). O limite utilizado pelos autores na análise da expressão de p53 e de Ki67 foi de 20%. Não foi observada expressão significativa de p53 em tumores *phyllodes* benignos e fibroadenomas (8, 41).

Em 2013, um grupo brasileiro publica na *Virchows Archiv* um artigo que relata a presença de mutação germinativa do *TP53* em pacientes diagnosticadas com tumor *phyllodes* (27). Na população geral, a presença de mutação do *TP53* é estimada em cerca de 1:2,000-5,000 indivíduos (75). Entretanto, diversos estudos têm mostrado a presença de uma mutação germinativa específica, p.R337H, ocorrendo em até 1:300 nascidos vivos na região sul e sudeste do Brasil, devido a um efeito fundante da mutação. Essa mutação tem sido identificada em famílias brasileiras com síndrome de Li-Fraumeni nas quais são diagnosticados tumores pediátricos como carcinoma adrenocortical, tumores do plexo coroide, osteossarcomas e mulheres com câncer de mama (27, 72, 76). Essa mutação específica não é relatada ocorrendo como alteração somática, embora diversas outras mutações somáticas do *TP53* sejam bastante frequentes em tumores da mama em geral (5). O estudo reforça evidências prévias sobre a importância da mutação do *TP53* no desenvolvimento de tumores *phyllodes* e considera que as pacientes com esses tumores, em especial os malignos, possam ser investigadas quanto a presença de mutação germinativa do *TP53* (27).

### Ki67 – aspectos gerais

Ki67 é uma proteína nuclear intimamente ligada ao ciclo celular, sendo expressa em células que estão proliferando, durante o meio da fase G1 e durante toda a fase S, G2 e M do ciclo celular. É rapidamente catabolizada no final da fase M, sendo indetectável durante o repouso, fase G0, e início da fase G1. A expressão de Ki67 mostra boa relação com a fração proliferativa e é utilizada em diversos tipos de câncer e especificamente no câncer de mama para estratificar pacientes em categorias prognósticas (28, 85, 86). Como a proteína é expressa apenas durante o ciclo celular, a avaliação quantitativa da expressão nuclear pelas células tumorais propicia uma fiel estimativa do índice proliferativo de um tumor (8). A praticidade de utilizar-se em material fixado em formalina e embebido em parafina para detectar a presença dessa proteína faz com que o estudo imuno-histoquímico seja uma ferramenta indispensável na pesquisa e diagnóstico assistencial (69, 81, 85). Diversos valores percentuais, definidos como baixos ou elevados, tem sido propostos como úteis na estratificação de prognóstico, embora não haja consenso sobre a relevância clínica desses parâmetros (50, 54, 85, 86).

A expressão de Ki67 em tumores *phylloides* restringe-se, na maior parte dos estudos, à análise do componente estromal e é frequentemente expressa percentualmente, em intervalos de 10. A técnica habitual envolve a análise de 10 campos microscópicos de grande aumento (*HPF*), representativos da lesão. Cada campo de grande aumento corresponde à combinação de objetiva de 40X e oculares de 10X, que gera uma área de cerca de 0,28 milímetros. Somente a positividade de padrão nuclear é considerada como positiva na

análise. A positividade observada em células epiteliais, na quase totalidade dos estudos, não é incluída na análise (50, 84, 85), sendo considerada apenas a positividade estromal correspondente ao componente neoplásico da lesão. A expressão de Ki67 tem relação com o diagnóstico de tumor *phyllodes* e associa-se diretamente com variáveis histológicas preditivas de tumor *phyllodes* em espécimes de biópsia por agulha, tais como hiper celularidade estromal, atipia nuclear, expansão estromal e índice mitótico (9). O achado é bastante semelhante ao publicado por Yang em 2014, que encontra elevada expressão de Ki67 restrita aos graus *borderline* e maligno do tumor *phyllodes*, além de correlacionar-se positivamente com SLR e SG (8). Por outro lado, não há uma estratificação definida em relação aos índices que devem ser considerados, tampouco como deve ser realizada metodologicamente a análise quantitativa (8, 21-23). A expressão elevada de Ki67 também tem sido associada a positividade para p53 em tumores *phyllodes borderline* e maligno (8, 23, 83).

### Ki67 – resultados reportados

Estudo realizado com 29 tumores *phyllodes* benignos, 8 malignos e 20 fibroadenomas, buscou identificar essa relação prognóstica nos tumores *phyllodes*. A análise final revelou associação estatisticamente significativa entre o percentual de células estromais positivas para Ki67 e os tipos histológicos de tumor *phyllodes*. A avaliação baseou-se na análise da positividade em células estromais em 10HPF. Os tumores *phyllodes* malignos apresentaram um percentual médio de 15%, enquanto nos benignos a média foi de 4,7% e de 2% nos fibroadenomas. Os achados foram correlacionados com os dados clínicos e evolução da doença. Não foi identificada a associação buscada no estudo, entre a expressão percentual de Ki67 e o prognóstico, evolução ou índice de recorrência. Entretanto, foi constatada uma relação direta com o grau histológico do tumor *phyllodes*, que segundo os autores necessitaria ser mais bem investigada (84). Uma correlação significativa entre o índice de Ki67 por imuno-histoquímica, e o grau do tumor *phyllodes*, também foi constatada por Umekita Yoshihisa em estudo publicado no mesmo ano (81). Os tumores *phyllodes* malignos apresentam uma proporção de células em proliferação muito maior que a observada em tumores *phyllodes* benignos. A conclusão de Gatalica, et al baseou-se na análise de 12 e 13 tumores *phyllodes* classificados, respectivamente, com malignos e benignos. A reação imuno-histoquímica, utilizando-se o clone MIB-1 do Ki67 foi analisada por 2 patologistas independentes e os resultados foram significativos utilizando-se o teste t, com  $p < 0.01$ . O percentual médio de expressão do Ki67 dos tumores benignos e malignos foi de 7,73% e 23,42%, respectivamente. A conclusão dos



autores é que a expressão de Ki67 pode ser útil como um adjunto ao diagnóstico em casos difíceis, ou naqueles em que a amostra é limitada em função das dimensões reduzidas da biópsia (79). A expressão de Ki67 por imuno-histoquímica, medida percentualmente, tem relação com o grau histológico e com o prognóstico de tumores *phyllodes*, segundo estudo realizado em uma grande série de 118 casos com tempo de observação médio de 60 meses (28). Ao testar a expressão do Ki67 em tumores *phyllodes*, 50 benignos e 13 malignos, Chan Y.J encontrou uma relação entre a expressão nuclear superior a 10% nas células estromais neoplásicas em 85% dos tumores malignos e em apenas 16% dos benignos, com  $p < 0.005$  (50). A utilidade do Ki67 também foi testada no diagnóstico de LFEC, ao correlacionar-se o diagnóstico original feito em biópsia por agulha grossa e os achados do espécime de ressecção. A expressão percentual de Ki67 mostrou-se significativamente maior em tumores *phyllodes* quando comparada à expressão em fibroadenomas, com  $p < 0.013$ . Entretanto, essa correlação mostrou sobreposição com o índice mitótico, tornando secundário o significado do achado (62). Estudo realizado no Japão selecionou casos de tumor *phyllodes* diagnosticados em uma única instituição. Todos os casos foram revistos por um único patologista, cegado em relação ao status clínico dos pacientes. Os dados de SG e SLR foram correlacionados com a graduação histológica e a expressão de Ki67 por imuno-histoquímica (54). Foram incluídos 41 pacientes com tumores *phyllodes* graduados como benigno (20 casos), *borderline* (5 casos) e maligno (16 casos). O índice de Ki67 foi definido como a percentagem de núcleos tumorais apresentando positividade, após análise de 1000 células. O valor da mediana encontrado foi de 5% para os graus benigno e *borderline* e

de 30% nos tumores malignos. Além de distinguir tumores *phyllodes* malignos, a expressão de Ki67 mostrou ser um fator prognóstico importante para SG e SLR, o que não havia sido observado em estudos anteriores (50, 81, 84, 85). Por fim, os autores recomendam um acompanhamento mais cuidadoso naqueles pacientes com índice elevado de Ki67 (54).

A positividade para Ki67 apresentou correlação estatisticamente significativa com os diagnósticos de fibroadenoma ou tumores *phyllodes* ( $p < 0.001$ ) em estudo realizado em espécimes de biópsia por agulha (9). Na amostra, 19 de 21 fibroadenomas mostraram Ki67 igual a zero, enquanto os outros 2 fibroadenomas apresentaram positividade em menos de 5% das células estromais. Nenhum fibroadenoma mostrou positividade igual ou superior a 5%. Por outro lado, a positividade igual ou superior a 5% foi observada exclusivamente em tumores *phyllodes* e 84% das biópsias com diagnóstico de tumor fibroepitelial celular com Ki67 igual ou superior a 5% confirmaram tratar-se de tumores *phyllodes* (9).

Tumores *phyllodes* benignos apresentaram um percentual de expressão médio de Ki67 menor que 2%, enquanto a média dos *borderline* foi 7,7% e dos malignos 12,2%, em estudo que analisou diferentes marcadores imuno-histoquímicos em 33 tumores *phyllodes*, 21 benignos, 6 *borderline* e 6 malignos (86).

A expressão imuno-histoquímica percentual de Ki67 se correlaciona com o grau histológico, mas não é útil na distinção entre casos considerados como de diagnóstico difícil, como tumores *phyllodes borderline*. Os autores relataram, após a análise de 76 tumores *phyllodes* e 117 fibroadenomas, que a expressão

de Ki67 era ausente ou muito baixa em fibroadenomas. Em tumores *phyllodes*, a expressão percentual foi de 15,6%, 35,3% e 21,4% em tumores benignos, *borderline* e malignos, respectivamente. Ao compararem a expressão estromal versus epitelial de Ki67, também confirmaram a noção hegemônica de que é o estroma o componente neoplásico dessa lesão bifásica (24). Em um outro artigo publicado no mesmo ano, que discutia a possível origem comum de fibroadenomas e tumores *phyllodes*, os autores observaram que a expressão de Ki67 era significativamente maior nos últimos (49).

Já o estudo de Lin et al, publicado em 2014 na revista *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, considerou o Ki67 útil na distinção entre fibroadenomas e tumores *phyllodes*, com elevadas sensibilidade, especificidade e acurácia, além de permitir o diagnóstico diferencial entre tumores *phyllodes* benignos e *borderline* (87).

## JUSTIFICATIVA

Espera-se que, ao final do projeto, a análise dos resultados contribua para o aumento da acurácia diagnóstica dos tumores *phyllodes* benignos, *borderline* e malignos, por meio do teste imuno-histoquímico, auxiliando o patologista na definição diagnóstica com consequente reflexo positivo no manejo clínico adequado.

## HIPÓTESES

Existe uma relação entre a expressão imuno-histoquímica de p53 e de Ki67 e os subtipos de tumores *phyllodes* benigno, *borderline*, maligno.

Não existe uma relação entre a expressão imuno-histoquímica p53 e de Ki67 e os subtipos de tumores *phyllodes* benigno, *borderline*, maligno.



## OBJETIVOS

### Principal

Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos p53 e Ki67 em espécimes cirúrgicos diagnosticados como tumor *phyllodes* benigno, *borderline* ou maligno.

### Secundários

Avaliar a relação entre a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos p53 e Ki67 e os diagnósticos de tumor *phyllodes* benigno, *borderline* e maligno e o seu eventual poder discriminatório, com o intuito de elevar a acurácia diagnóstica.

Determinar os pontos de corte e demais critérios que definem os testes de Ki67 e p53 como positivos ou negativos.

Correlacionar os diagnósticos anatomopatológicos com os parâmetros clínicos.

Correlacionar o resultados dos testes com os diagnósticos anatomopatológicos.

