



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafael Bispo Paschoalini

**CRITÉRIOS CITOLÓGICOS ASSOCIADOS AO FENÓTIPO
LUMINAL DO CARCINOMA DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rozany Mucha Duffloth

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt

Botucatu

2016

Rafael Bispo Paschoalini

**CRITÉRIOS CITOLÓGICOS ASSOCIADOS AO
FENÓTIPO LUMINAL DO CARCINOMA DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paschoalini, Rafael Bispo.

Critérios citológicos associados ao fenótipo luminal do carcinoma de mama / Rafael Bispo Paschoalini. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rozany Mucha Dufloth

Coorientador: Fernando Carlos de Landèr Schmitt

Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer. 2. Mamas - Citopatologia. 3. Diagnostico citológico. 4. Biopsia por agulhas.

Palavras-chave: Carcinoma de mama; Citopatologia da mama; Critérios citológicos; Fenótipo luminal; Punção aspirativa por agulha fina.

Dedicatória

Aos meus pais, Rodolfo e Valéria, e meu irmão, Lucas, por todo o amor e carinho que motivaram a perseverança rumo a esta realização.

Aos meus avós Benito e Marylena, pelo incentivo constante.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth por toda a atenção e paciência, pelo entusiasmo e encorajamento.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt pelo voto de confiança na realização deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Alves Moraes Neto pela oportunidade de desenvolver este trabalho em cooperação.

A toda a equipe de amigos, docentes e funcionários do Departamento de Patologia e do Programa de Pós-graduação da UNESP.

“E o senhor tirava os óculos e punha-os em Miguilim, com todo o jeito.

Olha agora!

Miguilim olhou. Nem podia acreditar! Tudo era uma claridade, tudo novo e lindo e diferente, as coisas, as árvores, as caras das pessoas.

Via grãozinhos de areia, a pele da terra, as pedrinhas menores, as formiguinhas passeando no chão de uma distância.

E tonteava. Aqui, ali, meu Deus, tanta coisa (...).

Coração batia descompassado.”

João Guimarães Rosa - *in* Campo Geral, Manuelzão e Miguilim.

INTRODUÇÃO: O carcinoma de mama é uma doença heterogênea. Pode ser classificado em fenótipos, com diferentes prognósticos, com base na expressão de determinadas proteínas. O fenótipo luminal é o mais frequente, correspondendo a cerca de 70% dos casos, sendo que tratamentos específicos para este fenótipo de carcinoma de mama já estão em estudo, com melhora promissora do prognóstico das pacientes acometidas. Entretanto, ainda não foram definidos critérios citológicos que pudessem prever este fenótipo no material obtido pela punção aspirativa por agulha fina (PAAF). **OBJETIVO:** Investigar critérios citológicos individuais presentes na PAAF que possam se associar com o diagnóstico do fenótipo luminal do carcinoma de mama. **MÉTODOS:** Trata-se de estudo tipo corte-transversal, com componente descritivo e comparativo. As lâminas de PAAF e espécimes de carcinomas de mama invasivos ductais e lobulares, do período de 2000 a 2005, foram selecionados do arquivo do Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú/São Paulo, totalizando 297 casos. Dos blocos doadores foram extraídos cilindros de 2mm de diâmetro e depositados nos blocos de parafina receptores, usando *Tissue Microarrays* (Bencher Instruments®, Silver Spring, Maryland). Nestes cortes, foi feita a pesquisa imunoistoquímica para diferenciação dos fenótipos do carcinoma de mama, segundo a Classificação Molecular. As lâminas obtidas por PAAF, foram revisadas em microscópio de multiobservação (BX50 Olympus®, Japan), por dois médicos patologistas (RMD e FMN), sendo estudados individualmente os cinco critérios citológicos: celularidade, coesão celular, necrose, nucléolo e atipia nuclear. Utilizou-se o teste exato de Fisher para testar a associação entre os critérios citológicos e os fenótipos do carcinoma de mama.

RESULTADOS: Dos 297 casos selecionados, 169 foram incluídos, resultando nos seguintes fenótipos - luminal A: 107 (63.3%), luminal B: 39 (23.1%), superexpressão de HER2: 8 (4.7%), e triplo negativo: 15 (8.9%). Os critérios citológicos que se associaram ao fenótipo luminal foram: celularidade baixa ou moderada (40.4%) (OR = 7.12, IC95%: 1.61 - 31.52), nucléolo inconspícuo ou presente (55.5%) (OR = 8.31, IC95%: 2.36 - 29.19) e atipia nuclear discreta ou moderada (44.5%) (OR = 8.42, IC95%: 1.90 - 37.25). Os critérios citológicos associados ao fenótipo luminal A foram: nucléolo inconspícuo ou presente (62.6%) (OR = 2.99, IC95%: 1.39 - 6.41), menor perda de coesão celular (OR = 0.46, IC95%: 0.24 - 0.88), mostrando grupamentos com coesão celular moderada a intensa, e ausência de necrose (40.2%) (OR = 0.32, IC95%: 0.15 - 0.68). CONCLUSÃO: Os critérios citológicos presentes nas lâminas obtidas por PAAF, e que mais se associaram ao fenótipo luminal do carcinoma de mama foram celularidade baixa e moderada, nucléolos inconspícuos ou pequenos e atipia nuclear leve a moderada. Cabe destacar, que para o fenótipo luminal A, os critérios citológicos que mais se associaram foram: nucléolos inconspícuos ou pequenos, coesão celular moderada a intensa e ausência de necrose. A distinção do fenótipo luminal é de relevância clínica, por apresentar melhor prognóstico, relacionado a menor mortalidade e menores taxas de metástase.

Abstract

BACKGROUND: Breast carcinoma is a heterogeneous disease. It can be classified into phenotypes based on the expression of certain proteins, with differences in prognosis. The luminal phenotype is the most common, accounting for about 70% of cases. Some specific treatments for this phenotype of breast carcinoma are already being studied, which could improve prognosis of affected patients. However, there is currently no consensus on which cytological criteria could predict the luminal phenotype. **OBJECTIVE:** To evaluate which cytological criteria in fine-needle aspiration (FNA) biopsy are related with the luminal phenotype of breast carcinoma. **METHODS:** This was a cross-sectional study with descriptive and comparative component from cases of breast carcinomas, from the Laboratory of Pathology, Hospital Amaral Carvalho de Jaú / São Paulo. FNA biopsy specimens and tissue sections (mastectomy specimens) of invasive ductal and lobular carcinomas of the breast, retrieved from 2000 to 2005, were selected and classified into phenotypes by immunohistochemistry, using tissue microarray technology (Bencher Instruments®, Silver Spring, Maryland): luminal A and B, HER2 overexpression and triple negative. The cytological criteria for all cases were reviewed blindly by two pathologists using a multiobserver microscope (BX50 Olympus®, Japan), according to five cytological criteria: cellularity, cell cohesion, necrosis, nucleoli and nuclear atypia. Exact Fisher test was used to test the association between cytological criteria and phenotypes of breast carcinoma. **RESULTS:** From 297 selected patients, 169 were included, resulting in the following phenotypes - luminal A: 107 (63.3%), luminal B: 39 (23.1%), HER2 overexpression: 8 (4.7%), and triple negative: 15 (8.9%). The luminal phenotype showed mild or moderate cellularity (40.4%) (OR = 7.12, 95% CI: 1.61 -

31.52), inconspicuous or present nucleoli (55.5%) (OR = 8.31, 95% CI: 2.36 - 29.19) and mild or moderate nuclear atypia (44.5%) (OR = 8.42, 95% CI: 1.90 - 37.25). Inconspicuous or present nucleoli (62.6%) (OR = 2.99, 95% CI: 1.39 - 6.41), less dishesive cells (OR = 0.46, 95% CI: 0.24 - 0.88), showing clusters with moderate to intense cell cohesion (54.2%), and absence of necrosis (40.2%) (OR = 0.32, 95% CI: 0.15 - 0.68) were associated with luminal A phenotype. CONCLUSION: The individual FNA cytological criteria that might indicate the luminal phenotype of breast cancer were mild to moderate cellularity, inconspicuous or little nucleoli and mild to moderate nuclear atypia. Inconspicuous or little nucleoli, moderate to intense cell cohesion and absence of necrosis were associated with luminal A phenotype. The distinction of luminal phenotype of breast carcinoma is clinically relevant, since it has better prognosis, related to lower mortality and lower metastases rate.

Lista de Abreviaturas

ACS	<i>American Cancer Society</i>
CGAN	<i>Cancer Genome Atlas Network</i>
c-DNA	DNA complementar
CK	Citoqueratina
FNA	<i>Fine needle aspiration</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HER2	<i>Human Epithelial Receptor 2</i>
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OR	<i>Odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista

Sumário

Folha de rosto	2
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	9
Lista de abreviaturas	11
CAPÍTULO I – Revisão da Literatura	13
1. Introdução	14
2. Referências bibliográficas	22
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Métodos	31
4.1. Tipo de estudo	31
4.2. Seleção dos sujeitos	31
4.2.1. Critérios de inclusão	31
4.2.2. Critérios de exclusão	31
4.3. Variáveis em estudo	32
4.3.1. Variáveis independentes	32
4.3.2. Variáveis dependentes	32
4.4. Coleta de dados	35
4.5. Processamento de dados	35
4.5.1. Critérios citológicos	35
4.5.2. Técnica <i>Tissue Microarray</i> (TMA)	36
4.5.3. Técnica Imunoistoquímica (IHQ)	37
4.5.4 Técnica de Hibridização (FISH)	40
4.6. Análise estatística	41
4.7. Aspectos éticos	41
CAPÍTULO II – Artigo científico	42
CAPÍTULO III – Conclusão	55
5. Conclusão	56
ANEXOS	57

CAPÍTULO I – Revisão da Literatura

1. Introdução

O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres de todos os grupos étnicos, excetuando-se os tumores de pele não-melanoma, representando cerca de 25% do total de casos de câncer no mundo (aproximadamente 1,4 milhão de casos novos). Em 2015, foram estimados 231.840 casos novos da neoplasia nos Estados Unidos (ACS, 2015). No Brasil, dados de 2015 indicam mais de 57.120 casos novos, com uma taxa de incidência de 56,06 casos por 100.000 mulheres, sendo, ainda, a neoplasia mais incidente em mulheres de todas as regiões (exceto na região Norte, onde o câncer do colo uterino permanece o mais frequente), e a principal causa de morte por câncer em mulheres no país (15,7% do total de óbitos), estando em quinto lugar na mortalidade geral por câncer, com 458.000 óbitos (INCA, 2015; INCA 2013).

As taxas de mortalidade do carcinoma de mama apresentaram decréscimo entre 2007 e 2011, com queda de 3,2% ao ano em mulheres brancas e 2,4% ao ano em mulheres negras, abaixo dos 50 anos; nas de 50 anos ou mais o decréscimo foi de 1,8% ao ano nas mulheres brancas e 1,1% ao ano em mulheres negras (Kohler et al., 2015). A redução da mortalidade se atribui, sobretudo, às melhorias na detecção precoce, ao tratamento efetivo e à redução na incidência, associados ao declínio do uso de terapias de reposição hormonal na menopausa. Ainda assim, foram estimadas 40.290 mortes pelo carcinoma de mama em mulheres nos Estados Unidos em 2015 (ACS, 2015). No Brasil, esse número foi de 14.207 mortes (INCA, 2015).

