

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SISTEMA DE PONTOS PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO**  
**HISTOPATOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES MAMÁRIAS PROLIFERATIVAS**

**FREDERICO DIEFENTHAELER KRAHE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PORTO ALEGRE**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SISTEMA DE PONTOS PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO**  
**HISTOPATOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES MAMÁRIAS PROLIFERATIVAS.**

**FREDERICO DIEFENTHAELER KRAHE**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação em  
Medicina: Ciências Médicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, para obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel  
Albano Edelweiss

**PORTO ALEGRE**

**2007**

## Dados Internacionais de catalogação na Publicação (CIP)

**K89s Krahe, Frederico Diefenthaler**

Sistema de pontos para auxílio no diagnóstico histopatológico das alterações mamárias proliferativas / Frederico Diefenthaler Krahe; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2007.

90 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Neoplasias mamárias 2. Citologia 3. Coleta de dados 4. Índice mitótico 5. Diagnóstico 6. Patologia I. Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Título.

NLM: WP 870

Catálogo: Biblioteca FAMED/HCPA

**DEDICATÓRIA**

*A minha família que sempre me apoiou na busca de meus ideais, especialmente a minha esposa Valesca, que esteve junto em todas as horas.*

## **AGRADECIMENTOS**

No decorrer desse trabalho pude contar com o apoio direto e indireto de muitas pessoas, meu profundo agradecimento a todas elas e, em especial:

À Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss que mais do que uma orientadora, foi uma amiga e uma mãe, em todos os momentos, especialmente nas horas mais difíceis. Agradeço pelo seu apoio, bom humor e incentivo.

À Prof. Dra. Luise Meurer que nos auxiliou de forma contundente na avaliação de todas as lâminas para realização desse trabalho.

Ao Prof Dr. Jorge Vilanova Biazús e ao Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por ter me recebido tão bem durante o período que frequentei suas reuniões.

Ao Prof. Dr. Cláudio Krahe pelo incentivo na realização desse projeto.

Aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clinicas de Porto Alegre que auxiliaram na busca do material a ser analisado em todo o arquivo do serviço.

Às estatísticas do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação: Daniela Benzano e Vânia Naomi Hirakata- pelo auxílio na análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Diego Uchoa e à Dra. Márcia Portela de Melo pelo auxílio durante a coleta dos dados da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e ao FIPE-HCPA pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

A CAPES, pelas diversas formas de incentivo à pesquisa nesse país e particularmente por ter sido contemplado como bolsista por dois anos.

À Dra. Márcia Edelweiss pela ajuda durante a elaboração do artigo.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 CICLO CELULAR .....	16
2.1.1 FASES DO CICLO CELULAR .....	17
2.2 HISTOLOGIA MAMÁRIA .....	19
2.2.1 MAMA NORMAL .....	20
2.2.2 FIBROADENOMA .....	21
2.2.3 HIPERPLASIA DUCTAL TÍPICA .....	21
2.2.4 HIPERPLASIA DUCTAL ATÍPICA .....	22
2.2.5 CARCINOMA DUCTAL <i>IN SITU</i> .....	23
2.2.6 CARCINOMA DUCTAL INVASOR .....	26
2.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	27
2.3.1 KI-67 .....	28
2.3.2 ÍNDICE MITÓTICO .....	30
2.3.3 KI-67 E ÍNDICE MITÓTICO .....	32
2.4 OUTROS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	32
2.4.1 DOSAGEM DA PROLIFERAÇÃO COM TIMIDINA TRITIADA .....	32
2.4.2 DOSAGEM <i>IN VIVO</i> DE BROMODEOXIURIDINA .....	33
2.4.3 ANTÍGENO CELULAR DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR .....	34
2.4.4 FRAÇÃO DA FASE-S PELA CITOMETRIA DE FLUXO .....	34
2.4.5 CICLINA-E .....	35
2.4.6 CICLINA-D1 .....	35
2.4.7 CICLINA-A .....	36
2.4.8 TOPOISOMERASE II $\alpha$ .....	36
2.4.9 TOMOGRAFIA COM EMISSÃO DE PÓSITRONSFLUOROTIMIDINA [ $^{18}\text{F}$ ].....	37
2.4.10 BANDA NOR- AgNORs .....	37
3 SISTEMA DE PONTOS PARA AUXÍLIO NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS MAMÁRIAS .....	38

4	IMUNOISTOQUÍMICA .....	38
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	39
6	OBJETIVOS .....	40
6.1	OBJETIVO GERAL .....	40
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
8	ARTICLE IN ENGLISH: .....	47
	ABSTRACT .....	48
	INTRODUCTION.....	49
	MATERIAL AND METHODS .....	50
	RESULTS .....	56
	DISCUSSION.....	57
	CONCLUSIONS.....	61
	REFERENCES .....	62
9	ARTIGO EM PORTUGUÊS .....	67
	RESUMO .....	68
	INTRODUÇÃO .....	69
	MATERIAL E MÉTODOS .....	70
	RESULTADOS .....	77
	DISCUSSÃO .....	78
	CONCLUSÃO .....	82
	REFERÊNCIAS .....	83
	ANEXO .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>18</sup> F-PET	Tomografia com emissão de pósitrons
AgNors	Região de organização nucleolar
BRCA1 / 2	Gene de suscetibilidade ao câncer de mama de início precoce
BRDU	Bromodeoxiuridina
CC	Ciclo celular
CDI	Carcinoma ductal invasor
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDIS-bg	Carcinoma Ductal <i>in situ</i> de baixo grau.
Cdk's	Ciclina quinase dependente
Cdk <sub>i</sub>	Inibidores da ciclina quinase dependente
CF	Citometria de fluxo
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FA	Fibroadenoma
HDT	Hiperplasia ductal típica
HE	Hematoxilina-eosina
IM	Índice mitótico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Antígeno nuclear presente no núcleo celular. Marcador do ciclo celular e crescimento de tumor que pode ser detectado através de métodos imunohistoquímico.
Mib-1	Anticorpo monoclonal para detecção do Ki-67
MN	Mama normal
NHSBSP	<i>National Health Service Breast Screening Program</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Gene de supressão tumoral
PCNA	Antígeno celular de proliferação nuclear
pRB	Proteína do retinoblastoma
TopoII $\alpha$	Topoisomerase II $\alpha$

**LISTA DE TABELAS****Tabela da Introdução**

Tabela 1- Diferenças histológicas entre HDT/ HDA/ CDIS.

Adaptada do NHSBSP 05 ..... 25

**LISTA DE FIGURAS****Figuras do artigo em inglês**

<b>Figure 1:</b> Total scoring system and hystology in 100 cases.....	65
<b>Figure 2:</b> Total Ki-67 in 100 cases .....	66

**Figuras do artigo em português**

<b>Figura 1-</b> Escore Total de Pontos e histologia estudada em 100 casos .....	87
<b>Figura 2-</b> Distribuição dos valores do Ki-67 em porcentagem nos 100 casos estudados .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações proliferativas mamárias são um grupo de lesões com diferentes características citológicas e arquiteturais que se originam na unidade ducto-lobular terminal e estão associadas a um risco variável de desenvolvimento de carcinoma invasor<sup>(1)</sup>.

A proliferação celular tem importância fundamental no processo biológico e é controlada por mecanismos celulares altamente coordenados e complexos. Progresso substancial no seu entendimento já se alcançou, mas muitas etapas persistem pouco conhecidas.

A carcinogênese mamária é um processo de múltiplas alterações nas quais as células da unidade ducto-lobular se modificam de normais a hiperplásicas, do câncer hormônio sensível até ao hormônio insensível. O câncer invasor tem sua possível origem em alterações mamárias benignas pré-existentes. As alterações consideradas pré-invasoras são: hiperplasia ductal típica e atípica, hiperplasia lobular atípica, carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Embora o CDIS e o CLIS apresentem particularidades malignas como a perda de controle de proliferação celular, eles não apresentam a propriedade de invasão e metástase podendo ser consideradas alterações pré-malignas<sup>(2)</sup>.

Entre as várias propostas conhecidas, o início da carcinogênese e a progressão do tecido mamário ao câncer dependem do estímulo proliferativo, através do estrógeno, dos fatores de crescimento e de dano genético<sup>(2)</sup>. A progressão do tumor hormônio dependente ao hormônio independente provavelmente envolva ativação de oncogenes, perda dos receptores de estrogênio e perda da resposta aos hormônios através de outros produtos gênicos<sup>(3)</sup>.

A definição do prognóstico dos tumores de mama pela simples classificação desses quanto ao tamanho no diagnóstico e à presença de metástases comprometendo os linfonodos axilares, não explica adequadamente as diferenças clínicas observadas entre as pacientes com o mesmo estágio<sup>(4)</sup>.

Os fatores prognósticos são indicadores que ajudam a determinar a história natural da doença na ausência de tratamento complementar; ajudam a decidir que tipo de intervenção é necessária para o melhor tratamento da neoplasia. Dentre os fatores prognósticos mais importantes para o tratamento estão a avaliação dos linfonodos axilares, tamanho tumoral, subtipo histológico, grau histológico e marcadores

biomoleculares envolvidos no processo carcinogênico <sup>(2)</sup>. Já os fatores preditivos são indicadores que orientam a probabilidade de resposta a determinadas terapias. Um dos fatores prognósticos mais importantes para o tratamento do câncer de mama são os receptores hormonais de estrógeno<sup>(2)</sup>.

A maioria dos estudos realizados avalia a expressão do Ki-67 em contextos clínicos procurando correlação com resultado clínico em pacientes com neoplasias avaliando o poder de prognóstico do Ki-67. Brown e Gatter revisaram diversos estudos com câncer de mama e outras neoplasias demonstrando que o Ki-67 tem importância prognóstica <sup>(5)</sup>. Dentre os fatores preditivos, o antígeno Ki-67 mostra-se com dados controversos: enquanto alguns estudos afirmam que ele não teria valor preditivo no contexto clínico <sup>(6)</sup>, outros afirmam que ele tem utilidade na avaliação de resposta ao tratamento hormonal neo-adjuvante <sup>(7)</sup>.

É muito importante estabelecer testes prognósticos reproduzíveis que podem ajudar na escolha do melhor tratamento para cada paciente. A proliferação celular tumoral é uma variável biológica que pode ser usada como um fator prognóstico. A atividade proliferativa no câncer de mama tem sido estudada por diversos métodos, entre eles a determinação da expressão do antígeno Ki-67 através do seu anticorpo monoclonal Mib-1 com a técnica de imunohistoquímica <sup>(8)</sup>. Doravante nós utilizaremos o termo Ki-67 como a presença de expressão do antígeno Ki-67 determinado pela técnica de imunohistoquímica.

O anticorpo Ki-67 é largamente utilizado para avaliar a proliferação celular mas ainda restam muitas dúvidas quanto ao seu papel e função, que é pouco conhecida <sup>(4,5,9)</sup>.

As células tumorais expressam novos antígenos que não são encontrados no tecido normal correspondente. A carcinogênese é acompanhada de modificações celulares que apresentam a formação de novos antígenos ou a perda de antígenos presentes nas células normais<sup>(10)</sup>. Esses neo-antígenos podem ou não provocar uma resposta imunológica do hospedeiro com formação de anticorpos específicos. Com a modificação celular (alteração fenotípica) pode haver diversas respostas imunológicas do organismo, dependendo se há ou não modificação do fenótipo de superfície celular, mas a transformação neoplásica não necessariamente modifica este fenótipo. Antígenos específicos dos tumores podem ser detectados com o auxílio de anticorpos <sup>(11)</sup>. A expressão fenotípica é bem ilustrada quando avaliamos o papel da imunoterapia nos vários estudos existentes, como o uso do anticorpo monoclonal humanizado

trastuzumab no tratamento do câncer de mama que expressa o protooncogene Her-2/neu, que está associado a um pior prognóstico<sup>(12-14)</sup>.

A avaliação de um índice prognóstico em alterações proliferativas mamárias é pouco estudada. Encontramos somente um estudo que avaliou um sistema de pontos baseado na heterogenidade histológica de carcinomas invasores de mama axila negativa, que estabeleceu uma correlação prognóstica. Este demonstrou que a avaliação de um sistema de pontos histológico pode ser útil na seleção de pacientes com alto risco, necessitando tratamento complementar. <sup>(15)</sup>. Em 2006, Mridha e colaboradores realizaram um estudo avaliando a citologia de lesões mamárias com punção aspirativa com agulha fina aplicando um escore de avaliação citológica <sup>(16)</sup>.

Realizamos neste estudo a criação de um sistema de pontos considerando diversas características histológicas, tentando identificar diferenças entre as alterações proliferativas mamárias quanto a sua expressão histológica e quanto à expressão do Ki-67.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de mama é a neoplasia mais causa mortes em mulheres no Brasil. A incidência estimada para 2006 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 48930 novos casos de câncer de mama, menor apenas que os casos de câncer de pele não melanoma em mulheres. Sua incidência geral no Brasil é cerca 51,66 novos casos por 100.000 mulheres. Seu prognóstico pode variar muito e é influenciado por vários fatores. É uma doença que pode se apresentar por diversas formas clínicas, sendo esta diversidade relacionada às múltiplas alterações genéticas e moleculares. Devido aos diferentes tipos de câncer de mama, algumas mulheres têm prognóstico muito bom com baixo risco de metástases à distância enquanto outras, ao contrário, apresentam alto risco<sup>(17)</sup>.

Estima-se que aproximadamente 178 480 mulheres e 2 030 homens serão diagnosticados com câncer de mama e que 40 460 mulheres e 450 homens poderão morrer da doença em 2007 nos Estados Unidos<sup>(18)</sup>. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, vem ocorrendo um sucessivo aumento de casos diagnosticados cada ano desde 1980 devido primeiramente ao aumento do rastreamento mamográfico. A melhoria dos métodos diagnósticos que levam a diagnósticos mais precoces, combinado com melhores tratamentos, resultaram apenas em um leve decréscimo na mortalidade por câncer de mama durante a última década<sup>(19)</sup>.

Fatores de risco associados com o desenvolvimento do câncer de mama incluem história familiar, idade da menarca, idade da menopausa, nuliparidade e paridade após os 30 anos e terapia de reposição hormonal e presença de biópsia mamária prévia com lesões proliferativas. Mutações hereditárias nos genes supressores de tumores BRCA1 e BRCA2, embora ocorrendo em apenas 5 a 10 % de todos os tumores da mama, podem aumentar o risco de doença ser desenvolvida em até 85% dos casos. A complexidade dos fatores que governam a incidência do câncer de mama e sua progressão têm levado a múltiplas teorias para a compreensão de sua patogênese<sup>(19)</sup>.

Um modelo hipotético de progressão sucessiva de carcinogênese indica que o câncer da mama se desenvolve através de uma série de lesões hiperplásicas intermediárias até carcinoma in situ e invasor, com um risco de desenvolvimento de carcinoma aumentando em cada estágio. Estudos epidemiológicos demonstram um risco

aumentado de desenvolvimento de câncer de mama associado com lesões proliferativas nos ductos e ácinos mamários <sup>(20)</sup>.

Hiperplasia do tipo usual é uma lesão proliferativa bastante comum que tem um leve aumento no risco para desenvolvimento subsequente de carcinoma de mama (risco relativo= 1,6, aumentado para 2,1 com história familiar positiva). A hiperplasia ductal típica não é necessariamente um precursor direto do câncer de mama, mas pode identificar indivíduos cujo tecido mamário adquiriu uma alteração molecular que pode facilitar o eventual desenvolvimento deste câncer <sup>(20)</sup>.

Eventuais alterações em elementos regulatórios do ciclo celular, entre os quais estão incluídos os receptores hormonais, p53, p21 e o Ki-67 entre outros, levam a uma proliferação celular aumentada. Este fato leva-nos a observar que em muitas análises de pacientes com câncer de mama, na mama contra-lateral (obtida de uma mamoplastia redutora para simetrização) há a expressão destes fatores em maior proporção do que em peças obtidas de pacientes que se submeteram à mamoplastia cosmética sem câncer. Também está relatado que em muitas pacientes com hiperplasia ductal típica pode ocorrer alteração da expressão destes marcadores relacionados ao ciclo celular defeituoso, ou seja, poderiam apresentar já algumas alterações moleculares presentes nos estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer de mama <sup>(20)</sup>.

A divisão celular é um processo que até hoje apresenta inúmeros questionamentos e está associada a todas as alterações proliferativas mamárias. A descoberta dos mecanismos moleculares e enzimáticos envolvidos na replicação do DNA, iniciando com a descoberta da DNA polimerase e a identificação de enzimas como as topoisomerases, helicases, ligases e as polimerases necessárias para a replicação cromossômica ajudaram a desvendar muitas fases do ciclo celular <sup>(21)</sup>.

## 2.1 CICLO CELULAR (CC)

As fases da proliferação celular podem ser identificadas através do ciclo celular, que é composto por uma série de eventos que culminam no crescimento celular e divisão em duas células filhas. É constituído de quatro fases distintas: fase G<sub>1</sub>, fase S, fase G<sub>2</sub>, juntas conhecidas como interfase, e fase M. A denominação G vem do inglês *gap* com significado de intervalo. S de *synthesis* significa síntese e M de mitose. A interfase compõe o maior período do ciclo e as células nesta fase não podem ser reconhecidas morfologicamente <sup>(22)</sup>. As células durante a mitose podem ser

reconhecidas e identificadas nas suas etapas devido à típica aparência que os cromossomos adquirem durante esta fase. Esta tem sido a base para a contagem de mitoses, um dos mais antigos métodos para acessar a proliferação celular.

### 2.1.1 FASES DO CICLO CELULAR

A interfase é o período do ciclo celular em que a célula obtém nutrientes e duplica o material genético preparando-se para uma mitose, sendo composta pelas fases  $G_1$ , S e  $G_2$ .

A fase  $G_1$  é o intervalo que ocorre entre o final de uma divisão celular e o início da próxima. Durante esta fase pode ocorrer o início de uma próxima divisão celular ou a célula pode sair do ciclo celular se tornando quiescente ou até tendo sua diferenciação celular final. As células neste segundo período são consideradas como células em  $G_0$ . As células podem ficar em  $G_0$  por períodos longos e após estímulos específicos podem retornar ao ciclo celular na fase  $G_1$ . Durante a  $G_1$  inicia-se a síntese de todos os componentes necessários para a mitose, com isso a célula começa a aumentar em tamanho <sup>(22)</sup>.

Na fase S ocorre a replicação do DNA e a síntese de algumas proteínas especializadas, como as histonas.

A fase  $G_2$  inicia-se quando o DNA está todo replicado. Os cromossomos começam a ficar condensados, os nucléolos desaparecem e inicia a formação de tubulinas para a produção dos fusos celulares.

A mitose é o período do CC onde ocorre a divisão celular com a formação de duas células filhas com material genético idêntico.

A fase M é composta por duas etapas: a mitose na qual ocorre a divisão dos cromossomos e a citocinese onde há o processo de divisão do citoplasma celular.

Quando as células não estão se dividindo elas entram em no estado de quiescência ou fase  $G_0$ . Quando elas não irão mais se dividir por motivos de envelhecimento ou por dano celular acumulado, elas entram no período de senescência.

O ciclo celular mamário é regulado por fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos. O principal tipo de células em proliferação na glândula mamária são as do tecido epitelial, onde ocorrem a maior parte das alterações.

As moléculas mais importantes envolvidas na progressão do CC consistem de uma série de proteínas conhecidas como: a) as ciclinas quinase dependentes ou *cyclin-*

*dependent kinases* (Cdk's), suas subunidades ativas, b) as ciclinas e suas sub-unidades, c) inibidoras da ciclina quinase dependentes (Cdk<sub>i</sub>), os produtos do gene de supressão tumoral do retinoblastoma (pRB) e d) a família dos fatores de transcrição E2F com suas proteínas associadas<sup>(2,23)</sup>.