## REFERÊNCIAS

1. Tan BY, Tan PH. A Diagnostic Approach to Fibroepithelial Breast Lesions. *Surg Pathol Clin*. 2018;11(1):17-42.
2. Tan BY, Acs G, Apple SK, Badve S, Bleiweiss IJ, Brogi E, et al. Phyllodes tumours of the breast: a consensus review. *Histopathology*. 2016;68(1):5-21.
3. Mishra SP, Tiwary SK, Mishra M, Khanna AK. Phyllodes tumor of breast: a review article. *ISRN Surg*. 2013;2013:361469.
4. Spitaleri G, Toesca A, Botteri E, Bottiglieri L, Rotmensz N, Boselli S, et al. Breast phyllodes tumor: a review of literature and a single center retrospective series analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(2):427-36.
5. Lakhani SR. WHO classification of tumours of the breast. World Health Organization classification of tumours, 4th edition - International Agency for Research on Cancer 2012;1.
6. Chang J, Denham L, Dong EK, Malek K, Lum SS. Trends in the Diagnosis of Phyllodes Tumors and Fibroadenomas Before and After Release of WHO Classification Standards. *Ann Surg Oncol*. 2018.
7. Pareja F, Geyer FC, Kumar R, Selenica P, Piscuoglio S, Ng CKY, et al. Phyllodes tumors with and without fibroadenoma-like areas display distinct genomic features and may evolve through distinct pathways. *NPJ Breast Cancer*. 2017;3:40.
8. Yang X, Kandil D, Cosar EF, Khan A. Fibroepithelial tumors of the breast: pathologic and immunohistochemical features and molecular mechanisms. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):25-36.
9. Jara-Lazaro AR, Akhilesh M, Thike AA, Lui PC, Tse GM, Tan PH. Predictors of phyllodes tumours on core biopsy specimens of fibroepithelial neoplasms. *Histopathology*. 2010;57(2):220-32.
10. Tan PH, Jayabaskar T, Chuah KL, Lee HY, Tan Y, Hilmy M, et al. Phyllodes tumors of the breast: the role of pathologic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(4):529-40.
11. Lawton TJ, Acs G, Argani P, Farshid G, Gilcrease M, Goldstein N, et al. Interobserver variability by pathologists in the distinction between cellular fibroadenomas and phyllodes tumors. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(8):695-8.
12. Chng TW, Gudi M, Lim SH, Li H, Tan PH. Validation of the Singapore nomogram for outcome prediction in breast phyllodes tumours in a large patient cohort. *J Clin Pathol*. 2018;71(2):125-8.
13. Rakha EA, Ahmed MA, Aleskandarany MA, Hodi Z, Lee AH, Pinder SE, et al. Diagnostic concordance of breast pathologists: lessons from the National Health Service Breast Screening Programme Pathology External Quality Assurance Scheme. *Histopathology*. 2017;70(4):632-42.
14. Khazai L, Middleton LP, Goktepe N, Liu BT, Sahin AA. Breast pathology second review identifies clinically significant discrepancies in over 10% of patients. *J Surg Oncol*. 2015;111(2):192-7.
15. Bansal M, Chen J, Wang X. Focal Anomalous Expression of Cytokeratin and p63 in Malignant Phyllodes Tumor: A Comparison With Spindle Cell Metaplastic Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(3):198-201.
16. Kulkarni MM, Khandeparkar SG, Joshi AR, Kothikar V, Nasare A, Patil S, et al. Role of CD10 Immunorexpression in Grading Phyllodes Tumour of the Breast. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(1):EC14-EC6.
17. Tawasil J, Go EM, Tsang JY, Ni YB, Ko CW, Tse GM. Associations of epithelial c-kit expression in phyllodes tumours of the breast. *J Clin Pathol*. 2015;68(10):808-11.



18. Tariq MU, Haroon S, Kayani N. Role of CD10 Immunohistochemical Expression in Predicting Aggressive Behavior of Phylloides Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(8):3147-52.
19. Tan WJ, Thike AA, Tan SY, Tse GM, Tan MH, Bay BH, et al. CD117 expression in breast phyllodes tumors correlates with adverse pathologic parameters and reduced survival. *Mod Pathol*. 2015;28(3):352-8.
20. Liu J, Liu X, Feng X, Liu J, Lv S, Zhang W, et al. C-kit overexpression correlates with KIT gene copy numbers increases in phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(2):395-401.
21. Vilela MH, de Almeida FM, de Paula GM, Ribeiro NB, Cirqueira MB, Silva AL, et al. Utility of Ki-67, CD10, CD34, p53, CD117, and mast cell content in the differential diagnosis of cellular fibroadenomas and in the classification of phyllodes tumors of the breast. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(6):485-91.
22. Romero Q, Bendahl PO, Ferno M, Grabau D, Borgquist S. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn Pathol*. 2014;9:118.
23. Kucuk U, Bayol U, Pala EE, Cumurcu S. Importance of P53, Ki-67 expression in the differential diagnosis of benign/malignant phyllodes tumors of the breast. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013;56(2):129-34.
24. Munawer NH, Md Zin R, Md Ali SA, Muhammad R, Ali J, Das S. ER, p53 and MIB-1 are significantly associated with malignant phyllodes tumor. *Biomed J*. 2012;35(6):486-92.
25. Nozad S, Sheehan CE, Gay LM, Elvin JA, Vergilio JA, Suh J, et al. Comprehensive genomic profiling of malignant phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;162(3):597-602.
26. Kim JY, Yu JH, Nam SJ, Kim SW, Lee SK, Park WY, et al. Genetic and Clinical Characteristics of Phyllodes Tumors of the Breast. *Transl Oncol*. 2018;11(1):18-23.
27. Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, Graudenz MS, Rivero LF, Lima E, et al. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Arch*. 2013;463(1):17-22.
28. Niezabitowski A, Lackowska B, Rys J, Kruczak A, Kowalska T, Mitus J, et al. Prognostic evaluation of proliferative activity and DNA content in the phyllodes tumor of the breast: immunohistochemical and flow cytometric study of 118 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;65(1):77-85.
29. Pornchai S, Chirappapha P, Pipatsakulroj W, Lertsithichai P, Vassanasiri W, Sitathanee C, et al. Malignant transformation of phyllodes tumor: a case report and review of literature. *Clin Case Rep*. 2018;6(4):678-85.
30. The world Health Organization Histological Typing of Breast Tumors--Second Edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol*. 1982;78(6):806-16.
31. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.
32. Efares B, Ebang GA, Tahiri L, Sidibe IS, Erregad F, Hammas N, et al. Phyllodes tumors of the breast: clinicopathological analysis of 106 cases from a single institution. *Breast Dis*. 2018;37(3):139-45.
33. Jia C, Mei F, Liu JY, Zhao HM, Lei YT, Su J, et al. [Histologic classification and prognosis factors in phyllodes tumors of breast]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2017;46(1):14-9.
34. Lin JJ, Huang CS, Yu J, Liao GS, Lien HC, Hung JT, et al. Malignant phyllodes tumors display mesenchymal stem cell features and aldehyde dehydrogenase/disialoganglioside identify their tumor stem cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R29.

35. Yeong J, Thike AA, Young Ng CC, Md Nasir ND, Loh K, Teh BT, et al. A genetic mutation panel for differentiating malignant phyllodes tumour from metaplastic breast carcinoma. *Pathology*. 2017;49(7):786-9.
36. Calhoun BC, Collins LC. Recommendations for excision following core needle biopsy of the breast: a contemporary evaluation of the literature. *Histopathology*. 2016;68(1):138-51.
37. Tremblay-LeMay R, Hogue JC, Provencher L, Poirier B, Poirier E, Laberge S, et al. How Wide Should Margins Be for Phyllodes Tumors of the Breast? *Breast J*. 2017;23(3):315-22.
38. Shaaban M, Barthelmes L. Benign phyllodes tumours of the breast: (Over) treatment of margins - A literature review. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(7):1186-90.
39. Lae M, Vincent-Salomon A, Savignoni A, Huon I, Freneaux P, Sigal-Zafrani B, et al. Phyllodes tumors of the breast segregate in two groups according to genetic criteria. *Mod Pathol*. 2007;20(4):435-44.
40. Loke BN, Md Nasir ND, Thike AA, Lee JYH, Lee CS, Teh BT, et al. Genetics and genomics of breast fibroadenomas. *J Clin Pathol*. 2018;71(5):381-7.
41. Piscuoglio S, Ng CK, Murray M, Burke KA, Edelweiss M, Geyer FC, et al. Massively parallel sequencing of phyllodes tumours of the breast reveals actionable mutations, and TERT promoter hotspot mutations and TERT gene amplification as likely drivers of progression. *J Pathol*. 2016;238(4):508-18.
42. Faridi SH, Siddiqui B, Ahmad SS, Aslam M. Progression of Fibroadenoma to Malignant Phyllodes Tumour in a 14-Year Female. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2018;28(1):69-71.
43. Sin EI, Wong CY, Yong WS, Ong KW, Madhukumar P, Tan VK, et al. Breast carcinoma and phyllodes tumour: a case series. *J Clin Pathol*. 2016;69(4):364-9.
44. Co M, Tse GM, Chen C, Wei J, Kwong A. Coexistence of Ductal Carcinoma Within Mammary Phyllodes Tumor: A Review of 557 Cases From a 20-year Region-wide Database in Hong Kong and Southern China. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(3):e421-e5.
45. Moo TA, Alabdulkareem H, Tam A, Fontanet C, Lu Y, Landers A, et al. Association Between Recurrence and Re-Excision for Close and Positive Margins Versus Observation in Patients with Benign Phyllodes Tumors. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(10):3088-92.
46. Borhani-Khomani K, Talman ML, Kroman N, Tvedskov TF. Risk of Local Recurrence of Benign and Borderline Phyllodes Tumors: A Danish Population-Based Retrospective Study. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1543-8.
47. Badwe RA, Kataria K, Srivastava A. Surgical Resection of Phyllodes Tumour: a Radical Approach as a Safeguard Against Local Recurrence. *Indian J Surg*. 2015;77(2):161-3.
48. Korcheva VB, Levine J, Beadling C, Warrick A, Countryman G, Olson NR, et al. Immunohistochemical and molecular markers in breast phyllodes tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(2):119-25.
49. Opric S, Opric D, Gugic D, Granic M. Phyllodes tumors and fibroadenoma common beginning and different ending. *Coll Antropol*. 2012;36(1):235-41.
50. Chan YJ, Chen BF, Chang CL, Yang TL, Fan CC. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in phyllodes tumor of the breast. *J Chin Med Assoc*. 2004;67(1):3-8.
51. Tan PH, Zhang L. Updates on Surgical and Molecular Pathology Concerning Breast Diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(7):625-7.
52. Wang H, Wang X, Wang C. [Prognostic analysis of benign, borderline and malignant phyllodes tumors of the breast]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2015;37(12):923-7.
53. Ben Hassouna J, Damak T, Gamoudi A, Chargui R, Khomsi F, Mahjoub S, et al. Phyllodes tumors of the breast: a case series of 106 patients. *Am J Surg*. 2006;192(2):141-7.
54. Yonemori K, Hasegawa T, Shimizu C, Shibata T, Matsumoto K, Kouno T, et al. Correlation of p53 and MIB-1 expression with both the systemic recurrence and survival in cases of phyllodes tumors of the breast. *Pathol Res Pract*. 2006;202(10):705-12.

55. Lenhard MS, Kahlert S, Himsl I, Ditsch N, Untch M, Bauerfeind I. Phyllodes tumour of the breast: clinical follow-up of 33 cases of this rare disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138(2):217-21.
56. Tan PH, Thike AA, Tan WJ, Thu MM, Busmanis I, Li H, et al. Predicting clinical behaviour of breast phyllodes tumours: a nomogram based on histological criteria and surgical margins. *J Clin Pathol.* 2012;65(1):69-76.
57. Morgan JM, Douglas-Jones AG, Gupta SK. Analysis of histological features in needle core biopsy of breast useful in preoperative distinction between fibroadenoma and phyllodes tumour. *Histopathology.* 2010;56(4):489-500.
58. Yoshidaya F, Hayashi N, Takahashi K, Suzuki K, Akiyama F, Ishiyama M, et al. Malignant phyllodes tumor metastasized to the right ventricle: a case report. *Surg Case Rep.* 2015;1(1):121.
59. Ouyang Q, Li S, Tan C, Zeng Y, Zhu L, Song E, et al. Benign Phyllodes Tumor of the Breast Diagnosed After Ultrasound-Guided Vacuum-Assisted Biopsy: Surgical Excision or Wait-and-Watch? *Ann Surg Oncol.* 2016;23(4):1129-34.
60. Bandyopadhyay S, Barak S, Hayek K, Thomas S, Saeed H, Beydoun R, et al. Can problematic fibroepithelial lesions be accurately classified on core needle biopsies? *Hum Pathol.* 2016;47(1):38-44.
61. Abdulcadir D, Nori J, Meattini I, Giannotti E, Boeri C, Vanzi E, et al. Phyllodes tumours of the breast diagnosed as B3 category on image-guided 14-gauge biopsy: analysis of 51 cases from a single institution and review of the literature. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(7):859-64.
62. Jacobs TW, Chen YY, Guinee DG, Jr., Holden JA, Cha I, Bauermeister DE, et al. Fibroepithelial lesions with cellular stroma on breast core needle biopsy: are there predictors of outcome on surgical excision? *Am J Clin Pathol.* 2005;124(3):342-54.
63. Marcil G, Wong S, Trabulsi N, Allard-Coutu A, Parsyan A, Omeroglu A, et al. Fibroepithelial breast lesions diagnosed by core needle biopsy demonstrate a moderate rate of upstaging to phyllodes tumors. *Am J Surg.* 2017;214(2):318-22.
64. Neville G, Neill CO, Murphy R, Corrigan M, Redmond PH, Feeley L, et al. Is excision biopsy of fibroadenomas based solely on size criteria warranted? *Breast J.* 2018.
65. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
66. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer.* 2011;2(4):466-74.
67. Appel ML, Edelweiss MI, Fleck J, Rivero LF, Rivoire WA, Monego HI, et al. P53 and BCL-2 as prognostic markers in endometrial carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(1):23-30.
68. Kawai A, Noguchi M, Beppu Y, Yokoyama R, Mukai K, Hirohashi S, et al. Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas. A possible prognostic factor. *Cancer.* 1994;73(10):2499-505.
69. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2006;19(9):1236-42.
70. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih Ie M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol.* 2011;24(9):1248-53.
71. Murnyak B, Hortobagyi T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(40):64910-20.
72. Mastellaro MJ, Seidinger AL, Kang G, Abrahao R, Miranda ECM, Pounds SB, et al. Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer.* 2017;123(16):3150-8.