No intuito de reduzir a mortalidade por esta neoplasia, que ainda permanece alta, há grande interesse dos pesquisadores em se caracterizar melhor o carcinoma de mama, a fim de prever seu comportamento biológico, assegurar um tratamento mais adequado e melhorar o prognóstico das pacientes.

Tendo em vista a grande heterogeneidade dos casos de carcinoma de mama, sobretudo em relação aos variados desfechos clínicos, buscou-se estudar extensamente o perfil de expressão gênica (Naderi et al. 2007; Sotiriou et al., 2006; Sørliie et al., 2003; Van't Veer et al., 2002; Sørliie et al. 2001; Perou et al., 2000) de forma a identificar uma assinatura molecular para cada tipo de tumor. Neste

contexto, cabe destacar o trabalho do grupo de Stanford, o qual demonstrou que a diversidade fenotípica dos carcinomas de mama foi acompanhada por uma correspondente diversidade na expressão gênica (Sørli et al., 2003; Sørli et al., 2001; Perou et al., 2000).

A classificação dos carcinomas de mama em fenótipos moleculares pode prever a forma de resposta a agentes terapêuticos específicos, sendo importante diferenciá-los o mais precocemente possível. Dentro deste contexto, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), associada aos exames clínicos e de imagem, é um método diagnóstico amplamente aceito, tanto em estudos clínicos, quanto na rotina diagnóstica, possibilitando o diagnóstico precoce do carcinoma de mama em cerca de 80% dos casos (Kocjan et al., 2008; Koss, 2003; Koss, 1993).

Na era da medicina personalizada, os espécimes citopatológicos ganharam importância por permitirem a realização de inúmeros testes moleculares, viabilizados, sobretudo, pela adequada preservação e pureza das amostras. Citam-se, entre outras, as técnicas de extração de DNA, sequenciamento de nova geração, estudos proteômicos, reação em cadeia da polimerase e hibridização *in situ* (Gailey et al., 2015; Wei et al., 2015; Knoepf et al., 2013). A inclusão em parafina (*cell block*) do material obtido pela punção aspirativa possibilita a realização de imunocitoquímica e, portanto, a caracterização fenotípica do carcinoma de mama. Destarte, a confecção do *cell block* é prática de rotina, cujo potencial intrínseco de reunir um conjunto de informações diagnósticas, preditivas e prognósticas em cada caso, está relacionado, sobretudo, à experiência do citopatologista, evitando procedimentos diagnósticos adicionais (Collins et al., 2015; Jain et al., 2014).

É bem conhecido que para a investigação inicial de lesões mamárias suspeitas de malignidade, pelo exame físico ou por exames de imagem, existem diversas modalidades diagnósticas que podem ser utilizadas. A rigor, a seleção do método de abordagem de biópsia dependerá das circunstâncias clínicas, dos achados nos exames de imagem, da habilidade do operador do exame e da confiança do médico em realizá-lo (Karimzadeh et al., 2008), sendo que os principais métodos diagnósticos utilizados são: punção aspirativa por agulha fina (PAAF), biópsia percutânea e biópsia cirúrgica aberta (excisional ou incisional) (Chaiwun et al., 2007; Stanley et al., 2000).

Desde sua introdução por Martin e Ellis em 1930 (Martin et al., 1930), a PAAF tem sido método utilizado para a obtenção de amostras para o diagnóstico citológico

em vários órgãos, sendo procedimento de rotina para a avaliação de lesões mamárias. Na maioria das Instituições, a PAAF tem sido o método inicial para a investigação de anormalidades diagnosticadas pela mamografia (Kocjan et al., 2006).

Dentre as vantagens da PAAF, podemos citar que se trata de método diagnóstico rápido, de baixo custo - por não requerer anestesia e internação hospitalar - e envolve menor morbidade, por menores riscos pós-procedimento (Zagorianakou et al., 2005; Layfield et al., 1993). Quando guiada por ultrassonografia, os estudos mostram sensibilidade em torno de 90% e especificidade em torno de 100% em relação à PAAF não guiada por imagem (Kamphausen et al., 2003; Arisio et al., 1998). Ainda vale destacar, segundo alguns estudos, que quando a leitura da lâmina é realizada por citopatologista experiente, obtém-se melhor acurácia diagnóstica, com sensibilidade variando entre 60 a 93% e especificidade em torno de 100% (Karimzadeh et al., 2008; Arisio et al., 1998; Eisenberg et al., 1986).

Quanto aos critérios citológicos diagnósticos de carcinoma de mama nos esfregaços obtidos pela PAAF, pelo menos três devem estar presentes: acentuada celularidade, dissociação celular e atipia. A maioria dos carcinomas apresenta abundante população de células neoplásicas, predominantemente dispersas e isoladas. Podem também se apresentar em agregados celulares tridimensionais com maior coesão celular, em menor número de casos, com menor grau de dissociação celular. A atipia citológica, por sua vez, consiste de um ou mais dos seguintes critérios: alta relação núcleo/citoplasma, aumento do tamanho do núcleo, pleomorfismo, anisocariose, cromatina grosseiramente granular, hipercromasia, nucléolos conspícuos, irregulares ou múltiplos (Bibbo, et al. 2008; DeMay, 2007; Koss et al., 2006).

Citologicamente, o carcinoma ductal invasivo apresenta como características esfregaços, na maioria das vezes, com acentuada celularidade, seja com células dispostas isoladamente ou em agregados tridimensionais, grupamentos sinciciais e ocasionais arranjos glandulares-*símile*, com atipia evidente quando de alto grau nuclear, o que não ocorre nos de baixo grau nuclear. Portanto, o diagnóstico dos carcinomas de mama de alto grau nuclear nos esfregaços obtidos pela PAAF tem melhor acurácia e concordância entre os citopatologistas (Lakhani et al., 2012; Bibbo et al., 2008).

Por outro lado, o carcinoma lobular invasivo, particularmente o do tipo clássico, apresenta relatos de dificuldade diagnóstica, mostrando esfregaços com baixa celularidade, células pequenas com núcleos de tamanho reduzido e relativamente uniformes, grupamentos de células sem pleomorfismo evidente e que podem ser interpretados como sendo de lesão benigna (Dufloth et al., 2015; Lakhani et al., 2012; Koss et al., 2006; Hwang et al. 2004; Tan et al. 2002). Ademais, é conhecido que há tendência de as células formarem pequenas filas - as “filas indianas” - com núcleos caracteristicamente bem pequenos, sendo este critério citológico uma pista bastante útil para este diagnóstico (Kocjan et al., 2008; DeMay, 2007). Porém, nem sempre este critério citológico está presente. Outros critérios citológicos referidos para o núcleo são a irregularidade da membrana nuclear e a presença de fendas ou sulcos. Ocasionalmente, pode ser visto lúmen intracitoplasmático com aspecto de alvo e células com aspecto de anel de sinete (Lakhani et al., 2012).

Neste contexto, fica evidente que os esfregaços citológicos obtidos pela PAAF apresentam menor acuidade no diagnóstico citológico de carcinoma lobular do que no caso de carcinoma ductal (Shabb et al., 2013).

Importa salientar que o planejamento terapêutico é realizado no pré-operatório e considera os resultados obtidos da PAAF, sendo relevante reunir o máximo de informações dos espécimes citológicos, uma vez que o tipo histológico, o grau tumoral, o *status* de receptor hormonal e a taxa de proliferação celular, que são indicadores prognósticos, podem ser avaliados por este método. Em relação ao *status* hormonal, os estudos mostram que a concordância diagnóstica varia de 80% a 90% entre o espécime cirúrgico e a amostra obtida pela PAAF. Já o índice de proliferação estimado pelo Ki67 apresenta valor prognóstico significativo e independente de fatores como a presença de invasão axilar, *status* hormonal e tamanho do tumor, e pode ser avaliado também em amostras citológicas (Marinšec et al. 2013; Jayaram et al., 2005; Löfgren et al., 2003; Billgren et al., 2002).

Atualmente, os estudos genômicos a partir de técnicas de cDNA *microarray* realizadas em material obtido por PAAF, permitem desde a identificação de pacientes de alto risco para o desenvolvimento de carcinoma de mama até a caracterização tumoral e predição de resposta da doença ao tratamento, de forma a avaliar a sensibilidade aos quimioterápicos (Schmitt et al., 2012; DiLorito et al., 2011; Tabchy et al., 2010; Schmitt et al., 2007).

Ao encontro dos avanços do conhecimento da biologia molecular do carcinoma de mama, uma notável contribuição para a pesquisa translacional foi a caracterização de diferentes perfis de expressão gênica do carcinoma de mama em estudo realizado por Perou e equipe e que utilizou uma plataforma de 8.100 genes em cerca de 65 amostras, pertencentes a 42 pacientes (Perou et al., 2000).

O primeiro nível de classificação separou carcinomas negativos para os receptores de estrogênio (RE -) e carcinomas positivos para a expressão deste receptor (RE +). Posteriormente, os carcinomas de mama foram classificados em cinco fenótipos moleculares distintos: luminal A (RE + e *Human epithelial receptor 2* [HER2] -), luminal B (RE + e HER2 +), basal (RE -, HER2 - e citoqueratinas [CKs] 5/6 + e CK17+), superexpressão de HER2 (RE - e HER2 +) e *normal breast-like* (Sørli et al., 2001).

O extenso conhecimento obtido com os estudos de perfis de expressão gênica do carcinoma de mama, ao longo dos últimos 15 anos, permitiu a configuração da classificação de fenótipos moleculares, baseada em escores semi-quantitativos de marcadores imunoistoquímicos, sendo então incluídos o índice de proliferação celular, expresso pelo Ki67 e a expressão de receptor de progesterona (RP) como critérios de classificação auxiliares (Aleksandarany et al. 2012; Goldhirsch et al., 2011; Callagy et al. 2003;).

A classificação do carcinoma de mama baseada na 12th *St Gallen International Breast Cancer Conference*, em 2011, recebeu destaque por definir a classificação dos seguintes fenótipos do carcinoma de mama: luminal A (RE + e/ou RP+, Ki67 baixo e HER2-), luminal B (RE + e/ou RP+, Ki67 alto e/ou HER2+), superexpressão de HER2 (RE-, RP- e HER2+) e triplo negativo (RE-, RP-, HER2-) (Goldhirsch et al., 2011).

Nas conferências seguintes, com o interesse crescente em melhor caracterizar os fenótipos luminais A e B, tanto os limiares do índice de proliferação celular, quanto de positividade do receptor de progesterona foram revistos. Até então, o valor utilizado como *cut-off* para o Ki67, baseado em estudos de revisão, era de 14% na definição dos tumores com baixo ou alto índice de proliferação. Atualmente, vem sendo aceito Ki67 de 20% como limiar entre baixo e alto índice de proliferação celular (Petrelli et al. 2015; Sato et al., 2014). Foram categorizados, ainda, os termos clinicopatológicos 'luminal A-like' e 'luminal B-like', correspondentes aos fenótipos moleculares luminal A e luminal B, respectivamente (Maisonneuve et

al., 2014).