As Cdks pertencem a um grupo de proteínas quinases, enzimas que modificam proteínas pela adição de grupos fosfato (fosforilação). As ciclinas são proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular. Recebem o nome de ciclinas por que sua concentração varia durante o ciclo celular e são produzidas e degradadas conforme a necessidade. As ciclinas formam complexos com as Cdks, quando sua concentração é baixa, ela se desliga das Cdks inibindo a atividade enzimática<sup>(24)</sup>. O controle do CC se deve à constante formação e degradação das ciclinas que se ligam e ativam as Cdks transitoriamente. As Cdks se ligam a ciclinas específicas como por exemplo: a Cdk1 com a ciclina A, B1-B3; a Cdk2 com a ciclina A, D1-D3. Na fase G<sub>1</sub> o complexo ciclina-Cdk tem como principal alvo pRB que sofre fosforilação e causa a dissociação do seu complexo com o E2F e seus fatores de transcrição, permitindo que se inicie a transcrição dos genes de proliferação celular<sup>(23)</sup>. As Cdks são inibidas pelas Cdk<sub>i</sub>, sendo sua melhor representante o p21<sup>Waf1/Cip1/Sdii</sup>, que é um produto do gene p53 o qual causa a parada do CC em G<sub>1</sub><sup>(23)</sup>. O p21<sup>Waf1</sup> é o fragmento ativo 1 do p53 tipo selvagem e é um importante efetor no desencadeamento do efeito desencadeador de bloqueio da proteína p53<sup>(25)</sup>.

O ciclo celular apresenta pontos de controle conhecidos como *checkpoints*, quando se dá a revisão de eventos de replicação do DNA, realizados durante a fase G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Pode ocorrer uma parada no CC até que todo e qualquer dano seja reparado. Durante a fase G<sub>1</sub> há o controle da integridade e a reparação do DNA para que célula possa entrar na fase S, já durante a fase G<sub>2</sub>, ocorre o segundo *checkpoint* para a revisão da integridade do DNA a fim de que ocorra a passagem da célula à fase da mitose<sup>(23)</sup>.

Existem outros pontos de controle como a formação do fuso celular, que para a mitose se esse não está pronto ou se todos os cromossomos não estão bem orientados e fixados no fuso; nessa fase também há o controle se os microtúbulos estão devidamente formados, caso contrário, a mitose também não progride. Todo este controle assegura que o material genético será bem replicado e que as células filhas terão a integridade cromossômica<sup>(21)</sup>. Falhas no processo de *checkpoint* permitem que a célula se divida quando há alterações no processo de replicação do DNA. Durante os pontos de controle há a atuação do p53 que é um fator de transcrição participando no processo do CC e na

apoptose. Em condições normais, a p53 limita a proliferação celular quando há dano genômico no DNA através de duas alternativas: pela parada da célula em G<sub>1</sub> / G<sub>2</sub> ou induzindo apoptose <sup>(25)</sup>.

No tratamento quimioterápico a deficiência da p21<sup>Waf1</sup> está associada a um aumento da resposta a agentes que provocam dano no DNA, enquanto sua super expressão em alguns tumores está relacionada a uma falha na resposta ao tratamento. O p27<sup>kip1</sup> é outra Cdk, que quando apresenta expressão diminuída, está relacionada a uma menor sobrevida no câncer de mama <sup>(26)</sup>.

A maioria dos fatores de crescimento e das vias dos hormônios sexuais atua através da modulação dos complexos Cdk4 e Cdk2. Os oncogenes e os genes supressores também modulam e ativam vias deste mesmo complexo e inativam controles apoptóticos e nos *checkpoints* do ciclo celular <sup>(2)</sup>. O CC na maioria das vezes está alterado nos tumores, ocorrendo expressão inapropriada e mutações das ciclinas e das Cdk. As ciclinas da fase G<sub>1</sub> estão associadas a propriedades oncogênicas em alguns tumores. A ciclina D1 é supreexpressa em cerca de 50% dos casos de câncer de mama <sup>(23)</sup>.

## 2.2 HISTOLOGIA MAMÁRIA

O epitélio normal da mama originalmente é descrito como sendo composto por dois tipos celulares básicos: as células glandulares luminiais e as células basais mioepiteliais, que se caracterizam por expressar as citoqueratinas Ck8/18/19 e a actina de músculo liso respectivamente. Estudos com marcadores de citoqueratinas estão mostrando que existe um terceiro tipo celular, localizado tanto na camada basal/parabasal quanto no compartimento intraluminal. São células coradas pelo marcador de citoqueratina Ck-5 e compreendem cerca de 5 % das células mamárias <sup>(27,28)</sup>. Já existem bastantes evidências que a proliferação no epitélio mamário normal é organizada de uma maneira hierárquica e experimentos apóiam a evidência da existência de células mamárias pluripotenciais <sup>(29)</sup>. Esse fato poderá contribuir no melhor entendimento dos processos proliferativos da mama, podendo ajudar no desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama <sup>(27,29)</sup>.

É de extrema importância a precisa definição das alterações mamárias. Entre essas alterações estão as proliferativas, associadas a um menor ou maior grau de desenvolvimento de carcinoma invasor. As alterações proliferativas são divididas

classicamente em três grupos: hiperplasia ductal típica (HDT), hiperplasia ductal atípica (HDA) e o carcinoma ductal *in situ* (DCIS) <sup>(1)</sup>.

### 2.2.1 MAMA NORMAL

A mama é constituída basicamente pelo parênquima que é a glândula (ou tecido epitelial) e o estroma que são os outros tecidos presentes. O parênquima é constituído pelo sistema ductal e lobular. O sistema ductal inicia-se no mamilo com 15 a 25 ductos principais e se ramifica até a unidade ducto-lobular terminal. Essa unidade consiste dos ductos terminais intralobulares e múltiplos ductos lobulares envolvidos pelo tecido conjuntivo perilobular. Enquanto os ductos extralobulares são revestidos por células epiteliais colunares, os ductos intralobulares e lobulares são revestidos por células cuboidais. Os grupamentos de ductos lobulares são também denominados de ácinos <sup>(30)</sup>.

O estoma é constituído por gordura, tecido conjuntivo, vasos e nervos. O tecido conjuntivo intralobular é hormônio responsável, formado por colágeno em uma matriz de ácido mucopolissacarídico com fibroblastos e poucos linfócitos e macrófagos.

Os ductos são formados basicamente por dois tipos celulares: a camada interna colunar ou cuboidal e a camada externa de células mioepiteliais e a membrana basal. O número de camadas celulares nos ductos normais pode variar durante o período reprodutivo feminino de uma a duas <sup>(31)</sup>. Qualquer aumento no número de células, como três ou quatro, já pode ser definido como hiperplasia <sup>(30)</sup>.

A expressão do Ki-67 na mama normal tem discrepância em alguns estudos. Em um estudo de Dessauvage de 2007 o Ki-67 demonstrou expressão em cerca de 1,9% das células do epitélio mamário normal <sup>(32)</sup>. Outro estudo onde o Ki-67 foi avaliado em alterações de células colunares da mama, a sua expressão na mama normal foi de 2,4% <sup>(33)</sup>. Já em outro estudo, realizado para avaliar a influência do tratamento com raloxifeno em lesões benignas de mama, a expressão média do Ki-67 na mama normal adjacente ao fibroadenoma foi de cerca de 11% <sup>(34)</sup>.

Existem poucos estudos com o Ki-67 na mama normal e nas alterações mamárias benignas. A expressão do Ki-67 na mama normal tem sido descrita de 0,7 % a 3 % das células dos lóbulos normais <sup>(28,35,36)</sup>.

### 2.2.2 FIBROADENOMA

O fibroadenoma (FA) é considerado uma lesão benigna da mama, sendo o resultado de pequenas alterações no processo de desenvolvimento do sistema lobular. Sua incidência é de aproximadamente 7 a 13 % nas mulheres e representa cerca de 50 % das biopsias de mama em mulheres jovens. Podem se apresentar como nódulos múltiplos em 10 a 15 % das pacientes.

A alteração principal é a proliferação estromal. O estroma é constituído de por proliferação fibroblástica e de colágeno. A celularidade estromal é variável, variando de hiper a hipocelular com ductos atróficos ou proliferados e com hiperplasia ductal típica<sup>(31)</sup>. A expressão do Ki-67 no FA é relatada em torno de 1 a 3%<sup>(37)</sup>

### 2.2.3 HIPERPLASIA DUCTAL TÍPICA

A hiperplasia ductal típica é caracterizada pelo aumento no número de células epiteliais dentro dos ductos mamários em comparação com o tecido normal encontrado além da membrana basal<sup>(30)</sup>. Este termo deve ser utilizado para descrever todos os casos de proliferação intraluminal que não apresentam atipias podendo variar desde uma HDT mínima até uma hiperplasia florida sem apresentar atipias<sup>(38)</sup>. As alterações envolvem a unidade ducto lobular terminal ou os ductos interlobulares. Células epiteliais, basais e mioepiteliais estão envolvidas. Pode apresentar margens celulares indistintas. Microscopicamente pode apresentar várias características entre uma proliferação esparsa até a oclusão e a distensão dos ductos com as células proliferadas. A hiperplasia pode ser papilar, variando desde a formação de múltiplas micropapilas até pequenos papilomas intraductais com delicado estroma fibrovascular. As células são uniformes e não apresentam atipias. As mitoses podem estar presentes, mas são infreqüentes e não apresentam figuras mitóticas anômalas<sup>(31)</sup>. Estudos indicam que a HDT é uma alteração heterogênea contendo subgrupos identificados de acordo com a expressão de receptores hormonais estrogênio (RE)<sup>(35)</sup>.

A HDT tem sua freqüência de 5 a 20 % nas mulheres jovens, aumentando para 20 a 50 % nas mulheres de maior idade. Não existem evidências de que esteja relacionada com fatores genéticos e aparentemente sua freqüência não está aumentada em mulheres com história familiar de câncer de mama, mas se sabe que está relacionada a um pequeno aumento de risco<sup>(39)</sup>. A expressão do Ki-67 na HDT está descrita com

mediana de 0,99% <sup>(28)</sup>. Segundo estudo caso-controle de Shaaban e colaboradores de 2002 que estudou pacientes com biópsia de mama com HDT e que posteriormente desenvolveram algum tipo de carcinoma de mama, o risco relativo foi de 1,53. A expressão do Ki-67 foi significativamente maior nos casos que desenvolveram carcinoma posteriormente (mediana 3,82%) do que nas pacientes controles (mediana 0,77%) desse estudo <sup>(35)</sup>.

O desfecho para cada pessoa que apresenta uma biópsia com HDT ainda não pode ser predito, sabe-se apenas que existe um aumento de risco ao nível populacional. Um progresso futuro, visando identificar marcadores moleculares, é necessário para melhor definir essas alterações. A dosagem de Ki-67 e do RE pode ter influência nessa definição, como demonstrado por Shaaban, em que o aumento da expressão do Ki-67 e do RE foi identificado no grupo de pacientes que progrediram de HDT para carcinoma <sup>(35)</sup>.

#### 2.2.4 HIPERPLASIA DUCTAL ATÍPICA

A hiperplasia ductal atípica (HDA) é caracterizada por uma proliferação ductal com múltiplas camadas com células que perderam a polaridade nuclear e com atipias nucleares. A atipia é definida como um aumento do núcleo e do nucléolo que pode ser múltiplo <sup>(31)</sup>. A HDA apresenta algumas alterações comuns também ao CDIS. Mesmo que o ducto envolvido apresente as características de um carcinoma intraductal, a não ser que haja mais de um ducto envolvido, o diagnóstico será de HDA. Segundo o estudo de DuPont e Page, o risco relativo da HDA é de 5,3 sendo que, se for associado história familiar de câncer este risco quase duplica <sup>(40)</sup>. Pelos critérios de Page, a HDA é a alteração proliferativa que tem características de um CDIS, mas não preenche todos os critérios para tal <sup>(30)</sup>. Os critérios de Tavassoli e Norris, que são bastante parecidos com o de Dupont, consideram que a HDA tem os critérios do CDIS, mas com diâmetro menor do que 2mm <sup>(31)</sup>.

A distinção da HDA e do CDIS de baixo grau é fundamental. A dificuldade nessa distinção é que as alterações são em número de células, tamanho dos espaços ductais e as características nucleares das células que não variam em sua disposição paralela <sup>(30)</sup>.

A variação interobservador é um problema quando se trata de distinguir lesões que podem apresentar um contínuo evolutivo <sup>(41)</sup>. A definição de atipia é necessária para

a estratificação de risco das pacientes. A distinção entre a HDA e o CDIS pode ser muito complicada especialmente quando se apresenta um carcinoma intraductal bem diferenciado não comedônico <sup>(1)</sup>, nestes casos a utilização de marcadores imunohistoquímicos pode ajudar na distinção.

A HDA é encontrada em cerca de 10 % das mulheres e sua frequência em pacientes com câncer de mama atinge o pico máximo em torno dos 40 anos, regredindo em frequência após os 55 anos.<sup>(39)</sup> A expressão do Ki-67 na HDA tem variação na literatura. Em um estudo japonês com o anticorpo Mib-1 sua expressão foi baixa (0 a 2.3%) sendo considerado o melhor parâmetro para a distinção com o CDIS de baixo grau.<sup>(42)</sup> Outro estudo avaliou a sua expressão em torno de 6% <sup>(32)</sup>.

### 2.2.5 CARCINOMA DUCTAL *IN SITU*

O carcinoma de mama se desenvolve dentro do sistema ductal, freqüentemente na unidade ducto lobular terminal. O CDIS que também recebe a terminologia de carcinoma intraductal é uma neoplasia que não apresenta invasão do estroma mamário. Existe uma extensa proliferação do epitélio ductal original em monocamada para um epitélio multicamadas com extensa hiperplasia e com atipias severas. O período de tempo que leva à transformação de um epitélio hiperplásico atípico ao CDIS não é bem estabelecido. O estroma peri-ductal também apresenta alterações, com a presença de elastose peri-ductal e estromal.

O crescimento intraductal pode apresentar uma variedade grande de características: micropapilar, papilar, sólido, comedo ou cribriforme, na forma pura, ou combinados. O componente intraductal pode ser bem diferenciado com proliferação monótona e uniforme, como nos casos micropapilares e cribriformes, já nos casos de comedocarcinoma, existe um acentuado pleomorfismo celular com evidentes mitoses anômalas <sup>(31)</sup>.

O diagnóstico diferencial do CDIS e da HDA pode ser bastante difícil. Pelos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) o CDIS é a neoplasia intraductal caracterizada pelo aumento da proliferação epitelial com atipias celulares variando de sutis a acentuadas com uma tendência a progressão ao carcinoma invasor e tem como sinônimo o termo neoplasia intraepitelial ductal (DIN1 a DIN3). Não existe um critério diagnóstico específico, enquanto alguns autores requerem um envolvimento total de um

único ducto com as características celulares e arquiteturais, outros descrevem como o comprometimento de um ou mais ductos excedendo 2 mm em diâmetro <sup>(1)</sup>.

A interpretação diagnóstica entre algumas alterações mamárias proliferativas pode ser bastante controversa. Em um estudo realizado por Ghofrani para analisar a concordância diagnóstica entre casos de HDA e carcinoma ductal *in situ* de baixo grau (CDIS-bg) foram distribuídos questionários com ênfase em cinco alterações proliferativas mamárias diferentes para cerca de 230 patologistas e as respostas quanto ao diagnóstico foram avaliadas verificando-se discrepâncias entre os diagnósticos. Com desenhos esquematizando alterações mamárias, 56,5% dos patologistas consideraram ser uma HDA enquanto 43,5% consideraram ser um CDIS-bg <sup>(41)</sup>. Dos 230 patologistas, 40,4% deles se consideravam especialistas em patologias mamárias, e mesmo entre esse grupo, ocorreu uma discrepância diagnóstica muito grande com conseqüências clínicas importantes.

Em outro estudo realizado, Rosai distribuiu dezessete casos de alterações proliferativas mamárias tipo ductal e lobular para cinco especialistas em patologia mamária e comparou a concordância diagnóstica. Nesse estudo, em nenhum dos casos houve concordância diagnóstica entre os cinco patologistas <sup>(43)</sup>. Isso ressalta a dificuldade diagnóstica imposta pelas alterações mamárias de CDIS e, mesmo com critérios estabelecidos desde 1985 por Page e em 1990 por Tavassoli, muitas vezes este diagnóstico parece ser dúbio, principalmente entre os casos de HDA e CDIS-bg <sup>(44,45)</sup>.

Sendo essa a diferenciação do CDIS e da HDA em alguns casos difícil, a expressão do Ki-67 pode ser útil. Em um estudo japonês avaliando a proliferação celular com o anticorpo Mib-1 observou-se que a expressão na HDA foi baixa (0 a 2,3%) e foi o melhor parâmetro para a distinção com o CDIS <sup>(42)</sup>. A expressão do Mib-1 no CDIS de baixo grau é reportada entre 7,9 % a 9 %, enquanto a expressão do Ki-67 no CDIS de alto grau é de aproximadamente 25,4% <sup>(28,33)</sup>. Segundo a OMS, o CDIS tipo comedo tem a expressão mais alta do anticorpo Ki-67, em torno de 13%, enquanto que no tipo cribriforme é de 4,5%, podendo chegar a 0% no micropapilar <sup>(1)</sup>.

Na TABELA 1 podem ser vistos os critérios histológicos diferenciais entre HDT, HDA e CDIS.

**TABELA 1:** Diferenças histológicas entre HDT/ HDA/ CDIS. Adaptada NHSBSP <sup>(38)</sup>.

<b>Característica Histológicas</b>	<b>Hiperplasia ductal típica</b>	<b>Hiperplasia Ductal Atípica</b>	<b>Carcinoma Ductal <i>in situ</i> de baixo grau</b>
<b>Tamanho</b>	Variável, mas raramente extenso a não ser que associado a outro processo benigno proli-ferativo	Usualmente pequeno (< 2 - 3 mm) a não ser que associado a outro processo benigno proli-ferativo	Raramente menor que 2-3 mm podendo ser bastante extenso
<b>Composição Celular</b>	Mista: com células epiteliais luminais e células basais fusiformes. Pode apresentar lin-fócitos e macrófagos. Pode ocorrer hiper-plasia da camada mio-epitelial.	População celular uniforme mas com áreas de HDT apa-recendo no mesmo espaço ductal. Células basais fusiformes po-dem se misturar com células proliferativas.	População celular uniforme com mono-tonia celular. As ce-lulas basais fusi-formes não são vistas. Células mioepiteliais são visíveis ao redor dos ductos mas po-dem estar atenuadas.
<b>Lúmen</b>	Irregular, às vezes com espaços similares a pó-ros periféricos mal definidos que são úteis para distinção	Pode ser bem for-mado com espaços arredondados, padrão cribiforme. Lúmen mal definido pode estar presente	Bem delimitado com padrão cribiforme
<b>Mitoses</b>	Infrequentes e usuais	Infrequentes com for-matos anormais raros	Infrequentes com for-matos anormais raros
<b>Orientação celular</b>	Freqüente agredado de células com longos eixos de núcleos arran-jados em paralelo com a direção das pontes celulares	Os núcleos celulares estão em ângulo reto às pontes interce-lulares com padrão tipo cribiforme, for-mando estruturas apa-rentemente rígidas.	Estruturas micropapi-lares com indiscerni-veis cordões fibrovas-culares em espaços geométricos bem de-limitados. Pontes ce-lulares rígidas no pa-drão cribiforme e nu-cleos orientados em direção ao espaço luminal.

<b>Arquitetura celular</b>	Variável	Micropapilar, criboforme ou padrão sólido.	Micropapilas bem desenvolvidas, criboforme ou sólido
<b>Espaços nucleares (“nuclear spacing”)</b>	Nunca	Podem aparecer ou não	Sempre
<b>Característica celular epitelial</b>	Pequenas e ovais mas com formatos diferentes	Pequenas ou médias com monotonia celular focal	Monotonia celular em células pequenas
<b>Nucléolo</b>	Indistinto	Único e pequeno	Único e pequeno
<b>Necrose</b>	Rara	Rara	Às vezes presente

Fonte: *NHS Cancer Screening Programmes. PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists, 2005*

## 2.2.6 CARCINOMA DUCTAL INVASOR

O carcinoma ductal invasor (CDI) é o tumor mais freqüente na mama. O componente invasor do carcinoma é avaliado histologicamente e definido seu grau histológico entre grau I, II e III, considerando-se a formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e o índice mitótico para a graduação. Quanto maior o grau histológico, menos diferenciado é o tumor e mais agressivo é seu comportamento biológico<sup>(31)</sup>.

No CDI a avaliação imunohistoquímica do Ki-67 demonstra uma correlação importante da sua expressão com o índice mitótico, grau histológico e a ausência de receptores hormonais<sup>(46,47)</sup>.

No tratamento do CDI a avaliação de fatores prognósticos é fundamental para o planejamento terapêutico. Classicamente a avaliação dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais importante.

O Ki-67 pode contribuir nessa avaliação sendo que alguns estudos o classificam como fator prognóstico independente do conhecimento do estado dos linfonodos axilares<sup>(9)</sup>. A expressão do ki-67 no CDI tem sido descrita com grande variação de positividade entre 20 a 36,4% das células tendo uma forte correlação entre sua expressão e a da bromodeoxiuridina<sup>(9,26,48,49)</sup>.

## 2.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular tem sido estudada como um importante mecanismo biológico na oncogênese; tendo importância fundamental nos processos biológicos com seu papel no crescimento celular e na manutenção da homeostase tecidual <sup>(22)</sup>.

Os índices de proliferação celular colaboram juntamente com outros fatores no cálculo da probabilidade de recidiva e nas decisões quanto ao tipo de tratamento das pacientes com câncer de mama <sup>(4,9)</sup>.

A importância da medida da proliferação em relação ao prognóstico quando comparado com o estadiamento patológico permanece controversa <sup>(9)</sup>. Existem várias maneiras de quantificar o nível de proliferação celular e algumas delas não são de fácil execução e reprodução, mas existem muitas que podem ser usadas na prática clínica diária, entre elas, a pesquisa com anticorpo para o Ki-67 por imunohistoquímica <sup>(22)</sup>. Não existe uma maneira ideal, cada uma tem vantagens e desvantagens.

A maneira padrão para a quantificação, com a qual as outras técnicas são comparadas, é a dosagem da fase S do ciclo celular com timidina tritiada (3-H-timidina) <sup>(4)</sup>. Como a dosagem de rotina *in vivo* com a 3-H-timidina não é prática <sup>(4)</sup> então a maneira considerada padrão para a quantificação da fase S é a dosagem *in vivo* de bromodeoxiuridina (BRDU) <sup>(50)</sup>.

A dosagem de BRDU e a expressão do Ki-67 têm correlação direta com outros fatores de agressividade tumoral, como tamanho do tumor, linfonodos axilares e grau histológico. O inverso acontece quando fatores de bom prognóstico estão presentes como a expressão de receptores hormonais e aumento da idade da paciente, ocorrendo uma diminuição dos fatores de proliferação nestes casos <sup>(4)</sup>.

Comparando o Ki-67 com o BRDU em um ensaio clínico com 145 pacientes com câncer de mama, Goodson e colaboradores relataram que, em um quinto dos casos classificados como alta proliferação com um dos marcadores, houve a reclassificação como baixa proliferação quando utilizado outro marcador. Assim, não se pode assumir definitivamente que um marcador possa substituir o outro <sup>(4)</sup>.

A proliferação celular sofre influência da idade, em mulheres jovens o tecido mamário normal tem maiores índices de proliferação do que em mulheres idosas, possivelmente devido às diferenças nos níveis hormonais. Em tumores de mama esta

influência também é notada.<sup>(51)</sup> Oestreicher e colaboradores em um estudo de 2004 não encontrou associação da idade da menarca, paridade, idade da primeira gestação, idade da menopausa ou o uso de anticoncepcionais orais com a proliferação celular utilizando o Ki-67 ou o índice mitótico<sup>(51)</sup>.

### 2.3.1 KI-67

Os tumores que apresentam alto índice de proliferação celular são correlacionados com prognóstico ruim. O antígeno Ki-67 tem correlação com a proliferação celular e é expresso no final da fase G1 na fase S, M e G2<sup>(2)</sup>.

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da estrutura, localização e mecanismos de regulação da proteína Ki-67 a sua função permanece desconhecida<sup>(5)</sup>. Sabe-se que é uma proteína fosforilada via serina e treonina com papel fundamental na divisão celular<sup>(50,52)</sup>. Sua meia-vida é de aproximadamente 60-90 minutos e a sua expressão durante o ciclo celular é altamente regulada pressupostamente por mecanismos precisos de síntese e degradação<sup>(5)</sup>.

Seu gene é conhecido (MKI-67) assim como sua posição cromossômica<sup>(2)</sup>. O gene do Ki-67 localiza-se no braço longo do cromossomo 10 (10q25)<sup>(50)</sup>. A seqüência completa do DNAC que codifica a proteína do Ki-67 foi publicada em 1993 por Schluter e colaboradores<sup>(53)</sup>. O Ki-67 grande apresenta peso molecular de 359 kD e sua isoforma pequena é de 320kD<sup>(50)</sup>.

Suas diferenças se fazem na presença ou ausência da seqüência codificada pelo exon 7. Existe uma seqüência repetida de 16 elementos no exon 13 que perfaz 70 e 79 % da parte de leitura da proteína do Ki-67 grande e pequeno, respectivamente<sup>(50)</sup>. Estas seqüências apresentam grande similaridade de 43 a 62 % de amino-ácidos idênticos. Nesta seqüência repetida se encontra o Ki-67*modif* representado por uma seqüência de 22 amino-ácidos, que é altamente conservada entre espécies e apresenta o epítipo que foi o alvo do anticorpo monoclonal Ki-67 original<sup>(50,53)</sup>. Um epítipo ou determinante antigênico é a parte estrutural do antígeno que reage com o anticorpo, são grupos de amino-ácidos em proteínas globulares e cadeias paralelas de polissacarídeos em que a parte principal é chamada de ponto imunodominante<sup>(11)</sup>.

O anticorpo Ki-67 foi descoberto por Gerdes e colaboradores em 1983<sup>(54)</sup>. Recebeu a denominação “Ki” porque a pesquisa se desenvolveu na cidade de Kiel após a imunização de ratos com a linhagem celular de linfoma de Hodgkin L428 e a

especificação “67” se refere ao número do clone na placa de 96 furos do exame em que foi descoberto. A proteína Ki-67 foi identificada pelo mesmo grupo em 1991<sup>(55)</sup> como uma proteína nuclear não histona.

A expressão do Ki-67 durante o ciclo celular é variável. O nível de Ki-67 é baixo durante a fase G<sub>1</sub> inicial e início da fase S e aumenta progressivamente até atingir seu máximo durante a mitose. A localização nuclear da proteína do Ki-67 também varia durante o CC. No início da fase G<sub>1</sub> se encontra fracamente positivo distribuído pelo carioplasma na região perinuclear. Grandes grânulos perinucleolares são formados no final desta mesma fase. Durante a fase S e a G<sub>2</sub> é encontrado principalmente na área nucleolar. Durante a mitose o antígeno é expresso em todos os cromossomos e aparece como estruturas reticulares em volta dos cromossomos em metáfase<sup>(53)</sup>. Quando há a ruptura da membrana nuclear na divisão celular o Ki-67 tem alta expressão na superfície de cromossomos condensados no citoplasma e esta intensidade rapidamente diminui durante a anáfase-telófase<sup>(50,53)</sup>.

O anticorpo original só podia ser utilizado com tecido fresco ou congelado. Anticorpos monoclonais novos como o Mib-1 e anticorpos policlonais Ki-67 foram desenvolvidos e podem ser empregados em peças cirúrgicas fixadas e emblocadas em parafina<sup>(2)</sup>. O anticorpo Mib-1 foi produzido juntamente com o Mib-3 em 1992, sendo demonstrado que ele funciona em peças cirúrgicas embebidas em parafina, tendo sua reação melhorada através da técnica de recuperação antigênica pelo forno de microondas<sup>(56)</sup>. O anticorpo monoclonal é produzido por um tipo celular e reage com um epítipo específico, já o policlonal reage com vários epítipos de um determinado antígeno<sup>(11)</sup>. Existem vários anticorpos anti Ki-67 comercializáveis, mas o Mib-1 é o mais utilizado na atualidade.

A expressão imunohistoquímica do Ki-67 nas células em divisão e sua ausência em células quiescentes, desenvolveu o interesse como possível marcador de proliferação celular. Diversos estudos confirmam a sua expressão em células em divisão, já em células quiescentes é raramente reportada<sup>(57)</sup>.

A expressão do Ki-67 demonstrou ser um fator prognóstico independente para menor sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama em uma análise multivariada<sup>(58)</sup>. Jalava e colaboradores demonstraram em pacientes com carcinoma invasor, através de análise univariada do Ki-67, que ele apresenta significância estatística demonstrando menor sobrevida<sup>(59)</sup>. Valores altos também estão correlacionado com outros fatores prognósticos adversos, como invasão vascular, grau

histológico, metástases em linfonodos e tamanho tumoral e, inversamente correlacionado com fatores de bom prognóstico como os receptores hormonais<sup>(2,50,58)</sup>. O Ki-67 tem correlação direta com o grau histológico.

A relação do Ki-67 nas diferentes alterações mamárias pode sofrer influência da expressão dos receptores hormonais de estrogênio. Na mama normal, alguns estudos não encontraram a expressão do Ki-67 quando o receptor estrogênio era expressado<sup>(36)</sup>. Esta característica não está presente no carcinoma mamário invasor quando ambos podem ser expressos<sup>(50)</sup>.

Os níveis de Ki-67 podem ter influência no tratamento quimioterápico neoadjuvante do câncer de mama. Dados indicam que tumores com alto índice de proliferação apresentam melhores respostas à quimioterapia neoadjuvante, sendo associado a maior número de resposta patológica completa<sup>(26)</sup>.

Chang em um estudo de 1999 avaliando marcadores biológicos pré quimioterapia neoadjuvante observou que um decréscimo no Ki-67 durante o tratamento está correlacionado a melhor resposta clínica ao tratamento. As pacientes que não apresentam declínio no período de 21 dias terão probabilidade menor de responder e uma via alternativa de tratamento deve ser avaliada<sup>(60,61)</sup>.

A vantagem do uso do Ki-67 é que se pode realizar a técnica com pouco material e em peças fixadas em parafina, mas variações na fixação do material pode alterar a coloração<sup>(62)</sup>.

### 2.3.2 ÍNDICE MITÓTICO

A contagem do número de figuras mitóticas é um dos primeiros métodos utilizados para avaliar a proliferação celular. A contagem mitótica tem sido utilizada na avaliação histológica, principalmente no diagnóstico de tumores desde a introdução da microscopia.

A fácil utilização, sem a necessidade de grande tecnologia, necessitando somente de um microscópio e uma boa coloração com hematoxilina-eosina, faz com que este método seja utilizado com frequência<sup>(22)</sup>. Na avaliação do grau histológico dos tumores, a contagem mitótica é o fator mais importante<sup>(63)</sup>. Critérios morfológicos restritos devem ser aplicados para a identificação de mitoses. Existe ainda alguma controvérsia na quantificação do índice mitótico (IM) devido a falta de padronização para realizar esta contagem.

O IM depende do número de mitoses por 10 campos de grande aumento; já que o grande aumento é variável entre os microscópios, é necessário verificar o diâmetro do campo de grande aumento e correlacionar com tabelas que existem para poder calcular o índice mitótico <sup>(38)</sup>.

Alguns estudos levam em consideração o número de mitoses por unidade de medida (como cinco mitoses por mm<sup>2</sup>) e outros pelo número de mitoses pelo número total de células em determinado volume tumoral <sup>(22)</sup>. Uma maneira com boa reprodutibilidade é a contagem com 400 aumentos, em uma área de 1,6mm<sup>2</sup>, na área com maior invasão e proliferação na periferia tumoral <sup>(63)</sup>.

A contagem de mitoses é um dos três componentes do sistema de graduação de Bloom-Richardson para o prognóstico tumoral e, quando os três componentes desse sistema foram analisados (formação tubular, grau nuclear e contagem de mitoses) em um estudo, a contagem de mitoses foi o único fator prognóstico significativo para sobrevida em 5 anos <sup>(51)</sup>.

Crítérios bem definidos devem ser utilizados para definir uma mitose: São pontos escuros dos cromossomos que podem frequentemente ser reconhecidos pela presença de extensões filamentosas quando se focaliza para cima e para baixo no micrômetro, quando o envelope está ausente e o citoplasma está mais basofílico do que eosinofílico, e quando os cromossomos estão em metáfase, anáfase ou telófase <sup>(22,64)</sup>.

A contagem de mitoses em alguns tumores pode não ser a melhor maneira de interpretar a proliferação celular, visto que o tempo da fase de mitose pode ser muito variado. Em alguns tumores, como no linfoma de Hodking, pode haver pausa na metáfase, não sendo a melhor maneira de avaliação em todas as situações <sup>(22)</sup>. A contagem de mitoses tem boa reprodutibilidade, sendo necessária à correta fixação e coloração com uma espessura de cortes estandarizada.

A avaliação do IM fornece um fator prognóstico forte no carcinoma de mama sendo avaliado em diversos estudos de vários grupos e poucos estudos não demonstraram relevância prognóstica <sup>(63)</sup>. Para a Sociedade Holandesa de Oncologia Clínica, um IM  $\geq 10/1,6\text{mm}^2$  indica alto risco de recorrência em pacientes com câncer de mama axila negativa, ajudando na definição quanto a quimioterapia <sup>(65)</sup>.

A atividade mitótica pode apresentar variação intra-tumoral, como descrito no estudo de Jannink e colaboradores, que estudou a atividade mitótica em alguns casos de carcinoma de mama, no qual múltiplos cortes histológicos foram feitos de cada caso e avaliados quanto à atividade mitótica. Esta variação intra-tumoral deve-se à

heterogeneidade tumoral, onde múltiplas populações celulares com diferentes potenciais de comportamento podem existir <sup>(66)</sup>.

A contagem apresenta uma desvantagem, pois a aparência da apoptose às vezes pode confundir-se com a mitose <sup>(62)</sup>.

### 2.3.3 KI-67 E ÍNDICE MITÓTICO

A correlação entre o Ki-67 ( ou Mib-1) e o IM já foi objeto de pesquisa em diversos estudos. Como a contagem do IM é demorada e difícil, exigindo treinamento para sua realização, o desenvolvimento do Ki-67 substituiu a análise do IM na avaliação da proliferação celular <sup>(59)</sup>. Existem estudos divergentes quanto à correlação do Ki-67 e o IM <sup>(59,67)</sup>. Nem todas as células que ficam demarcadas com o Ki-67 atingem a mitose, algumas entram em apoptose <sup>(59)</sup>.

A expressão do Ki-67 é superior do que a contagem de mitoses na avaliação do prognóstico, quanto à sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama <sup>(47)</sup>.

Especula-se que pode haver diferenças entre o Ki-67 e o IM devido às variações nos níveis hormonais das pacientes obesas, pois estas teriam maiores níveis circulantes de estrógeno. Foi detectada uma influência significativa do índice de massa corporal e do peso total na proliferação tumoral medida pelo Ki-67, mas esta correlação não existiu com o índice mitótico <sup>(51)</sup>.

## 2.4 OUTROS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Existem várias maneiras de avaliar a proliferação celular, algumas das mais utilizadas serão descritas a seguir:

### 2.4.1 DOSAGEM DA PROLIFERAÇÃO COM TIMIDINA TRITIADA

É considerado um método de incorporação onde um nucleotídeo marcado previamente com radiação é adicionado ao ciclo celular *in vivo* ou *in vitro* <sup>(22)</sup>. A dosagem de timidina tritiada (TLI) é o exame com o qual os outros marcadores de proliferação celular são comparados <sup>(4)</sup>.

A timidina é um composto químico do DNA e o trítio é um isótopo radioativo do hidrogênio. Foi um dos primeiros métodos utilizados na medida da proliferação celular<sup>(24)</sup>. O TLI é uma medida de síntese de DNA nas células podendo determinar o índice de crescimento tumoral<sup>(68)</sup>. Dá a estimativa da proporção de células em fase S e G2/M do ciclo celular<sup>(2)</sup>. A análise da proliferação se faz através da contagem do número de núcleos marcados pela timidina tritiada em material fresco previamente incubado com análise *in vivo* ou *in vitro* sendo visualizado autoradiograficamente<sup>(2,24)</sup>. O TLI expressa o índice entre o número total de células tumorais com as células marcadas.

Meyer refere em seu estudo que o TLI pode ser considerado como fator preditivo, independente para sobrevida e sobrevida livre de doença, confirmando achados de outros autores, onde também é um fator preditivo independente dos receptores hormonais. O TLI não tem correlação com o comprometimento axilar<sup>(68)</sup>. O Ki-67 tem boa correlação com a TLI<sup>(60)</sup>.

A aplicabilidade clínica da timidina tritiada é controversa devido ao fato de trabalhar com material radioativo e usualmente com peça cirúrgica fresca podendo ser utilizado em material emblocado em parafina, mas a análise autoradiográfica poder demorar até duas semanas<sup>(22,47,48,62)</sup>.

#### 2.4.2 DOSAGEM *IN VIVO* DE BROMODEOXIURIDINA

O bromodeoxiuridina (BRDU) é o análogo à dosagem de timidina tritiada na análise da proliferação celular indicando a fase S do ciclo<sup>(4,9)</sup>. Para a análise *in vivo* se administra BRDU antes do processo cirúrgico e se analisam os cortes histológicos fixados em parafina. Esta técnica pode ser utilizada com segurança *in vivo* em quantidades suficientes pra ser detectada com anticorpo monoclonal específico para BRDU incorporada ao DNA.

Goodson e colaboradores, em um estudo em 2000, que acompanharam 118 pacientes operadas por câncer de mama e que fizeram a dosagem *in vivo* de BRDU e Ki-67, demonstraram que o BRDU tem relação com o prognóstico clínico, dicotomizando as pacientes em dois grupos: alto risco e baixo risco com um nível de

significância similar ao previsto através da idade e dos linfonodos axilares; ocorreu também a correlação com o anticorpo Ki-67 na sobrevida global.

A dosagem de BRDU é uma simplificação do método da timidina tritiada, sendo um método útil para dosar dinamicamente a síntese de DNA<sup>(9)</sup>. Um alto índice de proliferação celular baseado no estudo *in vivo* com BRDU prediz um alto risco de recorrência sistêmica.

Estudos *in vivo* com este marcador não são recomendados para a prática clínica diária, sendo que o Ki-67 pode ser usado com a mesma função tendo boa correlação com a marcação da fase S tanto *in vivo* quanto *in vitro* das células tumorais com o BRDU<sup>(70)</sup>

### 2.4.3 ANTÍGENO CELULAR DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR

O antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA) é um marcador de proliferação celular que apresenta sua expressão durante a fase S e a G2 do ciclo celular, sendo um bom marcador. Pode ser detectado através da imunohistoquímica tendo utilidade associada a outros marcadores mamários para estabelecer prognóstico. Expressão aumentada do PCNA tem relação com intervalo livre de doença curto e sobrevida global em pacientes com câncer de mama<sup>(71)</sup>. Os dados quanto ao valor da correlação do PCNA com o Ki-67 são controversos.

Enquanto Leonardi e colaboradores não encontraram correlação entre PCNA e o Ki-67 em casos de câncer de mama, Haerslev afirma que em uma análise univariada ambos foram marcadores de pior sobrevida global<sup>(8,72)</sup>. Existem duas isoformas do PCNA no câncer de mama, já na mama normal somente uma isoforma tem sido observada. Não apresenta boa correlação com o Ki-67<sup>(60)</sup>.

### 2.4.4 FRAÇÃO DA FASE-S PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Com a citometria de fluxo (CF) se mede o conteúdo do DNA das células tumorais e se obtém informações sobre a fração da fase S<sup>(24)</sup>.

A maioria dos estudos que analisaram a CF utilizaram material fresco/congelado na análise e em um número razoável de pacientes se encontrou uma

associação com uma alta fração da fase-S com mau prognóstico <sup>(63)</sup>. Não é levado em consideração como um marcador de rotina para a decisão clínica pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica <sup>(73)</sup>. O Ki-67 não tem boa correlação com a medida da fase S <sup>(60)</sup>. Uma desvantagem da citometria de fluxo é que necessita de uma grande quantidade de tecido com pobre reprodutibilidade devido à variação no preparo do material e a análise interlaboratorial <sup>(62)</sup>.

#### 2.4.5 CICLINA-E

O ciclo celular é influenciado pela sucessiva ativação/inativação das Cdks. As Cdks são reguladas por proteínas diversas, entre elas ciclinas, que se ligam e ativam as Cdks formando complexos holoenzimáticos serina/treonina kinases. A ciclina-E é o fator limitador do final da fase G1 para a entrada na fase S e liga-se à Cdk2 e ativa a função da kinase logo antes de entrar na fase S.

Existem dois tipos de ciclina-E: a E1 e a E2. A ciclina-E2 tem 47% de similaridade com a E1. A ciclina-E1 apresenta algumas variantes que não se apresentam em células normais e aparentemente estimulam a célula no decorrer do ciclo <sup>(24)</sup>. Para a avaliação da ciclina-E utiliza-se a técnica de imunohistoquímica seguida da técnica de Western Blot, o que possibilita a medição da ciclina-E total e as isoformas. A presença de ciclina-E1 é de cerca de 42% e da E2 de 38% nos casos de câncer de mama receptor de estrogênio negativo <sup>(24)</sup>. A influência prognóstica da avaliação da ciclinas-E no câncer de mama não está estabelecida. Alguns estudos concluem que em pacientes com altos níveis de ciclina-E há um pior prognóstico e tem correlação com menor sobrevida global <sup>(74)</sup>. A análise das ciclinas é um método novo e não está disponível facilmente para uso clínico <sup>(62)</sup>.

#### 2.4.6 CICLINA-D1

Existem pelo menos três tipos diferentes de ciclinas-D, com diferentes funções no desenvolvimento mamário. A ciclina-D1 foi a primeira a ser identificada, pode ter função independente das Cdks e pode funcionar como co-fator no receptor estrogênio- $\alpha$ . Seu nível máximo é alcançado na metade da fase G1 com diminuição no final dessa fase. Em tumores tem sua expressão aumentada e provavelmente ajuda na promoção da proliferação celular encurtando o tempo de transição da fase G1/S<sup>(24)</sup>. Pode ser

pesquisada pela técnica de imunohistoquímica e aparentemente não tem função prognóstica definida.

#### 2.4.7 CICLINA-A

A ciclina-A tem sua expressão no final da fase S, G2 e na fase M do ciclo celular, sendo um bom marcador de proliferação celular<sup>(63)</sup>. É considerada uma ciclina da mitose porque é necessária para a replicação do DNA durante a fase S do ciclo, sendo produzida nesta fase e estando envolvida também na transcrição do DNA<sup>(75)</sup>.

Tem sido descrita por Bukholm como um bom marcador de proliferação sendo um marcador de mau prognóstico<sup>(75,76)</sup>. A super-expressão pode interferir na capacidade apoptótica do p53 e quando isso ocorre, este perde seu valor como fator prognóstico independente. O p53 é um gene de supressão tumoral, funciona como um importante mecanismo de indução da apoptose quando há dano ao DNA<sup>(77)</sup>. A ciclina-A e o p53 podem ter uma mesma via bioquímica, o que pode explicar as diferenças encontradas frente ao valor prognóstico em estudos com o p53 onde não foram avaliados a super-expressão da ciclina-A<sup>(77)</sup>.

#### 2.4.8 TOPOISOMERASE II $\alpha$

A topoisomerase II $\alpha$  (TopoII $\alpha$ ) é uma enzima de ligação do DNA que foi descoberta em 1997 e reflete a atividade proliferativa de células tumorais<sup>(63,78)</sup>.

Existem duas isoformas designadas:  $\alpha$  e  $\beta$  que têm uma homologia de 72%, mas são produtos de diferentes genes, diferindo quanto ao peso molecular, característica de expressão, função e sensibilidade a agentes anti-neoplásicos.

A topoII $\alpha$  é ciclo celular dependente na fase G2/M, e é essencial para o desenvolvimento das funções de segregação e condensação dos cromossomos replicados nas células filhas. A topoII $\alpha$  é a enzima alvo dos agentes quimioterápicos como as antraciclina, muito utilizadas no tratamento do câncer de mama<sup>(24)</sup>. Uma super-expressão da topoII $\alpha$  tem relação com menor sobrevida livre de doença e sobrevida global em alguns estudos, mas estudos prognósticos maiores devem ser desenvolvidos para definir o seu papel prognóstico<sup>(79)</sup>.

#### 2.4.9 TOMOGRAFIA COM EMISSÃO DE PÓSITRONS – FLUOROTIMIDINA[<sup>18</sup>F]

A tomografia com emissão de pósitrons (<sup>18</sup>F-PET) é um exame descrito por Kenny e colaboradores para avaliar a proliferação celular, através de um método de imagem em pacientes realizando tratamento quimioterápico neo-adjuvante para câncer de mama. É descrita como um método superior ao da biópsia para avaliar a proliferação, visto que avalia o tumor como um todo e pode avaliar também o estado dos linfonodos e de metástases, podendo monitorar a resposta ao tratamento sendo menos invasiva do que múltiplas biópsias. <sup>(80)</sup>

O [<sup>18</sup>F]FTL é um nucleosídeo pirimidínico que funciona como substrato para a enzima citoplasmática timidina quinase 1 que fosforila o [<sup>18</sup>F]FTL e pode ser detectado com o aparelho de PET. O [<sup>18</sup>F]FTL tem alta captação em tumores de mama em relação à mama normal e tem correlação com o Ki-67 <sup>(80)</sup>. A vantagem do uso dessa técnica é que se pode monitorar a modificação da proliferação celular durante um tratamento para o câncer, dando uma imagem global do tumor. A desvantagem é a exposição à radiação e o custo elevado <sup>(62)</sup>.

#### 2.4.10 BANDA NOR- AgNORs

O DNA apresenta segmentos chamados de região de organização nucleolar (NORs), que estão intimamente relacionados ao nucléolo e contêm genes codificantes do ribossomo do DNA, contribuindo para a regulação da síntese protéica. Tem afinidade pela prata (Ag), sendo corada pelas técnicas a empregam <sup>(22)</sup>.

Pode ser utilizada para a estimativa de duração do ciclo celular, podendo apresentar variações devidas à produção protéica de base em células em G<sub>0</sub>. Deve ser dosada somente em células durante o ciclo celular podendo ser correlacionada com a dosagem de Ki-67 <sup>(81)</sup>.

Este método tem pouca aplicabilidade clínica por falta de protocolos estabelecidos para sua realização técnica, devido à variabilidade nas colorações pela prata e falta de um sistema de pontuação para sua observação <sup>(22)</sup>.

### **3 SISTEMA DE PONTOS PARA AUXÍLIO NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS MAMÁRIAS**

A avaliação histológica das alterações proliferativas mamárias tem interpretação subjetiva entre os patologistas, podendo apresentar variações inter-observadores <sup>(41)</sup>. A criação de um sistema de pontos para auxílio na interpretação histopatológica de alterações proliferativas mamárias pode ajudar na diminuição da variação das interpretações. Não encontramos na literatura nenhum estudo que desenvolveu um sistema de pontos para a avaliação de alterações proliferativas pré-malignas na mama. Poucos estudos apresentam este objetivo e os que existem são focados nas alterações invasoras de mama <sup>(15)</sup>.

Criamos um sistema de pontos que avalia a morfologia histológica mamária para auxílio no diagnóstico histopatológico, classificando o padrão geral em pequeno e grande aumento, estabelecendo pontos que graduam as alterações de 0 a 5, vide ANEXO.

### **4 IMUNOHISTOQUIMICA**

A detecção do antígeno Ki-67 faz-se atualmente em larga escala com anticorpo MIB-1 e MIB-3, sendo o primeiro mais utilizado. Inicialmente pesquisava-se em tecido fresco com o anticorpo original <sup>(54)</sup>, mas desde 1992 com o desenvolvimento dos anticorpos MIB-1 e MIB-3 pesquisa-se com peças fixadas e incluídas em bloco de parafina <sup>(56)</sup>. Melhores resultados são obtidos no exame utilizando a técnica de recuperação dos antígenos, mais frequentemente com forno de microondas.

A leitura do resultado do exame é feita usualmente através da percentagem de células positivas coradas pelo anticorpo, sendo a coloração nuclear a mais aceita como critério de positividade <sup>(50)</sup>.

## **5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com número 03-110.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GERAL**

Criar um sistema de pontos para o auxílio diagnóstico histopatológico das alterações mamárias em tecido normal, fibroadenoma, lesões proliferativas intraductais e carcinoma infiltrativo .

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a variação do Ki-67 nas diferentes alterações mamárias.
- Avaliar a modificação da proliferação celular na mama normal, fibroadenoma, hiperplasia ductal típica, carcinoma ductal *in situ* e no carcinoma ductal invasor com anticorpo anti Ki-67 pela técnica de imunohistoquímica, comparando com o diagnóstico histológico na hematoxilina-eosina.
- Avaliar o índice mitótico nas alterações mamárias estudadas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs / World health organization classification of tumours. iarc press; 2003.
2. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the Breast. 3 ed. Lippincott Williams e Wilkins; 2004.
3. Miettinen M, Isomaa V, Peltoketo H, Ghosh D, Vihko P. Estrogen metabolism as a regulator of estrogen action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:259-70.
4. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:155-64.
5. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2-11.
6. Assersohn L, Salter J, Powles TJ, et al. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:113-23.
7. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:167-70.
8. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992;45:416-9.
9. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:113-23.
10. de Zoeten E, Carr-Brendel V, Markovic D, Taylor-Papadimitriou J, Cohen EP. Treatment of breast cancer with fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells. *J Immunol* 1999;162:6934-41.
11. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. 2 ed. editora manole ltda; 1992.
12. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 2005;353:1652-4.

13. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
14. Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1734-6.
15. Kurosumi M, Tabei T, Inoue K, et al. Prognostic significance of scoring system based on histological heterogeneity of invasive ductal carcinoma for node-negative breast cancer patients. *Oncol Rep* 2003;10:833-7.
16. Mridha AR, Iyer VK, Kapila K, Verma K. Value of scoring system in classification of proliferative breast disease on fine needle aspiration cytology. *Indian J Pathol Microbiol* 2006;49:334-40.
17. INCA. Instituto Nacional do Câncer. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) . 2007.  
Ref Type: Electronic Citation
18. NCI. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov> . 2007.  
Ref Type: Electronic Citation
19. Gupta PB, Kuperwasser C. Disease models of the breast. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004;1:9-16.
20. Tafuri LS, Rocha GF, Gobbi H. Cell cycle related proteins in hyperplasia of usual type in breast specimens of patients with and without breast cancer. *BMC Cell Biol* 2006;7:29.
21. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-8.
22. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998;51:716-24.
23. Buolamwini JK. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr Pharm Des* 2000;6:379-92.
24. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005;16:1723-39.
25. Sjostrom J, Blomqvist C, Heikkila P, et al. Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3103-10.
26. Pohl G, Rudas M, Taucher S, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:97-103.
27. Bocker W, Moll R, Poremba C, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002;82:737-46.

28. Bankfalvi A, Ludwig A, De Hesselde B, et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 2004;17:1051-61.
29. Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* 2006;8:211.
30. Page DL, Anderson TJ. *Diagnostic Histopathology of the Breast*. Churchill Livingstone; 1988.
31. Rosen PP, Oberman HA. *Atlas of tumor pathology*. Vol. 7, 3 ed. 1993.
32. Dessauvage BF, Zhao W, Heel-Miller KA, Harvey J, Bentel JM. Characterization of columnar cell lesions of the breast: immunophenotypic analysis of columnar alteration of lobules with prominent apical snouts and secretions. *Hum Pathol* 2007;38:284-92.
33. Noel JC, Fayt I, Fernandez-Aguilar S, Buxant F, Boutemy R. Proliferating activity in columnar cell lesions of the breast. *Virchows Arch* 2006;449:617-21.
34. da Silva BB, Lopes IM, Gebrim LH. Effects of raloxifene on normal breast tissue from premenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95:99-103.
35. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002;160:597-604.
36. de Lima GR, Facina G, Shida JY, et al. Effects of low dose tamoxifen on normal breast tissue from premenopausal women. *Eur J Cancer* 2003;39:891-8.
37. Silverman JS, Tamsen A. Mammary fibroadenoma and some phyllodes tumour stroma are composed of CD34+ fibroblasts and factor XIIIa+ dendrophages. *Histopathology* 1996;29:411-9.
38. NHS Cancer Screening Programmes. *PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE*. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005.
39. Stoll BA. Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:693-7.
40. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312:146-51.
41. Ghofrani M, Tapia B, Tavassoli FA. Discrepancies in the diagnosis of intraductal proliferative lesions of the breast and its management implications: results of a multinational survey. *Virchows Arch* 2006;449:609-16.
42. Hoshi K, Tokunaga M, Mochizuki M, et al. [Pathological characterization of atypical ductal hyperplasia of the breast]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995;22 Suppl 1:36-41.

43. Rosai J. Borderline epithelial lesions of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15:209-21.
44. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 1985;55:2698-708.
45. Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990;65:518-29.
46. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995;104:42-9.
47. Clahsen PC, Van de Velde CJ, Duval C, et al. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:356-63.
48. Benini E, Rao S, Daidone MG, Pilotti S, Silvestrini R. Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif* 1997;30:107-15.
49. Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, et al. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol* 1996;49:926-30.
50. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
51. Oestreicher N, White E, Malone KE, Porter PL. Hormonal factors and breast tumor proliferation: do factors that affect cancer risk also affect tumor growth? *Breast Cancer Res Treat* 2004;85:133-42.
52. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 1996;29:413-25.
53. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.
54. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
55. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
56. Key G, Becker MH, Baron B, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67

- cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993;68:629-36.
57. Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1989;49:2999-3006.
  58. Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:585-92.
  59. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, et al. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 2006;48:674-82.
  60. Chang J, Powles TJ, Allred DC, et al. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:3058-63.
  61. Dowsett M, Archer C, Assersohn L, et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:25-8.
  62. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 2006;8:216.
  63. van Diest PJ, van der WE, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004;57:675-81.
  64. van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol* 1992;23:603-7.
  65. Bontenbal M, Nortier JW, Beex LV, et al. [Adjuvant systemic therapy for patients with resectable breast cancer: guideline from the Dutch National Breast Cancer Platform and the Dutch Society for Medical Oncology]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:984-9.
  66. Jannink I, Risberg B, van Diest PJ, Baak JP. Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer. *Histopathology* 1996;29:421-8.
  67. Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987;152:287-95.
  68. Meyer JS, Province M. Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat* 1988;12:191-204.
  69. Benini E, Silvestrini R, Daidone MG, Canova S. Detection of P53 expression and S-phase cell fraction in paraffin-embedded tissue by a double-labeling technique. *J Histochem Cytochem* 1995;43:999-1003.

70. Goodson WH, Moore DH, Waldman FM. Ki-67 correlates with in vivo bromodeoxyuridine labeling index in operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3809.
71. Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, et al. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19472-7.
72. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37:101-13.
73. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1865-78.
74. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1566-75.
75. Bukholm IR, Bukholm G, Holm R, Nesland JM. Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2003;56:368-73.
76. Michalides R, van Tinteren H, Balkenende A, et al. Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br J Cancer* 2002;86:402-8.
77. Bukholm IR, Husdal A, Nesland JM, Langerod A, Bukholm G. Overexpression of cyclin A overrides the effect of p53 alterations in breast cancer patients with long follow-up time. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:199-206.
78. Lynch BJ, Guinee DG, Jr., Holden JA. Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997;28:1180-8.
79. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55:61-71.
80. Kenny LM, Vigushin DM, Al Nahhas A, et al. Quantification of cellular proliferation in tumor and normal tissues of patients with breast cancer by [18F]fluorothymidine-positron emission tomography imaging: evaluation of analytical methods. *Cancer Res* 2005;65:10104-12.
81. Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BM, Carney DN. Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am J Clin Pathol* 1989;92:401-7.

**8 ARTICLE IN ENGLISH:  
DIAGNOSING PROLIFERATIVE MAMMARY LESIONS USING A SCORING  
SYSTEM**

Frederico Diefenthaler Krahe<sup>\*</sup>, Luise Meurer<sup>‡</sup>, Jorge Vilanova Biazus<sup>§</sup>, Maria Isabel Albano Edelweiss<sup>\*‡</sup>.

From the Post Graduate Program in Medical Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)<sup>\*</sup>, Porto Alegre, Brazil, the Department of Pathology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)<sup>‡</sup>, Porto Alegre, Brasil, and the Mastology Division from the Department of Gynecology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)<sup>§</sup>, Porto Alegre, Brasil

Address for correspondence:

Frederico Diefenthaler Krahe

Rua: Ramiro Barcelos 910 /604

Tel: 55 51 3311 3380

e-mail: [fdkrahe@gmail.com](mailto:fdkrahe@gmail.com)

## ABSTRACT

**Introduction:** The evaluation of proliferative mammary lesions still poses diagnostic challenges as it involves great subjectivity from the evaluator. **Objective:** The aim of this study is to develop objective criteria using a scoring system to help performing the histopathologic diagnosis of mammary proliferative lesions. **Material and Methods:** Useful criteria were evaluated, selected and a scoring system was developed analyzing general histopathological pattern, cytological features and the expression of Ki-67. Hematoxylin and Eosin slides, as well as paraffin blocks from 100 mammary surgical specimens were selected, including 20 cases of normal breast tissue, 20 cases of fibroadenoma, 20 cases of usual ductal hyperplasia, 20 cases of ductal carcinoma in situ, and 20 cases of invasive ductal carcinoma. **Results:** The evaluation of the scoring system was statistically significant in all the groups analyzed, except among the cases of fibroadenoma and usual ductal hyperplasia. There was a significant difference in Ki-67 expression between the benign non-invasive proliferative lesions and the carcinomas. **Conclusion:** The scoring system developed in this study can be useful and attempts to establish some objectivity in diagnosing proliferative mammary lesions.

**Key words:** scoring system; Ki-67; mitotic index; proliferative mammary lesions; carcinoma; breast.

## INTRODUCTION

Proliferative mammary lesions derive from the ductal-lobular terminal unit, have different cytological and architectural characteristics, and are associated with a variable risk of developing invasive carcinoma. <sup>(1)</sup>

Tumor cell proliferation is a biological variable that can be used as a prognostic factor. Proliferative activity in breast cancer has been studied by several methods, including the expression of antigen Ki-67 through its monoclonal antibody Mib-1, using immunohistochemical techniques <sup>(2)</sup>. However, its routinely use is still controversial and its role and function have only been partly explained <sup>(3-5)</sup>.

Normal mammary epithelium was originally described as composed by two basic cell types: the luminal glandular cells and the myoepithelial basal cells, which characteristically express cytokeratins Ck8/18/19 and smooth muscle actin, respectively. Studies using cytokeratin markers show that there is a third cell type located both in the basal/parabasal layer and in the intraluminal compartment. These cells stain with cytokeratin 5 marker (Ck-5), and they represent about 5% of the mammary cells <sup>(6,7)</sup>. There is evidence that proliferation in the normal mammary epithelium is organized hierarchically based on the existence of pluripotential mammary cells<sup>(8)</sup>. The study of the biological behavior of this pluripotential cell is still incipient. In the future, its study may enable a better understanding of the proliferative processes in the breast as well as the development of new breast cancer therapies<sup>(6,8)</sup>.

From a practical standpoint, the definition of mammary lesions is extremely important. Precisely, proliferative mammary lesions, as they are knowingly associated with a higher or lower risk for the development of invasive carcinoma <sup>(9)</sup>. Non-invasive proliferative lesions are divided by the World Health Organization into three large groups: usual ductal hyperplasia (UDH), atypical ductal hyperplasia (ADH) and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) <sup>(1,9)</sup>.

The evaluation of mammary lesions based on a scoring system has not been studied much. A review of the literature identified only a single study that has assessed a scoring system based on the histological heterogeneity of invasive carcinomas of the breast with negative axilla, where a prognostic correlation was established. This study showed that the scoring system based on the evaluation of histological findings may be useful to select high risk patients who need additional treatment <sup>(10)</sup>.

In this sense, creating a scoring system that takes into consideration several histological characteristics in an attempt to objectively identify differences between

mammary proliferative changes, could be very useful as it contributes to minimize the great inter-observer variation described in some of these lesions.

## **MATERIAL AND METHODS**

A cross-sectional study was performed for a histological analysis of mammary lesions, in order to implement a protocol to evaluate breast specimens using a scoring system, independent of the patients' clinical data. The factors studied here, therefore, are the histological slides of different lesions, using slides of normal breast as a control. The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Research and Graduate Group at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, under number 03-110.

As to inclusion criteria, normal mammary tissue obtained in a reduction mammoplasty procedure was used, selecting a slide with normal characteristics. Proliferative changes of the breast were also included: fibroadenoma, usual ductal hyperplasia, ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma.

No cases of atypical ductal epithelial hyperplasia were included, since this diagnosis is controversial and the source of great intra and inter-observer variability<sup>(11)</sup>. Cases in which there was insufficient material in paraffin blocks were excluded, and also when there was a disagreement between the original anatomopathological diagnosis and the review before entering the study.

## **DEFINITION OF THE SCORING SYSTEM**

Considering that the histological diagnoses are performed based on several criteria, both cytological and architectural, a numerical point system was developed in order to allow discrimination of the histological pattern of each mammary lesion studied, using a protocol. These criteria are described at length in the literature, and some are considered quite conclusive for their respective diagnoses<sup>(1)</sup>.

Thirteen microscopic criteria were selected for the evaluation of normal and abnormal histological aspects of the breast. These criteria were selected in two large groups: a general pattern with characteristics that can be evaluated with small microscope magnification (up to 50X), and a more detailed pattern, resulting from the evaluation of a large magnification (200 and 400X). The mitotic index was obtained

according to the recommendations in the literature, counting the total number of mitoses in 10 High power field (HPF) <sup>(12)</sup>.

Initially, the slides stained with Hematoxylin-Eosin (HE) were evaluated to establish the presence or absence of change, and later, using our scoring system for final diagnosis, numerical values were assigned that ranged from 1 to 5. The criteria related to less severe changes received a value of 1, the intermediate ones, values from 2 to 3, and those that were most relevant for the diagnosis of malignity received a score of 4 to 5. Under special circumstances (the evaluation of the nuclear grade), a pattern of non-evaluative change was established, which was assigned score zero. An evaluation protocol was then established, which we call a scoring system, and all the samples were evaluated using this system. In order to rank the scores in the table, and to obtain uniform results of the two independent observing pathologists, followed by the author, it became necessary to define each of them, as described below:

## 1 **GENERAL PATTERN OF THE SLIDE** (low power field).

1.1 **DUCTAL AND LOBULAR ARCHITECTURE**- At that time the presence or absence of change in the architecture of the ductal and lobular mammary system was seen, and the absence was considered an infiltrative pattern of malignant neoplasm. Preserved – when the mammary tissue did not present diagnostic changes (1 POINT); Preserved – with cell proliferation within the ducts and no atypias (2 POINTS); Preserved- with cell proliferation and with atypias (in this study reserved to the low grade DCIS, (3 POINTS); Preserved- with cell proliferation and severe atypias accompanied by microcalcifications and/or intra-ductal necrosis (in this study suggesting high grade DCIS), and no evidence of basal layer and stromal invasion in the sample examined (4 points); Infiltration of the mammary stroma, with any histological type of invasive carcinoma being non special histological type, tubular, apocrine, micropapillary, solid, clear cell, mildly differentiated, high grade and mixed patterns (5 POINTS).

1.2 **NECROSIS**- strictly evaluated in the lesion areas, ignoring the peripheral areas with fatty necrosis. Necrosis is considered to exist when there are cell groups showing a coagulation necrosis process (ischemic necrosis). The apoptotic cells should not be evaluated. No necrosis – in cases of benign lesions and tumors without necrosis (1 POINT); with intraductal necrosis- and/or comedonecrosis – this could be amorphous

eosinophilic material, or with remnants of apoptotic/degenerated cells, partly or completely filling the lumen of ducts or lobes in cases of acinar extension (4 POINTS); with tumor necrosis – necrosis of the tumor proper, extensive or in small foci, likewise including ischemic stromal necrosis (5 POINTS).

1.3 **INFLAMMATORY INFILTRATE**- presence of chronic inflammatory cells – lymphocytes and plasma cells scattered in the lesion or in its periphery: Absent – no inflammatory infiltrate (1 POINT); Mild inflammatory infiltrate – generally on the periphery of the lesion, in the mammary stroma (2 POINTS); Intense inflammatory infiltrate – intra or perilesion, which could sometimes contain sparse neutrophils (3 POINTS).

1.4 **LOBULAR OR DUCTAL EXTENSION OF THE LESION**- when atypical or proliferating cells are present continuing beyond the lesion in ducts or lobules, in the canalicular or lobular portion: Absent: when this extension does not occur (1 POINT); Present: when the lesion extends to neighboring ducts or lobules (3 POINTS).

1.5 **QUANTITY OF DUCTS/LOBULES AFFECTED** (at low power magnification) - to include very small lesions, or when the whole microscope field presents proliferation with or without atypia or neoplastic infiltration: Absence of a lesion – when all the structures are normal (1 POINT); Few or up to two ducts – for very small lesions (2 POINTS); More than 2 ducts up to 30 – value stipulated for intermediate-size lesions (3 POINTS); Multiple ducts or lobules affected – for larger lesions (4 POINTS).

2 **CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS** (High Power field, lens with a magnification of 40 or 100).

2.1 **CELL SHAPE** - characterization that distinguishes benign from malignant lesions: General monomorphism: all the cells analyzed show an identical pattern to the normal one (1 POINT); Polymorphism in few cells – ducts lined with normal cells, a few of them with large nuclei. A good nucleus/cytoplasm ratio, with dominance of a well demarcated cytoplasm and round or ovoid nuclei (2 POINTS); Polymorphism in many cells: characteristic of lesions with atypical proliferation (3 POINTS); Pleomorphism and anaplasia: large, irregular nuclei with variable contour, multinucleation and very large cells (5 POINTS).

2.2 **ASPECT OF THE DUCTS**: With two cell layers, epithelial and myoepithelial, except in areas with transversal sections (apparent cell increases were not considered

here) (1 POINT); Between 3 and 8 cell layers – showing a cell proliferation without atypias (2 POINTS); roman bridges, tufts or papillae – intraductal proliferation distribution (3 POINTS); Solid with or without necrosis - when the duct is completely filled by cells, with or without central necrosis (4 POINTS); Cribriform: when the duct has this aspect, proliferation is more intense with empty spaces and/or intercellular bridges with more cells (4 POINTS); Proliferation with predominant formation of tubules infiltrating the stroma (5 POINTS); Proliferation with a moderate formation of tubules, infiltrating the stroma, associated with other forms of stromal infiltration (5 POINTS); No tubule formation – predominance of very cellular lesions, with dense fibrous stroma (5 POINTS); Isolated tumor cells in the stroma: frankly infiltrative lesion (5 POINTS).

2.3 **MITOTIC INDEX PER 10 HIGH POWER FIELD (10 HPF)**- counted using an Olympus Microscope, Model BX41TF, with a 40X lens, creating a 0.5mm microscopic field according to the criteria of NHSBSP 05 <sup>(12)</sup>: Zero to 7 mitoses /10HPF (1 POINT); 8 to 14 mitoses / 10HPF (2 POINTS);  $\geq 15$  mitoses /10 HPF (3 POINTS).

2.4 **ANTIGEN Ki-67 EXPRESSION**- looking at the presence or absence of brownish nuclear stain, using the immunohistochemistry technique. Positive results are evaluated as a percentage of positive nuclei in most fields and on the periphery of tumors, when there are malignant tumors present examined on the slide: Absent (0 ZERO POINT); Up to 5% (1 POINT); Up to 10% (2 POINTS); Up to 20% (3 POINTS); Up to 30% (4 POINTS); More than 30% (5 POINTS).

2.5 **BLACK' S NUCLEAR GRADE** Nuclear grade involves the tumor growth pattern and the variability of the cell nucleus compared with the normal cells. Pathologists usually grade on a scale of 1-3 or 1-4, the higher number being the more severe cases. When only the nuclear grade is considered, a few patterns are being observed in the cell (such as size, shape and cell activity – reflected by the mitoses) that, when combined with each other provide a general score that is then translated into the final nuclear grade. Since there is a certain degree of objectivity involved in cell interpretation by the pathologists, many prefer to use the descriptive nuclear grades: low, intermediate and high, making it easier for clinicians to perform prognostic interpretation: Low grade or 1 (5 POINTS); Intermediate or 2 (5 POINTS); High grade or 3 (5 POINTS); Not applicable or (0) was included in this option because we are also evaluating benign lesions that do not have a nuclear grade (0 POINT).

2.6 **NUCLEOLI:** Absent/not visible: this occurs more frequently in benign cells (1 POINT); Present/inconspicuous: smaller, not well defined nucleoli (3 POINTS); Present/many/large/irregular or multiple: the description of the criteria itself specifies the changes to be looked for in the nuclei of proliferated and/or atypical cells (4 POINTS).

2.7 **STROMAL REACTION** This clearly demonstrates the type of lesion found or absent. In the malignant neoplasm they are part of the tumor, in benign lesion fibrous proliferation predominates; No reaction: stroma without histological abnormalities (1 POINT); Desmoplastic: dense fibrosis and stroma hyalinization (3 POINTS); Fibromixoid: with variable degrees of loose, mixoid connective tissue and variable degrees of cellularity (2 POINTS); Periductal fibrosis: fibrous proliferation around the ducts (2 POINTS); Neoplastic cells in the stroma: characteristic of malignant neoplastic stroma (5 POINTS).

2.8 **MICROCALCIFICATIONS:** A common finding in neoplastic mammary lesions, also found in benign lesions; Present (3 POINTS); Absent (2 POINTS).

## **HISTOLOGICAL SAMPLES**

Slides of surgical specimens obtained in total or segmental resection, or in excisional biopsies of the breast, in patients who underwent surgery between 2002 and 2006 in the Mastology and Plastic Surgery Departments at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). They were selected from the files of the Pathology Department at HCPA. All slides of the selected cases were reassessed to confirm the initial diagnosis and to identify the best histological section chosen to perform staining and analysis for the purpose of this study. All of the material was observed with the HE stain and with the immunohistochemistry technique using the anti Ki-67 monoclonal antibody.

Two pathologists (M.I.E. and L.M.) were involved in the selection, evaluation and interpretation of all the material selected, performing an independent analysis, and the final values for this study were defined after a diagnostic consensus among the observers.

Since it involves testing a protocol created for this study, it was defined that the sample size would be 20 slides per pathological process to be examined. Five classes of diagnosis were chosen for this purpose, with a total of one hundred slides to be analyzed by HE and 100 slides processed by immunohistochemistry with anti-Ki-67 antibody.

Only cases with clear diagnoses of well-defined lesions were selected, in order to verify whether the scoring system is useful and feasible in the routine of surgical pathology laboratories. Twenty cases of normal breasts were chosen and 20 cases of each mammary change, according to criteria already mentioned above.

## **IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

Samples of mammary tissue fixed in formalin and embedded in paraffin were cut with 4 micrometers and placed on slides that had been previously prepared with (3-aminopropyl) triethoxy-silane-organosilane (Sigma code.A3648) to perform the immunohistochemistry technique according to the routine of the Pathology Laboratory at the HCPA Research Center. The method described by Mills in 1992<sup>(13)</sup> and Santos et al<sup>(14)</sup> in 1999 was performed in the following stages: deparaffining and hydration, antigen recovery with radiation in a microwave oven for 21 minutes at maximum strength in a buffer solution with citric acid, adjusting the pH to 6 with sodium hydroxide, blocking endogenous peroxidase: the slides were placed in a 5% hydrogen peroxide and distilled water solution for 30 minutes, and then in a solution of 5% skim milk and phosphate buffer (PBS-DAKO) for 20 minutes in a wet chamber; they were washed in running water and distilled after they had been placed in a PBS bath for 5 minutes. Incubation with the anti K-67 monoclonal primary antibody (monoclonal mouse anti human Ki-67 antibody, clone MIB1 cod M7240-DAKO) at a 1/50 dilution for 60 minutes; wash with PBS, reaction with the LSAB-DAKO kit for peroxidase later secondary antibody (30 minutes) wash with PBS 5 minutes and develop with Dab-DAKO kit until the brownish stain is obtained; counterstained with Harris Hematoxilin (30 seconds), washed in running water and 2% ammoniacal water solution in distilled water, dehydration in absolute alcohol (2x) xylol and mounting with Canada Balsam. Positive control slides for anti Ki-67 antibody in a lymph node section and negative control slides without the primary antibody were processed together with the groups that were being studied in every 50-slide lot. The criterion to read slides stained by immunohistochemistry was negative when no reaction occurred, and positive when there was brown nuclear staining in epithelial or mitotic cells, at variable percentages in the different microscopic fields of the slide studied, and in tumors, preferentially on the periphery of the lesions. The light brown color of the cytoplasm was considered non-

specific and was not included in the analysis of positives. The apoptotic cells were not looked at in this analysis.

## STATISTICAL ANALYSIS

Program SPSS v. 14.0 for data analysis and program PEPI version 3.0 were used for statistical evaluation.

The categorical variables were described by absolute frequency and percentage relative frequency; the quantitative variables were described by mean and standard deviation when they were symmetrically distributed and by median and inter-quartile range when they were asymmetrical. The categorical variables between the groups were compared using the Chi-square test, the quantitative variables using symmetrical distribution by ANOVA, followed by the Tukey test, and those with asymmetrical distribution using the Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney test, with Finner correction for multiple comparisons (using PEPI program version 3.0). The level of significance was 5%.

## RESULTS

The total point score showed a symmetrical distribution and the mean in the normal breast was  $14.05 \pm 1.3$ ; in FA and UDH values were very similar,  $20.6 \pm 1.7$  and  $20.3 \pm 2.2$  respectively. In DCIS the score was  $41.5 \pm 5.6$  and in IDC it was  $45.5 \pm 2.9$  points. The point score results were analyzed by ANOVA. There was a statistical difference among almost all groups, a difference which did not occur only between the score of fibroadenoma and usual ductal hyperplasia; all the others had a statistical difference to each other ( $p < 0.001$ ). Figure 1 shows the clear difference in points between a normal breast and the other 4 groups, and also the difference between benign proliferative changes (FA and UDH) and the cancer cases.

The expression of Ki-67 presented an asymmetrical distribution, the expression of its median in the normal breast was 1% (1 to 3); in fibroadenoma it was 5% (2.25 to 8); in usual ductal hyperplasia it was 5% (3 to 8); in DCIS, 15% (5 to 20) and in IDC it was 5% (4.25 to 15). The values of this expression of Ki-67 were statistically different between the normal breast (NB) and all the other variables (FA, UDH, DCIS and IDC); statistical differences were also found between FA and DCIS and between UDH and

DCIS. No statistical difference was found between the cases of UDH and IDC. Figure 2 shows detail on the distribution of values of Ki-67 expression in each group.

As to the count of total number of mitoses in 10 large magnification fields (400x), the distribution was asymmetrical and the median value for the normal breast was 1% (1 to 2.5), in FA 4% (3 to 6), in UDH 3.5% (2 to 4), in DCIS 14% (9 to 22) and in IDC 32% (17.5 to 57.5). The total number of mitoses was statistically significant ( $p < 0.001$ ) among all groups except in FA and UDH.

For the mitotic index (MI) there was a statistical difference according to the Chi-square test ( $p < 0.001$ ) between the group of the three first (NB, FA, UDH) and the last two groups (DCIS and IDC). Almost the whole first group presented an MI equal to 1, except for a case of UDH which was given an index of 2. On the other hand, in the carcinoma group there was a different distribution: among the 20 cases of DCIS, 4 (20%) had a score of 1; 7 (35%) had a score of 2; and 9 (45%) had a score of 3. In the IDC group 17 (85%) had a MI of 3; 2 (10%) presented index 2 and 1 (5%) obtained an index equal to 1.

## **DISCUSSION**

The initial aim of the study was achieved. The point score was valid for our cases and, with a detailed analysis of the histological criteria it was possible to distinguish two groups: benign and malignant proliferative lesions. The normal breast was introduced in the analysis to provide a baseline standard for this scoring system. The results of this evaluation system confirmed the expectation of the group. The purpose was to establish a valid system to distinguish mammary proliferative changes by systematically applying histological criteria chosen to help diagnose these changes, showing that there is a significant difference in the score between the specific groups. As expected, in the normal breast the score had a lower sum of points with a mean of 14.05, a minimum value of 13 and a maximum of 17.

There was no significant different between the cases of FA and UDH, with very similar scores. The benign changes had less points among the criteria analyzed. The result was the lowest score with a mean number of points of 20.3 for UDH, the minimum and maximum being respectively 17 to 24. This point score clearly shows these two changes in figure 1 presented between the score for a normal breast and that of malignant changes.

As expected, scores for carcinoma, DCIS and IDC, also were lower. The difference between these groups was significant. In invasive carcinomas scores of two cases were suppressed due to problems attributed to antibody Ki-67 staining. In both cases the mitotic count was high (MR of 3) and Ki-67 was assessed as being 0%. Due to this discrepancy the slides were stained again, confirming the negative result. With such a high mitotic index and a negative Ki-67, these results were not included in the total analysis, as it probably was a technical problem. Ki-67 is expressed in all mitotic cells but its expression may be negative in the end of mitosis and during the anaphase – telophase period<sup>(15)</sup>. As Ki-67 assessment is part of the point score, these two cases of invasive carcinomas were not included. In DCIS the mean expression of Ki-67 was 41.5, ranging between 32 and 48. As expected, the IDC cases had a higher mean score of 45, ranging from 39 to 49.

No point score to assess mammary histology similar to the one used in this paper was found in literature. Therefore we cannot compare it with already published data. We know that all attempts to reach consensus in mammary histology set high priority on malignant neoplasm, the most important examples being the Nottingham<sup>(16)</sup> score for invasive Ductal Carcinoma and the Van Nuys<sup>(17)</sup> score for in situ carcinoma. However, these approach several other, also relevant, criteria as macroscopic aspect, tumor size, and surgical borders. All these are relevant for malignant lesions and carcinoma in situ. However, this study aims to help the surgical pathologist in the routinely diagnosis of different lesions, as the ones mentioned here, thus allowing the non-specialist pathologist to be trained in the detailed assessment of several diagnostic factors in mammary disease.

A similar score aiming to use histological criteria for skin melanomas correlating them to benign lesions to help the pathologist's diagnosis was described<sup>(18)</sup>.

Atypical ductal hyperplasia was not included in our study due to the diagnostic disagreement with low grade DCIS described in literature<sup>(11)</sup>.

The nuclear grade of our DCIS cases was homogeneous: in 20 cases we had 7 high grade DCIS, 7 intermediate grade DCIS, and 6 with low grade. A possible criticism could be that we should have excluded low grade cases, only assessing high grade DCIS, as ADH was excluded due to inter-observer discrepancies, but if we excluded low grade cases the DCIS point scores would be unrealistically high.

One of the huge problems in mammary pathology is the good differential diagnosis between ADH and low grade DCIS. In a future study this point score will be

used retrospectively on many patients only with ADH and low grade DCIS, in order to correlate the patients' outcome and to systematically differentiate both groups. This differentiation is essential for the treatment.

Future studies could modify our protocol including other assessments in the point score for proliferative changes, as the presence of estrogen receptors. A previous study showed that UDH patients with increased expression of either alpha RE or Ki-67, or both, could define a subgroup of patients at risk of developing cancer<sup>(19)</sup>.

As expected, there was a significant difference between DCIS and IDC, despite the form of Figure 1 in which both groups have a visually similar distribution. In Figure 1 minimal, maximal, and mean values of the total score are shown stressing that malignant lesions were grouped at the upper part; the benign ones, in the lower part because they have the lower grades, as expected.

Ki-67 expression results were as expected in most cases. In the normal breast, in FA and in UDH our data are similar to those found in other studies<sup>(19-21)</sup>. Differently from Bánkfalvi et al who did not find significant differences between normal breast and UDH when using Ki-67, this study showed that there are significant differences in its expressions in these groups<sup>(7)</sup>.

Ki-67 expression in DCIS varies a lot, in different reports it ranges from 7.9 to 25.4%: lower values are found in low grade DCIS and higher values, in high grade DCIS<sup>(7,22)</sup>. In this analysis the Ki-67 expression median was 15% with inter-quartile variation of 5 to 20% on quartiles 25 and 75, respectively. In this analysis DCIS has a homogenous distribution of histological grades, as described at Results, therefore the 15% expression is a median value for DCIS in general. The 25 quartile value reflecting the expression of 5% is attributed to low grade cases, as reported in literature<sup>(7)</sup>; the 20% found in quartile 75, to high grade, as described by other authors<sup>(22)</sup>. There was a significant difference between Ki-67 values of DCIS and IDC.

However, different from literature data, the median Ki-67 expression in IDC was not the expected one. Regarding IDC, a big variation from 17.7 to 29.7 %<sup>(4,23-25)</sup>, is described, but in our cases the median expression was 5%, ranging from 4.25% to 15% in the quartiles 25 and 75, respectively. This is a surprising difference, as the used immunohistochemistry always was carried out with an internal positive controls. This difference is neither due to the excluded Ki-67 cases nor to possible Ki-67 variation caused by medical issues of the patients, as many studies describe Ki-67 immunohistochemical profiles in IDC, irrespective of the menstrual cycle phase.

There are few data about inter-laboratory variability in Ki-67 expression <sup>(15)</sup>, but one possible explanation could be such variability. However, other studies are needed to confirm our findings. The Ki-67 cut-off points are not well established making comparisons between studies difficult, when values are regarded as non-continuous variable <sup>(15)</sup>, but in this study Ki-67 expression values were considered a continuous variable, despite not showing a symmetrical distribution.

The total number of mitosis was significantly different between the analyzed cases, except for FA and UDH. Usually the total number of mitosis is not used by other authors who prefer to use the mitotic rate. We assessed the total number of mitosis because it initially was one of the elements of the point score; only later on it was replaced by the mitotic rate. Even though this analysis was maintained to validate its expression, as few published studies describe the total number of mitosis per ten high power fields in proliferative breast diseases. We chose to assess the mitotic rate according to NHSBSP 05 because its correlation scale between number of mitosis and microscopic field is good <sup>(12)</sup>. Regarding the mitotic rate, significant differences between the groups (MN, FA, UDH) and (DCIS and IDC) were expected, that is, the more proliferative a lesion, the higher the number of mitosis. This study did neither aim to correlate any clinical outcome of the assessed patients nor to observe other molecular changes frequently described in cellular or molecular biology journals. This may be criticized, as cell proliferation can influence several medical and molecular issues. However, the main objective of this study was to design a ten point score that could help surgical pathologists in daily practice diagnosis and not to be the main assessment of proliferative lesions in breast lesions.

There are other studies trying to correlate breast cancer patients' outcome and ovulation phase at surgery. Data are contradictory. Zurrida et al describe that the influence of the menstrual cycle phase on the prognosis of patients treated for breast cancer is not known yet <sup>(26)</sup>. This could be important in pre-menopausal, ovulating, women not using hormone replacement therapy. After developing this score and finding the differences between the groups we now intend to compare clinical features of the cases as age, the use of hormone replacement, and menstrual cycle with anatomopathological data and outcome. To do this we will need well computerized data of the patients' records and their follow up. This is a time demanding study, but we have already started it.

It was not possible to establish the score cut-off points by diagnosis due to the small number of cases, but this was not the aim of the present study. Maybe it can be done in future, when we have more cases.

## **CONCLUSIONS**

The main objective of this study was to establish and to assess a point score developed to be an aid in the hisopathological diagnosis of proliferative mammary changes. As expected, we were able to demonstrate differences between the analyzed groups, thus demonstrating that it is possible to systematically establish at least two well differentiated groups. There is a histological difference between benign and malignant diseases, but within the group of ADH and low grade DCIS this differentiation is not always easy. Therefore, the analyzer's subjectivity is very high.

In future the developed score may help to establish this differentiation, but studies with more cases with both changes have to be analyzed to test its applicability. As this is the first study using this method, some caution is recommended, because other studies including clinical features have to be done to asses the score's applicability, especially in distinguishing atypical hyperplasia and low grade DCIS. Possibly, the use of other biologic markers as estrogen receptors, p53, bcl-s, and HER-2, besides the Ki-67 can improve the score's use. The point score should not yet be used for the accurate diagnosis of mammary changes, but this study showed that it can be useful as an adjunct method to diagnose breast disease. As in any other diagnostic tool, there are transitional zones in which the highest values of one change reach the lowest values of another, with superimposition.

The exact cut-off points for each change have not been established yet. Additional studies with a higher number of cases involving more pathologists are needed to clarify the values observed in this study.

## **ACKNOWLEDGMENT**

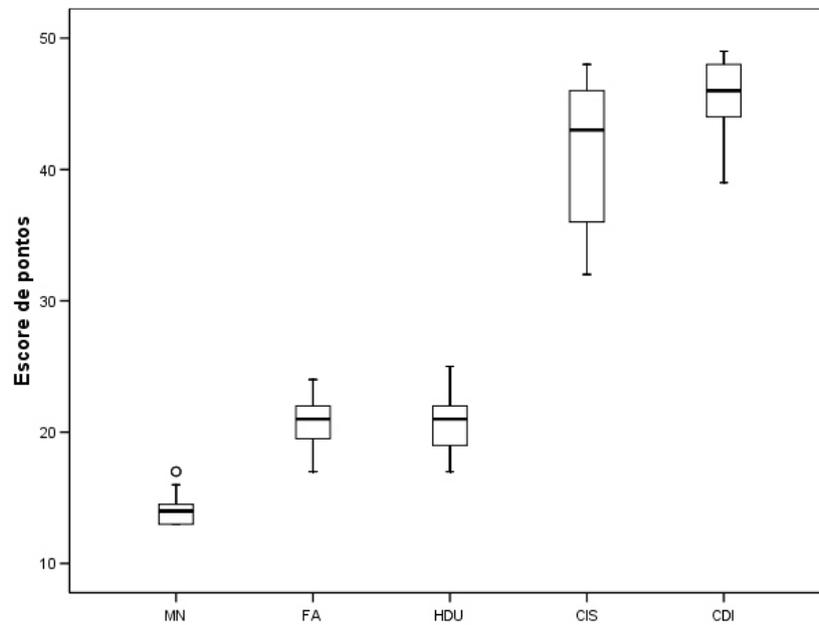
This study was funded by the Graduate Program in Medical Sciences of UFRGS and by FIPE – HCPA.

## References

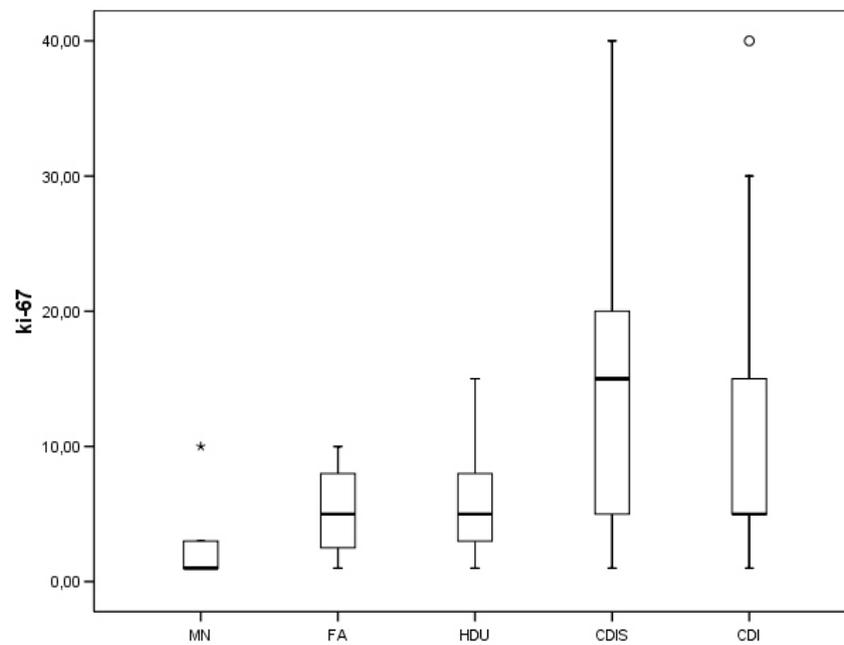
1. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs / World health organization classification of tumours. IARC press; 2003.
2. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992;45:416-9.
3. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:155-64.
4. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:113-23.
5. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2-11.
6. Bocker W, Moll R, Poremba C, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002;82:737-46.
7. Bankfalvi A, Ludwig A, De Hesselde B, et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 2004;17:1051-61.
8. Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* 2006;8:211.
9. Page DL, Anderson TJ. *Diagnostic Histopathology of the Breast*. Churchill Livingstone; 1988.

10. Kurosumi M, Tabei T, Inoue K, et al. Prognostic significance of scoring system based on histological heterogeneity of invasive ductal carcinoma for node-negative breast cancer patients. *Oncol Rep* 2003;10:833-7.
11. Ghofrani M, Tapia B, Tavassoli FA. Discrepancies in the diagnosis of intraductal proliferative lesions of the breast and its management implications: results of a multinational survey. *Virchows Arch* 2006;449:609-16.
12. NHS Cancer Screening Programmes. PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005.
13. Mills B. Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology ( Washington) ; 1992.
14. Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização in situ. *Manual de Imuno-histoquímica* ed. Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J; 1999.
15. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
16. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer* 2007.
17. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1996;77:2267-74.
18. Veronese LA, Corrente J.E., Marques MEA. Melanoma Maligno cutâneo: sistema de pontos (scoring system) para auxílio no diagnóstico histopatológico. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:375-83.
19. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002;160:597-604.

20. Dessauvage BF, Zhao W, Heel-Miller KA, Harvey J, Bentel JM. Characterization of columnar cell lesions of the breast: immunophenotypic analysis of columnar alteration of lobules with prominent apical snouts and secretions. *Hum Pathol* 2007;38:284-92.
21. Silverman JS, Tamsen A. Mammary fibroadenoma and some phyllodes tumour stroma are composed of CD34+ fibroblasts and factor XIIIa+ dendrophages. *Histopathology* 1996;29:411-9.
22. Noel JC, Fayt I, Fernandez-Aguilar S, Buxant F, Boutemy R. Proliferating activity in columnar cell lesions of the breast. *Virchows Arch* 2006;449:617-21.
23. El All HA, Ismail E, Abbas M, Ouf K. MIB-1 index, S-phase fraction, mitotic figure count, and SBR histologic grading in invasive breast carcinoma: a comparative study. *Breast J* 2001;7:106-10.
24. Pohl G, Rudas M, Taucher S, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:97-103.
25. Benini E, Rao S, Daidone MG, Pilotti S, Silvestrini R. Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif* 1997;30:107-15.
26. Zurrada S, Galimberti V, Gibelli B, et al. Timing of breast cancer surgery in relation to the menstrual cycle: an update of developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;38:223-30.

**Figure 1**

**Figure 1:** Total scoring system and histology in 100 cases (MN- normal breast, FA- fibroadenoma, HDU- usual ductal hyperplasia, CDIS- ductal carcinoma in situ and CI- invasive ductal carcinoma)

**Figure 2**

**Figure 2:** Total Ki-67 in 100 cases (MN- normal breast, FA- fibroadenoma, HDU- usual ductal hyperplasia, CDIS- ductal carcinoma in situ and CDI- invasive ductal carcinoma)

**9 ARTIGO EM PORTUGUÊS:  
SISTEMA DE PONTOS PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO  
HISTOPATOLÓGICO DAS ALTERAÇÕES MAMÁRIAS PROLIFERATIVAS**

Frederico Diefenthaler Krahe<sup>\*</sup>, Luise Meurer<sup>‡</sup>, Jorge Vilanova Biazus<sup>§</sup>, Maria Isabel Albano Edelweiss<sup>\*‡</sup>.

Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brasil.

<sup>\*</sup> Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

<sup>‡</sup> Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil

<sup>§</sup> Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil

Endereço para correspondência:

Frederico Diefenthaler Krahe

Rua: Ramiro Barcelos 910 /604

Tel: 55 51 3311 3380

e-mail: fdkrahe@gmail.com

## RESUMO

**Introdução:** A avaliação de algumas alterações mamárias tem atribuído um grau de subjetividade do avaliador. **Objetivo:** O estudo tem como objetivo desenvolver um escore de pontos para auxílio no diagnóstico histopatológico de alterações proliferativas mamárias. **Material e Métodos:** Foram selecionados critérios para diagnóstico histopatológico de patologia mamária e desenvolvido um sistema de escore de pontos analisando o padrão geral da histologia e características citológicas das alterações do tecido mamário e a expressão do Ki-67. Foi selecionado material histológico de 100 peças cirúrgicas mamárias, sendo 20 casos de mama normal e 20 casos de cada uma das alterações: fibroadenoma, hiperplasia ductal típica, carcinoma ductal in situ e carcinoma ductal invasor. **Resultados:** A avaliação do escore total de pontos teve relevância estatística entre todos os grupos analisados, menos entre os casos de fibroadenoma e hiperplasia ductal típica. A expressão do Ki-67 teve diferença significativa entre as alterações proliferativas não invasivas e os carcinomas. **Conclusão:** O escore de pontos desenvolvido pode ajudar o patologista cirúrgico no diagnóstico das alterações mamárias proliferativas.

**Palavras-chave:** Escore de pontos; Ki-67; Índice mitótico; Alterações proliferativas mamárias; Carcinoma; Mama.

## INTRODUÇÃO

Alterações proliferativas mamárias são um grupo de lesões com diferentes características citológicas e arquiteturais, que se originam na unidade ducto-lobular terminal e estão associadas a um risco variável de desenvolvimento de carcinoma invasor<sup>(1)</sup>.

A proliferação celular tumoral é uma variável biológica que pode ser usada como um fator prognóstico. A atividade proliferativa no câncer de mama tem sido estudada por diversos métodos, entre eles a determinação da expressão do antígeno Ki-67 através do seu anticorpo monoclonal Mib-1 com a técnica de imunohistoquímica<sup>(2)</sup>. O anticorpo anti- Ki-67 é largamente utilizado para avaliar a proliferação celular, mas sua utilização rotineira ainda é controversa e o seu papel e função estão apenas parcialmente esclarecidos<sup>(3-5)</sup>.

O epitélio normal da mama originalmente é descrito como sendo composto por dois tipos celulares básicos: as células glandulares lumbais e as células basais mioepiteliais que se caracterizam por expressar as citoqueratinas Ck8/18/19 e a actina de músculo liso, respectivamente. Estudos com marcadores de citoqueratinas estão mostrando que existe um terceiro tipo celular, localizado tanto na camada basal/parabasal quanto no compartimento intraluminal. São células coradas pelo marcador de citoqueratina Ck-5 e compreendem cerca de 5 % das células mamárias<sup>(6,7)</sup>. Existem evidências de que a proliferação no epitélio mamário normal é organizada de maneira hierárquica e a partir da existência de células mamárias pluripotenciais<sup>(8)</sup>. O estudo do comportamento desse tipo celular ainda é incipiente, podendo ajudar a entender melhor os processos proliferativos da mama e, por conseguinte, o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama<sup>(6,8)</sup>.

Do ponto de vista prático, a precisa definição das alterações mamárias é de extrema importância, especialmente no que tange as lesões proliferativas, pela sua associação com o risco, maior ou menor, de desenvolvimento de carcinoma invasor<sup>(9)</sup>. As alterações proliferativas não invasoras são divididas pela Organização Mundial da Saúde em três grandes grupos: hiperplasia ductal típica (HDT), hiperplasia ductal atípica (HDA) e o carcinoma ductal *in situ* (DCIS)<sup>(1,9)</sup>.

A possibilidade de avaliar lesões mamárias a partir de um escore de diagnóstico é pouco estudada. A revisão da literatura nas bases do PubMed com auxílio do programa Reference Manager 10 e no Lilacs identificou apenas um estudo, que avaliou

um sistema de pontos baseado na heterogeneidade histológica de carcinomas invasores de mama com axila negativa, onde foi estabelecida uma correlação prognóstica. Este estudo demonstrou que a avaliação por um sistema de pontos, baseado em achados histológicos pode ser útil na seleção de pacientes com alto risco que necessitam tratamento complementar. <sup>(10)</sup>.

Neste sentido, a criação de um sistema de pontos considerando diversas características histológicas, tentando identificar diferenças entre as alterações proliferativas mamárias poderia ser muito útil. Esse sistema de pontos auxiliaria o patologista cirúrgico na avaliação rotineira das alterações mamárias proliferativas e contribuiria para minimizar, através da determinação de alguns itens específicos da observação, a grande variação interobservador descrita para estas lesões.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado estudo transversal para análise histológica de lesões mamárias, com a finalidade de implementar um protocolo de avaliação de espécimes de mama através de um sistema de escores, independente dos dados clínicos das pacientes. O fator em estudo, portanto, são as lâminas histológicas de diferentes lesões, utilizando-se como controle, lâminas de mama normal. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com número 03-110.

Em relação aos critérios de inclusão, foi utilizado tecido mamário normal obtido por cirurgia de mamoplastia redutora, selecionando-se uma lâmina com características dentro da normalidade. Também foram incluídas alterações proliferativas da mama: fibroadenoma, hiperplasia ductal típica, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasor.

Não foram incluídos casos de hiperplasia epitelial ductal atípica, posto que esta é uma entidade de diagnóstico controverso, fonte de extensa variabilidade intra e interobservador <sup>(11)</sup>. Foram excluídos casos em que havia material insuficiente em blocos de parafina e ainda quando houve discordância entre o diagnóstico anatomopatológico original e o da revisão prévia à entrada no estudo.

## DEFINIÇÃO DO SISTEMA DE ESCORES

Considerando que os diagnósticos histológicos são feitos com base em diversos critérios, tanto citológicos quanto arquiteturais, foi desenvolvido um sistema de pontos numéricos com o objetivo de criar uma discriminação através de um sistema de pontuação quanto ao padrão histológico de cada alteração mamária estudada. Tais critérios são extensamente descritos na literatura, sendo alguns considerados bastante conclusivos em relação aos respectivos diagnósticos <sup>(1)</sup>.

Foram selecionados 13 critérios microscópicos de avaliação de aspectos normais e anormais da histologia da mama. Esses critérios foram selecionados em dois grandes grupos: um padrão geral, com características avaliáveis em pequeno aumento ao microscópio (até 50X) e, um padrão mais detalhado, resultante da avaliação em grande aumento (200 e 400X). O índice mitótico foi obtido de acordo com as recomendações da literatura, contando-se o número total de mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA) <sup>(12)</sup>.

Inicialmente, as lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) foram avaliadas com o intuito de estabelecer a presença ou ausência de alteração e, após, usando-se um sistema de escore com pontos, pela sua importância no diagnóstico final, foram atribuídos valores numéricos que variaram de 1 a 5. Aos critérios relacionados com alterações menos graves foi atribuído o valor 1, aos de importância intermediária, valores de 2 a 3, e aos mais relevantes para o diagnóstico de malignidade foi atribuída pontuação de 4 a 5. Numa situação especial (a avaliação do grau nuclear) estabeleceu-se um padrão de alteração não avaliável, que recebeu o escore zero. Foi então estabelecido um protocolo de avaliação, que denominamos de sistema de escore, e todas as amostras foram avaliadas com a utilização deste sistema. Com o objetivo de ordenar os escores na tabela e para a uniformização entre as duas observadoras patologistas independentes, acompanhadas pelo autor, tornou-se necessário à definição de cada um deles, conforme descrito a seguir:

### 1 **PADRÃO GERAL DA LÂMINA** (pequeno aumento).

1.1 **ARQUITETURA DUCTAL E LOBULAR-** Verificava-se neste momento a presença ou ausência de alteração na arquitetura do sistema ductal e lobular mamário, sendo a ausência considerada um padrão infiltrativo de neoplasia maligna: Preservada quando o tecido mamário não apresentava alterações diagnósticas (1 PONTO);

Preservada- com proliferação de células dentro dos ductos e sem atipias (2 PONTOS); Preservada- com proliferação celular e com atipias (neste estudo reservado aos CDIS de baixo grau) 3 PONTOS; Preservada- com proliferação celular e atipias graves acompanhadas de microcalcificações e/ou necrose intraductal (neste estudo sugerindo CDIS de alto grau) e sem evidência de invasão da camada basal e estroma na amostra examinada (4 PONTOS); Infiltrativo no estroma mamário, com qualquer tipo histológico de carcinoma invasor, seja sem tipo histológico especial, tubular, apócrino, micropapilar, sólido, células claras, pouco diferenciados, de alto grau e padrões mistos (5 PONTOS).

1.2 **NECROSE**- avaliada rigorosamente nas áreas de lesão, desconsiderando-se as áreas periféricas de necrose gordurosa. A necrose deve ser considerada presente quando houver agrupamentos de células mostrando processo de necrose de coagulação (necrose isquêmica). As células apoptóticas não devem ser avaliadas: Sem necrose- nos casos de lesões benignas e tumores sem necrose (1 PONTO); Com necrose intraductal- e/ou comedonecrose- poderia ser material amorfo eosinofílico, ou com restos de células apoptóticas / degeneradas, preenchendo parcial ou totalmente a luz dos ductos ou lóbulos nos casos de extensão acinar (4 PONTOS); Com necrose tumoral- necrose do tumor propriamente dito, extensa ou em pequenos focos, abrangendo igualmente a necrose isquêmica do estroma (5 PONTOS).

1.3 **INFILTRADO INFLAMATÓRIO**- presença de células inflamatórias crônicas- linfócitos e plasmócitos de permeio a lesão ou em sua periferia.: Ausente- sem infiltrado inflamatório (1 PONTO); Infiltrado inflamatório leve – geralmente na periferia da lesão, no estroma mamário (2 PONTOS); Infiltrado inflamatório intenso – intra ou perilesional, algumas vezes podendo conter neutrófilos esparsos (3 PONTOS)

1.4 **EXTENSÃO LOBULAR OU DUCTAL DA LESÃO**- quando células atípicas ou proliferadas estão presentes em continuidade à lesão em ductos ou ácinos, em sua porção canalicular ou lobular: Ausente- quando não ocorrer essa extensão (1 PONTO); Presente- quando a lesão se estender a ductos ou ácinos vizinhos (3 PONTOS)

1.5 **QUANTIDADE DE DUCTOS/LOBULOS AFETADOS** (no mesmo campo microscópico de pequeno aumento) - para contemplar lesões muito pequenas, ou quando todo o campo microscópico apresentar proliferação com ou sem atipias ou infiltração neoplásica: Ausência de lesão- quando as estruturas todas forem normais (1 PONTO); Poucos, ou até dois ductos- para lesões muito pequenas (2 PONTOS); Mais

de 2 ductos até 30 - valor estipulado para lesões de tamanho intermediário (3 PONTOS); Incontáveis ductos ou lóbulos afetados- para lesões maiores (4 PONTOS).

**2 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS** (grande aumento ao microscópio, objetivas de 40 ou 100 aumentos).

**2.1 FORMA DAS CÉLULAS-** caracterização que distingue lesões benignas de malignas: Monomorfismo geral- todas as células analisadas com padrão idêntico ao normal (1 PONTO); Polimorfismo em poucas células- ductos revestidos por células normais, com algumas apresentando núcleos maiores. Boa relação núcleo citoplasma, com predomínio do citoplasma bem delimitado e núcleos redondos ou ovóides (2 PONTOS); Polimorfismo em muitas células- característico de lesões com proliferação atípica (3 PONTOS); Pleomorfismo e anaplasia- núcleos grandes e irregulares com variação do seu contorno, multinucleação e células muito grandes (5 PONTOS).

**2.2 ASPECTO DOS DUCTOS:** Com duas camadas de células, epiteliais e mioepiteliais, excetuando-se as áreas com cortes seccionados transversalmente (aparente aumento de células não foram considerados aqui) (1 PONTO); Entre 3 e 8 camadas de células- evidenciando-se uma proliferação celular sem atipias (2 PONTOS); Pontes romanas, tufos ou papilas- forma de distribuição de proliferação intraductal (3 PONTOS); Sólido com ou sem necrose- quando o ducto estiver totalmente preenchido por células, com ou sem necrose central (4 PONTOS); Cribriforme- quando o ducto apresentar este aspecto é uma proliferação mais intensa com espaços vazios e/ou pontes intercelulares com mais células (4 PONTOS); Proliferação com formação de túbulos predominante, infiltrando o estroma (5 PONTOS); Proliferação com formação de túbulos moderada, infiltrando o estroma, associada a outras formas de infiltração estromal (5 PONTOS); Sem formação de túbulos- predomínio de lesões muito celulares, com estroma fibroso denso (5 PONTOS); Células tumorais isoladas no estroma- lesão francamente infiltrativa (5 PONTOS)

**2.3 ÍNDICE MITÓTICO POR 10 CAMPOS DE GRANDE AUMENTO (10CGA)-** contado em Microscópio Olympus- Modelo BX41TF, em objetiva de 40 aumentos, criando um campo microscópico de 0,5 mm conforme os critérios do NHSBSP 05 <sup>(12)</sup>: Zero a 7 mitoses /10CGA (1 PONTO); 8 a 14 mitoses / 10CGA (2 PONTOS);  $\geq 15$  mitoses /10 CGA (3 PONTOS).

**2.4 EXPRESSÃO DO ANTIGENO Ki-67-** verificando-se a presença ou ausência de coloração nuclear amarronada pela técnica de imunohistoquímica. Positividade

avaliada em porcentagem de núcleos positivos na maioria dos campos e na periferia dos tumores, quando na presença de lesões malignas examinadas na lâmina: Ausente (0 PONTOS); Até 5% (1 PONTO); Até 10% (2 PONTOS); Até 20% (3 PONTOS); Até 30% (4 PONTOS); Mais de 30% (5 PONTOS).

**2.5 GRAU NUCLEAR DE BLACK-** O grau nuclear refere-se ao padrão de crescimento do tumor e o quão variável está o núcleo da célula em relação às células normais. Os patologistas usualmente graduam com a escala de 1-3 ou 1-4, sendo com os números maiores os de maior gravidade. Quando se aborda somente o grau nuclear estão sendo observados alguns padrões na célula (como tamanho, forma e atividade da célula – refletida pelas mitoses) que combinadas entre si dão um escore geral que é então traduzido para o grau nuclear final. Como ocorre um certo grau de subjetividade na interpretação das células pelos patologistas, muitos preferem usar os graus nucleares descritivos: baixo, intermediário e alto facilitando a interpretação prognóstica para os clínicos: Baixo grau ou 1 (5 PONTOS); Intermediário ou 2 (5 PONTOS); Alto grau ou 3 (5 PONTOS); Não se aplica ou (0) - foi incluído esta opção pois estamos avaliando também lesões benignas que não possuem grau nuclear (0 PONTOS).

**2.6 NUCLÉOLOS:** Ausentes/não visíveis- esta característica ocorre mais frequentemente em células benignas (1 PONTO); Presentes/ inconspícuos – nucléolos menores, não bem definidos (3 PONTOS); Presentes/muitos/grandes/ irregulares ou múltiplos- a própria descrição do critério já especifica as alterações a serem procuradas nos núcleos das células proliferadas e/ou atípicas (4 PONTOS).

**2.7 REAÇÃO ESTROMAL-** demonstra muito o tipo de lesão encontrada ou ausente. Nas neoplasias malignas fazem parte do componente tumoral, nas lesões benignas predomina a proliferação fibrosa; Sem reação- estroma histologicamente sem anormalidades (1 PONTO); Desmoplásico- densa fibrose e hialinização do estroma (3 PONTOS); Fibro-mixóide- com variáveis graus de tecido conjuntivo frouxo, mixóide e variados graus de celularidade (2 PONTOS); Fibrose periductal- proliferação fibrosa ao redor dos ductos (2 PONTOS); Células neoplásicas no estroma- característica do estroma neoplásico maligno (5 PONTOS).

**2.8 MICROCALCIFICAÇÕES:** Achado comum em lesões mamárias neoplásicas, sendo também encontrado em lesões benignas; Presentes (3 PONTOS); Ausentes (2 PONTOS).

## **AMOSTRAS HISTOLÓGICAS**

Lâminas de peças cirúrgicas de ressecção total, segmentar ou de biópsias excisionais de mama em pacientes submetidas à cirurgia no período entre 2002 a 2006 nos Serviços de Mastologia e de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Estas foram selecionadas dos arquivos do Serviço de Patologia do HCPA. Todas as lâminas dos casos selecionados foram reavaliadas para confirmação do diagnóstico inicial e identificação do melhor corte histológico que foi selecionado a fim de realizar as colorações para a análise dos propósitos deste estudo. Todo o material foi observado na coloração de HE e pela técnica imuno-histoquímica com o uso do anticorpo monoclonal anti Ki-67.

Duas patologistas (M.I.E. e L.M.) foram envolvidas na seleção, avaliação e interpretação de todo o material selecionado analisando independentemente e os valores finais referidos para este estudo foram definidos após o consenso diagnóstico entre as observadoras.

Por tratar-se da testagem de um protocolo idealizado para este estudo, definiu-se que o tamanho da amostra seria de 20 lâminas por processo patológico a ser examinado. Cinco classes de diagnóstico foram escolhidas para este fim, totalizando 100 lâminas a serem analisadas por HE e 100 lâminas processadas por imuno-histoquímica com o anticorpo anti-Ki-67. Foram selecionados apenas casos com diagnósticos indiscutíveis de lesões bem definidas, com intenção de verificar se o sistema de escore é útil e factível na rotina dos laboratórios de patologia cirúrgica. Foram selecionados 20 casos de mama normal e 20 casos de cada alteração mamária, conforme critérios já especificados acima.

## **IMUNOHISTOQUÍMICA**

Amostras de tecido mamário fixadas em formalina e emblocadas em parafina foram seccionadas com quatro micrômetros e colocadas em lâminas previamente preparadas com (3-aminopropyl) triethoxy-silane-organosilano (Sigma cód.A3648) para realização da técnica de imunohistoquímica segundo a rotina do Laboratório de patologia do Centro de Pesquisa do HCPA. O método descrito por Mills em 1992<sup>(13)</sup> e Santos e cols<sup>(14)</sup> em 1999 seguiu de acordo com as seguintes etapas: desparafinização e

hidratação, recuperação antigênica com irradiação em forno de microondas 21 minutos em potencia máxima em solução tampão com ácido cítrico, ajustando o pH em 6 com Hidróxido de sódio, bloqueio da peroxidase endógena : as lâminas foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio a 5% e água destilada por 30 minutos, e após em uma solução a 5% de leite desnatado e tampão fosfato (PBS-DAKO), durante 20 minutos em câmara úmida; foram lavadas em água corrente e destilada após colocadas no banho de PBS por 5 minutos. Incubação com o anticorpo primário monoclonal anti Ki-67 (anticorpo monoclonal mouse anti humano Ki-67,clone MIB1 cod M7240-DAKO) na diluição de 1/50, por 60 minutos; lavar com PBS, reação com o kit LSAB – DAKO para Peroxidase após: anticorpo secundário(30 minutos) lavar com PBS 5 minutos e revelação com kit Dab- DAKO até obter coloração amarronada; contracoloração com Hematoxilina de Harris (30 segundos) água corrente e solução de água amoniacal a 2% em água destilada, desidratação em álcool absoluto (2x) xilol e montagem com Balsamo do Canadá. Lâminas de controle positivo para o anticorpo anti Ki-67 em secção de linfonodo e Lâminas de controle negativo, sem o anticorpo primário, foram processadas em conjunto com os grupos em estudo, em cada lote de 50 lâminas. O critério para leitura das lâminas coradas pela imunohistoquímica foi o de negativo, quando não ocorreu reação e positivo, quando havia marcação nuclear de cor marrom em células epiteliais ou em células mitóticas, em porcentagens variadas nos vários campos microscópicos da lâmina em estudo e, nos tumores preferencialmente na periferia das lesões. A coloração em marrom fraco do citoplasma foi considerada não específica e não foi incluída na análise dos positivos. As células apoptóticas não foram consideradas para esta análise.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para avaliação estatística foi utilizado o programa SPSS v.14.0 para análise dos dados, além do programa PEPI versão 3.0.

Foram descritas as variáveis categóricas pela frequência absoluta e pela frequência relativa percentual; as variáveis quantitativas pela média e desvio padrão quando a sua distribuição foi simétrica e pela mediana e amplitude interquartil, quando assimétrica. Foram comparadas as variáveis categóricas entre os grupos pelo teste de Qui quadrado, as variáveis quantitativas com distribuição simétrica pelo teste Anova, seguido do teste de Tukey e aquelas com distribuição assimétrica pelo teste Kruskal

Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, com correção de Finner para múltiplas comparações (realizado no programa PEPI versão 3.0). Foi considerado um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

O valor do escore total de pontos apresentou distribuição simétrica sendo sua média na mama normal de  $14,05 \pm 1,3$ ; no FA e na HDT os valores foram muito semelhantes,  $20,6 \pm 1,7$  e  $20,3 \pm 2,2$  respectivamente. No CDIS o escore foi de  $41,5 \pm 5,6$  enquanto que no CDI foi de  $45,5 \pm 2,9$  pontos. Os resultados do escore de pontos foram analisados pelo teste de Anova. Houve diferença estatística entre quase todos os grupos só não ocorrendo esta diferença entre o escore dos fibroadenomas e das hiperplasias ductais usuais; os demais todos tiveram diferença estatística entre si ( $p < 0,001$ ). A Figura 1 evidencia a nítida diferença de pontos entre a mama normal e o restante dos 4 grupos e, também, a diferença entre as alterações proliferativas benignas (FA e HDT) e os casos de câncer.

A expressão do Ki-67 apresentou distribuição assimétrica, o valor da expressão da sua mediana na mama normal foi de 1% (1 a 3); no fibroadenoma foi de 5% (2,25 a 8); na hiperplasia ductal típica de 5% (3 a 8); no CDIS de 15% (5 a 20) e no CDI de 5% (4,25 a 15). Os valores dessa expressão do Ki-67 foram diferentes estatisticamente entre a mama normal e todas as outras variáveis (FA, HDT, CDIS e CDI); entre o FA e o CDIS e entre a HDT e o CDIS também houve diferenças estatísticas. Não se observou diferença estatística entre os casos de HDT e de CDI. A figura 2 detalha a distribuição dos valores da expressão do Ki-67 em cada grupo.

Em relação à contagem do número total de mitoses em 10 campos de grande aumento (400x), a distribuição foi assimétrica e o valor mediano para a mama normal foi de 1% (1 a 2,75), no FA de 4% (3 a 6), na HDT de 3,5% (2 a 4), no CDIS de 14% (9 a 22) e no CDI de 32% (17,5 a 57,5). O número total de mitoses foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) entre todos os grupos com exceção dos casos de FA e HDT.

Quanto ao índice mitótico (IM) houve diferença estatística pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,001$ ) entre o grupo dos três primeiros (MN, FA, HDT) e os últimos dois grupos (CDIS e CDI). Quase a totalidade do primeiro grupo apresentava IM igual a 1, com a exceção de um caso de HDT que recebeu índice 2. Já no grupo dos carcinomas houve uma distribuição diferente: Dos 20 casos de CDIS, 4 (20%) receberam escore 1;

7 (35%) tiveram escore 2; e 9 (45%) receberam escore 3. No grupo do CDI, 17 (85%) apresentaram IM de 3; 2 (10%) apresentaram índice 2 e 1 (5%) obteve índice igual a 1.

## DISCUSSÃO

O objetivo inicial do trabalho foi alcançado. O escore de pontos mostrou-se válido em nossa casuística, sendo factível, através de uma análise detalhada de critérios histológicos, diferenciar dois grupos distintos: o grupo das lesões proliferativas benignas das malignas. A mama normal foi introduzida na análise para servir como um padrão de base para o escore de pontos que estava sendo desenvolvido. Os resultados da avaliação desse escore de pontos corresponderam à expectativa do grupo. O objetivo era criar um sistema válido para a distinção de alterações proliferativas mamárias através da aplicação sistemática de critérios histológicos selecionados para o auxílio no diagnóstico dessas alterações, demonstrando que entre os grupos específicos existe uma diferença significativa na escala de pontuação. O escore como esperado, na mama normal obteve a menor soma de pontos com média de 14,05 com valor mínimo de 13 e máximo de 17.

Entre os casos de FA e HDT não houve diferença significativa, sendo os escores muito parecidos. As alterações benignas apresentaram uma pontuação menor entre o contingente de critérios analisados, resultando no menor escore apresentado, com pontuação média da HDT de 20,3 com mínimo e máximo de 17 a 25 respectivamente e o FA de 20,6 com mínimo e máximo de 17 a 24 respectivamente. Essa pontuação observada situa bem essas duas alterações na figura 1 apresentado entre a pontuação da mama normal e a das alterações malignas.

A pontuação atribuída nos casos de carcinoma, tanto CDIS quanto CDI foram também maiores conforme o esperado. Houve diferença estatística entre esses dois grupos. Nos casos de carcinoma invasor houve a supressão de dois casos do escore de pontos por problemas atribuídos à técnica de coloração do anticorpo Ki-67. Nesses dois casos houve uma contagem mitótica elevada recebendo IM de 3 e a avaliação do Ki-67 foi de 0 % . Devido a essa discrepância, foram novamente coradas as lâminas confirmando o resultado negativo. Sendo o índice mitótico tão alto com uma avaliação de Ki-67 negativa, os valores dessa avaliação foram censurados para a análise total por tratar-se provavelmente de um problema técnico. Há expressão do Ki-67 em todas as células em mitose, mas sua expressão pode ser negativa no final da mitose no período

da anáfase-telófase <sup>(15)</sup>. Como a avaliação do Ki-67 faz parte integrante do escore de pontos, ficamos sem a avaliação de dois casos no grupo dos carcinomas invasores. Nos casos de CDIS o valor médio do escore de pontos foi de 41,5 com mínimo de 32 e máximo de 48. Já os casos de CDI como esperado obtiveram o maior escore médio com 45,5 com variação de 39 a 49 pontos.

Não encontramos na literatura um escore de pontos semelhante para a avaliação histológica mamária como os estudados nesta pesquisa. Dessa forma, não temos como correlacionar com outros estudos já publicados. Sabemos que todas as tentativas de consenso em Patologia mamária enfocam, como prioridade maior as neoplasias malignas, tendo como exemplo maior os escores de Nottingham <sup>(16)</sup> para o Carcinoma Ductal invasor e o de Van Nuys <sup>(17)</sup> para o Carcinoma in situ, mas estes abordam muitos outros critérios diversos, também relevantes, como macroscopia, tamanho do tumor e limites cirúrgicos. Todos esses fatores são importantes para as lesões malignas ou do carcinoma in situ. Mas nosso trabalho visa auxiliar o patologista cirúrgico no diagnóstico rotineiro de lesões variadas, como as estudadas aqui, fazendo que esse patologista não especialista fique treinado na avaliação detalhada de muitos elementos diagnósticos em patologia mamária.

Foi descrito escore semelhante com objetivo de avaliar com critérios histológicos a apresentação histológica de melanomas cutâneos e avaliando e correlacionando os critérios com lesões benignas, numa tentativa de auxílio ao diagnóstico do patologista <sup>(18)</sup>. Não incluímos na nossa avaliação os casos de hiperplasia ductal atípica devido à discordância diagnóstica que esta apresenta com o CDIS de baixo grau descritos na literatura <sup>(11)</sup>.

A distribuição dos nossos casos de CDIS quanto ao grau nuclear foi homogênea sendo dos 20 casos, 7 de CDIS alto grau, 7 de grau intermediário e 6 de baixo grau. Uma crítica que se pode fazer é que talvez devêssemos ter excluído da avaliação os casos de CDIS de baixo grau e avaliados somente os casos de CDIS de alto grau, já que excluímos do trabalho os casos de HDA pelo motivo de discordâncias interobservadores, porém acreditamos que retirando os casos de baixo grau, estaríamos forçando para cima o escore de pontos do CDIS.

Um dos grandes problemas na patologia mamária é o adequado diagnóstico diferencial da HDA com o CDIS de baixo grau. Uma proposta para a continuação deste estudo é aplicar o escore de pontos em um estudo retrospectivo somente com casos de HDA e CDIS de baixo grau em um número de pacientes elevado, correlacionando o

desfecho clínico destas pacientes visando, de uma maneira sistematizada, diferenciar os dois grupos, já que essa distinção é fundamental para o tipo de tratamento que se seguirá após cada diagnóstico.

Pode-se pensar em estudos futuros na modificação de nosso protocolo com a inclusão de outros fatores na avaliação do escore de pontos para alterações proliferativas como a presença de receptores hormonais de estrogênio. Em estudo prévio foi demonstrado que pacientes que apresentavam HDT com expressão aumentada de RE alfa e de Ki-67 embora não necessariamente em conjunto, poderiam definir um subgrupo de pacientes com HDT com risco aumentado de desenvolver câncer<sup>(19)</sup>.

Como esperado, entre os escores do CDIS e CDI houve diferença significativa, apesar do aspecto da Figura 1, na qual os dois grupos apresentam distribuição visual parecida. A Figura 1 mostra os valores entre mínimo, máxima e média do escore total de pontos ressaltando que as lesões malignas ficaram agrupadas na porção superior do gráfico enquanto que as benignas, conforme esperado na porção inferior, com menores escores.

O resultado da expressão do Ki-67 foi conforme esperado na maioria dos casos. Na mama normal, no FA e na HDT os nossos resultados são semelhantes aos dados da literatura<sup>(19-21)</sup>. Ao contrário de um estudo realizado por Bánkfalvi e colaboradores, que não encontrou diferença significativa entre a mama normal e a HDT na avaliação do Ki-67, nosso estudo demonstrou haver diferença estatística nessa expressão entre esses dois grupos<sup>(7)</sup>.

A expressão do Ki-67 nos casos de CDIS tem grande variação reportada, entre 7,9 a 25,4 % sendo os menores valores atribuídos aos casos de CDIS de baixo grau e os maiores aos de alto grau<sup>(7,22)</sup>. Em nossa análise a expressão do Ki-67 teve mediana de 15% com variação interquartil de 5 a 20 % para os quartís 25 e 75 respectivamente. Sabemos que o grupo de CDIS de nossa análise apresenta uma distribuição homogênea dos graus histológicos, conforme descrito nos resultados, assim o valor da expressão de 15 % corresponde a uma mediana de valor considerando-se o CDIS em geral. O valor do quartil 25 que corresponde à expressão de 5% é atribuído aos casos de baixo grau assim como reportado em outros estudos<sup>(7)</sup> e o valor de 20 % do quartil 75 aos casos de alto grau semelhante também com a literatura<sup>(22)</sup>. Houve diferença estatística entre os valores do Ki-67 no grupo do CDIS e do CDI.

Já ao contrário da literatura revisada, a mediana da expressão do Ki-67 no CDI foi diferente do esperado. Nos casos de CDI a literatura descreve variação grande de

17,7 até 29,7 %<sup>(4,23-25)</sup>, nos nossos casos a expressão mediana foi de 5% com variação de 4,25% a 15% no percentil 25 e 75 respectivamente. Esta diferença nos surpreende visto que a técnica imunohistoquímica empregada sempre acompanhava a realização de controle interno positivo. Não atribuímos essa diferença aos dois casos que foram descartados da avaliação do Ki-67 nem a possíveis variações do Ki-67 devido à influência de fatores clínicos das pacientes visto que existem muitos estudos que descrevem o perfil imunohistoquímico do Ki-67 nos casos de CDI não levando em conta a fase do ciclo menstrual.

Existe poucos dados da variabilidade inter-laboratórios na expressão do Ki-67<sup>(15)</sup>, pode ser que este resultado discrepante tenha relação com isso, mas outros estudos em nosso meio seriam necessários para confirmar ou não nossos achados. Valores de pontos de corte para o Ki-67 não são bem estabelecidos o que dificulta a avaliação entre estudos quando considerado os valores como variável não contínua<sup>(15)</sup>, mas em nosso estudo, consideramos os valores de expressão do Ki-67 como uma variável contínua apesar de não apresentar uma distribuição simétrica.

O número total de mitoses foi significativamente diferente entre todos os casos analisados com exceção do FA e da HDT. Na literatura não se utiliza usualmente o número total de mitoses e sim o índice mitótico. Nós avaliamos o número total, pois ele fazia parte inicialmente do escore de pontos e posteriormente foi substituído pelo índice mitótico. Mantivemos a análise para avaliar sua expressão porque são poucos os estudos na literatura que descrevem o número total de mitoses por dez campos de grande aumento em alterações proliferativas da mama. Escolhemos a avaliação do índice mitótico conforme NHSBSP 05 por apresentar uma boa escala de correlação do número de mitoses pelo tamanho do diâmetro do campo da microscopia<sup>(12)</sup>. Quanto ao índice mitótico, à diferença significativa entre os grupos (MN, FA, HDT) e (CDIS e CDI) corresponderam às expectativas, ou seja, quanto mais proliferativa a alteração, maior a quantidade de mitoses encontradas.

Nosso estudo não visou correlacionar nenhum desfecho clínico nas pacientes com os dados analisados e nem observar as várias alterações moleculares que vem sendo descritas quase que diariamente nas revistas médicas de biologia celular ou molecular. Sabemos que pode haver críticas quanto a isso, visto que a proliferação celular pode ter influência de diversos fatores clínicos e moleculares, mas o objetivo inicial e principal do estudo era desenvolver um projeto com aplicação na prática diária do patologista cirúrgico desse escore de pontos para auxílio no diagnóstico e não uma

primeira avaliação quanto ao seu comportamento na progressão das alterações proliferativas da mama.

Existem estudos que tentaram correlacionar desfecho clínico em pacientes com câncer de mama e a fase do ciclo ovulatório durante o período cirúrgico. Dados contraditórios quanto a isso existem e Zurrída e colaboradores descreveram que ainda não se sabe qual a influência do ciclo menstrual no prognóstico de pacientes tratadas por câncer de mama <sup>(26)</sup>. Esse fato poderá ter importância em pacientes que ovulam, não menopausadas e que não estão utilizando terapia hormonal.

Agora que esse escore está desenvolvido e que ocorreram diferenças entre os grupos, pretendemos desenvolver novos estudos comparando características clínicas dos casos como idade, uso de hormônios, características menstruais entre outros com os dados anatomopatológicos e desfecho clínico associado. Sabemos que para isso precisamos de um bom nível de informatização do acompanhamento das pacientes e dos registros hospitalares, e que o tempo para a obtenção destes resultados é longo. Mas acreditamos ter dado um primeiro passo.

Não foi possível estabelecer pontos de corte para o escore por diagnóstico entre os grupos devido ao pequeno número de casos envolvidos, mas esse não foi o objetivo do estudo mas no futuro com maior número de casos talvez esse objetivo possa ser alcançado.

## **CONCLUSÕES**

Este estudo teve como principal objetivo a criação e a avaliação de um escore de pontos desenvolvido para auxílio no diagnóstico histopatológico de alterações mamárias proliferativas. Como esperado obtivemos sucesso demonstrando diferença entre os grupos analisados, demonstrando que se pode de uma maneira sistemática categorizar pelo menos dois grupos bem distintos de alterações proliferativas mamárias. Existe uma boa distinção histológica entre os processos benignos e malignos, mas entre o grupo das HDA e do CDIS de baixo grau essa distinção nem sempre é tão fácil sendo a subjetividade da avaliação muito elevada.

O escore desenvolvido pode futuramente ajudar nessa diferenciação, sendo necessário novos estudos com o mesmo envolvendo um número mais elevado de casos com essas duas alterações para avaliar a sua aplicabilidade. Nossos resultados devem ser vistos com alguma cautela visto que esse é o primeiro estudo com essa metodologia

e são necessários estudos maiores com associação dos fatores clínicos envolvidos para a avaliação da aplicabilidade do escore principalmente na distinção das hiperplasias atípicas e do CDIS de baixo grau. Talvez a associação de outros marcadores moleculares e biológicos como os receptores de estrogênio, p53, bcl-2 e o HER-2 além do já investigado Ki-67 possam contribuir na avaliação futura do escore.

O escore de pontos ainda não deve ser utilizado para obter o diagnóstico preciso das alterações mamárias, porém esse estudo demonstrou que ele pode ser útil como mais um método de auxílio diagnóstico patológico em patologia da mama. Como em todo método de diagnóstico existem as zonas de transição, onde os valores máximos de uma alteração atingem o limite dos valores mínimos de outra, ocorre uma sobreposição de valores.

Não se sabe com exatidão quais seriam os valores de corte determinantes para cada alteração, sendo necessária a realização de novos estudos, contemplando um número maior de casos e mais patologistas envolvidos, a fim de elucidar os valores observados nesta pesquisa.

## **AGRADECIMENTO**

Este estudo teve apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS e do FIPE-HCPA

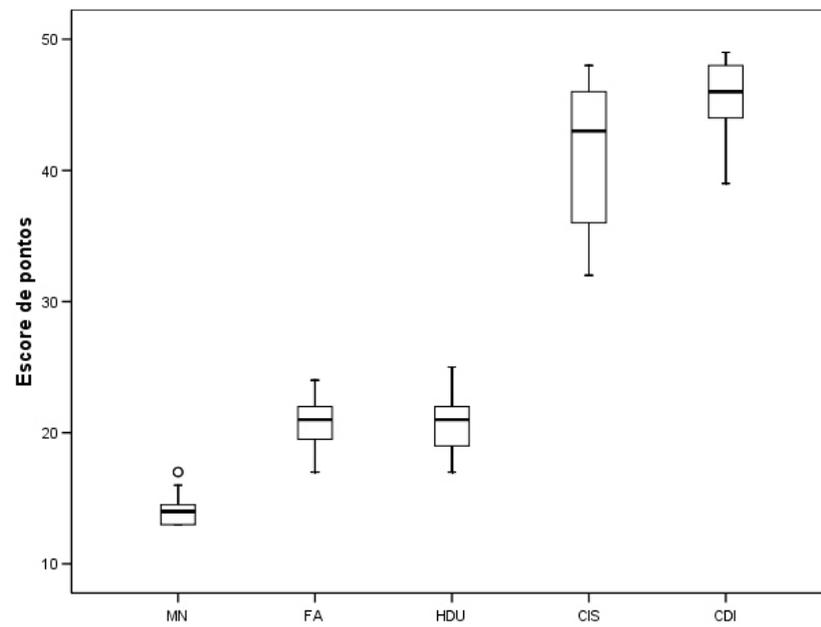
## **REFERÊNCIAS**

1. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs / World health organization classification of tumours. iarc press; 2003.
2. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol 1992;45:416-9.

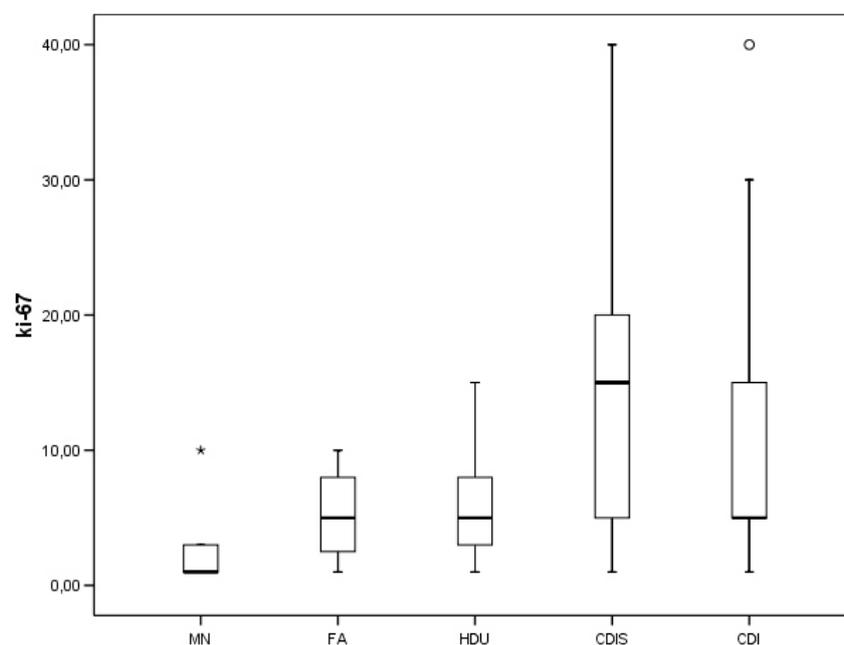
3. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyuridine labeling index and Ki-67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;49:155-64.
4. Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:113-23.
5. Brown DC, Gatter KC. Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2-11.
6. Bocker W, Moll R, Poremba C, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 2002;82:737-46.
7. Bankfalvi A, Ludwig A, De Hesselde B, et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 2004;17:1051-61.
8. Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* 2006;8:211.
9. Page DL, Anderson TJ. *Diagnostic Histopathology of the Breast*. Churchill Livingstone; 1988.
10. Kurosumi M, Tabei T, Inoue K, et al. Prognostic significance of scoring system based on histological heterogeneity of invasive ductal carcinoma for node-negative breast cancer patients. *Oncol Rep* 2003;10:833-7.
11. Ghofrani M, Tapia B, Tavassoli FA. Discrepancies in the diagnosis of intraductal proliferative lesions of the breast and its management implications: results of a multinational survey. *Virchows Arch* 2006;449:609-16.
12. NHS Cancer Screening Programmes. *PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE*. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005.

13. Mills B. Immunohistochemistry. In: Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology ( Washington) ; 1992.
14. Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização in situ. Manual de Imuno-histoquímica ed. Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J; 1999.
15. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
16. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer* 2007.
17. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1996;77:2267-74.
18. Veronese LA, Corrente J.E., Marques MEA. Melanoma Maligno cutâneo: sistema de pontos (scoring system) para auxílio no diagnóstico histopatológico. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:375-83.
19. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 2002;160:597-604.
20. Dessauvagie BF, Zhao W, Heel-Miller KA, Harvey J, Bentel JM. Characterization of columnar cell lesions of the breast: immunophenotypic analysis of columnar alteration of lobules with prominent apical snouts and secretions. *Hum Pathol* 2007;38:284-92.
21. Silverman JS, Tamsen A. Mammary fibroadenoma and some phyllodes tumour stroma are composed of CD34+ fibroblasts and factor XIIIa+ dendrophages. *Histopathology* 1996;29:411-9.
22. Noel JC, Fayt I, Fernandez-Aguilar S, Buxant F, Boutemy R. Proliferating activity in columnar cell lesions of the breast. *Virchows Arch* 2006;449:617-21.

23. El All HA, Ismail E, Abbas M, Ouf K. MIB-1 index, S-phase fraction, mitotic figure count, and SBR histologic grading in invasive breast carcinoma: a comparative study. *Breast J* 2001;7:106-10.
24. Pohl G, Rudas M, Taucher S, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78:97-103.
25. Benini E, Rao S, Daidone MG, Pilotti S, Silvestrini R. Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif* 1997;30:107-15.
26. Zurrada S, Galimberti V, Gibelli B, et al. Timing of breast cancer surgery in relation to the menstrual cycle: an update of developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;38:223-30.

**Figura 1**

**Figura 1:** Escore Total de Pontos e Histologia estudada em 100 casos. (MN- mama normal, FA- fibroadenoma, HDT- hiperplasia ductal típica, CDIS- carcinoma ductal in situ e CI- carcinoma ductal invasor

**Figura 2**

**Figura 2** : Distribuição dos valores do Ki-67 em porcentagem nos 100 casos estudados (MN- mama normal, FA- fibroadenoma, HDU- hiperplasia ductal típica, CDIS- carcinoma ductal in situ e CDI- carcinoma ductal invasor)

## ANEXO

## PROTOCOLO GERAL DO ESCORE DE PONTOS

<b>1- PADRÃO GERAL (pequeno aumento)</b>	
<b>1.1- ARQUITETURA DUCTAL E LOBULAR</b>	
A- PRESERVADA	1
B- PRESERVADA: PROLIFERAÇÃO E SEM ATIPIAS	2
C- PRESERVADA: PROLIFERAÇÃO E COM ATIPIAS	3
D- PRESERVADA: PROLIFERAÇÃO E ATIPIAS GRAVES com microcalcificações E / OU necrose	4
E- INFILTRATIVO NO ESTROMA	5
<b>1.2- NECROSE</b>	
A- SEM NECROSE	1
B- COM NECROSE INTRADUCTAL – COMEDONECROSE	4
C- COM NECROSE TUMORAL	5
<b>1.3- INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>	
A- AUSENTE	1
B- LEVE	2
C INTENSO	3
<b>1.4- EXTENSÃO LOBULAR OU DUCTAL DA LESÃO</b>	
A- AUSENTE	1
B- PRESENTE	3
<b>1.5- QUANTIDADE DE DUCTOS/LOBULOS AFETADOS (no mesmo campo)</b>	
A- AUSENCIA DE LESÃO	1
B- POUCOS :ATÉ 2 DUCTOS	2
C- MAIS DE 2 DUCTOS ATÉ 30	3
D-INCONTÁVEIS	4
<b>2- CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS (grande aumento)</b>	
<b>2.1- FORMA DAS CÉLULAS</b>	
A- MONOMORFISMO GERAL	1
B- POLIMORFISMO EM POUCAS CELULAS	2
C- POLIMORFISMO EM MUITAS CELULAS	3
D- PLEOMORFISMO E ANAPLASIA	5
<b>2.2- ASPECTO DOS DUCTOS</b>	
A- DUAS CAMADAS DE CELULAS	1
B- ENTRE 3-8 CAMADAS	2
C- PONTES ROMANAS, TUFOS OU PAPILAS	3
D- SOLIDO com ou sem necrose	4
E- CRIBRIFORME	4
F- PROLIF C FORM. DE TUBULOS PREDOMINANTE	5
G-PROLIF C FORM. DE TUBULOS MODERADA	5
H- SEM FORMAÇÃO DE TUBULOS	5
I- CELULAS TUMORAIS ISOLADAS NO ESTROMA	5

<b>2.3- INDICE MITOTICO 10 CGA</b>	
A- 0 a 7	1
B- 8 a 14	2
C- $\geq 15$	3
<b>2.4-EXPRESSÃO KI-67</b>	
A- AUSENTE	0
B- ATÉ 5 %	1
C- ATÉ 10%	2
D- ATÉ 20%	3
E- ATÉ 30%	4
F- MAIS DE 30%	5
<b>2.5- GRAU NUCLEAR DE BLACK</b>	
A- BAIXO GRAU OU 1	5
B- MODERADO OU 2	5
C- ALTO OU 3	5
D- NÃO SE APLICA	0
<b>2.6-NUCLEOLOS</b>	
A- AUSENTES/NÃO VISIVEIS	1
B- PRESENTES/ INCONSPÍCUOS	3
C- PRESENTES/ MUITOS, GRANDES IRREGULARES OU MÚLTIPLOS	4
<b>2.7- REAÇÃO ESTROMAL</b>	
A- SEM REAÇÃO	1
B- DESMOPLASICO	3
C- FIBRO-MIXÓIDE	2
D- FIBROSE PERIDUCTAL	2
E- CELULAS NEOPLASICAS NO ESTROMA	5
<b>2.8- MICROCALCIFICAÇÕES</b>	
A- PRESENTES	3
B- AUSENTES	2