73. Feakins RM, Mulcahy HE, Nickols CD, Wells CA. p53 expression in phyllodes tumours is associated with histological features of malignancy but does not predict outcome. *Histopathology*. 1999;35(2):162-9.
74. Prochazkova K, Foretova L, Sedlacek Z. A rare tumor and an ethical dilemma in a family with a germline TP53 mutation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;180(1):65-9.
75. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001;20(34):4621-8.
76. Ossa CA, Molina G, Cock-Rada AM. Li-Fraumeni syndrome. *Biomedica*. 2016;36(2):182-7.
77. Kim CJ, Kim WH. Patterns of p53 expression in phyllodes tumors of the breast--an immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*. 1993;8(5):325-8.
78. Millar EK, Beretov J, Marr P, Sarris M, Clarke RA, Kearsley JH, et al. Malignant phyllodes tumours of the breast display increased stromal p53 protein expression. *Histopathology*. 1999;34(6):491-6.
79. Gatalica Z, Finkelstein S, Lucio E, Tawfik O, Palazzo J, Hightower B, et al. p53 protein expression and gene mutation in phyllodes tumors of the breast. *Pathol Res Pract*. 2001;197(3):183-7.
80. Tse GM, Putti TC, Kung FY, Scolyer RA, Law BK, Lau TS, et al. Increased p53 protein expression in malignant mammary phyllodes tumors. *Mod Pathol*. 2002;15(7):734-40.
81. Umekita Y, Yoshida H. Immunohistochemical study of MIB1 expression in phyllodes tumor and fibroadenoma. *Pathol Int*. 1999;49(9):807-10.
82. Tan PH, Jayabaskar T, Yip G, Tan Y, Hilmy M, Selvarajan S, et al. p53 and c-kit (CD117) protein expression as prognostic indicators in breast phyllodes tumors: a tissue microarray study. *Mod Pathol*. 2005;18(12):1527-34.
83. Wang Y, Zhu J, Gou J, Xiong J, Yang X. Phyllodes tumors of the breast in 2 sisters: Case report and review of literature. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(46):e8552.
84. Kocova L, Skalova A, Fakan F, Rousarova M. Phyllodes tumour of the breast: immunohistochemical study of 37 tumours using MIB1 antibody. *Pathol Res Pract*. 1998;194(2):97-104.
85. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol*. 2005;18(3):374-81.
86. Noronha Y, Raza A, Hutchins B, Chase D, Garberoglio C, Chu P, et al. CD34, CD117, and Ki-67 expression in phyllodes tumor of the breast: an immunohistochemical study of 33 cases. *Int J Surg Pathol*. 2011;19(2):152-8.
87. Lin CK, Tsai WC, Lin YC, Yu JC. Biomarkers distinguishing mammary fibroepithelial neoplasms: tissue microarray study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(6):433-41.

## ARTIGO EM INGLÊS

O artigo em inglês foi submetido, e encontra-se em análise pelo editor, à revista *Applied Cancer Research – BMC Part of Springer Nature* <https://www.biomedcentral.com/>

**Applied Cancer Research**  
**Accuracy of p53 and ki-67 in the diagnosis of phyllodes tumor, a model for practical application**  
 –Manuscript Draft–

<b>Manuscript Number:</b>	ACRE-D-19-00024
<b>Full Title:</b>	Accuracy of p53 and ki-67 in the diagnosis of phyllodes tumor, a model for practical application
<b>Article Type:</b>	Research article
<b>Section/Category:</b>	Cancer Cell Biology
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background</b></p> <p>The accurate diagnosis of a phyllodes tumor (PT) is critical for effective treatment as it allows correct surgical management, and avoids inadequate excision for malignant or borderline PT, or surgical overtreatment in benign PT. PTs of the breast are notoriously difficult to classify, and reliable differentiation of a benign PT from a borderline or malignant PT can be problematic for the pathologist. Although several authors acknowledge a strong relationship between the immunohistochemical expression of p53 and Ki-67 and the histopathological grade of PT—with potential impact on diagnostic accuracy—the literature lacks consensus about which cutoff defines a positive index test. The objective of this study is to establish a practical application score that increases the diagnostic accuracy of PT through the appropriate use of these auxiliary methods.</p> <p><b>Methods</b></p> <p>A blinded review of 146 consecutive PTs surgically removed between January 2000 and December 2015 were retrospectively searched from archives of three pathology laboratories from Porto Alegre. The Ki-67 test was considered positive if &gt;10% of neoplastic cell were stained. The p53 test was considered positive if &gt;10% of neoplastic cell were stained in a moderate or strong intensity.</p> <p><b>Results</b></p> <p>Of the 146 PT cases reviewed, 110 were classified as benign, 16 as borderline, and 20 as malignant. The correlation between age and size with benign, borderline, and malignant subgroups was statistically significant (<math>p &lt; 0.001</math>). Significance was observed in the expression of both Ki-67 and p53 in the comparison of benign, borderline, and malignant PT with <math>p &lt; 0.001</math> and a 95% confidence interval (CI). When correlating the presence of positivity in either of the two index tests with the diagnosis of borderline or malignant PT, we reached a sensitivity of 100% and a specificity of 91.8 (<math>p &lt; 0.001</math>; 95% CI).</p> <p><b>Conclusion</b></p> <p>We propose a practical methodology to achieve an accurate diagnosis of PT, based on clearly defined and easy to apply cutoffs of a simple immunohistochemical panel of Ki-67 and p53. A PT positive for either of the index tests should be graded as borderline or malignant. We hope this new approach might provide the basis for the development of standardization in using p53 and Ki-67 for grading PT with accuracy.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Luis Fernando da Rosa Rivero, M.D. Hospital de Clínicas de Porto Alegre porto alegre, RS BRAZIL
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	lfrivero@hcpa.edu.br

## Accuracy of p53 and ki-67 in the diagnosis of phyllodes tumor, a model for practical application

Luís Fernando da Rosa Rivero – Rivero LF - corresponding author – lfrivero@hcupa.edu.br

Ana Maria Delgado – Delgado AM – adcunha@hcupa.edu.br

Marcia Silveira Graudenz – Graudenz MS – mgraudenz@hcupa.edu.br

Patricia Ashton-Prolla – Ashton-Prolla P – pprolla@hcupa.edu.br

Lúcia Maria Kliemann – Kliemann LM - lkliemann@hcupa.edu.br

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Patologia

Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Ginecologia e Obstetrícia

### **Abstract**

**Background:** The accurate diagnosis of a phyllodes tumor (PT) is critical for effective treatment as it allows correct surgical management, and avoids inadequate excision for malignant or borderline PT, or surgical overtreatment in benign PT. PTs of the breast are notoriously difficult to classify, and reliable differentiation of a benign PT from a borderline or malignant PT can be problematic for the pathologist. Although several authors acknowledge a strong relationship between the immunohistochemical expression of p53 and Ki-67 and the histopathological grade of PT—with potential impact on diagnostic accuracy—the literature lacks consensus about which cutoff defines a positive index test. The objective of this study is to establish a practical application score that increases the diagnostic accuracy of PT through the appropriate use of these auxiliary methods.

**Methods:** A blinded review of 146 consecutive PTs surgically removed between January 2000 and December 2015 were retrospectively searched from archives of three pathology laboratories from Porto Alegre. The Ki-67 test was considered positive if >10% of neoplastic cell were stained. The p53 test was considered positive if >10% of neoplastic cell were stained in a moderate or strong intensity.

**Results:** Of the 146 PT cases reviewed, 110 were classified as benign, 16 as borderline, and 20 as malignant. The correlation between age and size with benign, borderline, and malignant subgroups was statistically significant ( $p < 0.001$ ). Significance was observed in the expression of both Ki-67 and p53 in the comparison of benign, borderline, and malignant PT with  $p < 0.001$  and a 95% confidence interval (CI). When correlating the presence of positivity in either of the two index tests with the diagnosis of borderline or malignant PT, we reached a sensitivity of 100% and a specificity of 91.8 ( $p < 0.001$ ; 95% CI).

**Conclusion:** We propose a practical methodology to achieve an accurate diagnosis of PT, based on clearly defined and easy to apply cutoffs of a simple immunohistochemical panel of Ki-67 and p53. A PT positive for either of the index tests should be graded as borderline or malignant. We hope this new approach might provide the basis for the development of standardization in using p53 and Ki-67 for grading PT with accuracy.

**Keywords:** Phyllodes, Immunohistochemistry, p53, Ki-67

## Introduction

A phyllodes tumor (PT) is the least common lesion in the category of fibroepithelial tumors of the breast, which has fibroadenoma as its common

exponent (2, 3). These are quite unusual lesions, which correspond to 0.3% to 0.5% of all female breast tumors, and are composed of variable proportions of epithelial cells (the non-neoplastic component of lesion), and stromal cells (the neoplastic component of the tumor) (2, 5).

In addition to the rarity, the anatomopathological diagnosis is complicated by the complex nature of microscopic morphology associated with the differential diagnosis with morphologically similar lesions, and by its biological behavior depending on the graduation (5, 11). PT of the breast covers a broad spectrum of biological behavior ranging from benign to the frankly malignant (5, 6, 10). Pathological diagnosis is the gold standard in the definition of these entities with different biological behaviors (benign, borderline and malignant), has a high correlation with recurrence-free survival, and is used in counseling and clinical management (6, 12, 13). Studies have provided evidence that only two types of PTs could be distinguished at genetic basis—benign and malignant/borderline (7, 39). Complete surgical resection is the established treatment for breast PT, since residual PT at the excision margins is a strong predictor of local recurrence; however there is a consensus that benign PTs benefit from more conservative treatment (2, 5, 37, 38, 54, 56). The graduation of PT is based on a constellation of microscopic parameters, which include (i) the degree of cellular atypia of stromal cells; (ii) the degree of stromal cellularity; (iii) the evaluation of the mitotic index in 10 microscopic high-power fields (HPF); (iv) stromal expansion; and (v) the characteristics of surgical margins (1, 2, 5). Since each of the three main morphological parameters (stromal atypia, stromal cellularity and mitotic index evaluation) presents three levels of



stratification, there are significant challenges in the search for accuracy and diagnostic reproducibility in difficult lesions (13, 14).

Beyond the dispute regarding the histopathology of PTs, investigators have studied the role of the biological markers and their relationship with clinical and pathological characteristics, with p53 and Ki-67 perhaps being the most widely evaluated (21, 23, 29, 54, 70, 77, 80-82, 86).

P53 is a tumor suppressor gene located on the short arm of chromosome 17p, and P53 mutations are among the most common identifiable genetic abnormalities in human cancer. The P53 gene encodes a phosphoprotein that is implicated in cell cycle control, and which can induce arrest in the G1 phase either to allow DNA repair or to induce apoptosis when there is extensive damage. The wild-type p53 gene product has a short half-life, and this unstable protein is thus rarely detectable by immunohistochemistry. In contrast, immunohistochemical positivity is believed to highlight the expression of mutant p53 protein, which is more stable with a longer half-life. Not all mutations result in immunopositivity, while positive staining may reflect events other than mutation, such as stabilization of wild-type p53 by cytoplasmic factors. Nevertheless, extensive immunohistochemical positivity for p53 increases the likelihood that there is an underlying mutation. It is commonly used as a surrogate method for tumor-suppressor gene mutation, since the sequencing of the P53 gene carried out by various authors has mostly discovered mutations (24, 27, 65, 66, 71, 73, 79).

Cellular proliferation is one of the fundamental biological processes, and its assessment provides useful predictive information with a growing body of

evidence for the utility of Ki-67 for predicting prognosis in many different tumor entities (21, 23, 24, 50, 81, 86). Ki67 is a labile, non-histone nuclear protein tightly linked to the cell cycle. It is expressed in proliferating cells during the mid-G1 phase, increasing in level through S and G2, and peaking in the M phase of the cell cycle. It is rapidly catabolized at the end of the M phase, and is undetectable in resting (G0 and early G1) cells (85).

Although reports are quite controversial when correlating the expression of p53 and Ki-67 with clinical variables, such as global survival and recurrence-free survival, most authors point to a strong relation between the expression of these markers and the histopathological potential impact on diagnostic accuracy, even though this was not the original objective of the studies (21, 23, 24, 26, 28, 30, 39, 41, 48, 50, 54, 66-73, 75, 77-88).

The objective of this study is to establish a positivity score for p53 and Ki-67 that allows the increase of diagnostic accuracy of benign, borderline, and malignant PTs through the appropriate use of these ancillary methods. There is no consensus in the literature regarding (i) the percentage of ki67 that has discriminant power in relation to the degrees of PTs; and (ii) the intensity of the reaction and the percentage of expression of p53 that can be considered as a positive result.

## **Methods**

### Study design

With the aim of reducing the biases usually related to retrospective studies in which the index test is not performed in order to be evaluated—resulting in non-

standardized and not always blinded analysis in relation to the reference standard (89)—all cases were reviewed based on current histopathological classification, and all immunohistochemical markers were performed at one time. Both were interpreted by the pathologist blinded to the diagnosis and the clinical status.