O consenso da 14th *St Gallen International Breast Cancer Conference*, de 2015, considera que entre os carcinomas de mama com receptores hormonais positivos - os fenótipos luminal A e luminal B - representam aproximadamente 60% a 70% dos carcinomas de mama (Coates et al., 2015; Esposito et al., 2015).

Através da classificação de *St Gallen* e apoiados por publicação da *Cancer Genome Atlas Network* os carcinomas do fenótipo luminal receberam destaque por serem os mais heterogêneos em termos de expressão gênica, espectro de mutação e de alterações no número de cópias gênicas, e portanto, com prognóstico clínico variável (CGAN, 2012).

O fenótipo luminal A foi caracterizado pela alta expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais, por exemplo, as citoqueratinas (CK) CK7, CK8, CK18 e CK19. Este fenótipo está associado a menor grau histológico, menor índice de proliferação celular e assinatura genética de melhor prognóstico, com resposta, em geral, satisfatória à terapêutica com antiestrogênicos, uma vez que possui alta sensibilidade endócrina (CGAN, 2012; Blows et al., 2010).

O fenótipo luminal B foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como CK7, CK8, CK18 e CK19, além de menor expressão de receptores de progesterona, alto índice de proliferação celular e maior grau histológico. Este fenótipo está associado a pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral por apresentar possíveis semelhanças com os tumores RE - (fenótipos superexpressão de HER2 e triplo negativo), sendo recomendada a realização de quimioterapia, além da terapia endócrina (CGAN, 2012; Cheang et al., 2009).

A distinção dos fenótipos luminais no contexto clínico vem apresentando maior relevância. Em termos de risco clínico, foi identificada sua associação com elevado índice de massa corpórea e fatores reprodutivos nas pacientes com carcinoma de mama RE + (Xiaohong R et al., 2010). O estudo dos métodos de imagem também pode apresentar utilidade na distinção do fenótipo luminal (Zhang et al., 2015; Pessoa, 2014). Tais avanços são diretamente relacionados ao entendimento crescente em relação ao comportamento biológico diverso, associados a fatores prognósticos e preditivos dos carcinomas luminais (Aleksandarany et al. 2012; CGAN, 2012; Lowery et al. 2012).

A distinção entre os fenótipos luminal A e luminal B também apresenta

relevância. Os carcinomas de mama de fenótipo luminal B não apresentam expressão correspondente de genes regulados pelo estrogênio, de modo que podem estar associados a vias alternativas de crescimento (Geyer et al. 2012; Creighton, 2012). Em nível molecular, são extremamente distintos dos carcinomas de fenótipo luminal A, em termos de expressão gênica, número de cópias de genes, mutações somáticas e metilação do DNA (CGAN, 2012). Sabe-se que os carcinomas de fenótipo luminal B apresentam maior amplitude de alterações genéticas e genômicas do que aquelas do fenótipo luminal A, o que tem sido motivo de extensas pesquisas (Bartsch et al., 2013).

Com relação ao estudo de terapias-alvo, há diversos quimioterápicos para o fenótipo luminal. Sobretudo em relação ao fenótipo B, são descritas alterações de vias de inibição de *phosphoinositide 3-kinase / mammalian target of rapamycin* (PI3K/mTOR), *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) e *cyclin dependent kinase 4/6* (CDK4/6) (Bartsch et al., 2013). Alguns destes agentes estão em fase I e II de estudos, como o TKI235 - Dovitinib, inibidor de FGFR - em casos de progressão de carcinomas de mama com receptores RE +. O Everolimus é um inibidor oral do mTOR já aprovado, em combinação com o Exemestano, para o tratamento de casos de carcinoma de mama metastáticos, RE + e refratários a outras terapias (Esposito et al, 2015; Creighton, 2012; Baselga et al. 2012).

Foi descrito associação do fenótipo luminal com o subtipo histológico lobular do carcinoma de mama (Ciriello et al., 2015). Em uma série de 817 casos, contendo 127 carcinomas lobulares invasivos, demonstrou-se que estes tumores, além da perda de expressão da E-caderina, apresentavam, ainda, mutações envolvendo *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), *T-box transcription factor 3* (TBX3) e *forkhead box protein A1* (FOXA1), sendo sobretudo associados ao fenótipo luminal A. Mostrou-se que a inativação do PTEN é característica discriminante destes carcinomas em relação ao carcinoma ductal invasivo de fenótipo luminal A. Também a menor expressão de receptores de estrogênio no carcinoma lobular de fenótipo luminal A poderia determinar uma melhor resposta a inibidores de aromatase como o Letrozol, em relação ao Tamoxifeno (Ciriello et al., 2015; Sikora, 2014).

Cabe citar, ainda, em relação às decisões do tratamento sistêmico de pacientes com carcinoma de mama, recente estudo sueco, que correlacionou o fenótipo molecular do tumor primário com o das metástases sincrônicas em linfonodos axilares de 85 pacientes, encontrando maiores chances de metástase à

distância e de morte em todos os fenótipos moleculares, comparados ao luminal A (Falk et al., 2013). Estes dados reforçam a relevância da identificação do fenótipo luminal, de modo a buscar melhor planejamento terapêutico.

Em relação ao prognóstico variável do carcinoma de mama, o fenótipo triplo negativo é caracterizado pela maior agressividade, menores taxas de sobrevida e pela relação com o carcinoma hereditário da mama, compreendendo, em sua maioria, o subtipo molecular basal-*like* (Bose, 2015; Rakha et al., 2008; Banerjee et al., 2006). É possível caracterizar também o fenótipo basal, no contexto clínico, pela imunorreatividade para marcadores de células basais ou mioepiteliais, aplicando-se, de modo geral, uma combinação de citoceratinas de alto peso molecular (CK5/6, CK14, CK17) e EGFR. A associação deste fenótipo com mutações do gene BRCA1 e do gene supressor de tumor p53 possibilita a utilização de inibidores da polimerase Poli(ADP-ribose) (inibidores PARP) (Bose, 2015; Badve et al., 2011; Fadare et al., 2007).

Frente aos avanços expostos no entendimento da biologia molecular do carcinoma de mama, torna-se relevante a caracterização citológica dos fenótipos moleculares no material proveniente da PAAF. Citologicamente, a caracterização do fenótipo basal foi explorada, tendo sido encontrado, sobretudo, o critério citológico 'necrose' presente em 67,4% dos esfregaços obtidos pela PAAF em carcinomas de mama de fenótipo basal. Cabe destacar ainda a presença de critério citológico 'maior celularidade' e 'nucléolos proeminentes' presentes nesse fenótipo em relação ao fenótipo luminal A, demonstrando que estes foram os critérios citológicos mais associados ao fenótipo basal do carcinoma de mama (Dufloth et al., 2009).

O fenótipo luminal, no entanto, apesar de ser o mais comum, com melhor prognóstico e com promissores avanços nas terapias-alvo, ainda não possui a caracterização citológica descrita. Utilizando amostras de PAAF e resultados imunoistoquímicos obtidos pela técnica de *tissue microarray* (TMA) de carcinomas invasivos de mama, de tipo ductal e lobular, o objetivo deste estudo foi investigar os critérios citológicos individuais presentes em esfregaços obtidos pela PAAF que poderiam indicar o fenótipo luminal do carcinoma de mama.

2. Referências Bibliográficas

Aleksandarany MA et al. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2012; 14(1)R3.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43(1):55-60.

Arisio R, Cuccorese C, Accinelli G, Mano MP, Bordon R, Fessia L. Role of fine-needle aspiration biopsy in breast lesions: analysis of a series of 4.110 cases. *Diagn Cytopathol*. 1998; 18(6):462-7.

Badve S, Dabbs DJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*. 2011; 24:157-167.

Banerjee S, Reis-Filho JS, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006; 59:729-735.

Bartsch R. et al. Present and future breast cancer management—bench to bedside and back: a positioning paper of academia, regulatory authorities and pharmaceutical industry. *Ann Oncol*. 2013; 1–8 201.

Baselga J, Campone M, Piccart M et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366: 520–529.

Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology, Breast*. 3rd edition. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2008; 715.

Billgren AM, Tani E, Liedberg A, Skoog L, Rutqvist LE. Prognostic significance of tumor cell proliferation analyzed in fine needle aspirates from primary breast cancer.

Breast Cancer Res Treat. 2002; 71(2):161-170.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, Van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med. 2010; 7(5):e1000279.

Bose S. Triple-negative breast carcinoma: morphologic and molecular subtypes. Adv Anat Pathol. 2015; 22(5):306-313.

Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. Diagn Mol Pathol. 2003; 12(1):27–34.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012; 4;490(7418):61-70.

Chaiwun B, Thorner P. Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. Curr Opin Obstet and Gynecol. 2007; 19(1):48-55.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2009; 101(10):736–50.

Ciriello G, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. Cell. 2015; 163:506-19.

Coates AS, Winer EP, et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. Ann Oncol. 2015; 26:1533-46.

Collins BT, Garcia TC, Hudson JB. Effective clinical practices for improved FNA biopsy cell block outcomes. Cancer Cytopathol. 2015; 123(9):540-7.

Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. Biologics: Targets and Therapy. 2012; 6: 289-97.

DeMay M. Practical principles of cytopathology. Revised Edition. American Society for Clinical Pathology. 2007; 257-80.

Di Lorito A, Schmitt FC. (Cyto)pathology and sequencing: Next (or last) generation? *Diagn Cytopathol.* 2011; 40(5):459-61.

Dufloth RM, Alves JM, Martins D, et al. Cytological criteria to predict basal phenotype of breast carcinomas. *Diagn Cytopathol.* 2009; 37:809-14.

Dufloth RM, Xavier-Júnior JCC, Neto FAM, Santos KJ, Schmitt F. Fine needle aspiration cytology of lobular breast carcinoma and its variants. *Acta Cytol.* 2015; 59:37-42.

Eisenberg AJ, Hajdu SI, Winhelmus J, Melamed MR, Kinne D. Preoperative aspiration cytology of breast tumors. *Acta Cytol.* 1986; 30(2):135-46.

Esposito A, et al. Highlights from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer. *Ecancer.* 2015; 9:518.

Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14(5):358-373.

Falck AK, et al. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases - aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomized trial. *BMC Cancer.* 2013; 13:558.

Gailey MP, Stence AA et al. Multiplatform comparison of molecular oncology tests performed on cytology specimens and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Cancer Cytopathol.* 2015; 123(1):30-9.

Gerhard R, Carvalho A, Carneiro V, Bento RS, Uemura G, Gomes M, Albergaria A, Schmitt F. Clinicopathological significance of ERCC1 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2013; 206(6):331-6.

Geyer FC et al. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast

cancers. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19(1):39-53.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24:2206–23.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes: dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22:1736–47.

Hammond MEH, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(16):2784-95.

Hwang S, Ioffe O, Lee I, Waisman J, Cangiarella J, Simsir A. Cytologic diagnosis of invasive lobular carcinoma: factors associated with negative and equivocal diagnoses. *Diagn Cytopathol*. 2004; 31:87–93.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil /Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA; 2013.

Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Brasil: Portal do Instituto Nacional de Câncer [updated in 2015; cited in 2015 Nov 10 (acesso 10/11/15)]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama.

Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*. 2014; 25:356-71.

Jayaram G, Elsayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol*. 2005; 49(6):605-10.

Kamphausen BH, Toellner T, Ruschenburg I. The value of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of the breast: 354 cases with cytohistological correlation. *Anticancer Res.* 2003; 23(3C):3009-13.

Karimzadeh M, Sauer T. Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration cytology in histological grade 1 breast carcinomas: are we good enough? *Cytopathology* 2008; 19(5):279-86.

Knoepp SM, Roh MH. Ancillary techniques on direct-smear aspirate slides: a significant evolution for cytopathology techniques. *Cancer Cytopathol.* 2013; 121(3):120-8.

Kocjan G et al. Fine needle aspiration cytology: a survey of current European practice. *Cytopathol.* 2006; 17(5):219-26.

Kocjan G et al. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology.* 2008; 19(5):271-8.

Kohler BA, Recinda L et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(6)djv048.

Koss LG. *Koss's diagnostic cytology.* 5 th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; 1004–1120.

Koss LG. The palpable breast nodule: a cost-effectiveness analysis of alternate diagnostic approaches. The role of the needle aspiration biopsy. *Cancer.* 1993; 72 (5): 1499-502.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van De Vijver MJ. *World Health Organization Classification of Tumours of the Breast.* Lyon, France: IARC Press; 4th edition. 2012; 34–42.

Layfield LJ, Chrischilles EA, Cohen MB, Bottles K. The palpable breast nodule: A cost-effectiveness analysis of alternate diagnostic approaches. *Cancer.* 1993; 72(5):1642-51.

Löfgren L, Skoog L, Von Schoultz E, Tani E, Isaksson E, Fernstad R, Carlström K,

Von Schoultz B. Hormone receptor status in breast cancer – a comparison between surgical specimens and fine needle aspiration biopsies. *Cytopathology*. 2003; 14(3):136-142.

Lowery AJ, Kell MR, Glynn RW et al. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133:831–841.

Maisonneuve P, Disalvatore D, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research*. 2014; 16:R65.

Marinšek ZP, Nolde N, Kardum-Skelin I, Nizzoli R, Onal B, Rezanko T, Tani E, Ostović KT, Vielh P, Schmitt F, Kocjan G. Multinational study of oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry on breast carcinoma fine needle aspirates. *Cytopathol*. 2013; 24(1):7-20.

Marsan C, Adotti F et al. *Cytopathologie mammaire par ponction*. Le pathologiste. Elsevier. 2001.

Martin H, Ellis E. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg*. 1930; 92(2):169-81.

Naderi A, Teschendorff AE, Barbosa-Morais NL, Pinder SE, Green AR, Powe DG, Robertson JF, Aparicio S, Ellis IO, Brenton JD, Caldas C: A gene- expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene* 2007; 26:1507-16.

Neto FAM. Análise da relevância clínica da classificação histológica dos carcinomas da mama de tipos lobular e sua relação com a classificação molecular [dissertação de mestrado]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista; 2014.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000. 17; 406(6797):747–52.

Pessoa CPKC. Correlação das características ultrassonográficas com o perfil

imunoistoquímico dos tumores mamários malignos [tese de doutorado]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista; 2014.

Rakha E, et al. Basal-like breast câncer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008; 26(5):2568-81.

Schmitt FC, Soares R, Leitão D. Detection of numerical chromosome 17 abnormalities in fine-needle aspirates of breast cancer using a novel in situ hybridization signal amplification method. *Diagn Citopath*. 1997; 19(2):141-46.

Schmitt FC et al. Molecular biology and cytopathology. Principles and applications. *Annales de pathologie*. 2012; 32(1):57-63.

Schmitt FC, Longatto-Filho A, Valent A, Vielh P. Molecular techniques in cytopathology practice. *J Clin Pathol* 2008;61:258-267.

Shabb NS, Boulos FI, Abdul-Karim FW. Indeterminate and erroneous fine-needle aspirates of breast with focus on the 'true grey zone': a review. *Acta Cytol* 2013; 57:316-331.

Sikora MJ, Cooper KL, Bahreini A, Luthra S, Wang G, Chandran UR, Davidson NE, Dabbs DJ, Welm AL, Oesterreich S. Invasive lobular carcinoma cell lines are characterized by unique estrogen-mediated gene expression patterns and altered tamoxifen response. *Cancer Res*. 2014; 74:1463–1474.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(19):10869–74.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 00(14):8418-23.

Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smedes J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 15;98(4):262-72.

Stanley MW, Sidawy MK, Sanchez MA, Stahl RE, Goldfisher M. Current issues in

breast cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113(5):49-75.

Tabchy A, Valero V, Vidaurre T, Lluch A, Gomez H, Martin M, et al. Evaluation of a 30-gene paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy response predictor in a multicenter randomized trial in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:5351-61.

Tan SM, Behranwala KA, Trott PA, et al. A retrospective study comparing the individual modalities of triple assessment in the pre-operative diagnosis of invasive lobular breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2002; 28:203–208.

Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002; 415(6871):530-6.

Wakasa T, Nakamura M, et al. Loss of cellular cohesion in cytology composes a special subgroup of breast tumors – analyses of 37 cases. *Acta Cytol.* 2014; 58(1):89-95.

Wei S et al. Using “residual” FNA rinse and body fluid specimens for next-generation sequencing: An institutional experience. *Cancer Cytopathol.* 2015; Doi:10.1002/cncy.21666.

Wolff A, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer. *ASCO/CAP Clinical Practice Guideline Update. Arch Pathol Med Lab.* 2013.

Zagorianakou P, Fiaccavento S, Zagorianakou N, Makrydimas G, Stefanou D, Agnantis NJ. FNAC: its role, limitations and perspective in the preoperative diagnosis of breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005; 26(2):143-9.

Zhang L, Li J et al. Identifying ultrasound and clinical features of breast cancer molecular subtypes by ensemble decision. *Nature. Scientific Reports.* 2015; 5:11085.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar os critérios citológicos individuais presentes nos esfregaços citológicos obtidos pela punção aspirativa por agulha fina e que poderiam indicar o fenótipo luminal do carcinoma de mama, tendo como padrão ouro uma série de carcinomas de mama classificados segundo a atual classificação molecular, através de estudo imunoistoquímico, utilizando técnica de *tissue microarray* (TMA).

3.2. Objetivos específicos

1. Verificar a frequência dos critérios citológicos individuais presentes nos esfregaços citológicos obtidos pela PAAF em relação aos fenótipos moleculares do carcinoma de mama.

2. Analisar a associação dos critérios citológicos individuais presentes nos esfregaços citológicos obtidos pela PAAF com o diagnóstico do fenótipo luminal do carcinoma de mama.

4. Métodos

4.1. Tipo de estudo

Este estudo foi do tipo corte-transversal, com componente descritivo e comparativo, como parte da linha de pesquisa em Oncopatologia do Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu/São Paulo - Brasil, em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade do Porto/Portugal. O estudo atual é um subprojeto do projeto intitulado “Análise da relevância clínica da classificação histológica dos carcinomas da mama de tipo lobular e ductal e sua relação com a classificação molecular de tipo luminal”, protocolo no CEP No. 10/2012.

4.2. Seleção dos sujeitos

4.2.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos 297 casos de pacientes com idade maior do que 18 anos e com o diagnóstico de carcinoma de mama – lobular ou ductal - confirmado por estudo histológico de biópsia ou peça operatória, tendo sido realizada a PAAF anteriormente à biópsia ou à exérese do tumor. Os casos foram selecionados no Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú.

4.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos 128 casos cujas lâminas e/ou blocos não foram encontrados ou não apresentavam condições técnicas para a avaliação da expressão das proteínas através do método imunistoquímico.

4.3. Variáveis em estudo

4.3.1. Variáveis independentes

As variáveis independentes foram cinco critérios citológicos individuais pré-estabelecidos: celularidade, coesão celular, necrose, nucléolo e atipia nuclear. Esses cinco critérios citológicos são sumarizados no Quadro 1 e demonstrados nas figuras (Figuras A-F) e foram analisados individualmente, através da revisão microscópica de esfregaços citológicos obtidos pela PAAF, utilizando microscópio óptico para múltiplos observadores (BX50 Olympus®, Japan). A análise das variáveis independentes foi realizada de modo blindado (duplo-cego) em relação ao fenótipo do carcinoma de mama obtido em cada caso (variável dependente) (vide abaixo).

4.3.2. Variáveis dependentes

Os fenótipos do carcinoma de mama foram as variáveis dependentes e seguiram a classificação de Perou (Perou et al., 2000), modificada por Sørli (Sørli et al., 2001) e revistos na *13th St Gallen International Breast Cancer Conference* (Maisonneuve et al., 2014; Goldhirsch et al. 2011), que incluem a caracterização do fenótipo luminal (Quadro 2).

Quadro 1 – Variáveis independentes

Variável	Definição	Categorização
Celularidade	Quantidade de células presentes no esfregaço	1- Discreta 2- Moderada 3- Acentuada
Coesão celular	Grau de associação celular	1- Predominância de células agregadas: acentuada coesão celular 2- Igual representação de células agregadas e células dissociadas: moderada coesão celular 3- Predominância de células dissociadas: pouca coesão celular
Necrose	Presença de áreas de necrose	1- Presença de necrose 2- Ausência de necrose
Nucléolo	Aspecto do nucléolo	1- Nucléolo inconspícuo ou somente micronucléolo: nucléolo inconspícuo 2- Macronucléolo isolado presente na maioria das células: nucléolo presente 3- Múltiplos macronucléolos presentes: nucléolo presente e proeminente
Atipia nuclear	Pleomorfismo nuclear	1- Ausente 2- Discreta 3- Moderada 4- Intensa

FONTES: DeMay M. Practical principles of cytopathology. Revised Edition. American Society for Clinical Pathology. 2007; Koss LG. Diagnostic Cytology and its histopathologic bases, 5a ed., vol. 1, 2006.

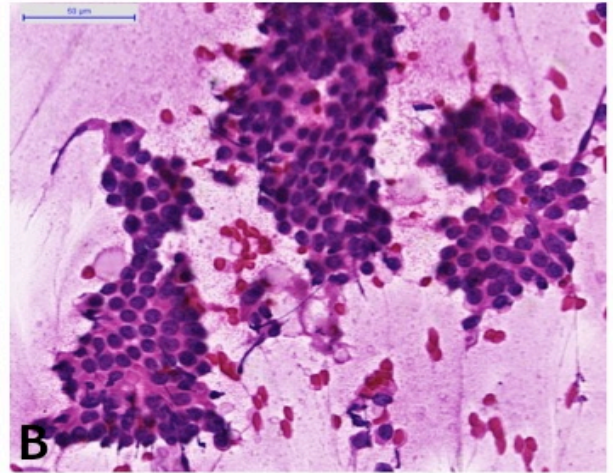
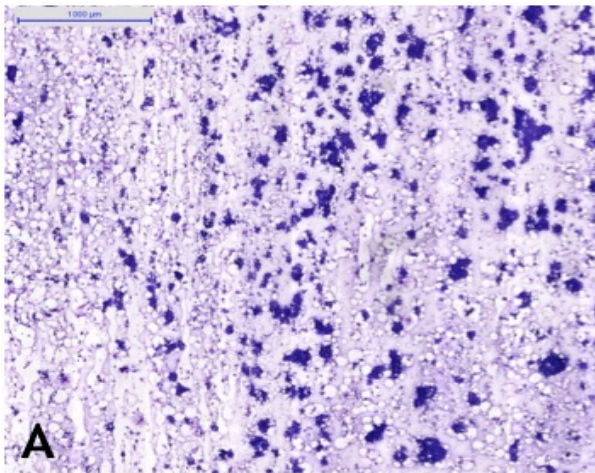


Figura A - Celularidade acentuada (May-Grünwald Giemsa, x50).