### Participants

The archives of the Department of Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and more two pathology laboratories of the city, were searched for PT surgically removed between January 2000 and December 2015. The diagnostic slides and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks of 146 consecutive benign, borderline, and malignant PTs were retrieved. All samples were anonymized prior to pathological analysis, and ethical approval was received from the institution.

### Test methods

A blinded review of all 146 cases, including all tumor sections (according to the latest WHO criteria) (5) was performed by a pathologist without knowledge of the anatomopathological report or any clinical data, and the results were compared with the original diagnosis. The reviewed diagnosis was assumed as the gold standard for analysis.

A representative paraffin block for each case was chosen for immunohistochemical analysis. Two slides of formalin-fixed, paraffin-embedded sections, 4  $\mu\text{m}$  in thickness, were prepared and affixed to electrostatically charged slides. After deparaffinization and rehydration in xylene and graded alcohols, endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide. Antigen

retrieval—as in all staining processes—was performed on the Ventana BenchMark automatic staining system (Ventana, Tucson, AZ). Mouse monoclonal antibodies directed against Ki-67 (clone 30-9, prediluted, Ventana) and human p53 (clone DO-7 prediluted, Ventana) were used. Antigen-antibody reactivity was detected using the multimer Ventana detection kit with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as chromogen. Positive controls were included in all slides.

The stained sections for Ki67 was considered to be positive only if unequivocal nuclear staining of neoplastic stromal cells was present. The most active areas—hot spots—with the maximal number of nuclei staining were chosen to perform counting. The Ki-67 index was defined as the percentage of cells that showed a positive stain in 10 microscopic HPF using a 40× objective with an eyepiece of 10× (0.28mm<sup>2</sup> area), as previously described (62, 84).

The intensity of the immunohistochemical neoplastic stromal nuclear staining for p53 was scored as negative (0), weak staining (1+), moderate staining (2+), and strong staining (3+). The percentage was analyzed in 10 microscopic HPF. The proportion of nuclear positive cells was categorized as sporadic (positive cells <10%); focal (positive cells >11% and < 50%); and diffuse (positive cells ≥ 50%). The immunohistochemical scores of 2+ and 3+ with focal to diffuse distribution were considered to represent positive expression of p53, as described previously (54). Index texts analysis was performed—without knowledge of the diagnosis or clinical status—by two pathologists independently and, for discordant cases, a consensus diagnosis was achieved on a multi-head microscope.

## Analysis

Statistical analysis was carried out using the software SPSS for windows 21.0. Quantitative variables were described by mean and standard deviation or median and interquartile range. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. To compare means between degrees of tumor malignancy, the analysis of variance (ANOVA) plus the Tukey test were applied. In case of asymmetry, the Kruskal–Wallis test with the Dunn method was used. In comparing proportions, Pearson's chi-squared test together with an adjusted residuals analysis was applied. To determine the best Ki-67 cutoff point for borderline or malignant PT, a receiver operating characteristic (ROC) curve was used. Diagnostic properties, as sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and accuracy, in addition to the kappa concordance coefficient, were calculated to aid in deciding the best combination of p53 and Ki-67 markers. A *p*-value below of 0.05 was considered a significant result.

## Results

**Table 1** Clinical and pathological characteristics

Variables	<i>n</i> = 146
Age (years) – mean ± SD	44.7 ± 13.9
Size of tumor – md (P25–P75)	4 (2.3–7.1)
Laterality – <i>n</i> (%)	
Right	64 (45.7)
Left	76 (54.3)
Anatomopathological result – <i>n</i> (%)	
Benign	110 (75.3)
Borderline	16 (11.0)
Malignant	20 (13.7)

## Participants

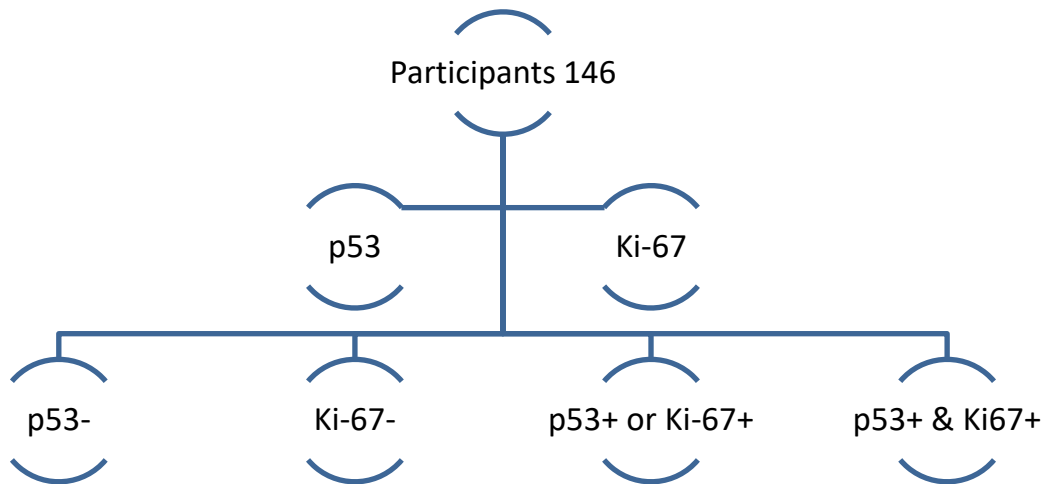
The clinicopathologic characteristics are summarized in Table 1. The overall diagnostic agreement level was high, and all cases were considered to be originally correctly diagnosed as PT, and the agreement between grades was achieved in 92.5%. Briefly, the median age of patients with PT was 45 years (range: 16–74 years) and the correlation between age and benign, borderline, and malignant subgroups (see Table 2) was statistically significant ( $p < 0.001$ ); as the patient's age increases the degree of malignancy of the tumor increases. The median size of PT was 4.0 cm (range: 1–20 cm) and a positive association was established in the comparison of histological grades of PT with the tumor size ( $p = 0.005$ ).

**Table 2** Anatomopathological results

Variables	Benign ( <i>n</i> = 110)	Borderline ( <i>n</i> = 16)	Malignant ( <i>n</i> = 20)	<i>p</i>
Age (years) – mean ± SD	41.2 ± 12.6 <sup>a</sup>	52.4 ± 10.9 <sup>b</sup>	63.3 ± 9.2 <sup>c</sup>	<0.001
Size of tumor – md (P25–P75)	3.4 (2.0–5.9) <sup>a</sup>	6 (3–13) <sup>ab</sup>	7.4 (3–17) <sup>b</sup>	0.005
Laterality – <i>n</i> (%)				0.133
Right	51 (49.0)	8 (50.0)	5 (25.0)	
Left	53 (51.0)	8 (50.0)	15 (75.0)	
Ki-67 – md (P25–P75)	5 (5–10) <sup>a</sup>	20 (11–29) <sup>b</sup>	30 (22.5–40) <sup>b</sup>	<0.001
P53 – <i>n</i> (%)				<0.001
Negative	105 (95.5)*	8 (50.0)	5 (25.0)	
Positive	5 (4.5)	8 (50.0)*	15 (75.0)*	

\* Statistically significant association with the adjusted residuals with 5% of significance

<sup>a,b,c</sup> Equal letters do not differ by the Tukey or Dunn tests with 5% significance



**Fig. 1** Diagram to report flow of participants through the study

Ki-67: Test is considered positive for malignant/borderline PT if more than 10% of the total neoplastic nuclei is stained

p53: Immunohistochemical scores of 2+ and 3+ with focal to diffuse distribution is considered to represent positive expression of p53 and a positive test for malignant/borderline PT

### Test results

Significance was observed in the expression of Ki-67 in the comparison of benign, borderline, and malignant PT with  $p < 0.001$  being significantly lower in benign tumors when compared to borderline and malignant tumors, with no significant difference between them. The 10% cutoff point for Ki-67 best balanced sensitivity with specificity, with an area under the curve of 0.98 (95% confidence interval [CI]: 0.95–1) (see Figure 2), resulting in high specificity (96.4%), sensibility (88.9%), and accuracy (94.5%) for borderline or malignant PTs with a very good concordance coefficient kappa of 0.85 ( $p < 0.001$ ). For the analysis, if more than 10% of the total neoplastic cell nuclei stained, the case was considered positive. Of the benign tumors, 106 of 110 (96.4%) showed Ki-

Ki-67 positivity  $\leq 10\%$  of the neoplastic cells, and all benign tumors showed Ki-67 expression lower than 20%. On the other hand, all 20 malignant PT showed Ki-67 positivity  $>20\%$  in the stromal neoplastic cells. In the borderline group, the Ki-67 was  $\geq 20\%$  in 12 cases, with the remaining 4 cases achieving a positivity range  $\geq 10$  and  $<20\%$ .

The study also showed a greater expression of p53 in malignant and borderline tumors when compared to benign PTs, and the p53 expression was significantly associated with grade ( $p < 0.001$ ). The expression of p53 was considered to be positive in 28 (19.2%) of all 146 PTs. Only 5 of 110 (4.5%) benign PTs expressed p53 positivity; meanwhile, p53 positivity was achieved in 15 of 20 (75%) malignant PTs. The specificity of the p53 positivity to diagnose a borderline or malignant PT was 95.5%; the sensibility was 63.9% and accuracy was 87.7%, with a good concordance coefficient kappa of 0.64 ( $p < 0.001$ ).

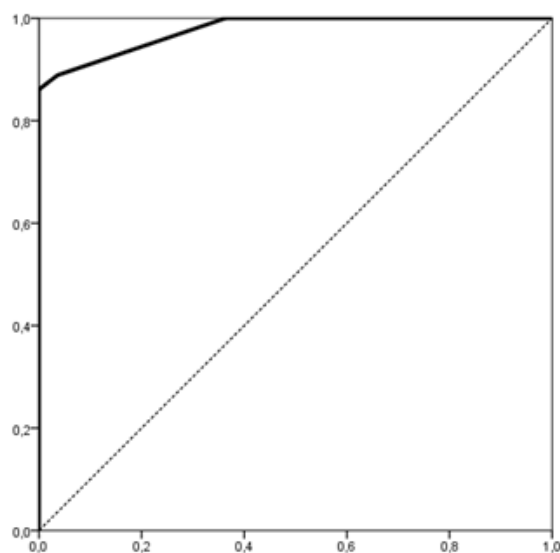
When considering either of the positive tests for the diagnosis of a borderline or malignant PT (see Table 3), we achieved a sensibility of 100%, a specificity of 91.8%, a positive predictive value (80%), a negative predictive value (100%), and an accuracy of 93.8%, with a very good concordance coefficient kappa of 0.85 ( $p < 0.001$ ). When considering both positive tests—p53 positivity and Ki67 positivity ( $>10\%$ )—a diagnosis of malignant or borderline TP can be made with 100% specificity. However, the sensibility is low (52.8%), the positive predictive value is 100%, the negative predictive value is 86.6%, and the accuracy is 88.4%, with a good concordance kappa of 0.63 ( $p < 0.001$ ).



**Table 3** Agreement between P53 and Ki-67 tests with anatomopathological results of borderline/malignant PT

Diagnostic properties	P53	Ki-67	P53 or Ki-67*	P53 & Ki-67**
	% (95% CI)	% (95% CI)	% (95% CI)	% (95% CI)
Sensibility	63.9 (46.2–79.2)	88.9 (73.9–96.9)	100 (90.3–100)	52.8 (35.5–69.6)
Specificity	95.5 (90.2–98.3)	96.4 (90.9–99)	91.8 (85–96.2)	100 (96.7–100)
Positive predictive value	82.1 (63.1–93.9)	88.9 (73.9–96.9)	80 (65.4–90.4)	100 (82.4–100)
Negative predictive value	88.9 (81.9–94)	96.4 (90.9–99)	100 (96.4–100)	86.6 (79.4–92)
Accuracy	87.7 (81.2–92.5)	94.5 (89.5–97.6)	93.8 (88.6–97.1)	88.4 (82–93.1)
Kappa	0.64	0.85	0.85	0.63
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

CI: confidence interval ;\* Positive for any test; \*\* Positive for both tests.



**Fig. 2** ROC curve to determine the best cutoff point for borderline/malignant PT pathological results. PT: phyllodes tumor; ROC: receiver operating characteristic.

## Discussion

An increasing trend of age, tumor size, and positivity scores of p53 and Ki67 were clearly detected for benign, borderline, and malignant PTs in this series (see Tables 2 and 3).

According to the WHO classification (5), the cases included in our study reported as benign (75.5%), borderline (11%), and malignant (13.7%), falling within published ranges of PT in the relevant series of other authors (2, 4, 6, 10, 32, 33). An interesting study published in 2018 by Chang et al. analyzes the impact of the new WHO classification by retrospectively assessing 305 fibroepithelial lesions in the 2007–2017 period, and observing an increased diagnosis of benign PT, with a relative reduction in fibroadenoma diagnoses. The authors assume that this fact stems from the more methodical application of the morphological criteria described in the new classification (6).