Figura B - Coesão acentuada (HE, x400).

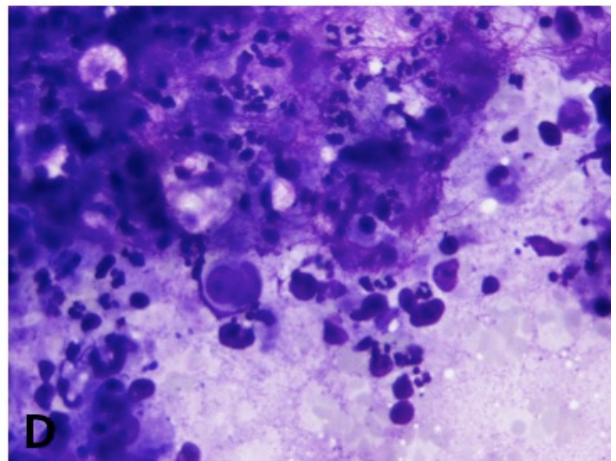
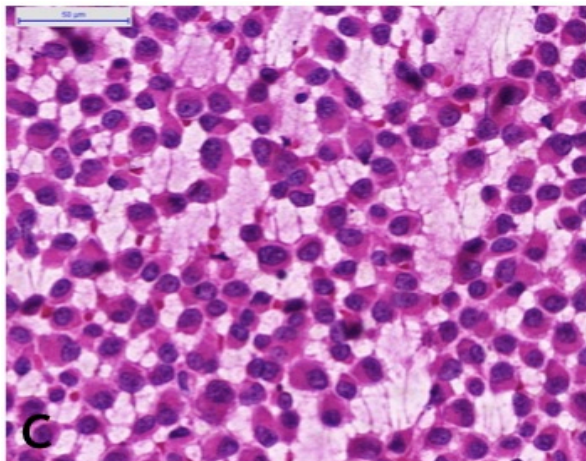


Figura C - Células pouco coesas (HE, x400).

Figura D - Presença de necrose (May-Grünwald Giemsa, x400).

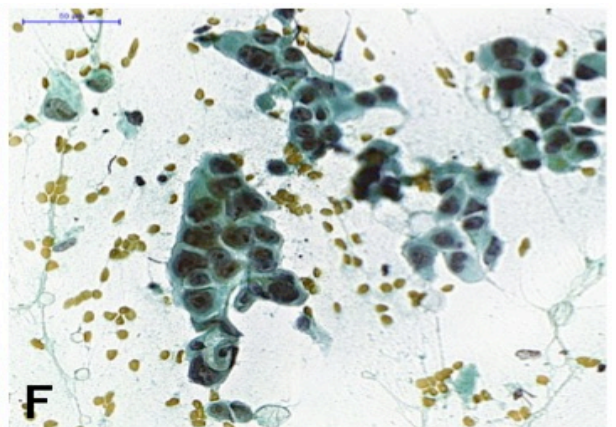
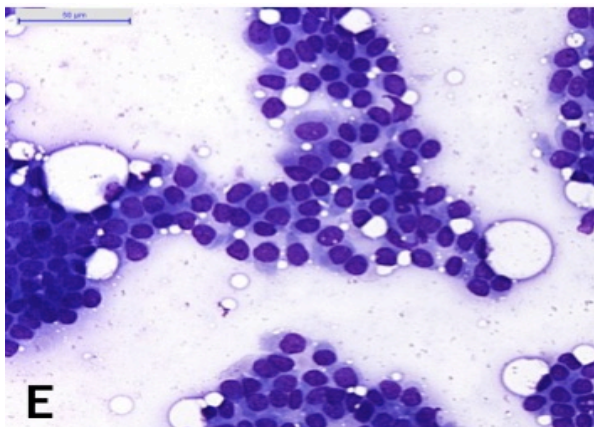


Figura E - Ausência de necrose (May-Grünwald Giemsa, x400).

Figura F - Nucléolos proeminentes e atipia citológica intensa (Papanicolaou, x400).

Quadro 2 – Variáveis dependentes: Classificação molecular do carcinoma de mama.

Fenótipo molecular	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	+	-	≤ 20%
Luminal B	+	+/-	-	> 20%
	+	+/-	+	qualquer
Superexpressão de HER2	-	-	+	qualquer
Triplo-negativo	-	-	-	qualquer

RE (Receptor de estrogênio); RP(receptor de progesterona); HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*); Ki67 (índice de proliferação celular)

FONTE: St Gallen Consensus Conference 2013.

4.4. Coleta de dados

Foram identificadas e separadas todas as cópias dos laudos citopatológicos e anatomopatológicos que foram emitidos pelos médicos patologistas do Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, Jaú/São Paulo no período de 2000 a 2005. As lâminas e os respectivos blocos de parafina encontravam-se arquivados no laboratório e foram retiradas do arquivo para as análises deste estudo. Para construção da amostra, todos os casos disponíveis no laboratório foram identificados de maneira sequencial.

4.5. Processamento de dados

4.5.1. Critérios citológicos

As lâminas dos esfregaços citológicos do material obtido pela PAAF estavam previamente fixadas e coradas pelos métodos de HE, Papanicolaou e May-Grünwald

Giemsa - seguindo protocolos do Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú /SP (Quadro 3) (Marsan et al. 2001), e foram reavaliadas por dois patologistas (R.M.D. e F.A.N.M.) para identificar a presença de cinco critérios citológicos individuais pré-estabelecidos: celularidade, coesão celular, necrose, nucléolo e atipia nuclear (DeMay, 2007; Koss, 2006) (Quadro 1 e Figuras A-F).

Quadro 3 – Métodos de fixação do material obtido pela PAAF.

Coloração	Método de fixação
HE	Imediata, em álcool 95°
Papanicolaou	Imediata, em álcool 95°
May-Grünwald-Giemsa	Secagem ao ar

FONTE: Marsan C. Cytopathologie mammaire par ponction. Le pathologiste. Elsevier. 2001.

4.5.2. Técnica de *Tissue Microarray* (TMA)

A pesquisa da expressão de todos os marcadores imunoistoquímicos foi estudada pela técnica de TMA, seguindo os protocolos do Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP) (Gerhard et al., 2013).

Foram obtidas lâminas dos blocos de tecidos doadores, nas quais foram selecionadas duas áreas morfológicamente significativas do carcinoma. Tais lâminas foram sobrepostas aos blocos doadores, e em cada um destes foram marcadas as duas áreas para delimitar o local de extração do material. Dessa forma, de cada bloco doador foram extraídos dois cilindros de 2 mm de diâmetro que foram depositados nos blocos receptores, previamente preparados. Os blocos receptores dos TMA foram construídos no *Tissue Microarray builder ab1802* (Abcam®, Cambridge, UK), composto por um molde de 24 cilindros e por uma “seringa extratora” (*punch-extractor*). Depois de depositados todos os cilindros, os blocos receptores foram os TMAs. Em cada bloco receptor foram colocados casos que serviram de controle interno (1 fragmento de tecido testicular e 3 fragmentos de tecido mamário normal). Estas amostras foram processadas da mesma forma, uma

vez que pertenciam ao TMA. Após o corte sequencial de 2 µm de espessura, as lâminas foram envolvidas em uma camada de parafina até a sua utilização no processo de imunohistoquímica (IHQ). Foi feita a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) do primeiro corte de cada TMA para controle morfológico da presença do carcinoma. Foi utilizada uma placa fria (Leica® 11 EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung® 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos. Foram utilizados dois tipos de lâminas, conforme os cortes histológicos eram destinados para coloração com HE (Marienfeld, Germany) ou para imunohistoquímica (Superfrost®Plus, Germany), apresentando estas um maior poder de adesão.

4.5.3. Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

A pesquisa da expressão dos marcadores imunohistoquímicos estudados foi feita no Laboratório de imunohistoquímica do Departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú/SP (Neto FAM, 2014) utilizando técnica imunohistoquímica manual nas lâminas obtidas pela técnica de TMA (exceto para o marcador E-caderina, sendo utilizados cortes histológicos convencionais), seguindo protocolo da Instituição e descrito resumidamente a seguir: lâminas com revestimento adesivo próprias para coloração imunohistoquímica (Superfrost®Plus, Germany) contendo cortes histológicos de 3µ de cada bloco de TMA foram confeccionadas, desparafinizadas em estufa a 58°C por três horas, reidratadas em três banhos em xilol de 5' cada, dois banhos em álcool 96% e mais dois banhos em álcool 70% e submetidas à técnica de recuperação antigênica com panela de pressão Pascal® Dako (USA) em solução tampão citrato pH 7 (Target® Dako) ou EDTA pH 8 por 45'. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos monoclonais primários por 30'.

Os clones, fabricantes, diluições e métodos de recuperação empregados estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação
E-caderina	NCH-38	1:100	Dako	Citrato pH6
RE	SP1	1:100	Spring	Citrato pH6
RP	SP42	1:200	Spring	Citrato pH6
HER2	SP3	1:200	Spring	Citrato pH6
Ki67	MIB-1	1:200	Dako	EDTA

FONTE: Neto FAM, 2014 Análise da relevância clínica da classificação histológica dos carcinomas da mama de tipos lobular e sua relação com a classificação molecular [dissertação de mestrado] UNESP – protocolo do Hospital Amaral Carvalho de Jaú / SP.

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada (PBS) e incubadas com o polímero Histofine® Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and – Rabbit (Nichirei, Tokyo, Japan) por 30'. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas com Diaminobenzidina (DAB, Dako, USA) por 1' para revelação da reação imunoistoquímica e contracoradas com hematoxilina (30"). Controles positivos e negativos (omissão do anticorpo primário) externos foram incluídos para validação da reação imunoistoquímica.

Para o marcador E-caderina, foi considerada positiva a marcação de membrana de qualquer intensidade das células tumorais.

Para os marcadores RE e RP foi considerado positivo a marcação nuclear de qualquer intensidade em $\geq 1\%$ das células tumorais, como preconizado pela ASCO/CAP (*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*) (Hammond et al., 2010). Para o *HER2* foram também utilizados os critérios estabelecidos pela ASCO-CAP (Wolff et al. 2013) e descritos no Quadro 5.

Quadro 5 - Critérios estabelecidos pela ASCO-CAP para HER2.

HER2	Descrição
Escore 0	Nenhuma coloração observada ou coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas
Escore 1+	Coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $> 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 2+	Coloração de membrana circunferencial incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais invasivas; ou coloração de membrana completa e circunferencial intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 3+	Coloração de membrana circunferencial completa e intensa em $> 10\%$ das células tumorais invasivas

FONTE: ASCO-CAP Test Guideline 2013 (Wolff et al. 2013).

O índice de proliferação celular Ki67 foi determinado através de contagem com retículo graduado inserido na ocular de um microscópio óptico (BX50 Olympus®, Japan), considerando-se a porcentagem de células exibindo coloração nuclear de qualquer intensidade em 100 células tumorais na área mais proliferativa (“hot spot”). O *cut-off* de 20%, recentemente recomendado pela *13th St Gallen Consensus Conference 2013*, foi usado para dividir os casos com baixo índice de proliferação celular ($< 20\%$) e alto índice de proliferação celular ($\geq 20\%$) (Maisonneuve et al., 2014).

Os tumores foram classificados segundo a classificação molecular (*St Gallen Consensus Conference 2013*) (Maisonneuve et al., 2014) em quatro fenótipos mostrados no Quadro 2 (acima).

Todas as lâminas foram examinadas independentemente por dois patologistas *Senior* (R.D. e F.A.M.N.). As diferenças de interpretação foram solucionadas em microscópio óptico para múltiplos observadores (BX50 Olympus®, Japan).

4.5.4. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Os casos HER2 com escore 2+ foram submetidos ao teste de FISH para pesquisa da amplificação do gene HER2 conforme recomendação da ASCO-CAP (Wolff et al. 2013), seguindo o protocolo do Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP) (Schmitt et al., 1997). Foi utilizado o *kit* HER2 FISH® (Dako, USA). Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados conforme descrição da imunoistoquímica, acima. As lâminas foram então mergulhadas por 3' na solução tampão de lavagem do *kit* e incubadas em banho maria a 95° com a solução de pré-tratamento do mesmo *kit* por 10'. As lâminas foram a seguir lavadas na solução tampão (dois banhos de 3' a temperatura ambiente). O excesso de solução tampão foi removido e 5 a 8 gotas de Pepsina foram aplicadas sobre os cortes histológicos e incubadas por 10' a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com a solução tampão (2 banhos de 3' a temperatura ambiente), desidratadas em três soluções de álcool a 70%, 85% e 96% por 2' cada e deixadas secar ao ar livre. Aplicação de 10 µL da sonda de DNA e colocação de lamínula e selante em toda a periferia da lamínula. As lâminas foram então colocadas no Hibridizador (Hibridizer® Dako, USA) e submetidas a programa de desnaturação a 82° por 5' e hibridação overnight (18 horas) a 45°. Remoção do selante e da lamínula e incubação com a solução de estringência do *kit* a 65° por 10'. Lavagem das lâminas na solução tampão (2 banhos de 3' a temperatura ambiente), desidratação em três soluções graduadas de álcool 70%, 85% e 96% por 2' cada, secagem ao ar livre e por fim a aplicação de 15µL de meio de montagem fluorescente DAPI que acompanha o *kit* e cobertura da lâmina com lamínula para leitura no microscópio de fluorescência.

Foram utilizadas duas sondas de DNA de cores vermelha e verde correspondendo ao HER2 e ao centrômero do cromossomo 17 (CEN-17) respectivamente. Foi considerado amplificado quando a relação HER2/CEN-17 foi igual a dois ou, no caso de ser inferior a dois, quando havia um número de cópias do HER2 maior ou igual a seis por célula, conforme recomendação do ASCO-CAP (Wolff et al. 2013).

4.6. Análise estatística

A análise estatística da magnitude da associação dos critérios citológicos individuais dos esfregaços citológicos obtidos pela PAAF com os diagnósticos dos fenótipos do carcinoma de mama, obtidos através da técnica de TMA, foi realizada por valores estimados de *odds ratio* com os respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%). Os dados foram descritos em frequências absolutas (n) e frequências relativas (%) para avaliar a associação dos critérios citológicos. O *odds ratio* (OR) considerado significativo quando não inclui o valor 1. A análise da associação dos critérios citológicos na predição do diagnóstico do fenótipo luminal de carcinoma de mama foi feita com modelos de regressão logística, com a inclusão de todos os critérios, sendo aplicada uma seleção do tipo *backward*. Os resultados da análise de regressão logística foram expressos em valores de OR, com os respectivos IC95%. Esses critérios foram comparados entre os fenótipos de carcinoma de mama através do Teste exato de Fisher. O nível de significância assumido foi de 5% e o software utilizado para a análise estatística foi o SAS, Versão 9.2.

4.7. Aspectos éticos

Foram obedecidos os preceitos do Código de Ética Médica para a utilização de dados das pacientes e respeitados os princípios enunciados nas Resoluções no. 196/96, no. 251/97 do Conselho Nacional de Saúde e as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP (Protocolo 4117-2012; Of.23/2014-CEP) (vide Anexos).

CAPÍTULO II – Artigo Científico

Os resultados deste estudo estão sendo apresentados na forma de artigo científico que se encontra em fase final de elaboração.

Rafael Bispo Paschoalini^a, Rozany Mucha Dufloth^{a,b}, Francisco Alves Moraes Neto^c, Fernando Schmitt^d

^a Department of Pathology, São Paulo State University. Faculty of Medicine. Botucatu, Brazil.

^b Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation. Barretos, Brazil.

^c Laboratory of Pathology. Hospital Amaral Carvalho de Jaú. Jaú, Brazil.

^d Department of Pathology and Medicine, Laboratoire National de Sante 1. Dudelange, Luxembourg.

CYTOLOGICAL CRITERIA TO PREDICT LUMINAL PHENOTYPE OF BREAST CARCINOMA

Abstract

Background: Advances in understanding the genetics of breast cancer associated with the attempt to apply them routinely allowed the development of a classification of molecular phenotypes, according to immunohistochemical expression profiles. Cytologically, the characterization of the basal phenotype has been explored, given its relation to hereditary breast carcinoma. However, the luminal phenotype, despite being the most common, with better prognosis and targeted therapies under study, has not yet recognized specific cytological criteria. **Method:** Using the material obtained by fine-needle aspiration (FNA) the intention is to identify the luminal phenotype on breast cancer samples, through the evaluation of cytological criteria recognized in routine practice. The immunohistochemical and cytological correlation of 169 cases of breast carcinoma was studied. **Results:** From 297 selected patients, 169 were included, resulting in the following molecular phenotypes - luminal A: 107 (63.3%), luminal B: 39 (23.1%), HER2 overexpression: 8 (4.7%), and triple negative: 15 (8.9%). The luminal phenotype showed mild or moderate cellularity (40.4%) (OR = 7.12, 95% CI: 1.61 - 31.52), inconspicuous or present nucleoli (55.5%) (OR = 8.31,

95% CI: 2.36 - 29.19) and mild or moderate nuclear atypia (44.5%) (OR = 8.42, 95% CI: 1.90 - 37.25). Inconspicuous or present nucleoli (62.6%) (OR = 2.99, 95% CI: 1.39 - 6.41), less dishesive cells (OR = 0.46, 95% CI: 0.24 - 0.88), showing clusters with moderate to intense cellular cohesion (54.2%), and absence of necrosis (40.2%) (OR = 0.32, 95% CI: 0.15 - 0.68) were mainly associated with luminal A phenotype.

Conclusion: The individual FNA cytological criteria that might indicate the luminal phenotype of breast cancer in FNA samples were cellularity, nucleolus and nuclear atypia.

Keywords: breast carcinoma; molecular classification; luminal phenotype; fine needle aspiration; cytological criteria; cytopathology of the breast.

Introduction

Breast carcinoma is widely known as a heterogeneous disease requiring separation of clinically relevant groups for treatment, surveillance, prevention activities and research [1, 2]. Genetic studies have confirmed a previous morphologic impression of heterogeneity and continue to improve understanding. Besides great data provided by multicenter molecular studies and international epidemiological reports, efforts on translating this to clinical models still face some obstacles, substantially concerning early diagnosis [3-6]. From a pathologist's perspective, morphological and immunohistochemical correlates – as provided by surrogate classification of molecular phenotypes - can be useful tools to reach this goal [7-10].

Since its description by Martin and Ellis in 1930 [11], fine-needle aspiration (FNA) has been a widely used and accepted method for obtaining samples for cytological diagnosis in various organs and is a routine procedure for the assessment of breast lesions. It is a fast, low-cost technique, with great diagnostic accuracy and with minimum risks to the patient [12-15]. Well-fixed FNA samples are not only optimal subsidies to perform ancillary techniques, such as immunocytochemistry and a series of molecular tests [16], but can, at first, supply further information for the diagnosis of breast cancer at the cytomorphological level [17, 18, 19]. This fact has been used in an attempt to predict the molecular phenotype of breast carcinoma in cytological specimens [20].

Gene-expression profiling is not currently standard in clinical practice, but, for nearly a decade, testing for joint hormone receptor (HR) and human growth factor-neu receptor (HER2) status has been a routine part of treatment planning [6, 21, 22]. In the meantime, there has been a proliferation of commercially offered multigene prognostic/predictin assays that are being increasingly used in clinical decision-making [2, 9]. Analyses of gene-expression profiling have confirmed two main groups of breast carcinoma, which can be further separated into four molecular subtypes according to HR expression (HR \pm) and/or epithelial cell of origin (luminal or basal). There are two HR+ breast cancers (Luminal A and Luminal B) and two HR- cancers (HER2-positive and basal-like). The molecular subtypes can be approximated by HR/HER2 status; i.e. Luminal A (HR+/HER2-), Luminal B (HR+/HER2+), HER2-overexpression (HR-/HER2+), and triple-negative (HR-/HER2-) [1, 5, 7-10]. The basal phenotype is characterized by immunoreactivity for basal or myoepithelial cells markers by applying, in general, a combination of high molecular weight cytokeratins (CK5/6, CK14, CK17) and EGFR [23, 24].

Cytologically, the characterization of the basal phenotype has been explored, given its relation to hereditary breast carcinoma [20]. However, the luminal phenotype, despite being the most common, with better prognosis and targeted therapies under study, has not yet recognized specific cytologic criteria. Using FNA samples, the aim here, is to identify the luminal phenotype of breast carcinoma through the evaluation of cytologic criteria recognized in routine practice, as it is relevant for guiding treatment and predicting survival.

Materials and method

Samples

The study was based on a review of mastectomy specimens obtained from 297 patients with invasive breast carcinomas treated at the Oncology Hospital Amaral Carvalho (Jau, Brazil) from 1997 to 2009; histological classification was performed according to the WHO Classification of Breast Tumors. The Research Ethics Committee of the Medical School of São Paulo State University (UNESP) approved the study.

Immunohistochemical assay

Cases were grouped using conventional tissue microarray technique. The specimens were immunohistochemically stained for estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), HER2, Ki-67, CK5/6 and E-cadherin using the streptavidin-biotin-peroxidase technique (NCH-38, dilution 1: 100, pH 7; Dako, USA). The antigen retrieval times, clone antibodies, dilutions, and suppliers are listed in table 1. Positive and negative controls were included in each run in order to guarantee the reliability of the assays. Assessments of the molecular phenotype were carried out, according to hormone receptor expression (HR±), HER2 expression and proliferative status as defined by Ki-67 index, into four categories: Luminal A (HR+/HER2-/low Ki-67 index), Luminal B (HR+/HER2±/high Ki-67 index), HER2 overexpression (HR-/HER2+), and triple-negative (HR-/HER2-). All slides were analyzed by two senior pathologists (F.A.M.N. and R.M.D.). Complete expression profiles allowing molecular phenotyping were obtained in 237 cases. There was a loss of 60 cases due to either detaching cores or inconclusive results. Techniques and analyses were based on updated protocols of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists.