The mean lesion size observed in this analysis, as well as the median and range, is also comparable to those reported in the literature (2, 4, 10, 32). Although in this study series demonstrates a significant increase in the size of the lesions in relation to the degrees—a fact also observed in previous studies—the size of the lesion alone does not authorize the therapeutic decisions, according to Neville et al.'s study (64). The mean, median, and range of age of patients observed in this analysis are similar to those reported previously, as well as the significant association between age and degrees of PT (4, 5, 10, 33).

The differences in the clinical and pathological characteristics of PT reported by other authors are probably due to the inherent limitation of smaller series, as well as methodological aspects related to the recruitment of cases, or biases related to retrospective studies (26, 41, 43, 86).

PTs are biphasic neoplasms, but the stromal element is regarded as the neoplastic component and, consequently, as the determinant of clinical

behavior (2, 73). Nevertheless, many authors describe immunohistochemical patterns of epithelial positivity as being indicative of p53 positivity (24, 77, 82). Moreover, the scores used to evaluate the presence of positivity for p53 are quite varied when quantifying expression and intensity of the reaction, and in some studies the positivity criterion is not even detailed (3, 83). The strong relation between immunohistochemical expression of p53 and malignant PT had already been observed by Kim and Kim in 1993, in the first report in the literature on this subject (77). Since then, studies evaluating p53 expression in PT have been few in the literature, with most of them including only a limited number of cases. The largest published series on PT originated from a single institution, where Tan et al. analyzed the prognostic role of morphological parameters in 355 Asian women diagnosed with PT (82), authors considered epithelial and stromal positivity, and any percentage of expression or intensity of reaction, as a positive result for p53, without determination of a cutoff for the index test. Although counting on a series of only 15 PTs (6 malignant, 9 benign) and 20 fibroadenomas, Millar et al. suggest that not only the positivity itself but also the expression pattern of p53 and the intensity of the reaction are of diagnostic value for PT (78). The same impression was shared by Niezabitowski et al. 2 years later, when they stated that expression of the p53 in tumor cells also could be useful as a predictive indicator when the number of cells and the intensity of expression are considered (28). Similarly, when analyzing 143 cases of PT (87 benign, 37 borderline, and 19 malignant), Tse et al. stated that the strong and diffuse pattern of p53 presents high specificity (99%) but low sensitivity (47%) for the diagnosis of malignant PT (80). However, this pattern was only observed in one (3%) borderline PT in this series, which

limits its practical use since these tumors have biological behavior and consequent surgical management similar to malignant ones. When compared to our findings, the specificity (95.5%) and sensitivity (63.9%) values are similar. However, in our series this association was observed in the group that includes malignant and borderline PTs, which makes the finding more significant with implications for the practice and intended use of the index test. We believe that the difference is due to the nature of the score used to establish the positivity of the index test. When studying 63 PTs (50 benign and 13 malignant), Chan et al. found similar results (50). An interesting aspect of their study was—in the absence of generalized accepted standard percentage to define high expression—with different authors applying different cutoff levels from 5% to 34% (28, 73, 77-79, 84), Chan proposed a new score (0-10%, 11-30%, 31-50%, and 51-100%). However, their study did not take into account the intensity of the reaction in the evaluation, nor did it define what should be considered a positive result for the index test based on the analysis of the scores (50). One of the few studies that correlated p53 expression with systemic recurrence and survival in PT, adopted the intensity of the immunohistochemical staining and the proportion of positive cells, which were categorized as sporadic, focal, and diffuse (54). This score has been used in our study and is described in detail above.

Although there is a growing body of evidence for the utility of Ki-67 for predicting clinical prognosis in many different tumor entities, reports failed to demonstrate an association in PT cases (84). The likely reasons are the same for p53: associated with a small series and short follow-up. Umekita and

Yoshida were the first to correlate Ki-67 with the histological grade of malignancy in PT, using a grading histopathological system similar to the current WHO classification. Applying a 10% cutoff for positivity, but considering stromal and epithelial cells for analysis, they correlated Ki-67 with a histological grade of malignancy (81). When analyzing 52 benign PTs, 24 borderline PTs, and 42 malignant PTs, Niezabitowski et al. found a correlation between the expression of Ki-67 and prognostic factors among patients with malignant PT, and with histological grading (28). However, the cutoff used in the analyses—defined as 11.2% and derived from a previous study on cutaneous melanomas—is difficult to apply in practice. The same cutoff was used later and also showed a correlation with prognostic factors (54). Although almost all authors have been correlating Ki-67 expression with morphologic grading, increasing from benign, borderline, to malignant PTs, labelling indices have been reported to range from 1.3% to 50%. Also, there is no generally accepted standard percentage that defines a positive result, with different authors applying different cutoff levels from 5% to 20% (9, 28, 50, 54, 81). Furthermore, many reports have not used any cutoff to define a positive index test (1, 9, 28, 50, 54, 81).

Our study has some limitations. We performed all analyses on surgical specimens, so we cannot extend the application of our findings to core biopsy samples. A similar study design focused on biopsy specimens could clear this restriction. Alternatively, a tissue microarray could be constructed with random samples and then the results correlated. The tissue microarray technique can

be effectively applied in PTs to study immunohistochemical markers, according to Tan et al. and Munawer et al. (24, 82).

## Conclusions

Our experiment provides a practical methodology to achieve a highly accurate diagnosis of PT grades, benign versus borderline/malignant, compared to gold standard, based on clearly defined and easy to apply cutoffs of a simple immunohistochemical panel of Ki-67 and p53. When considering either of the positive tests for the diagnosis of a borderline or malignant PT, we achieved a sensibility of 100% with a specificity of 91.8%. In conclusion, a PT positive for either of index tests should be graded as borderline or malignant. We hope this new approach might provide a basis for the development of standardization in the use of p53 and Ki-67 for grading PTs.

## Abbreviations

PT: phyllodes tumor; ROC: receiver operating characteristic; SD: standard deviation; ANOVA: analysis of variance; CI: confidence interval; HPF: high power fields.

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate

Ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study.

CAAE: 50732315.5.0000.5327

- Consent for publication

Not applicable.

- Availability of data and material

Please contact author, Luís Fernando da Rosa Rivero (lfrivero@hcpa.edu.br) for data requests.

- Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

- Funding

FIPE from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for financial support for carrying out the immunohistochemical tests.

- Authors' contributions

Rivero LF: main author of the manuscript, worked in conception and design of study, analyzed and interpreted the diagnosis and immunohistochemical tests performed.

Delgado AM: have been involved in requisition of data and analysis.

Kliemann LM: have been involved in conception and design of the study, analysis and revision of manuscript.

All authors read, revise and gave approval of the final manuscript.

- Acknowledgements

We gratefully acknowledge the staff members of Patology laboratory, Gabriela Remonato, Luciana Ferreira and Carina Henriques for their help and cooperation.

- Author information

Rivero LF, Department of Pathology Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

1. Tan BY, Tan PH. A Diagnostic Approach to Fibroepithelial Breast Lesions. *Surg Pathol Clin.* 2018;11(1):17-42.
2. Tan BY, Acs G, Apple SK, Badve S, Bleiweiss IJ, Brogi E, et al. Phyllodes tumours of the breast: a consensus review. *Histopathology.* 2016;68(1):5-21.
3. Mishra SP, Tiwary SK, Mishra M, Khanna AK. Phyllodes tumor of breast: a review article. *ISRN Surg.* 2013;2013:361469.
4. Spitaleri G, Toesca A, Botteri E, Bottiglieri L, Rotmensz N, Boselli S, et al. Breast phyllodes tumor: a review of literature and a single center retrospective series analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88(2):427-36.
5. Lakhani SR. WHO classification of tumours of the breast. World Health Organization classification of tumours, 4th edition - International Agency for Research on Cancer 2012;1.
6. Chang J, Denham L, Dong EK, Malek K, Lum SS. Trends in the Diagnosis of Phyllodes Tumors and Fibroadenomas Before and After Release of WHO Classification Standards. *Ann Surg Oncol.* 2018.
7. Pareja F, Geyer FC, Kumar R, Selenica P, Piscuoglio S, Ng CKY, et al. Phyllodes tumors with and without fibroadenoma-like areas display distinct genomic features and may evolve through distinct pathways. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:40.
8. Yang X, Kandil D, Cosar EF, Khan A. Fibroepithelial tumors of the breast: pathologic and immunohistochemical features and molecular mechanisms. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(1):25-36.
9. Jara-Lazaro AR, Akhilesh M, Thike AA, Lui PC, Tse GM, Tan PH. Predictors of phyllodes tumours on core biopsy specimens of fibroepithelial neoplasms. *Histopathology.* 2010;57(2):220-32.
10. Tan PH, Jayabaskar T, Chuah KL, Lee HY, Tan Y, Hilmy M, et al. Phyllodes tumors of the breast: the role of pathologic parameters. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(4):529-40.
11. Lawton TJ, Acs G, Argani P, Farshid G, Gilcrease M, Goldstein N, et al. Interobserver variability by pathologists in the distinction between cellular fibroadenomas and phyllodes tumors. *Int J Surg Pathol.* 2014;22(8):695-8.
12. Chng TW, Gudi M, Lim SH, Li H, Tan PH. Validation of the Singapore nomogram for outcome prediction in breast phyllodes tumours in a large patient cohort. *J Clin Pathol.* 2018;71(2):125-8.
13. Rakha EA, Ahmed MA, Aleskandarany MA, Hodi Z, Lee AH, Pinder SE, et al. Diagnostic concordance of breast pathologists: lessons from the National Health Service Breast Screening Programme Pathology External Quality Assurance Scheme. *Histopathology.* 2017;70(4):632-42.
14. Khazai L, Middleton LP, Goktepe N, Liu BT, Sahin AA. Breast pathology second review identifies clinically significant discrepancies in over 10% of patients. *J Surg Oncol.* 2015;111(2):192-7.
15. Bansal M, Chen J, Wang X. Focal Anomalous Expression of Cytokeratin and p63 in Malignant Phyllodes Tumor: A Comparison With Spindle Cell Metaplastic Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(3):198-201.
16. Kulkarni MM, Khandeparkar SG, Joshi AR, Kothikar V, Nasare A, Patil S, et al. Role of CD10 Immunorexpression in Grading Phyllodes Tumour of the Breast. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(1):EC14-EC6.
17. Tawasil J, Go EM, Tsang JY, Ni YB, Ko CW, Tse GM. Associations of epithelial c-kit expression in phyllodes tumours of the breast. *J Clin Pathol.* 2015;68(10):808-11.



18. Tariq MU, Haroon S, Kayani N. Role of CD10 Immunohistochemical Expression in Predicting Aggressive Behavior of Phylloides Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(8):3147-52.
19. Tan WJ, Thike AA, Tan SY, Tse GM, Tan MH, Bay BH, et al. CD117 expression in breast phyllodes tumors correlates with adverse pathologic parameters and reduced survival. *Mod Pathol*. 2015;28(3):352-8.
20. Liu J, Liu X, Feng X, Liu J, Lv S, Zhang W, et al. C-kit overexpression correlates with KIT gene copy numbers increases in phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(2):395-401.
21. Vilela MH, de Almeida FM, de Paula GM, Ribeiro NB, Cirqueira MB, Silva AL, et al. Utility of Ki-67, CD10, CD34, p53, CD117, and mast cell content in the differential diagnosis of cellular fibroadenomas and in the classification of phyllodes tumors of the breast. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(6):485-91.
22. Romero Q, Bendahl PO, Ferno M, Grabau D, Borgquist S. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn Pathol*. 2014;9:118.
23. Kucuk U, Bayol U, Pala EE, Cumurcu S. Importance of P53, Ki-67 expression in the differential diagnosis of benign/malignant phyllodes tumors of the breast. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013;56(2):129-34.
24. Munawer NH, Md Zin R, Md Ali SA, Muhammad R, Ali J, Das S. ER, p53 and MIB-1 are significantly associated with malignant phyllodes tumor. *Biomed J*. 2012;35(6):486-92.
25. Nozad S, Sheehan CE, Gay LM, Elvin JA, Vergilio JA, Suh J, et al. Comprehensive genomic profiling of malignant phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;162(3):597-602.
26. Kim JY, Yu JH, Nam SJ, Kim SW, Lee SK, Park WY, et al. Genetic and Clinical Characteristics of Phyllodes Tumors of the Breast. *Transl Oncol*. 2018;11(1):18-23.
27. Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, Graudenz MS, Rivero LF, Lima E, et al. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Arch*. 2013;463(1):17-22.
28. Niezabitowski A, Lackowska B, Rys J, Kruczak A, Kowalska T, Mitus J, et al. Prognostic evaluation of proliferative activity and DNA content in the phyllodes tumor of the breast: immunohistochemical and flow cytometric study of 118 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;65(1):77-85.
29. Pornchai S, Chirappapha P, Pipatsakulroj W, Lertsithichai P, Vassanasiri W, Sitathanee C, et al. Malignant transformation of phyllodes tumor: a case report and review of literature. *Clin Case Rep*. 2018;6(4):678-85.
30. The world Health Organization Histological Typing of Breast Tumors--Second Edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol*. 1982;78(6):806-16.
31. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.
32. Efares B, Ebang GA, Tahiri L, Sidibe IS, Erregad F, Hammas N, et al. Phyllodes tumors of the breast: clinicopathological analysis of 106 cases from a single institution. *Breast Dis*. 2018;37(3):139-45.
33. Jia C, Mei F, Liu JY, Zhao HM, Lei YT, Su J, et al. [Histologic classification and prognosis factors in phyllodes tumors of breast]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2017;46(1):14-9.
34. Lin JJ, Huang CS, Yu J, Liao GS, Lien HC, Hung JT, et al. Malignant phyllodes tumors display mesenchymal stem cell features and aldehyde dehydrogenase/disialoganglioside identify their tumor stem cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R29.

35. Yeong J, Thike AA, Young Ng CC, Md Nasir ND, Loh K, Teh BT, et al. A genetic mutation panel for differentiating malignant phyllodes tumour from metaplastic breast carcinoma. *Pathology*. 2017;49(7):786-9.
36. Calhoun BC, Collins LC. Recommendations for excision following core needle biopsy of the breast: a contemporary evaluation of the literature. *Histopathology*. 2016;68(1):138-51.
37. Tremblay-LeMay R, Hogue JC, Provencher L, Poirier B, Poirier E, Laberge S, et al. How Wide Should Margins Be for Phyllodes Tumors of the Breast? *Breast J*. 2017;23(3):315-22.
38. Shaaban M, Barthelmes L. Benign phyllodes tumours of the breast: (Over) treatment of margins - A literature review. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(7):1186-90.
39. Lae M, Vincent-Salomon A, Savignoni A, Huon I, Freneaux P, Sigal-Zafrani B, et al. Phyllodes tumors of the breast segregate in two groups according to genetic criteria. *Mod Pathol*. 2007;20(4):435-44.
40. Loke BN, Md Nasir ND, Thike AA, Lee JYH, Lee CS, Teh BT, et al. Genetics and genomics of breast fibroadenomas. *J Clin Pathol*. 2018;71(5):381-7.
41. Piscuoglio S, Ng CK, Murray M, Burke KA, Edelweiss M, Geyer FC, et al. Massively parallel sequencing of phyllodes tumours of the breast reveals actionable mutations, and TERT promoter hotspot mutations and TERT gene amplification as likely drivers of progression. *J Pathol*. 2016;238(4):508-18.
42. Faridi SH, Siddiqui B, Ahmad SS, Aslam M. Progression of Fibroadenoma to Malignant Phyllodes Tumour in a 14-Year Female. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2018;28(1):69-71.
43. Sin EI, Wong CY, Yong WS, Ong KW, Madhukumar P, Tan VK, et al. Breast carcinoma and phyllodes tumour: a case series. *J Clin Pathol*. 2016;69(4):364-9.
44. Co M, Tse GM, Chen C, Wei J, Kwong A. Coexistence of Ductal Carcinoma Within Mammary Phyllodes Tumor: A Review of 557 Cases From a 20-year Region-wide Database in Hong Kong and Southern China. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(3):e421-e5.
45. Moo TA, Alabdulkareem H, Tam A, Fontanet C, Lu Y, Landers A, et al. Association Between Recurrence and Re-Excision for Close and Positive Margins Versus Observation in Patients with Benign Phyllodes Tumors. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(10):3088-92.
46. Borhani-Khomani K, Talman ML, Kroman N, Tvedskov TF. Risk of Local Recurrence of Benign and Borderline Phyllodes Tumors: A Danish Population-Based Retrospective Study. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1543-8.
47. Badwe RA, Kataria K, Srivastava A. Surgical Resection of Phyllodes Tumour: a Radical Approach as a Safeguard Against Local Recurrence. *Indian J Surg*. 2015;77(2):161-3.
48. Korcheva VB, Levine J, Beadling C, Warrick A, Countryman G, Olson NR, et al. Immunohistochemical and molecular markers in breast phyllodes tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(2):119-25.
49. Opric S, Opric D, Gugic D, Granic M. Phyllodes tumors and fibroadenoma common beginning and different ending. *Coll Antropol*. 2012;36(1):235-41.
50. Chan YJ, Chen BF, Chang CL, Yang TL, Fan CC. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in phyllodes tumor of the breast. *J Chin Med Assoc*. 2004;67(1):3-8.
51. Tan PH, Zhang L. Updates on Surgical and Molecular Pathology Concerning Breast Diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(7):625-7.
52. Wang H, Wang X, Wang C. [Prognostic analysis of benign, borderline and malignant phyllodes tumors of the breast]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2015;37(12):923-7.
53. Ben Hassouna J, Damak T, Gamoudi A, Chargui R, Khomsi F, Mahjoub S, et al. Phyllodes tumors of the breast: a case series of 106 patients. *Am J Surg*. 2006;192(2):141-7.
54. Yonemori K, Hasegawa T, Shimizu C, Shibata T, Matsumoto K, Kouno T, et al. Correlation of p53 and MIB-1 expression with both the systemic recurrence and survival in cases of phyllodes tumors of the breast. *Pathol Res Pract*. 2006;202(10):705-12.

55. Lenhard MS, Kahlert S, Himsl I, Ditsch N, Untch M, Bauerfeind I. Phyllodes tumour of the breast: clinical follow-up of 33 cases of this rare disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138(2):217-21.
56. Tan PH, Thike AA, Tan WJ, Thu MM, Busmanis I, Li H, et al. Predicting clinical behaviour of breast phyllodes tumours: a nomogram based on histological criteria and surgical margins. *J Clin Pathol.* 2012;65(1):69-76.
57. Morgan JM, Douglas-Jones AG, Gupta SK. Analysis of histological features in needle core biopsy of breast useful in preoperative distinction between fibroadenoma and phyllodes tumour. *Histopathology.* 2010;56(4):489-500.
58. Yoshidaya F, Hayashi N, Takahashi K, Suzuki K, Akiyama F, Ishiyama M, et al. Malignant phyllodes tumor metastasized to the right ventricle: a case report. *Surg Case Rep.* 2015;1(1):121.
59. Ouyang Q, Li S, Tan C, Zeng Y, Zhu L, Song E, et al. Benign Phyllodes Tumor of the Breast Diagnosed After Ultrasound-Guided Vacuum-Assisted Biopsy: Surgical Excision or Wait-and-Watch? *Ann Surg Oncol.* 2016;23(4):1129-34.
60. Bandyopadhyay S, Barak S, Hayek K, Thomas S, Saeed H, Beydoun R, et al. Can problematic fibroepithelial lesions be accurately classified on core needle biopsies? *Hum Pathol.* 2016;47(1):38-44.
61. Abdulcadir D, Nori J, Meattini I, Giannotti E, Boeri C, Vanzi E, et al. Phyllodes tumours of the breast diagnosed as B3 category on image-guided 14-gauge core biopsy: analysis of 51 cases from a single institution and review of the literature. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(7):859-64.
62. Jacobs TW, Chen YY, Guinee DG, Jr., Holden JA, Cha I, Bauermeister DE, et al. Fibroepithelial lesions with cellular stroma on breast core needle biopsy: are there predictors of outcome on surgical excision? *Am J Clin Pathol.* 2005;124(3):342-54.
63. Marcil G, Wong S, Trabulsi N, Allard-Coutu A, Parsyan A, Omeroglu A, et al. Fibroepithelial breast lesions diagnosed by core needle biopsy demonstrate a moderate rate of upstaging to phyllodes tumors. *Am J Surg.* 2017;214(2):318-22.
64. Neville G, Neill CO, Murphy R, Corrigan M, Redmond PH, Feeley L, et al. Is excision biopsy of fibroadenomas based solely on size criteria warranted? *Breast J.* 2018.
65. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
66. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer.* 2011;2(4):466-74.
67. Appel ML, Edelweiss MI, Fleck J, Rivero LF, Rivoire WA, Monego HI, et al. P53 and BCL-2 as prognostic markers in endometrial carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(1):23-30.
68. Kawai A, Noguchi M, Beppu Y, Yokoyama R, Mukai K, Hirohashi S, et al. Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas. A possible prognostic factor. *Cancer.* 1994;73(10):2499-505.
69. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2006;19(9):1236-42.
70. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih Ie M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol.* 2011;24(9):1248-53.
71. Murnyak B, Hortobagyi T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(40):64910-20.
72. Mastellaro MJ, Seidinger AL, Kang G, Abrahao R, Miranda ECM, Pounds SB, et al. Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights

from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer*. 2017;123(16):3150-8.

73. Feakins RM, Mulcahy HE, Nickols CD, Wells CA. p53 expression in phyllodes tumours is associated with histological features of malignancy but does not predict outcome. *Histopathology*. 1999;35(2):162-9.
74. Prochazkova K, Foretova L, Sedlacek Z. A rare tumor and an ethical dilemma in a family with a germline TP53 mutation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;180(1):65-9.
75. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001;20(34):4621-8.
76. Ossa CA, Molina G, Cock-Rada AM. Li-Fraumeni syndrome. *Biomedica*. 2016;36(2):182-7.
77. Kim CJ, Kim WH. Patterns of p53 expression in phyllodes tumors of the breast--an immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*. 1993;8(5):325-8.
78. Millar EK, Beretov J, Marr P, Sarris M, Clarke RA, Kearsley JH, et al. Malignant phyllodes tumours of the breast display increased stromal p53 protein expression. *Histopathology*. 1999;34(6):491-6.
79. Gatalica Z, Finkelstein S, Lucio E, Tawfik O, Palazzo J, Hightower B, et al. p53 protein expression and gene mutation in phyllodes tumors of the breast. *Pathol Res Pract*. 2001;197(3):183-7.
80. Tse GM, Putti TC, Kung FY, Scolyer RA, Law BK, Lau TS, et al. Increased p53 protein expression in malignant mammary phyllodes tumors. *Mod Pathol*. 2002;15(7):734-40.
81. Umekita Y, Yoshida H. Immunohistochemical study of MIB1 expression in phyllodes tumor and fibroadenoma. *Pathol Int*. 1999;49(9):807-10.
82. Tan PH, Jayabaskar T, Yip G, Tan Y, Hilmy M, Selvarajan S, et al. p53 and c-kit (CD117) protein expression as prognostic indicators in breast phyllodes tumors: a tissue microarray study. *Mod Pathol*. 2005;18(12):1527-34.
83. Wang Y, Zhu J, Gou J, Xiong J, Yang X. Phyllodes tumors of the breast in 2 sisters: Case report and review of literature. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(46):e8552.
84. Kocova L, Skalova A, Fakan F, Rousarova M. Phyllodes tumour of the breast: immunohistochemical study of 37 tumours using MIB1 antibody. *Pathol Res Pract*. 1998;194(2):97-104.
85. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol*. 2005;18(3):374-81.
86. Noronha Y, Raza A, Hutchins B, Chase D, Garberoglio C, Chu P, et al. CD34, CD117, and Ki-67 expression in phyllodes tumor of the breast: an immunohistochemical study of 33 cases. *Int J Surg Pathol*. 2011;19(2):152-8.
87. Lin CK, Tsai WC, Lin YC, Yu JC. Biomarkers distinguishing mammary fibroepithelial neoplasms: a tissue microarray study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(6):433-41.
88. Vidal M, Peg V, Galvan P, Tres A, Cortes J, Ramon y Cajal S, et al. Gene expression-based classifications of fibroadenomas and phyllodes tumours of the breast. *Mol Oncol*. 2015;9(6):1081-90.
89. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: An Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies. *Radiology*. 2015;277(3):826-32.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que a utilização sistemática do estudo imuno-histoquímico, com a análise da expressão da p53 e do escore de Ki67, contribuirá para a elevação da acurácia diagnóstica dos tumores *phylloides*. O diagnóstico preciso dessas lesões fibroepiteliais complexas proporcionará um tratamento mais adequado dos tumores *phylloides* benignos, *borderline* e malignos, contribuindo para a redução da morbidade e mortalidade das pacientes acometidas por essa neoplasia rara.

## PERSPECTIVAS

Uma vez que o tumor *phylloides* apresenta um componente genético importante na sua patogênese, na forma de uma mutação com consequente expressão proteica anômala, abre-se um amplo campo de pesquisa, não só para o desenvolvimento de novos marcadores relacionados ao diagnóstico e ao prognóstico dessas lesões, mas também, e fundamentalmente, relacionado à terapia farmacológica. O desenvolvimento de drogas direcionadas a alvos moleculares específicos, como mutações, é uma realidade que vem revolucionando a oncologia moderna, sendo comumente referida como medicina personalizada.

## ANEXOS

### Avaliação histopatológica

Critério	Escore		
Celularidade estromal	Mínima	Moderada	Acentuada
Atipia estromal	Mínima	Moderada	Acentuada
Expansão estromal	Ausente		Presente
Mitoses em 10HPF	0-4	5-9	≥10
Borda tumoral	Circunscrita		Permeativa

## Avaliação imuno-histoquímica

p53

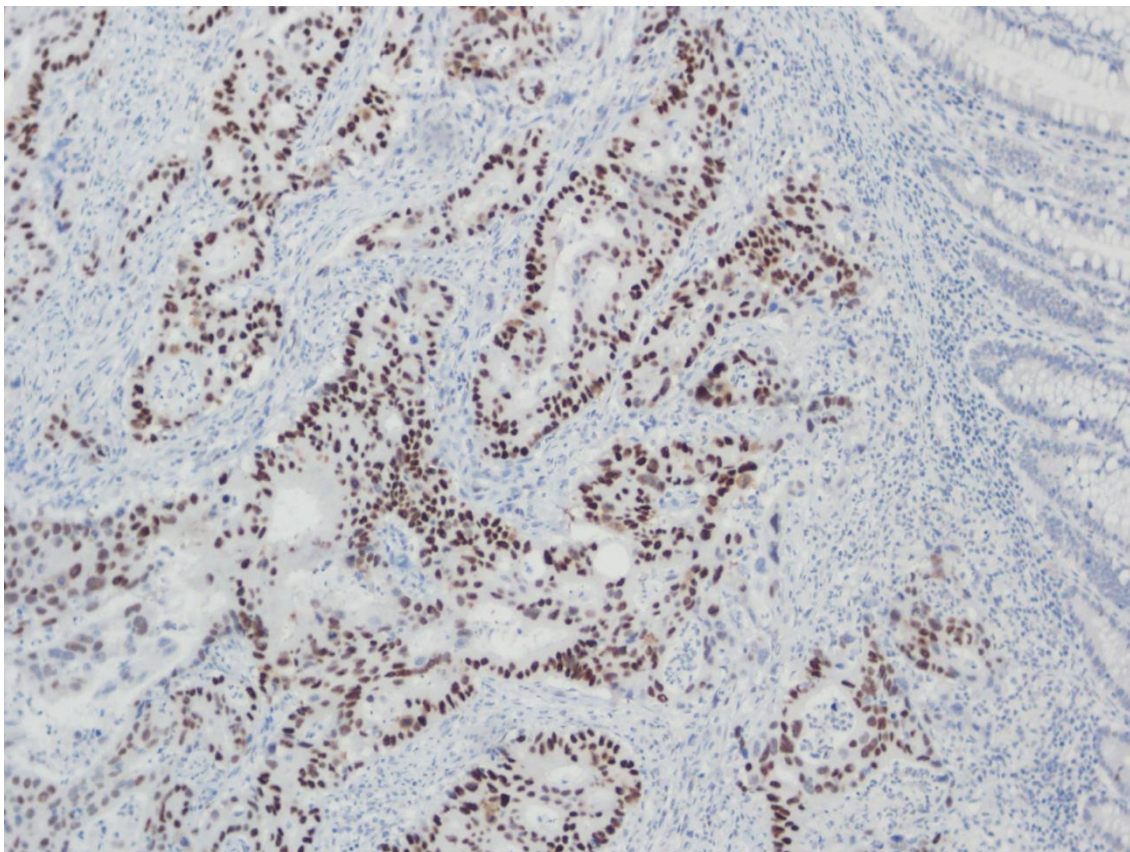


Figura 6 - Lâmina de controle para p53 (adenocarcinoma colo-retal).

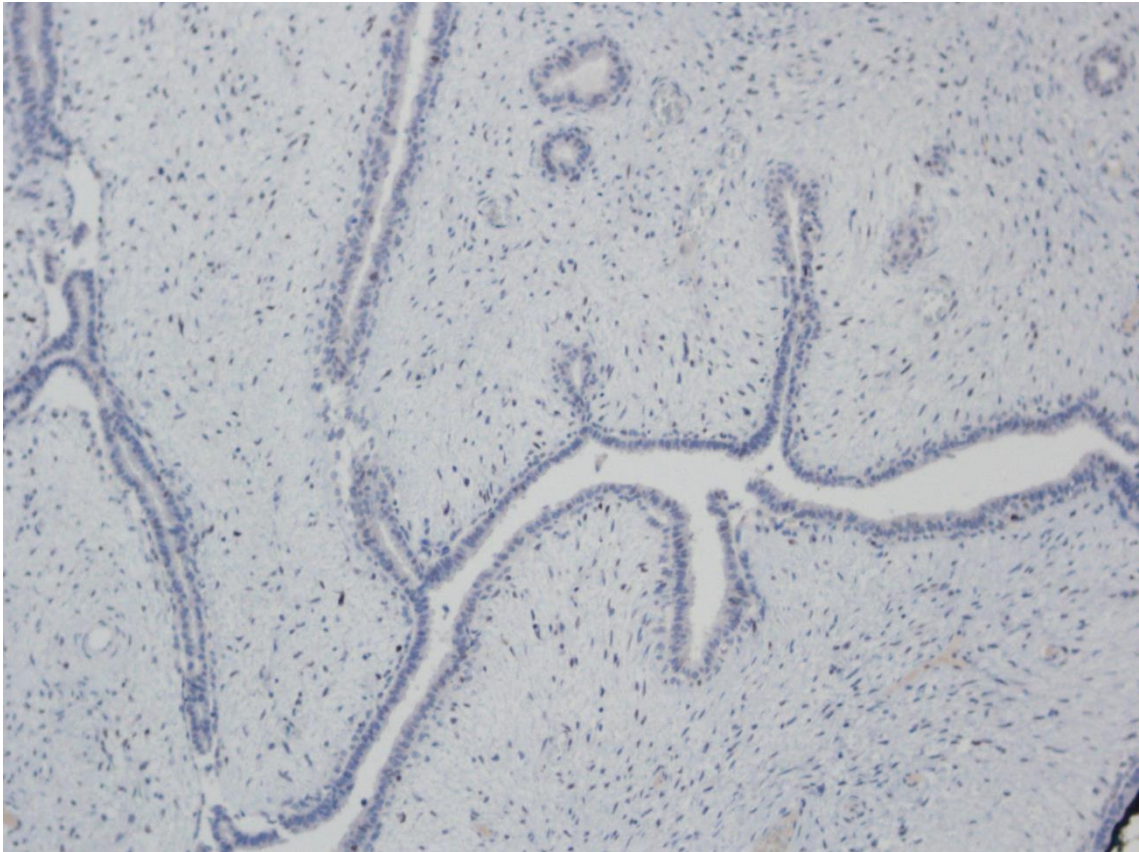


Figura 7 - Tumor phyllodes benigno negativo para p53.



### Intensidade da reação para o p53

zero = negativo    1+ = intensidade fraca    2+= intensidade moderada    3+ = intensidade forte

### Expressão da reação para o p53

Menos de 10%	Mais de 10% e menos de 50%	Mais de 50%
= expressão esporádica	= expressão focal	= expressão difusa

### Escore de positividade para o p53

Intensidade zero e 1+ = negativo.

Intensidade 2+ e 3+ com distribuição focal ou difusa = positivo.

Escore segundo Yonemori (54).

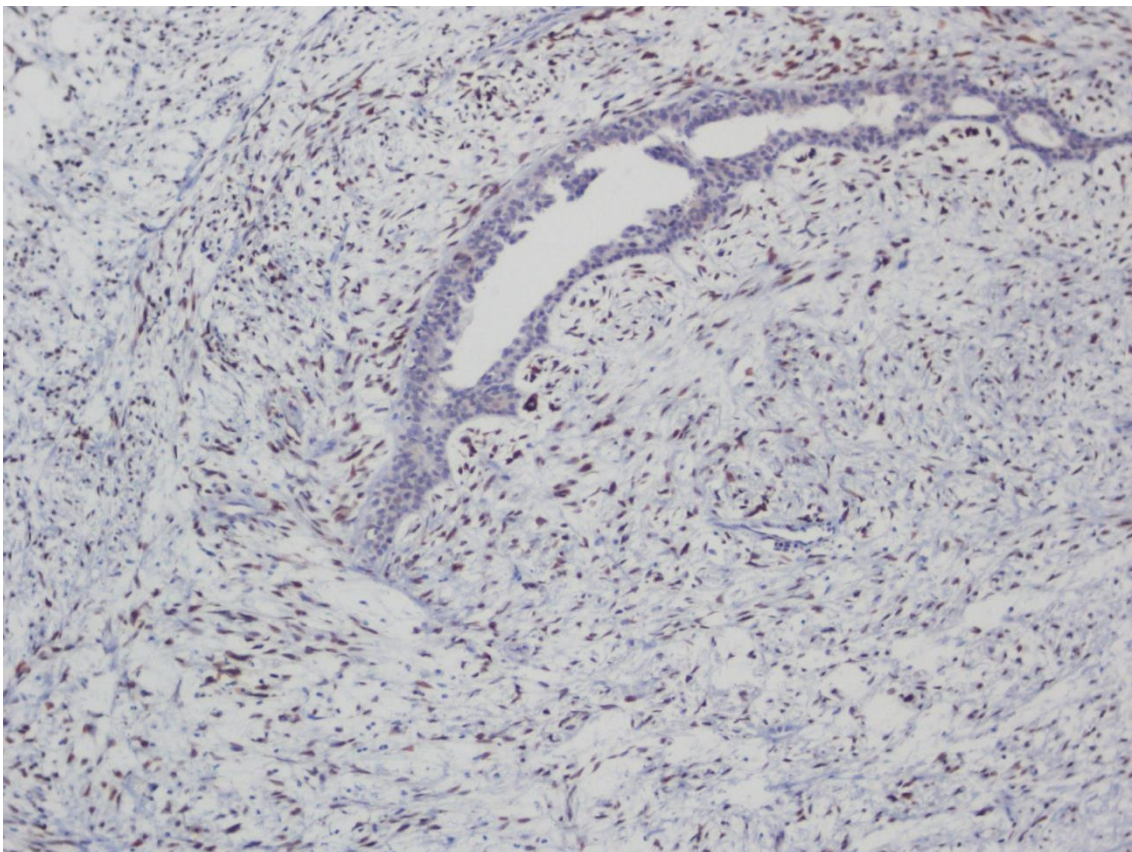


Figura 8 - Tumor phyllodes maligno positivo para p53 com intensidade moderada em cerca de 30% das células neoplásicas.

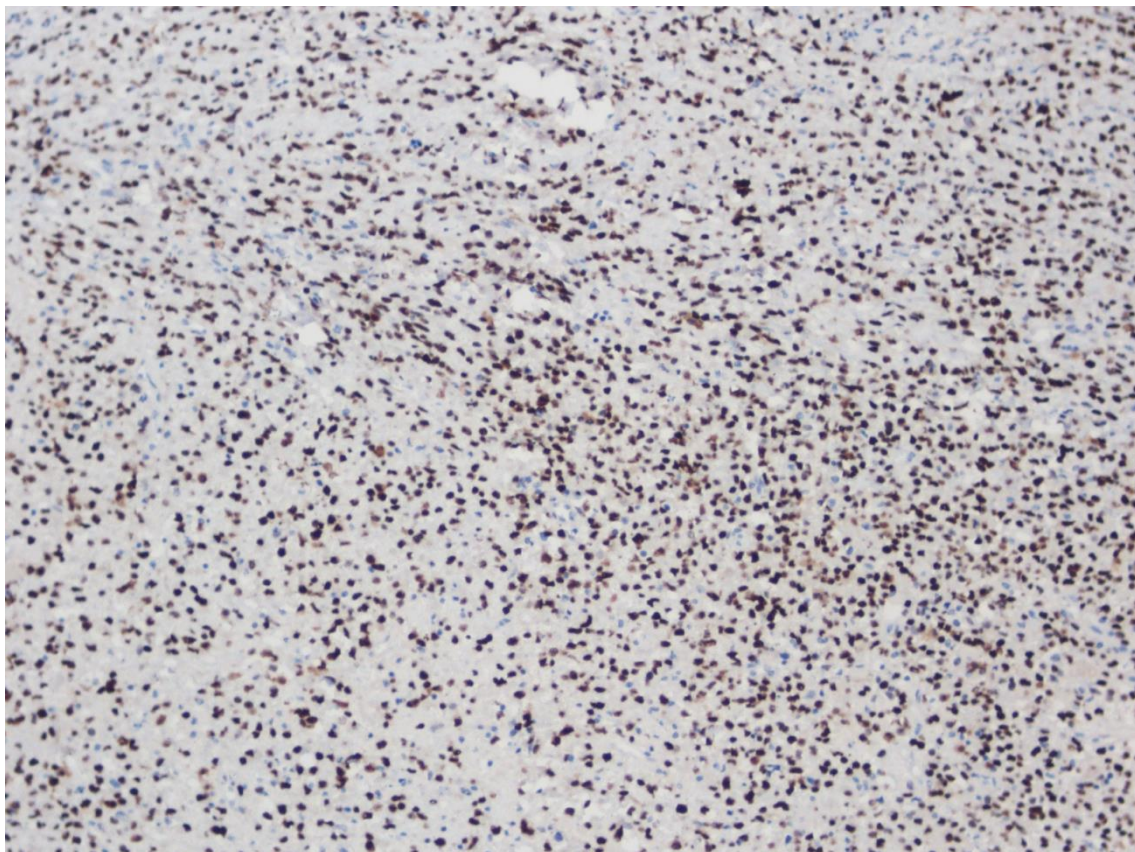


Figura 9 - Tumor phyllodes maligno positivo para p53 com intensidade forte em cerca de 70% das células neoplásicas.