Table 1. Sources and dilutions of primary antibodies used in this immunohistochemistry study

Antibody	Clone	Dilution	Manufacturer	Retrieval
E-cadherin	NCH-38	1:100	Dako	Citrate pH6
ER	SP1	1:100	Spring	Citrate pH6
PR	SP42	1:200	Spring	Citrate pH6
HER2	SP3	1:200	Spring	Citrate pH6
Ki67	MIB-1	1:200	Dako	EDTA

Cytological Criteria

All FNA specimens were previously stained with Giemsa, hematoxylin and eosin (HE) and Papanicolaou stains. All patients had FNA obtained before the histological diagnosis of breast carcinoma. The initial result of cytological analysis in

the laboratory of origin, based on the NIH Consensus Development Conference, was named the initial cytology result. All cases were analyzed to assess the presence of five individual cytological criteria: cellularity (analyzed at lower magnification as either mild/moderate or intense); cellular cohesion (the presence of tight cell clusters with loose cribriform or papillary clusters in which tumor cells are poorly cohesive and show cellular dissociation was classified as mild cohesion, while the presence of more marked cellular cohesion was classified as moderate/intense cohesion); necrosis (absent or present, i.e. the presence of numerous neutrophils/tumoral diathesis); nucleoli were classified into inconspicuous or present and prominent, and nuclear atypia (analyzed considering the nuclear-cytoplasmic ratio, i.e. the dimension of nuclei compared with the diameter of red blood cells and features of the nuclear membrane among neoplastic cells and considering two categories: mild and moderate/intense). Each criterion was assessed individually for each case and was reviewed by two senior pathologists who were blinded from the data of the cases; FNA was performed using a multi-headed microscope (Olympus® BX50). The complete evaluation of cytological criteria was performed on 169 cases. Excluded cases excluded were due to lack of cytological material, absence of histological data, incomplete staining and broken slides.

Statistical Analysis

The program SAS for Windows, version 9.2 was used. Data were presented as absolute (n) and relative values (%) to assess the association of cytological criteria with histological type and molecular phenotype. The χ^2 test or Fisher's exact test with 95% CI was used. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

From the total of 297 cases selected for this study, 169 cases were included. After the completion of TMAs, the following molecular phenotypes were identified: 107 luminal A (63.3%), 39 luminal B (23.1%), 8 HER2 overexpression (4.7%) and 15 triple-negative (8.9%) (Table 2). 146 cases were ER+ (86.4%) and were classified into luminal phenotype (Table 3).

Analysis of frequencies and association of individual cytologic criteria present in the FNA showed that the diagnosis of luminal phenotype of breast cancer was indicated by mild or moderate cellularity (40.4%) (OR = 7.12, 95% CI: 1.61 - 31.52), inconspicuous or present nucleoli (55.5%) (OR = 8.31, 95% CI: 2.36 - 29.19) and mild to moderate nuclear atypia (44.5%) (OR = 8.42, 95% CI: 1.90 - 37.25).

Luminal A phenotype was associated with inconspicuous or present nucleoli (62.6%) (OR = 4.43, 95% CI: 2.24 - 8.77), less dishesive cells (OR = 0.46, 95% CI: 0.24 - 0.88), showing clusters with moderate to intense cellular cohesion (54.2%), and absent necrosis (40.2%) (OR = 0.32, 95% CI: 0.15 - 0.68) (fig. 1). The nucleoli criterion allowed for differentiating luminal A from luminal B phenotype (OR = 2.99, 95% CI: 1.39 - 6.41) and showed bordering significance to distinguish luminal B from non-luminal phenotypes (OR = 3.73, 95% CI: 0.94 - 14.82) (Table 4).

Table 2. Frequencies of five cytological criteria in 169 FNA, by molecular phenotype.

Variable	Category	Molecular phenotype			
		Luminal A	Luminal B	HER2-overexp.	Triple-negative
Cellularity	Mild	13 (12.2%)	3 (7.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	Moderate	29 (27.1%)	14 (35.9%)	1 (12.5%)	1 (6.7%)
	Intense	65 (60.7%)	22 (56.4%)	7 (87.5%)	14 (93.3%)
Cellular cohesion	Mild	49 (45.8%)	24 (61.5%)	6 (75.0%)	10 (66.7%)
	Moderate	48 (44.9%)	9 (23.1%)	2 (25.0%)	4 (26.6%)
	Intense	10 (9.3%)	6 (15.4%)	0 (0.0%)	1 (6.7%)
Necrosis	Present	64 (59.8%)	28 (71.8%)	8 (100.0%)	15 (100.0%)
	Absent	43 (40.2%)	11 (28.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Nucleoli	Inconspicuous	21 (19.6%)	6 (15.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	Present	46 (43.0%)	8 (20.5%)	1 (12.5%)	2 (13.3%)
	Present and prominent	40 (37.4%)	25 (64.1%)	7 (87.5%)	13 (86.7%)
Nuclear atypia	Mild	24 (22.4%)	4 (10.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	Moderate	28 (26.2%)	9 (23.1%)	1 (12.5%)	1 (6.7%)
	Intense	55 (51.4%)	26 (66.6%)	7 (87.5%)	14 (93.3%)

Table 3. Frequencies of markers in TMA performed in 169 cases of invasive breast carcinoma.

Molecular phenotype	ER		PR		HER2		Ki67*		E-cadherin	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Low	High	Negative	Positive
Luminal A	0 (0.0%)	107 (63.3%)	24 (14.2%)	83 (49.1%)	107 (63.3%)	0 (0.0%)	107 (63.3%)	0 (0.0%)	58 (34.3%)	49 (29.0%)
Luminal B	0 (0.0%)	39 (23.1%)	17 (10.1%)	22 (13.0%)	26 (15.4%)	13 (7.7%)	3 (1.8%)	36 (21.3%)	14 (8.3%)	25 (14.8%)
HER2-overexpression	8 (4.7%)	0 (0.0%)	8 (4.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (4.7%)	3 (1.8%)	5 (3.0%)	0 (0.0%)	8 (4.7%)
Triple negative	15 (8.9%)	0 (0.0%)	15 (8.9%)	0 (0.0%)	15 (8.9%)	0 (0.0%)	6 (3.5%)	9 (5.3%)	0 (0.0%)	15 (8.9%)
Total	23 (13.6%)	146 (86.4%)	64 (37.9%)	105 (62.1%)	148 (87.6%)	21 (12.4%)	119 (70.4%)	50 (29.6%)	72 (42.6%)	97 (57.4%)

*The cut-off of 20% was accepted by the 13th St Gallen Consensus Conference.

Table 4. Association of five cytological criteria between different molecular phenotypes of breast carcinoma in 169 FNA biopsies.

<i>Cytological criteria</i>	<i>p value</i>	<i>OR (95%CI)</i>
Cellularity (mild/moderate vs. abundant)		
Luminal x Non-luminal	0.010	7.12 (1.61 - 31.52)
Luminal A x Non-luminal	0.012	6.78 (1.51 - 30.45)
Luminal B x Non-luminal	0.009	8.11 (1.61 - 39.49)
Luminal A x Luminal B	0.637	0.84 (0.40 - 1.76)
Luminal A x Other (including luminal B)	0.263	1.46 (0.75 - 2.84)
Cell cohesion (mild vs. moderate/intense)		
Luminal x Non-luminal	0.087	0.44 (0.17 - 1.13)
Luminal A x Non-luminal	0.043	0.37 (0.14 - 0.97)
Luminal B x Non-luminal	0.524	0.70 (0.23 - 2.10)
Luminal A x Luminal B	0.095	0.53 (0.25 - 1.12)
Luminal A x Other (including luminal B)	0.002	0.46 (0.24 - 0.88)
Necrosis (present)		
Luminal x Non-luminal	0.935	0.00 (0.00 - 999.99)
Luminal A x Non-luminal	0.934	0.00 (0.00 - 999.99)
Luminal B x Non-luminal	0.955	0.00 (0.00 - 999.99)
Luminal A x Luminal B	0.187	0.56 (0.26 - 1.30)
Luminal A x Other (including luminal B)	0.003	0.32 (0.15 - 0.68)
Nucleoli (inconspicuous/present vs. prominent)		
Luminal x Non-luminal	0.001	8.31 (2.36 - 29.19)
Luminal A x Non-luminal	0.000	11.12 (3.12 - 39.94)
Luminal B x Non-luminal	0.061	3.73 (0.94 - 14.82)
Luminal A x Luminal B	0.005	2.99 (1.39 - 6.41)
Luminal A x Other (including luminal B)	0.000	4.43 (2.24 - 8.77)
Nuclear atypia (mild/moderate vs. intense)		
Luminal x Non-luminal	0.005	8.42 (1.90 - 37.25)
Luminal A x Non-luminal	0.003	9.93 (2.22 - 44.44)
Luminal B x Non-luminal	0.042	5.25 (1.06 - 25.88)
Luminal A x Luminal B	0.103	1.89 (0.88 - 4.07)
Luminal A x Other (including luminal B)	0.002	2.96 (1.48 - 5.93)

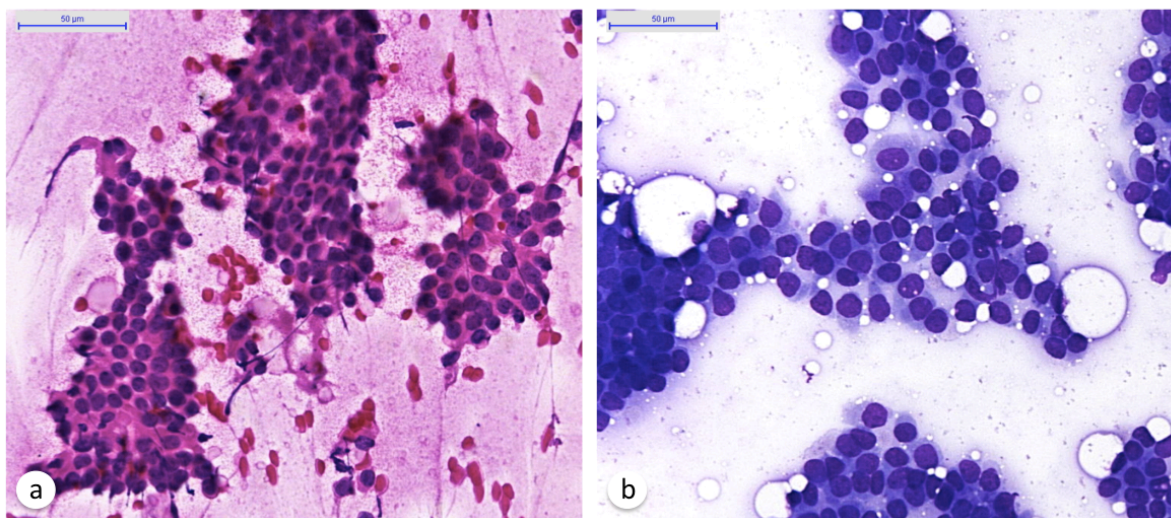


Fig. 1. Cell cohesion (a; H&E; x400) and absence of necrosis (b; Giemsa; x400) were mainly associated with luminal A phenotype in FNA samples.