### Ki-67

As áreas de maior concentração de células estromais neoplásicas e com conseqüente maior número de núcleos positivos serão escolhidas para a análise. O índice de Ki-67 será definido como a percentagem de núcleos com marcação positiva em 10 *HPF* usando objetiva de 40x e ocular de 10x (área de 0.25mm) (62, 84).

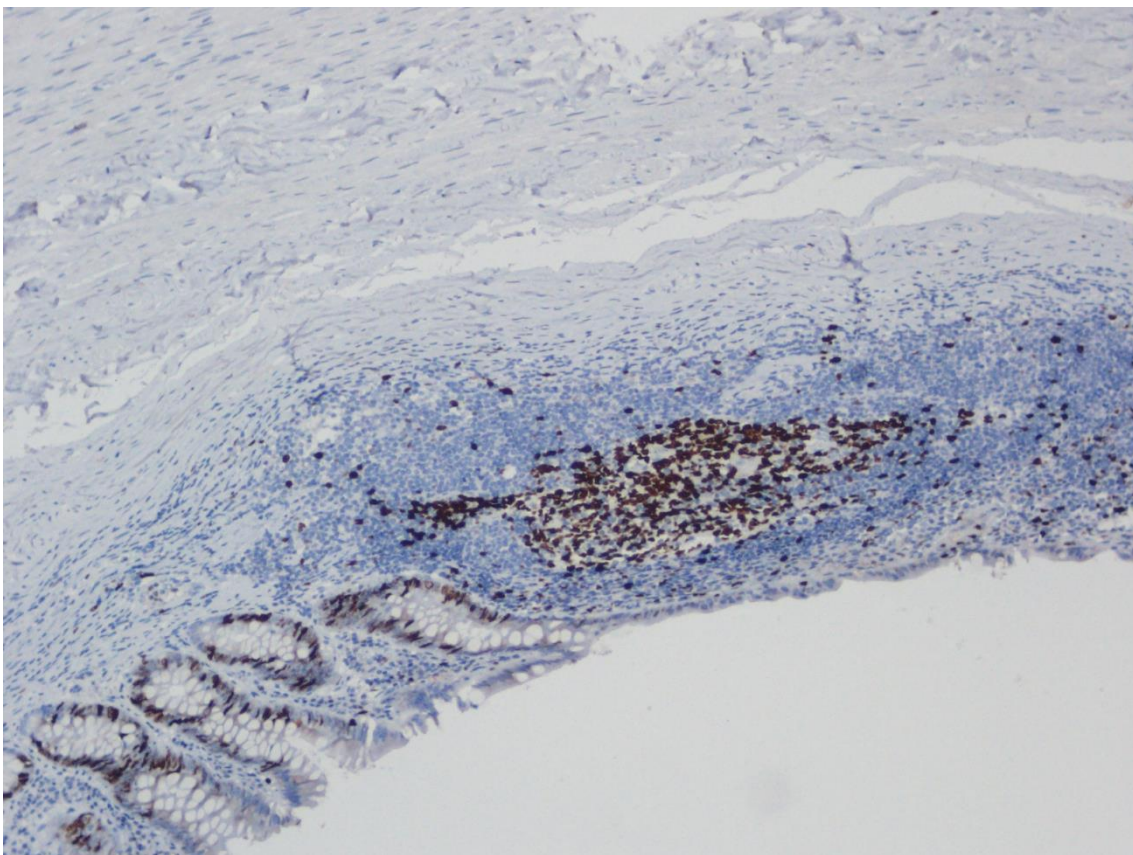


Figura 10 - Lâmina de controle para Ki67 (centro germinativo de folículo linfóide do apêndice cecal).

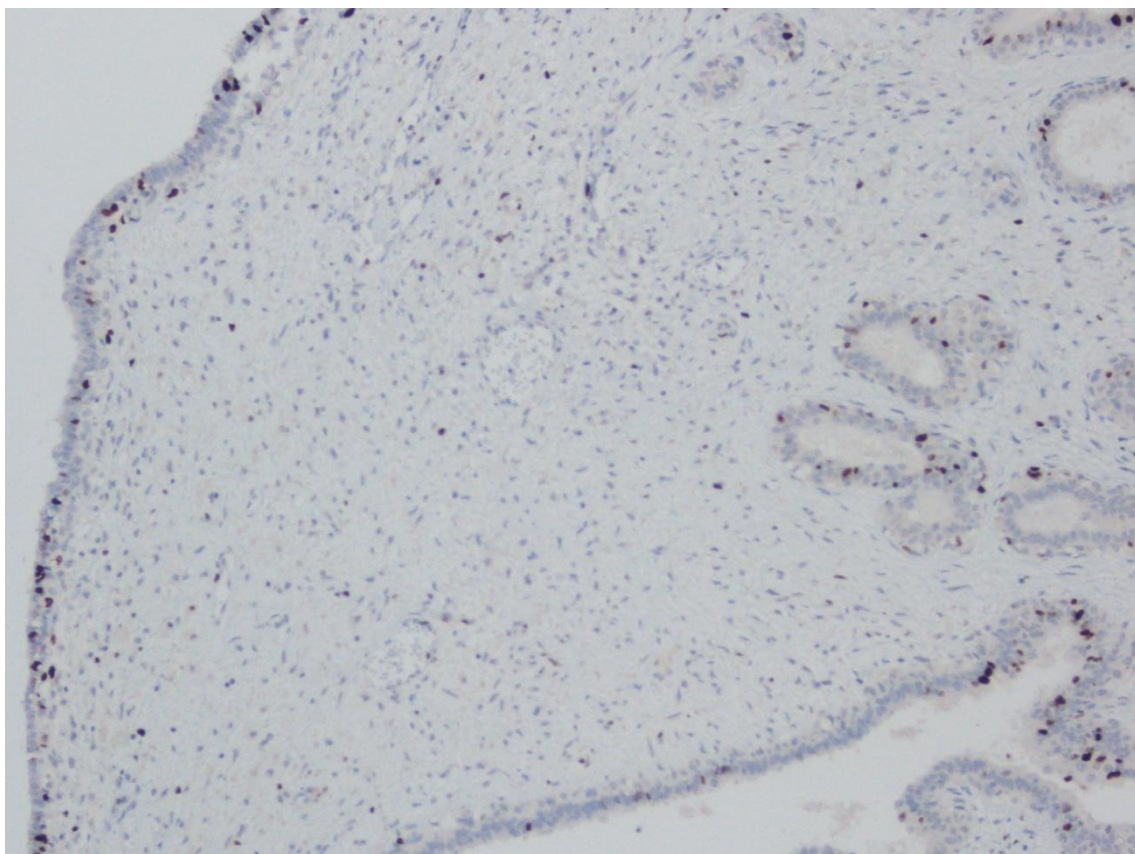


Figura 11 - Tumor phyllodes benigno com Ki67 de 5%.

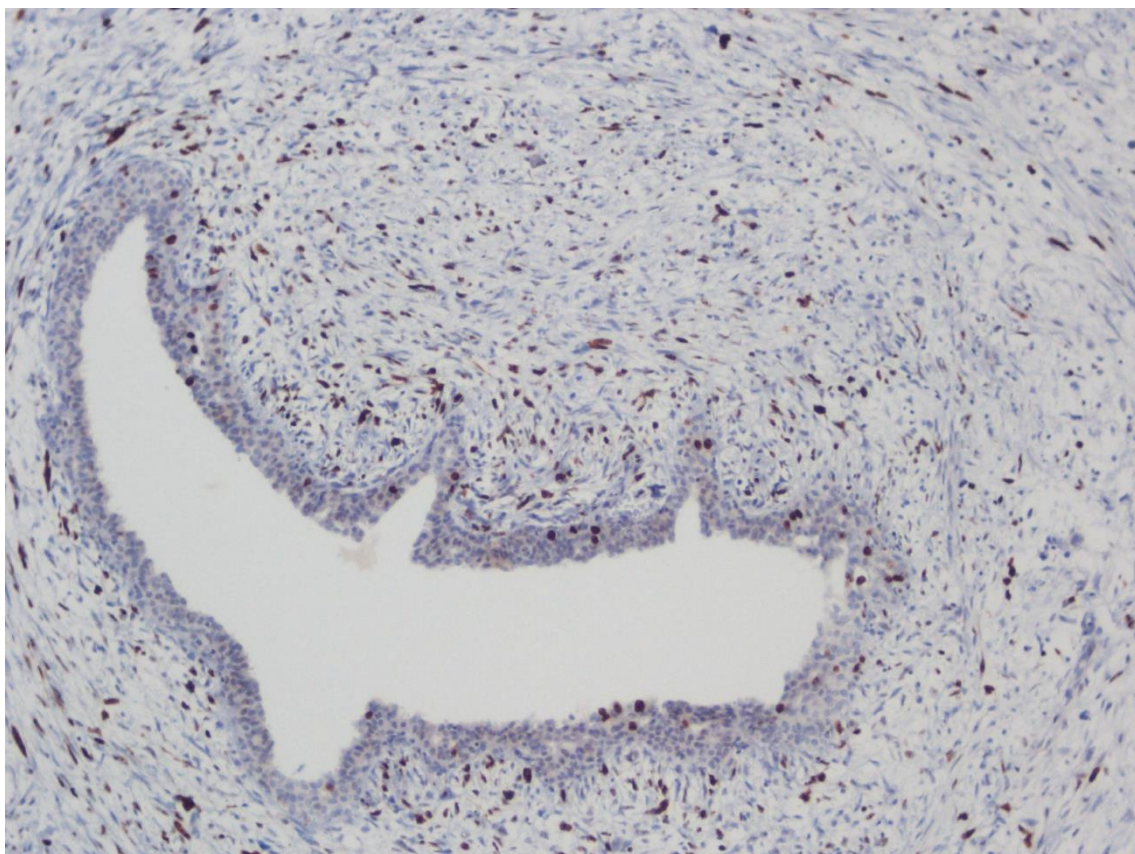


Figura 12 - Tumor phyllodes maligno com Ki67 de 30%.

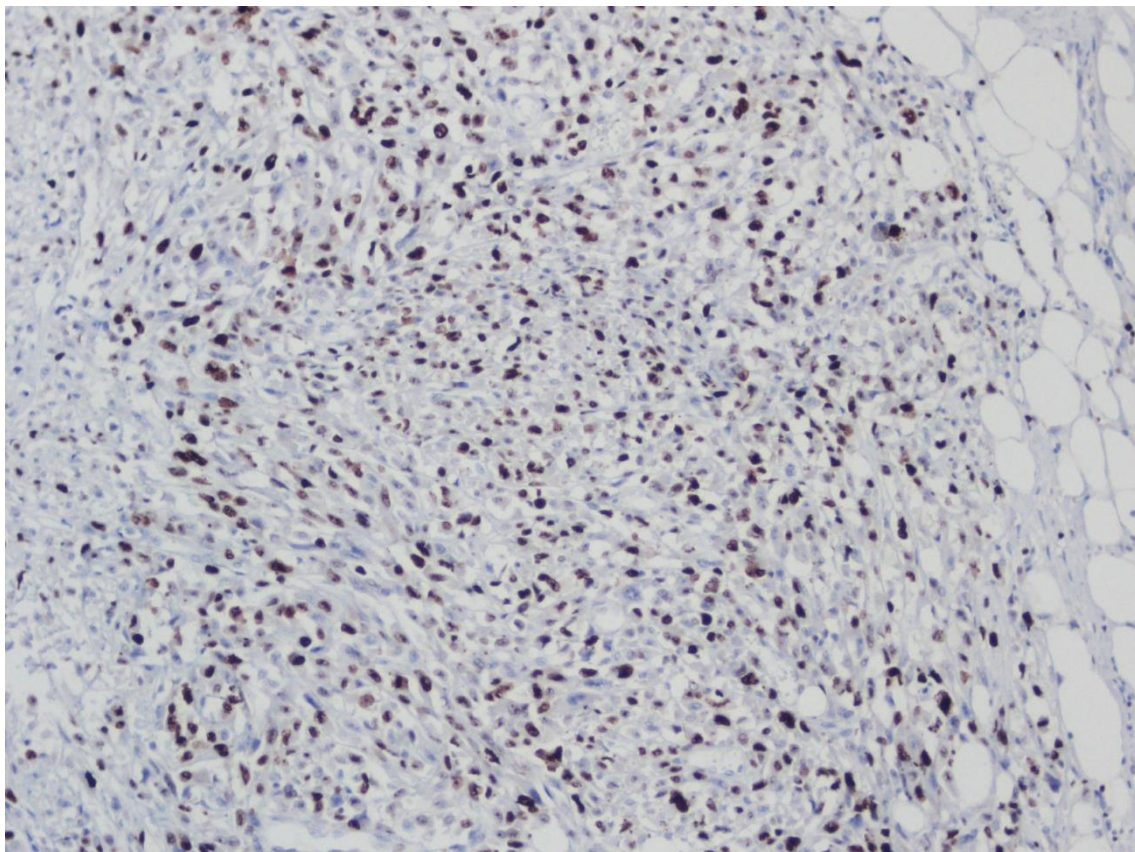


Figura 13 - Tumor phyllodes maligno com Ki67 de 60%.