Discussion

Cytological specimens have gained importance in the era of personalized medicine, for allowing the realization of numerous molecular tests - such as DNA extraction techniques, next-generation sequencing, proteomic studies, polymerase chain reaction and *in situ* hybridization - made possible, mainly, by the proper preservation and purity of samples [16, 25, 26]. The cell block is part of the FNA procedure and enables performing immunocytochemistry and molecular tests for further characterization of breast carcinoma. Thus, the intrinsic potential of each sample is directly related with the experience of the cytopathologist in bringing together a set of diagnostic, predictive and prognostic information by using systematic analysis which include, at first, cytomorphology [16, 25].

Studies in literature on cytological criteria associated with molecular phenotypes of breast cancer on FNA samples are limited to the basal phenotype, with necrosis being described as the most relevant criterion to predict the basal phenotype in these samples [20]. To date, no study has been identified that aims to investigate individual cytologic criteria that could predict the luminal phenotype of breast cancer.

The investigation of routinely applied cytological criteria in FNA specimens showed that luminal phenotype has a tendency to less cellular samples, associated with key criteria present in the nucleus, especially the nuclear grade and nucleolus. For instance, the luminal B phenotype is related to higher nuclear grade [27, 28] as compared to luminal A, which could require a greater evaluation of nuclear details.

Regarding absence of necrosis, a significant result to distinguish samples of luminal A phenotype from other phenotypes was observed. This phenotype presents mostly lower nuclear grade, so the presence of extensive necrosis is not expected [8, 23].

The luminal A phenotype showed greater cell cohesion in relation to non-luminal phenotype. The loss of tumor cell cohesion is a significant characteristic associated with increased risk of malignancy in mammary cytology. Wakasa et al. [29] described a cytological subclassification for breast cancer samples that showed the criterion 'loss of cellular cohesion', and for invasive lobular carcinoma, medullary carcinoma, neuroendocrine carcinoma and solid papillary carcinoma this criterion

was present in most cases. However, this criterion was not studied with the molecular phenotype classification of breast carcinoma.

The differentiation of luminal phenotype of breast carcinoma, especially, the luminal A phenotype is of clinical value, since this phenotype presents a better prognosis, related to lower mortality and lower rates of metastases, Otherwise, it may be associated with lobular carcinoma according to recent studies [30, 31].

Conclusion

The individual FNA cytological criteria that might indicate the luminal phenotype of breast cancer were mild to moderate cellularity, inconspicuous or little nucleoli and mild to moderate nuclear atypia. Inconspicuous or little nucleoli, moderate to intense cell cohesion and absence of necrosis were associated with luminal A phenotype.

Further research with larger samples, as well as application of new molecular markers possibly related with luminal phenotype, are required to establish which cytological criteria could be predictive and prognostic in FNA biopsies. The difficulties are considerable, as the luminal phenotype is the most heterogeneous in terms of genetic pathways of growth.

The application of these cytological criteria in routine diagnosis of FNA biopsies can lead to the establishment of diagnostic models with greater precision and accuracy, in order to achieve early detection and prompt therapeutic approach in patients with breast carcinoma.

Acknowledgments

We acknowledge the team of Amaral Carvalho Hospital, Jau, Sao Paulo, Brazil, the team of the Institute of Molecular Pathology and Immunology at the University of Porto (IPATIMUP) and Eloisa Elena Paschoalinotte who performed statistical analysis.

References

1. Kohler BA, Recinda L et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(6)djv048.
2. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, Van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010; 7(5):e1000279.
3. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; 4;490(7418):61-70.
4. Geyer FC et al. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol.* 2012; 19(1):39-53.
5. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000. 17; 406(6797):747–52.
6. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19):10869–74.
7. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206–23.
8. Maisonneuve P, Disalvatore D, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research.* 2014; 16:R65.
9. Coates AS, Winer EP, et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol.* 2015; 26:1533-46.
10. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol.* 2003; 12(1):27–34.
11. Martin H, Ellis E. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg.* 1930;

- 92(2):169-81.
12. Chaiwun B, Thorner P. Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. *Curr Opin Obstet and Gynecol* .2007; 19(1):48-55.
 13. Kocjan G et al. Fine needle aspiration cytology: a survey of current European practice. *Cytopathol*. 2006; 17(5):219-26.
 14. Kocjan G et al. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology*. 2008; 19(5):271-8.
 15. Koss LG. The palpable breast nodule: a cost-effectiveness analysis of alternate diagnostic approaches. The role of the needle aspiration biopsy. *Cancer*. 1993; 72 (5): 1499-502.
 16. Collins BT, Garcia TC, Hudson JB. Effective clinical practices for improved FNA biopsy cell block outcomes. *Cancer Cytopathol*. 2015; 123(9):540-7.
 17. Billgren AM, Tani E, Liedberg A, Skoog L, Rutqvist LE. Prognostic significance of tumor cell proliferation analyzed in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 71(2):161-170.
 18. Löfgren L, Skoog L, Von Schoultz E, Tani E, Isaksson E, Fernstad R, Carlström K, Von Schoultz B. Hormone receptor status in breast cancer – a comparison between surgical specimens and fine needle aspiration biopsies. *Cytopathology*. 2003; 14(3):136-142.
 19. Marinšek ZP, Nolde N, Kardum-Skelin I, Nizzoli R, Onal B, Rezanko T, Tani E, Ostović KT, Vielh P, Schmitt F, Kocjan G. Multinational study of oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry on breast carcinoma fine needle aspirates. *Cytopathol*. 2013; 24(1):7-20.
 20. Dufloth RM, Alves JM, Martins D, et al. Cytological criteria to predict basal phenotype of breast carcinomas. *Diagn Cytopathol*. 2009; 37:809-14.
 21. Sikora MJ, Cooper KL, Bahreini A, Luthra S, Wang G, Chandran UR, Davidson NE, Dabbs DJ, Welm AL, Oesterreich S. Invasive lobular carcinoma cell lines are characterized by unique estrogen-mediated gene expression patterns and altered tamoxifen response. *Cancer Res*. 2014; 74:1463–1474.
 22. Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415(6871):530-6.
 23. Badve S, Dabbs DJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and

- oncologists. *Modern Pathology*. 2011; 24:157-167.
24. Bose S. Triple-negative breast carcinoma: morphologic and molecular subtypes. *Adv Anat Pathol*. 2015; 22(5):306-313.
 25. Knoepp SM, Roh MH. Ancillary techniques on direct-smear aspirate slides: a significant evolution for cytopathology techniques. *Cancer Cytopathol*. 2013; 121(3):120-8.
 26. Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*. 2014; 25:356-71.
 27. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*. 2012; 6: 289-97.
 28. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(10):736–50.
 29. Wakasa T, Nakamura M, et al. Loss of cellular cohesion in cytology composes a special subgroup of breast tumors – analyses of 37 cases. *Acta Cytol*. 2014; 58(1):89-95.
 30. Falck AK, et al. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases - aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomized trial. *BMC Cancer*. 2013; 13:558.
 31. Ciriello G, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*. 2015; 163:506-19.

CAPÍTULO III – Conclusão

5. Conclusão

Até o presente momento não foi identificado estudo que se propõe a investigar os critérios citológicos individuais que pudessem identificar o fenótipo luminal do carcinoma de mama.

1. Com relação a frequência, os esfregaços citológicos obtidos pela PAAF dos carcinomas de mama de fenótipo luminal mostraram celularidade baixa e moderada (40.4%), nucléolos inconspícuos ou pequenos (55.5%) e atipia nuclear leve a moderada (44.5%).

2. Com relação a associação dos critérios citológicos do fenótipo luminal do carcinoma de mama, os esfregaços citológicos mostraram celularidade baixa e moderada (OR = 7.12, IC95%: 1.61 - 31.52), nucléolos inconspícuos ou pequenos (OR = 8.31, IC95%: 2.36 - 29.19) e atipia nuclear leve a moderada (OR = 8.42, IC95%: 1.90 - 37.25). O fenótipo luminal A se associou a menor perda de coesão celular (OR = 0.46, IC95%: 0.24 - 0.88), mostrando grupamentos com coesão celular moderada a intensa, e ausência de necrose (OR = 0.32, IC95%: 0.15 - 0.68), sendo que o critério citológico 'nucléolo' permitiu ainda distinção dos fenótipos luminal A e luminal B (OR = 2.99, IC95%: 1.39 - 6.41).

São necessárias novas pesquisas com amostras mais amplas e com aplicação de novos marcadores moleculares, de modo a se buscar quais são os critérios citológicos preditivos e prognósticos relacionados ao fenótipo luminal nos esfregaços citológicos obtidos pela PAAF. As dificuldades são consideráveis, em vista da heterogeneidade genética e molecular associada a este fenótipo.

A aplicação de critérios citológicos preditivos na rotina diária da PAAF poderá levar à elaboração de possíveis modelos diagnósticos, com maior precisão e acurácia, no intuito de estabelecer o diagnóstico precoce e a pronta conduta terapêutica das pacientes com carcinoma de mama.

ANEXOS

6.1. Ficha de coleta de dados

FICHA DE COLETA DE DADOS

1. Número do caso:
2. Número do bloco de parafina:
3. Número da punção aspirativa:
4. Fenótipos dos carcinomas de mama:
 - 1= Luminal A
 - 2= Luminal B
 - 3= Superexpressão de HER2
 - 4= Triplo negativo
- 4.1. Celularidade:
 - 1= Discreta
 - 2= Moderada
 - 3= Acentuada
- 4.2. Coesão celular:
 - 1= Pouca
 - 2= Moderada
 - 3= Acentuada
- 4.3. Necrose:
 - 1= Presente
 - 2= Ausente
- 4.4. Nucléolo:
 - 1= Inconspícuo
 - 2= Presente
 - 3= Presente e proeminente
- 4.5. Atipia nuclear:
 - 1 = Ausente
 - 2= Discreta
 - 3= Moderada
 - 4= Intensa

6.2. Planilha do *tissue microarray* (TMA)

Observador: () 1 () 2

TMA PLANO ____

Número do caso	E-caderina	Ki67	RE	RP	HER2

6.3. Comitê de ética



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 27 de Fevereiro de 2014

Of. 23/2014-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª Rozany Mucha Dufloth
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu


Cara Prof^ª Rozany,

Em relação ao Projeto de Pesquisa (Protocolo 4117-2012) "Análise da relevância clínica da classificação histológica dos carcinomas da mama de tipo lobular e ductal e sua relação com a classificação molecular de tipo luminal" coordenado por Vossa Senhoria e aprovado por este CEP em 07/05/12, informo que foi AUTORIZADA a inclusão de 01 sub-projeto à saber:

Título: "Critérios citológicos associados ao fenótipo luminal do carcinoma de mama"
Autor: Rafael Bispo Paschoalini
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rozany Mucha Dufloth
Título Acadêmico: Mestrado

Ao final do projeto é necessário apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP