

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

*EXPRESSÃO DE CITOCERATINAS DE PADRÃO BASAL
(CK5/6), LUMINAL (CK8/18) E ACTINA DE MÚSCULO LISO
(1A4) EM CARCINOMA DE MAMA.*

*Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime
cirúrgico.*

WILLIAM DAVILA DELGALLO

*Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP,
para obtenção do título de Doutor.*

ORIENTADOR: Dr. José Ricardo P. Rodrigues

*BOTUCATU - S.P.
2007*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Delgallo, William Davila.

Expressão de citoceratinas de padrão basal (CK5/6), luminal (CK8/18) e actina de músculo liso (1A4) em carcinoma de mama. Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico / William Davila Delgallo – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: José Ricardo Paciência Rodrigues

Co-orientador: Cléverson Teixeira Soares

Assunto CAPES: 40101045

1. Mamas - Câncer - Cirurgia

CDD 616.9947

Palavras chave: Actina de músculo liso; Câncer de mama; Citologia de inclusão; Citoceratinas padrão basal e luminal; Citopatologia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferenciação da célula progenitora (CK5+).....	47
Figura 2	PAAF para citoinclusão.....	51
Figura 3	Parafina citoinclusão e coloração HE.....	51
Figura 4	Citoinclusão: (a) HE (400X); (b) Expressão fraca e focal para Ck8/18 (100X); (c) Positiva para Ck5/6 (400X).....	54
Figura 5	Citoinclusão: (a) HE (40X); (b) Expressão forte e difusa para Ck8/18 (200X); (c) Negativa para Ck5/6 (400X).....	55
Figura 6	Espécime cirúrgico (a, b e c): (a) carcinoma neuroendócrino de pequenas células com extensa necrose, HE (100X); (b) detalhe em maior aumento (200X) e (c) positividade focal para 1A4 (400X). Citoinclusão (d, e e f): (d)HE (40X); (e) detalhe em maior aumento (200X) e (f) positividade focal para 1A4 (100X).....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia de CK5/6 na citoinclusão.....	61
Gráfico 2	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia de CK8/18 na citoinclusão.....	61
Gráfico 3	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia de 1 ^A 4 na citoinclusão.....	62
Gráfico 4	Porcentagem de Falso-Positivos e Falso-Negativos.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Distribuição dos casos de acordo com os tipos tumorais.....	60
Tabela II	Valores (%) de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de CK5/6, CK8/18 e 1A4 entre citoinclusão e espécime cirúrgico.....	62
Tabela III	Número de verdadeiro-positivos, verdadeiro-negativos, falso-positivos e falso-negativos entre citoinclusão e espécime cirúrgico.....	63
Tabela IV	Índice de concordância kappa (k) e intervalo de confiança para expressão de citoceratinas CK5/6 no espécime cirúrgico e citoinclusão.....	64
Tabela V	Índice de concordância kappa (k) e intervalo de confiança para expressão de citoceratinas CK8/18 no espécime cirúrgico e citoinclusão.....	64
Tabela VI	Índice de concordância kappa (k) e intervalo de confiança para expressão de citoceratinas 1A4 no espécime cirúrgico e citoinclusão.....	65
Tabela VII	Expressão concomitante de CK5/6 e CK 8/18 em material de citoinclusão.....	65
Tabela VIII	Expressão concomitante de CK5/6 e 1A4 em material de citoinclusão.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CK	Citoceratinas
E	Especificidade
FP	Falso-positivo
FN	Falso-negativo
FNA	Fine needle aspiration
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Intervalo de confiança
IQ	Imunoistoquímica
IHC	Imunohistochemistry
K	Kappa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção aspirativa de agulha fina
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
S	Sensibilidade
SERMS	Moduladores seletivos de receptor de estrógeno
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

SUMÁRIO

I	Revisão de Literatura.....	12
	Referências Bibliográficas.....	26
II	Expressão de citoceratinas de padrão basal (CK5/6), luminal (CK8/18) e actina de músculo liso (1A4) em carcinoma de mama. Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico.....	37
	Resumo.....	39
	Abstract.....	42
	Introdução.....	45
	Casuística e Métodos.....	49
	Resultados.....	59
	Discussão.....	67
	Conclusão.....	73
	Referências Bibliográficas.....	75
III	Anexos	
	1- Cálculos da sensibilidade e falso- negativos.....	80
	2- Cálculos de especificidade e falso-positivos.....	81
	3- Cálculo do valor preditivo positivo.....	82
	4- Cálculo do valor preditivo negativo e acurácia.....	83
	5- Valores de Kappa e força de concordância.....	84
	Lista de Figuras.....	85
	Lista de gráficos.....	86
	Lista de Tabelas.....	87
	Lista de Abreviaturas.....	88
	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	89

REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama é provavelmente a patologia que maior temor causa às mulheres, por ser de frequência elevada e pelos efeitos que causa em nível psicológico, afetando sua sexualidade e a própria imagem pessoal¹. Essa patologia está se tornando cada vez mais freqüente em todas as partes do mundo, sendo considerada o segundo tipo de neoplasia maligna mais incidente e o primeiro entre os cânceres ginecológicos^{1,2}.

Segundo estudos epidemiológicos a estimativa para o ano de 2005 foi de 211.250 casos novos e 40.410 mortes pela doença nos Estados Unidos³. No Reino Unido é o tipo de câncer mais comum

entre as mulheres⁴. Nos países em desenvolvimento são diagnosticados mais de 50% dos casos mundiais de câncer de mama⁵. No Brasil, a estimativa para o ano 2006 foi de 48.930 casos novos, com risco estimado de 71 mulheres para cada 100.000 na região sudeste¹. No Brasil, assim como no mundo, o câncer de mama é a primeira causa de morte de mulheres entre 35 e 54 anos^{1,6,7}. Na população mundial, a sobrevivência em cinco anos após o diagnóstico da referida doença é em torno de 61%¹.

O aumento na incidência do câncer de mama provavelmente está associado à maior expectativa de vida da população, tanto nos países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento⁵. São fatores de risco: sexo, idade, fatores hormonais, obesidade, consumo de álcool, baixa paridade, primeira gestação tardia^{8,9,10,11}, assim como antecedentes pessoais de câncer de mama¹² e familiar¹³.

Fatores que aumentam o risco para o câncer de mama:

Sexo

O câncer de mama têm uma incidência rara nos homens, sendo de um caso para cada cem mulheres acometidas pela doença^{14,15}. A mulher americana têm um risco de 12,5%, ou seja uma a cada oito, de desenvolver o câncer de mama até os 85 anos, com um risco de morte de 3,4%¹⁶.

Idade

Mulheres com idade entre 35 e 65 anos têm um risco maior para o desenvolvimento do câncer de mama, e ocorre um aumento de risco com o progredir da idade, sendo que aos 60 anos, 17 em cada 100 mulheres podem vir a ter esse tipo de câncer num período de 5 anos¹⁵.

Fatores hormonais

A exposição endógena ou exógena ao estrógeno e progesterona tem uma associação importante com a patologia, pois são estes hormônios que promovem a atividade mitótica no tecido mamário¹⁷. Assim, quanto maior o estímulo hormonal, maior a probabilidade do aparecimento de câncer de mama, como a menarca precoce, menopausa tardia, obesidade, primeira gestação após 35 anos, uso de terapia hormonal e utilização de anticoncepcionais orais^{17,18}.

Quando a primeira menstruação ocorre antes dos 12 anos, tem-se observado um maior risco para o câncer de mama,

principalmente em países desenvolvidos, podendo chegar a 50% a mais do que as que tiveram a menarca com 15 anos ou mais¹³. No caso da menopausa tardia, a exposição prolongada aos hormônios contribui para o aumento do risco. Estima-se que mulheres que entraram na menopausa antes dos 45 anos tenham metade do risco para o câncer de mama quando comparado com as menopausadas acima dos 55 anos¹⁹. Para cada ano de atraso do início da menstruação, o risco diminui em 5% e para cada ano de atraso da menopausa, o risco aumenta em 3%¹⁵. Alguns estudos mostram estímulo estrogênico em células tumorais in vitro e menor incidência do tumor nas mulheres submetidas a ooforectomia bilateral, adrenalectomia ou usuárias de terapia anti-estrogênica⁷. O uso de terapia hormonal está associado a um maior risco para o câncer de mama, especialmente naquelas acima de 60 anos recebendo tratamento hormonal, provavelmente pela ação destes na atividade mitótica do tecido glandular^{17,20}. As mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal por mais de 5 anos, com estrogênio isolado ou associado a progestágeno têm um risco significativamente mais elevado quando comparado com as mulheres sem terapia hormonal. Esse risco é tempo dependente, ou seja diminui após a parada da sua utilização^{17,21}. Quanto à progesterona, alguns autores acham que esta pode exercer efeito protetor e outros que poderia agir como um potencializador, pois a maior concentração de progesterona ocorre na fase lútea quando há maior atividade proliferativa na mama⁷.

Obesidade

Mulheres obesas apresentam níveis estrogênicos mais elevados, observado-se um aumento na incidência de câncer de mama nas menopausadas obesas, em torno de 50% maior do que nas não obesas¹⁷.

Álcool

Parece haver associação entre a ingestão de álcool e o câncer de mama e estudo caso-controle mostrou ser dose dependente, ou seja, a medida que aumenta a ingestão diária, aumenta o risco para o desenvolvimento da doença^{11,13}.

História reprodutiva

A nuliparidade tem sido associada a fator de risco para o câncer de mama, assim como as mulheres que tiveram o primeiro filho após os 35 anos. Estas apresentam um risco duas vezes maior, quando comparadas às que o fizeram antes dos 20 anos¹³. As mulheres que tiveram uma gestação levada a termo antes dos 20 anos, têm uma diminuição de 30% no risco de desenvolver a doença¹⁷.

Antecedente pessoal de câncer de mama

Mulheres com câncer de mama têm cinco vezes mais risco para um novo câncer de mama contralateral, apresentando também maior risco para o câncer de endométrio, ovário e cólon quando comparado com as sem antecedente pessoal da patologia²².

O antecedente de carcinoma lobular in situ também aumenta o risco, assim como as hiperplasias atípicas o aumentam em duas vezes¹².

Antecedente familiar

O antecedente familiar de primeiro grau, ou seja, se a mãe ou irmã teve câncer de mama, aumenta o risco relativo em duas vezes em relação às que não apresentam antecedentes¹³, embora os fatores ambientais pareçam contribuir com o aumento da suscetibilidade a tal tipo de câncer, pois quando são estudadas pacientes migrantes oriundas de países com baixo risco para esse câncer, para locais onde o risco é maior, observa-se elevação neste risco¹⁷. As células geneticamente alteradas são mais suscetíveis aos efeitos produzidos por fatores ambientais¹⁸.

Câncer de mama hereditário

Aproximadamente 5 a 10% dos cânceres de mama têm uma base hereditária, sendo todos autossômicos dominantes e a maioria bilateral²³.

Os genes BRCA1 e BRCA2 são supressores de tumor e quando alterados associam-se, a um risco maior de desenvolver câncer de mama e de ovário²⁴.

O BRCA1 é responsável por 30 a 40% de todo câncer de mama hereditário e foi mapeado no cromossomo 17q. Quando essa alteração é evidenciada, a mulher tem 85% de risco de desenvolvê-lo durante a sua vida, distribuídos de acordo com a

idade. Nas mulheres com 50 anos, o risco associado para o câncer de mama é 50%, já aos 70 anos esse chega a 87%; enquanto que nas mulheres com BRCA1 normal, o risco é de 2% aos 50 anos e 7% aos 70 anos^{25, 26}.

O BRCA2 foi mapeado no cromossomo 13q, estando associado com início precoce de câncer de mama nas mulheres^{26,27}. Algumas mutações específicas de BRCA2 como a 6174de1T e 999de115 estão presentes respectivamente nos judeus e nos islandeses, sendo a frequência nos primeiros menor do que o BRCA1, em torno de 1%, enquanto que no segundo grupo são responsáveis por 40% dos casos de câncer de mama masculino ocorridos na Islândia²⁸.

Métodos citopatológicos aplicados à avaliação do tumor

Histórico da citologia de mama

Em 1853, James Paget foi o primeiro a utilizar a punção aspirativa para o exame de tumores de mama²⁹. Em estudo clássico, de MARTIN e ELLIS, em 1930, sobre o uso da punção biópsia aspirativa por agulha fina (PAAF) para o diagnóstico em lesões tumorais deu início às pesquisas neste campo³⁰. Fred Stewartem (1933) e Martin & Ellis (1934), publicaram outros estudos sobre a PAAF, mas esses não ganharam aceitação por várias razões, uma das quais foi a preocupação da disseminação do tumor através da punção. Alguns casos em que se detectou o crescimento do tumor no trajeto da agulha foram muito influentes, provavelmente porque as agulhas utilizadas eram de maior calibre³⁰. Em 1968, após estudos cuidadosos, o procedimento foi reintroduzido, renovando-se o interesse pela PAAF nos E.U.A. e em outras partes do

mundo³¹. A PAAF da mama é um procedimento rápido e de baixo custo, quando comparado com a biópsia cirúrgica da mama.

A análise de 498 casos com lesões palpáveis de mama, mostrou uma alta correlação entre os resultados de citologias mamárias, mamografia e exame clínico da paciente³². Outro estudo, com 1321 pacientes submetidas a PAAF, mostrou uma sensibilidade (S) de 94,0% e especificidade (E) de 99,3%, assim como um valor preditivo positivo (VPP) de 98,7% e valor preditivo negativo (VPN) de 96,8%. Os casos falso-positivos (FP) corresponderam a 0,4%, justificando-se como imaturidade do responsável pela interpretação, pois ocorreram nos primeiros anos do referido estudo. Já os casos falso-negativos (FN) ocorreram em 2,1% desta casuística³³.

A avaliação de um grupo de 366 pacientes com câncer de mama, em que 58 deles foram diagnosticados através da PAAF e 308 por biópsia a céu aberto, mostrou no seguimento, que após cinco anos, 94% das submetidas à PAAF estavam livres de doença local ou a distância enquanto que nas que foram submetidas à biópsia foi de 86%, demonstrando que a PAAF não afeta a recidiva de doença local ou a distância como se questionou na década de 30, quando MARTIM e ELLIS publicaram os primeiros trabalhos³⁴. Dois casos de aparecimento de tumor no trajeto da agulha foram relatados em um grupo de 47 punções realizadas com agulha calibre 19 (40mm), mas aqui é importante atentar para o fato de

que a agulha calibre 19 (40mm) não é hoje considerada fina para o procedimento de PAAF³⁵.

Em correlação cito-histológica de 1.472 casos, a análise estatística demonstrou sensibilidade do método em 89,9% e especificidade de 99,3%. Neste estudo houve um caso falso-positivo, porém a paciente não foi submetido à cirurgia mutiladora de mama por apresentar correlação clínico-mamográfica discordante. Foi concluído que a especificidade do método é tão alta quanto boa, sendo um método de rápido diagnóstico e baixo custo, pelo qual pode-se ter uma melhor preparação da paciente no pré-operatório, evitando-se o trauma psicológico da mastectomia com congelação e ressaltando, ainda, que a experiência do clínico e/ou patologista é essencial na coleta do material³⁶.

Outro estudo com 1.398 PAAF de mama realizadas num período de 5 anos, das quais 450, ou seja, 32% tiveram seguimento histológico, demonstrando sensibilidade de 93,49% e especificidade de 95,73%³⁷.

Outros ratificaram a alta sensibilidade e especificidade da PAAF no diagnóstico de lesões mamárias de nódulos palpáveis e não palpáveis guiado por ultrassonografia^{38,39,40}.

A PAAF, além de ser um excelente método para se diferenciar patologias malignas e benignas, pode também nos fornecer dados morfológicos do tumor, bem como, material suficiente para estudos por imunohistoquímica (IQ), citometria de

fluxo e técnicas de biologia molecular^{41,42}, podendo ser empregada para o diagnóstico de lesões benignas e malignas, nos diversos órgãos^{43,44,45}.

Através da PAAF pode-se obter material para confecção da citoinclusão. Este pode ser retirado do próprio material obtido na PAAF ou de material raspado de esfregaços muito espessos, sendo, em seguida, fixado e processado de forma semelhante aos cortes histológicos do material cirúrgico^{46,47}.

CITOINCLUSÃO COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO

A citologia de inclusão foi avaliada em vários estudos e mostrou alta sensibilidade e especificidade em vários tipos de neoplasias de diversos órgãos^{48,49,50}. Entretanto, apesar de ser obtida a partir de material da PAAF tem maior aplicabilidade na realização de IQ entre os variados tipos de tumores^{45,48}. O material obtido por PAAF para confecção da citoinclusão é processado igualmente ao espécime cirúrgico e permite a realização de múltiplos cortes e a utilização de amplo painel de marcadores imunoistoquímicos, fornecendo dados importantes dos tumores, tanto sobre a morfologia dos mesmos quanto da possibilidade de uso de IQ para pesquisa de fatores prognósticos e preditivos^{51,52,53}. Através da IQ realizada em material de citoinclusão, pode-se obter dados quanto a expressão de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e Her2-neu, marcadores importantes para o tratamento do câncer de mama⁵⁴.

Os receptores de estrógeno são subdivididos em alfa e beta, estando presentes em células do estroma e de glândula mamária, assim também como em outros órgãos^{55,56,57}. O receptor alfa é positivo em torno de 80% dos tumores de mama e quando presente está associado ao crescimento mais lento do tumor e melhor prognóstico^{55,56,57}. No entanto, sua ausência indica tumores mais agressivos, de crescimento rápido e geralmente pacientes com uma menor sobrevida livre de doença⁵⁸. O receptor beta parece estar envolvido como modulador da resposta do receptor alfa, reduzindo a proliferação celular⁵⁸. Além de estar envolvido neste processo, o receptor de estrógeno também é importante para que se possa prever e empregar o tratamento com endócrinoterapia^{55,56,57,58}. Os SERMS (moduladores seletivos do receptor de estrógeno) antagonizam o efeito estrogênico no tecido mamário competitivamente⁵⁹. O tamoxifeno é ainda hoje o mais utilizado, embora a literatura também se refira ao fulvestrant como um anti-estrogênico esteroide como alternativa no tratamento do câncer de mama, assim como os inibidores da enzima aromatase, anastrozol e letrozol, envolvida na síntese de estrógeno⁵⁹. Existe uma concordância em torno de 50% quanto à positividade de Her2neu e receptor de estrógeno, sendo observada uma inadequada resposta à hormonioterapia neste grupo^{60,61}. O gene Her-2/neu é um protooncogene codificado no cromossomo 17q21, que têm importante valor preditivo e de prognóstico no câncer de mama^{62,63,64}. Na superexpressão do Her-2neu, ocorre um

descontrole do crescimento celular, o que favorece o aparecimento de vários tumores, inclusive o carcinoma de mama, mostrando que a alta positividade de Her-2neu está relacionada à agressividade do tumor, assim como sua atividade metastática⁶³. Pacientes com Her-2neu positivo apresentam uma diminuição no tempo de sobrevida⁶⁵ e resistência a quimioterápicos geralmente utilizados na terapêutica do câncer de mama, como a ciclofosfamida e 5-fluorouracil⁶⁴ e maior sensibilidade aos antracíclicos^{66,63,60}. Os tumores com superexpressão de Her-2neu, associado àqueles que expressam positividade para citoceratinas de alto peso molecular (CK5/6), apresentam pior prognóstico com maior agressividade^{67, 68}.

A IQ permite também a avaliação de citoceratinas (CK) de alto peso molecular (CK5/6 e 14/17) de padrão basal às de baixo peso molecular, padrão luminal tipo (CK8/18), e marcadores de células mioepiteliais basais, actina de músculo liso. (1A4), proteína S100, calponina e p63⁶⁹.

Estudos para avaliação de células progenitora ("stem-cell") em tecido mamário, mostram expressão diferenciada de citoceratinas de padrão basal, luminal e marcadores de células de músculo liso na região da transição ducto lobular terminal, local de origem de mais de 90% dos carcinomas de mama⁶⁹. A avaliação destas células progenitoras (stem-cell) demonstrou serem citoceratina 5 positivas, que sofrem diferenciação tanto para o padrão glandular com expressão final de citoceratinas de padrão

luminal (Ck8/18) ou mioepitelial com expressão de marcadores de células basais mioepiteliais (1A4, p63, calponina e proteína S-100)^{70,71,72}.

Neste ponto de vista, os carcinomas de mama podem ser classificados em cinco subtipos moleculares identificados por imunohistoquímica usando-se marcadores para citoceratinas, receptor de estrógeno e Her2-neu^{67,69}. O padrão luminal A, expressa positividade para receptor de estrógeno e Her2-neu negativo. O luminal B expressa receptor de estrógeno positivo e Her2-neu positivo. O terceiro subtipo é o que superexpressa o Her2-neu e também é receptor de estrógeno positivo. O tipo basal tem positividade para CK 5/6, receptor de estrógeno negativo e Her2-neu negativo e o último subtipo é chamado de “null” por ter ausência desses marcadores^{67,68,70,71,72}. Os subtipos basal e hiperexpressão de Her2-neu são carcinomas de alto grau histológico, com alto índice de proliferação, estadiamento mais avançado; com diminuição da sobrevida e sobrevida livre de doença, bem como apresentam menor resposta à quimioterapia convencional⁶⁷. Talvez o tratamento com quimioterapia neoadjuvante em casos como esse possa evidenciar uma melhor resposta no tratamento global da paciente. Alguns dados de literatura mostram em torno de 30% de regressão completa do tumor, com uma taxa de 100% de sobrevida livre de doença para o estágio I, 82% para o estágio IIA e 61% no estágio IIIB⁷³.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1- Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde. Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional, vol 3. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2003; [citado em 25 de outubro de 2005]. Disponível em: [http// www. Inca.gov.Br/regpop/2003](http://www.Inca.gov.Br/regpop/2003).

2- Pöhls UG, Renner SP, Fasching PA, Lux MP, Kreis H, Ackermann S, et al. Awareness of breast cancer incidence and risk factors among healthy women. *Eur J of Can Prev.* 2004;13 (4): 249-56.

3- Simon MS, Korczak JF, Yee CL, Malone KE, Ursin G, Bernisten L, et al. Breast cancer risk estimates for relatives of white and african american women with breast cancer in the women's contraceptive and reproductive experiences study. *J Clinl Oncol.* 2006; 24(16): 2498-504,.

4- Nunes FLS. Esquema de diagnóstico auxiliado por computador para detecção de agrupamentos de microcalcificações por processamento de imagens mamográficas [dissertação]. São Carlos (SP): USP. Curso de Engenharia de São Carlos; 1997.

5- Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, Odicino F. Cancer in woman. *Int J Gynecol and Obst.* 2003; 82(3): 369-79.

6- Wunsch FV, Moncau JE. Cancer mortality in Brazil 1980-1995: regional patters and trends. *Rev Assoc Med Bras.*2002; 48 (3): 250-7.

- 7- Benschushan A, Brzezinski A. hormonal manipulations and breast cancer. *Obstet Gynaecol Surv.* 2002; 57 (5): 314-23.
- 8- Robert SA, Strombom I, Trentham-Dietz A, Hampton JM, McElroy JA, Newcomb PA, et al. Socieconomic risk factors for breast cancer distinguishing individual-and community-level effects. *Epidemiology.* 2004; 15 (4): 442-50.
- 9- Euhus DM. Breast cancer prevention in the 21st century: Defining the challenge. *Breast J.* 2006; 12 (2): 97-8
- 10- Ursin G, Longnecker MP, Haile RW, Greenland S. A meta-analysesof body mass index and risk of premonopausal breast cancer. *Epidemiology.*1995; 6: 137-41.
- 11- Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer. *Cancer Causes Control.* 1994; 5: 73-82.
- 12- Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease end atypical hyperplasia. *Cancer.* 1993; 71: 1258-65.
- 13- Tessaro S. Epidemiologia do câncer de mama. In: Boff RA. *Mastologia aplicada: abordagem multidisciplinar.* 1^a edição. Caxias do Sul: EDUCS; 2001. p.15-28.
- 14- Mant D, Vessey MP. Epidemiologia e prevenção do cancer de mama. In: Bland KI, Copeland EM. *A mama: tratamento compreensivo das doenças benignas e malignas.*1^a edição. São Paulo: Manole, 1994. p 265-78.

15- Bilimoria MM, Morow M. The woman at increased risk for breast cancer: evolution and management strategies. *CA Cancer J Clin.* 1995; 45: 263-78.

16- Willett WC, Rockhill B, Hankinson SE, Hunter BJ, Colditz GA. Epidemiologia e causas não genéticas do câncer de mama. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Doenças da mama.* 2ª edição. Belo Horizonte (MG): Medsi, 2002. p.205-59.

17- Key TJ, VerKasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2 (3): 133-40.

18- Vogel VG, Taioli E. Have we found the ultimate risk factor for breast cancer?. *J Clinl Oncol.* 2006; 24 (12): 1791-4.

19- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl cancer Inst.* 1972; 48: 605-13.

20- Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willet WC, Manson JE, Stampfer MJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Engl J Med.* 1995; 332: 1589-93.

21- Gertig DM, Fletcher AS, English DR, Macinnis RJ, Hopper JL, Giles GG. Hormone therapy and breast cancer: what factors modify the association?. *Menopause.* 2006; 13 (2): 178-84.

22- Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New Engl J Med.* 1985; 312: 146-51.

- 23- Greene MH. Genetics of breast cancer. Mayo Clin Proc. 1997; 72 (1): 54-65.
- 24- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and Beyond. . Nature Reviews Cancer. 2004; 4 (9): 665-76.
- 25- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutatin carries Breast cancer Linkage Consortium. Lancet. 1994; 343: 692-95
- 26- Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. New Engl J Med. 2003; 348 (23): 2339-47.
- 27- Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R, et al. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. New Engl J Med. 1997; 336: 1416-21.
- 28- Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavpiggian SV, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer familes from Iceland with varied cancer. Nat Genet.1996; 13: 117-19.
- 29- Bales EC. Laboratoy Techniques. In: Koss LG, editor. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins; 2005. p.1569-634.
- 30- Wilkinson EJ, Franzine DA, Masood S. Amostragem citológica da mama por agulha: técnicas e resultados finais. In: Bland KI, Copeland EM. A mama: tratamento compreensivo das doenças benígnas e malignas. 1ª edição. São Paulo: Manole, 1994. p.541-66.

- 31- Franzen S, Zajicek J. Aspiration biopsy in diagnosis of palpable lesions of the breast: critical review of 3479 consecutive biopsies. *Acta Radiol.* 1968; 7 (4): 241-62
- 32- Costa MJ, Tadros T, Hilton G, Birdsong G. Breast fine needle aspiration cytology: utility as a screening tool for clinically palpable lesions. *Acta Cytol.* 1993; 37 (4): 461-71.
- 33- Guimarães EM, Fernandes PC, Cervilha N, Oliveira DF, Alcantara TN, Menezes FC. Punção com agulha fina: resultados e dificuldades. *J Bras. Patol.* 1996; 32 (4): 153-60.
- 34- Taxin A, Tartter PI, Zappetti D. Breast cancer diagnosis by fine needle aspiration and excisional biopsy. *Acta Cytol.* 1997; 41 (2): 302-6.
- 35- Grabau DA, Andersen JÁ, Graversen HP, Dyreborg U. Needle biopsy of breast cancer: appearance of tumour cells along the needle track. *Eur J Surg Oncol.* 1993; 19 (2): 192-4.
- 36- Feitcher GE, Haberthur F, Gobat S, Dalquen P. Statistical analysis and cytohistologic correlations. *Acta Cytol.* 1997; 41 (2): 327-32.
- 37- Dominguez F, Riera JR, Tojo S, Junco P. Fine needle aspiration of breast masses: an analysis of 1398 patients in a community hospital. *Acta Cytol.* 1997; 41 (2): 341-7.
- 38- Shah SH, Kayani N, Hasan SH, Soonro IN, Pervez S, Hussainy AS. Diagnostic evaluation of fine needle aspiration cytology in the management of palpable breast lesions. *J Pak Med Assoc.* 1998; 48 (1): 7-8.

- 39- Klijanienko J, Côté JF, Thibault F, Zafrani B, Meunier M, Clough K, et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of nonpalpable breast lesions: Institut Curie's experience with 198 histologically correlates cases. *Cancer*. 1998; 84 (1): 36-41.
- 40- Reis-Filho JC, Andrade JM, Velludo MASL, Oliveira AS, Feitosa RB, Marana HRC, et al. Punção biópsia aspirativa (PBA) com agulha fina no diagnóstico diferencial de patologias da mama. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1998; 20 (4): 209-13.
- 41- Schmitt, FC.; Soares, R.; Cimes, L.; Seruca, R. PCR Amplication of DNA Obtained From Archived Hematoxylin-Eosin- and Giemsa-Stained Breast Cancer Aspirates. *Diagnostic Cytopathology*.1998; 19(5) 395-7.
- 42-Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell clock immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J Clin Pathol*. 2000; 53 (6): 451-7.
- 43- Fröstad B, Martinsson T, Tani E, Falkmer U, Darnfors C, Skoog L, et al. The use of fene needle aspiration cytology in the molecular characterization of neuroblastoma in children. *Cancer*.1999; 87(2): 60-68.
- 44- de Boer WB, Segal A, Frost FA, Sterrett GF. Can CD34 discriminate between benign and malignant hepatocytic lesions in fine needle aspirates and core biopsies?. *Cancer*. 2000; 90 (5): 273-8.

45- - Wu M, Szporn AH, Zhang D, Wasserman P, Gan L, Miller L, et al. Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. *Diagn Cytopathol*. 2005; 33(4): 223-7.

46- Kulkarni MB, Prabhudesal NM, Desai SB, Borges AM. Scrape cell-block technique for needle aspiration cytology smears. *Cytopathology*. 2000;11: 179-84.

47- Hudock JA, Hanau CA, Chirsten R, Bibbo M. Expression of estrogen and progesterone receptors in cytologic specimens using various fixatives. *Diagn Cytopathol*. 1996; 15(1): 78-83.

48- Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell-block preparations. *Cancer*. 2004; 102(2): 109-14.

49- Levine PH, Joutovsky A, Cangiarella J, Yee H, Simsirr A. CDX-2 expression in pulmonary fine-needle aspiration specimens: a useful adjunct for the diagnosis of metastatic colorectal adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2006; 34(3): 191-5.

50- Lee BH, HechtnJL, Pinkus JL, Pinkus GS. WT1, estrogen, receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117(5): 745-50.

51- Briffod M, Hacene K, Le Doussal V. Immunohistochemistry on Cell Blocks From Fine-Needle Cytopunctures of primary Breast Carcinomas and Lymph Node Metastases. *Modern Pathology*. 2000; 13(8): 841-50.

- 52- Mayall F, Chang B, Darlington A. A Review of 50 consecutive cytology cell block preparations in a large general hospital. *J Clin Pathol.* 1998; 50 (12): 985-90.
- 53- Vesoulis Z, Rajappannair L, Define L, Beach J, Schnell B, Myers S. Quantitative image analysis of estrogen receptor in breast fine needle aspiration biopsies. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004. 26 (6): 323-30.
- 54- Bueno SP. Receptores hormonais e Her2-neu em câncer de mama. Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico [dissertação]. Botucatu (SP): UNESP. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2007.
- 55- Visvader JE, Lindeman GJ. Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35 (7): 1034-51.
- 56- Keen JC, Davidson NE. The Biology of Breast Carcinoma. *Cancer* . 2003; 97(3) 825-33.
- 57- Doisneau-Sixoul SF, Sergio CM, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells endocrine-Related. *Cancer* 2003; 10 (2): 179- 86.
- 58- Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, et al. The expression and function of estrogen receptor α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer.* 2003; 10 (2): 193-202.
- 59- Jordan VC.; Osipo C.; Fox JE.; Cheng D.; Liu H. Changing role of the estrogen receptor in the life and death of breast cancer cells. *Breast.* 2003; 12: 432-41.

60- Hayes D, Thor AD. C-erb-2 in Breast Cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol.* 2002; 29 (3): 231-45.

61- Nahleh ZA.; Jazieh AR. Multitargeted therapy in estrogen receptor- positive human epidermal growth factor receptor-2 positive breast cancer. *American Journal of Clinical Oncology* 28 (6): 631-633, 2005.

62- Walker RA. The significance of histological determination of HER-2 status in breast cancer. *Breast.* 2000; 9: 130-33.

63- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER 2. *Annals of Oncology.* 2001; 12(1): S3-8.

64- Bozzetti CB, Musolino A, Camisa R, Bisagni G, Flora M, Bassano C, et al. Evaluation of Her-2/Neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline based chemotherapy in primary breast cancer. The role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol.* 2006; 29(2): 171-7.

65- Faló C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A. Algorithm for the Diagnosis of HER-2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26 (5): 465-70.

66- Massod S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microscopy Research and Technique.* 2002; 59 (2): 102-8.

67- Torsten ON, Forrest DH, Kristin J, Maggie C, Gamze K, Zhiyuan H, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Resear.* 2004; 10: 5367-74.

68- Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Oncol Pathol*. 2006; 59 (7): 729-35.

69- Petersen OW, Gudjonsson T, Villadsen R, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Proliferation*. 2003; 36 (1): 33-44.

70- Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Proliferation*. 2003; 36 (1): 73-84.

71- Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Diest PJV, Dervan P, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept. *Labortat Investig*; 2002, 82 (6): 737-45.

72- Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Maia D, Jackson S, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Human Pathol*. 2007; 38: 197-204.

73- Trimble EL, Ungerleider RS, Abrams JA, Kaplan RS, Feigal EG, Smith MA, et al. Neoadjuvant therapy in cancer treatment. *Cancer*; 1993, 72 (11): 3515-24.

EXPRESSÃO DE CITOCERATINAS DE PADRÃO BASAL (Ck5/6), LUMINAL (Ck8/18) E ACTINA DE MÚSCULO LISO (1A4) EM CARCINOMA DE MAMA. Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico.

William Davila Delgallo, MD¹

José Ricardo Paciência Rodrigues, MD²

Cleverson Teixeira Soares, MD³

1- Pós-Graduando. Curso de Pós-Graduação em Mastologia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP- Botucatu, São Paulo – Brasil.

2- Professor Assistente Doutor – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo – Brasil.

3- Patologista. Departamento de Anatomia Patológica e Doutor em Patologia do “Instituto Lauro de Souza Lima” – Bauru, São Paulo – Brasil.

Palavras Chave: Actina de músculo liso; Câncer de mama; Citologia de inclusão; Citoceratinas padrão basal e luminal; Citopatologia.

*Trabalho apresentado de acordo com as normas da revista Cancer Cytopathology.

Endereço para correspondência:

William Davila Delgallo

Rua: Nilo Peçanha, 3-72 Bauru – S.P CEP: 17051-130

Telefone: com (14) 3223-6211 res: (14) 3227-1697

E-mail: wi.delgallo@uol.com.br

RESUMO

Introdução/objetivos: Estudos de expressão gênica têm identificado vários grupos moleculares de carcinoma de mama, com diferentes comportamentos clínico e biológico. A correlação entre “cDNA microarray” e imunohistoquímica(IQ) com marcadores para citoceratinas, Her2/neu, receptor de estrógeno(RE) e de células basais mioepiteliais (1A4, S-100 e p63), identificaram cinco grupos: (1) luminal A (RE+; Her2/neu-), (2) luminal B (RE+; Her2/neu+), (3) superexpressão de Her2/neu (RE-; Her2/neu+), (4) tipo basal (RE-; Her2/neu-; Ck 5/6 +) e (5) nenhum destes (“null”). Os de tipo luminal expressam citoceratinas de padrão luminal (Ck8/18) e os de tipo basal expressam citoceratinas 5/6 e 14 ou marcadores de células basais mioepiteliais. Avaliamos a expressão de Ck5/6, Ck8/18 e 1A4 em material de citoinclusão, comparando-a ao espécime cirúrgico. **Material e Métodos:** Foram selecionados 62 casos, seqüenciais, de carcinoma de mama diagnosticados por PAAF, com citoinclusão e espécime cirúrgico. Cortes de citoinclusão e do espécime cirúrgico foram imunocorados para Ck 5/6, Ck 8/18 e 1A4. **Resultados e Conclusão:** Os valores, em porcentagem, de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo(VPP), valor preditivo negativo(VPN) e acurácia foram, respectivamente: Ck5/6 (77, 100, 100, 92 e 94); Ck8/18 (98, 66, 96, 80 e 95) e 1A4 (92, 96, 85, 98 e 95). Portanto, a identificação de Ck5/6, Ck8/18 e 1A4 por IQ em

material de citoinclusão é método confiável, com resultados muito próximos aos obtidos no espécime cirúrgico e pode contribuir para a classificação dos carcinomas mamários de expressão luminal e basal, fornecendo informações importantes que possam orientar na escolha do tratamento, bem como na avaliação de fatores prognósticos e preditivos.

A importância da obtenção de dados morfológicos e imunoistoquímicos sobre os carcinomas mamários através do material de PAAF é oferecer informações que possam auxiliar na melhor escolha do tratamento quimioterápico, de forma rápida e de baixo custo.

EXPRESSION OF BASAL-LIKE CYTOKERATIN (Ck5/6), LUMINAL (Ck8/18) AND SMOOTH MUSCLE ACTIN (1 A 4) IN BREAST CARCINOMA. Comparative study between cell block and surgical specimen.

Key words: luminal and basal-like cytokeratin, smooth muscle actin; cell block; breast cancer; cytopathology.

ABSTRACT

Introduction/objectives: Genetic expression studies have identified many molecular groups of breast carcinoma, with different clinical and biological behavior. The correlation between cDNA microarray and immunohistochemistry (IHC) with markers for cytokeratin, Her2/neu, estrogen receptor (ER) and of basal myoepithelial cells (1A4, S-100 e p63), identified five groups: (1) luminal A (ER+; Her2/neu-), (2) luminal B (ER+; Her2/neu+), (3) overexpression of Her2/neu (ER- ; Her2/neu+), (4) basal-like (ER- ; Her2/neu-; Ck 5/6 +) and (5) none of them (null). The luminal-like express cytokeratines of luminal pattern (Ck8/18) and the basal-like express cytokeratines 5/6 and 14 or markers of myoepithelial basal cells. We have evaluated the expression of Ck5/6, Ck8/18 and 1A4 in cell block comparing it to the surgical specimen. **Material and Methods:**

62 cases have been selected, sequential, of breast carcinoma diagnosed through fine needle aspiration (FNA), with cell block and surgical specimen. Cuts of cell block and from the surgical specimen were immunostained for Ck 5/6, Ck 8/18 and 1A4. **Results and Conclusion:** The value, in percentage, of sensibility, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy were respectively: Ck5/6 (77, 100, 100, 92 e 94); Ck8/18 (98, 66, 96, 80 e 95) e 1A4 (92, 96, 85, 98 e 95). Therefore, the identification of CK5/6, 8/18 and 1A4 for IHC in cell block is a reliable method, with results very close to the ones obtained in the surgical specimen, and it can contribute to the sub classification of the breast carcinomas of luminal and basal expression, providing important information, which can orientate the treatment choice as well as in the prognostic and predictive evaluation factors.

INTRODUÇÃO

Estudos de expressão gênica têm mostrado vários subtipos moleculares de carcinoma de mama que diferem entre si nos comportamentos clínico e biológico^{1,2}. A correlação entre estudos de “cDNA microarray” e perfil imunohistoquímico em carcinoma de mama, utilizando marcadores para citoceratinas, Her2/neu, receptor de estrógeno e marcadores de células basais mioepiteliais (proteína S-100, actina de músculo liso e proteína p63) identificaram cinco grandes subtipos: (1) luminal A (RE +; Her2/neu -), (2) luminal B (RE +; Her2/neu +), (3) hiperexpressão de Her2 (RE -; Her2/neu +), (4) tipo basal (RE -; Her2/neu -, CK 5/6 e 14 +) e (5) nenhum destes (“null”)^{1,2,3,4,5}. Os subtipos basal e de hiperexpressão de Her2/neu estão associados com carcinoma de alto grau histológico, de alto índice de proliferação, maior estadiamento quando do diagnóstico, diminuição de sobrevida e da sobrevida livre da doença, bem como menor resposta à quimioterapia convencional^{6,7,8}. Dentre os grupos, o subtipo basal tem se mostrado o de curso clínico mais agressivo, devido à ausência de expressão do Her2/neu e de receptores hormonais^{6,7,8,9}.

Os carcinomas de tipo luminal apresentam forte expressão de citoceratinas de padrão luminal (CK8/18) e, geralmente, não expressam citoceratinas de padrão basal (CK5/6 e 14) e/ou marcadores de células basais mioepiteliais (actina de músculo

liso, calponina, proteína S-100 e p63). Os carcinomas tipo basal apresentam positividade fraca ou focal para citoceratinas 8/18 e expressam citoceratinas 5/6 e 14 ou marcadores de células basais mioepiteliais^{1,4,5,6}.

Estudos para avaliação de células progenitoras em tecido mamário de mulheres têm mostrado células com expressão diferenciada de citoceratinas de padrão basal, luminal e marcadores de células de músculo liso na região da transição ducto-lobular, local onde mais de 90% dos carcinomas mamários se originam¹⁰. Os resultados indicam que células progenitoras (stem-cell) são citoceratinas 5 positivo que se diferenciam, posteriormente, tanto para o padrão glandular com expressão de citoceratinas de padrão luminal (CK8/18), quanto para diferenciação mioepitelial com expressão de marcadores de células basais mioepiteliais^{11,12,13}. Também, no processo de diferenciação, há uma população de células intermediárias com expressão tanto de citoceratinas de padrão luminal e basal quanto de marcadores de células mioepiteliais (figura 1). Esses modelos funcionais de células progenitoras tem sido apresentados como explicação para o entendimento e distinção entre os vários padrões de proliferação epitelial intraductal como a hiperplasia ductal usual, as neoplasias “in situ” do tipo ductal e lobular e os vários tipos de carcinomas.

Célula Progenitora

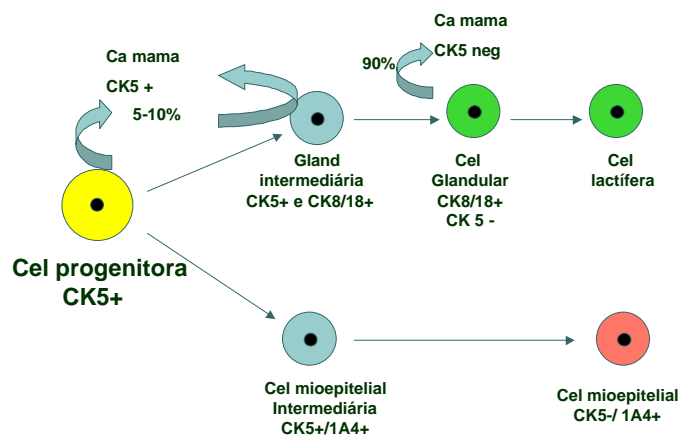


Figura 1 – Diferenciação da célula progenitora (CK5+)

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é método diagnóstico seguro, rápido, de menor custo e pouco agressivo. Quando realizada por pessoas experientes e associada aos dados clínico-radiológicos, permite o diagnóstico preciso das lesões de mama¹⁴. Na análise dos esfregaços, além do diagnóstico de carcinoma de mama, é possível avaliar o seu grau citológico, índice mitótico e presença de necrose. Estudos imunoistoquímicos têm mostrado que a avaliação de receptores hormonais, Her2/neu e índice de proliferação celular (Ki-67) em esfregaços apresentam boa correlação com o espécime cirúrgico^{15,16}. A importância da obtenção de dados morfológicos e imunoistoquímicos sobre os carcinomas mamários através do material de PAAF é oferecer informações que possam auxiliar na melhor escolha do tratamento quimioterápico, de forma rápida e de baixo custo.

No presente estudo, propõe-se comparar o perfil imunoistoquímico no carcinoma de mama em material de

citoinclusão e espécime cirúrgico, através de marcadores para citoceratinas de padrão luminal (Ck8/18), de padrão basal (Ck5/6) e de células basais mioepiteliais (1A4). Os autores desconhecem publicações na literatura sobre o perfil de citoceratinas basal e luminal em material de citoinclusão.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Seleção dos Casos

Foram avaliados 126 casos com diagnóstico de carcinoma de mama por PAAF, que possuíam citoinclusão, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2006, sendo o material obtido dos arquivos do Instituto de Patologia de Bauru-SP e cedido sem dados que permitissem a identificação das pacientes. Destes, foram selecionados 62 casos, após a exclusão daqueles de pacientes submetidas à quimioterapia prévia, material de citoinclusão insuficiente ou sem comprovação histológica de carcinoma. Na inclusão, considerou-se lesões palpáveis e não palpáveis observadas em exames de mamografia e ultra-sonografia. As lesões não-palpáveis foram puncionadas por orientação ultra-sonográfica. Todos os casos foram puncionados por patologistas, com esfregaços corados por Giemsa (Way-Grüwald Giemsa) e hematoxilina-eosina (HE). Dados como sexo, idade, mama e quadrantes acometidos, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos e estadiamento patológico foram obtidos através dos laudos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo-Brasil.

Seleção das lâminas e blocos de parafina

Os 62 casos selecionados apresentavam esfregaços corados por HE e Giemsa e cortes histológicos de material de citoinclusão e do espécime cirúrgico. Foram considerados suficientes os cortes de citoinclusão que apresentavam pelo menos dez campos de grande aumento, preenchidos por células junto a elementos do sangue periférico. Selecionou-se de cada caso, duas lâminas de PAAF, uma corada por HE e outra por Giemsa, uma lâmina e um bloco do material de citoinclusão e uma lâmina e um bloco representativos da lesão do espécime cirúrgico. Procedeu-se, então, cortes histológicos com 4 μ m de espessura dos blocos em parafina e realizou-se as colorações por HE para avaliação dos dados morfológicos e IQ para marcadores de citoceratinas 8/18, citoceratinas 5/6 e actina de músculo liso (1A4).

Preparação prévia do material de citoinclusão e dos esfregaços

As PAAF foram realizadas utilizando-se agulha de calibre 25 x 6 mm. O material foi, em parte, colocado sobre as lâminas para realização dos esfregaços e o que restou no bulbo da agulha e no interior da seringa, foi processado para citoinclusão. Este foi fixado, primeiramente, com aspiração de 1,0 ml de álcool 95 %, seguido, imediatamente, por aspiração de 5,0 ml de solução de formalina 10% tamponada, permanecendo em fixação por um período de 6 a 24 horas. Posteriormente, foi submetido a

processamento histológico com cortes em parafina para colorações por HE e IQ (figuras 2 e 3).



Figura 2 - PAAF para citoinclusão



Figura 3 - Parafina citoinclusão e coloração HE

Em nenhum caso, realizou-se o ato da PAAF para a obtenção exclusiva do material para citoinclusão. Foram realizados, em geral, de 2 a 6 esfregaços por caso, sendo metade corados por HE e metade por Giemsa. Os esfregaços para HE foram fixados em álcool 95% e para Giemsa a seco, em temperatura ambiente.

Reação de Imunoistoquímica

A reação de IQ foi realizada segundo protocolos internacionais¹⁷, pelo método indireto streptavidina-biotina peroxidase (LSAB – Dako, CA/USA), para pesquisa de citoceratinas 8/18 (anticorpo monoclonal anti-humano, clone Can 5.2, Novocastra, VK), citoceratina 5/6 (anticorpo monoclonal anti-humano, clone D5/16 B4, 1/300 - Dako, CA/USA) e actina de músculo liso (anticorpo monoclonal, clone 1A4, 1/300-

Dako,CA/USA), utilizando-se anticorpo isolado, em lâminas separadas, nas diluições especificadas. As lâminas foram incubadas em três banhos de xilol (Synth, Diadema/SP, Brasil), de cinco minutos cada. Posteriormente, foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % em álcool metílico absoluto por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas por 10 minutos em água destilada, sendo então, realizada a reativação antigênica, utilizando-se tampão citrato (pH: 6,0). As amostras foram, então, resfriadas e lavadas em tampão fosfato (pH: 7,6) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram recobertos pelo anticorpo primário anti-citoceratinas e anti-actina de músculo liso, previamente diluídos em tampão TRIS-HCL (pH: 7.6). As amostras foram, na seqüência, levadas para uma câmara úmida, à temperatura de 36-37° C, por uma hora. A seguir, foram lavadas em tampão fosfato, dois banhos por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram incubadas com anticorpos secundários IgG/IgM biotilado (Dako, CA/USA), em câmara úmida por 25 minutos, à temperatura ambiente. Novamente, as amostras foram lavadas por 5 minutos, em dois banhos com tampão fosfato de pH 7,6 e incubadas com conjugado streptavidina-biotina-peroxidase (Dako, CA/USA) por 25 minutos, à temperatura ambiente. Foram novamente lavadas em tampão fosfato, dois banhos por 5 minutos à temperatura ambiente. A revelação colorimétrica foi realizada com 3'-3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio como substrato (Dako, CA/USA).

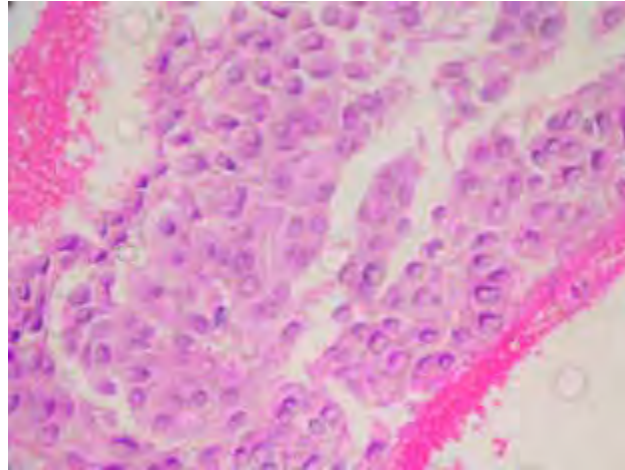
As lâminas foram contra coradas com hematoxilina (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) e montadas com lamínulas e entelan (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Controles negativos e positivos internos e externos de material de carcinoma de mama, conhecidamente negativos e positivos, foram realizados.

Análise Morfológica

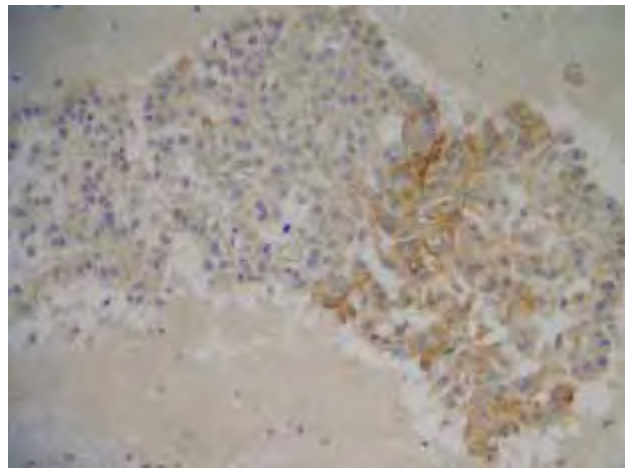
Os casos foram analisados conjuntamente com um patologista, sem conhecimento prévio do diagnóstico. A análise morfológica foi realizada através de microscópio óptico (Nikon-eclipse-50i). As lâminas foram analisadas separadamente, de forma a não se identificar a correspondência entre as lâminas de citoinclusão e do espécime cirúrgico de um mesmo caso ou entre os mesmos. Foi realizada a classificação dos carcinomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁸.

Análise Imunoistoquímica

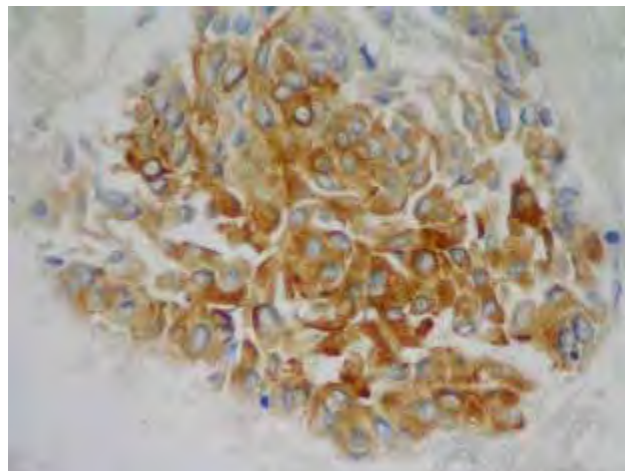
Foi realizada análise comparativa das citoceratinas e 1A4 na citoinclusão, no espécime cirúrgico e considerada positiva a expressão do marcador em qualquer número de células, com positividade citoplasmática fraca ou forte, e negativa na ausência de expressão das mesmas. Foram comparados os resultados obtidos na citoinclusão e espécime cirúrgico (figuras 4, 5 e 6).



(a) HE (400X)

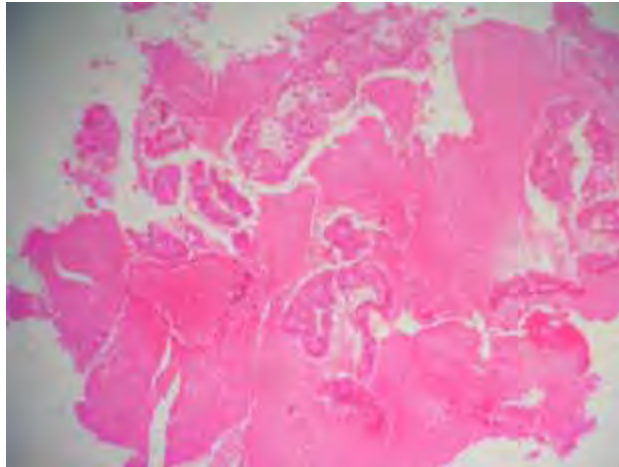


(b) Ck8/18 (100X)

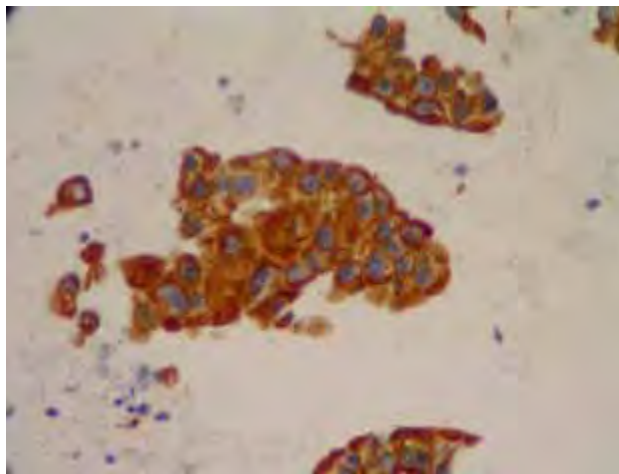


(c) Ck5/6 (400X)

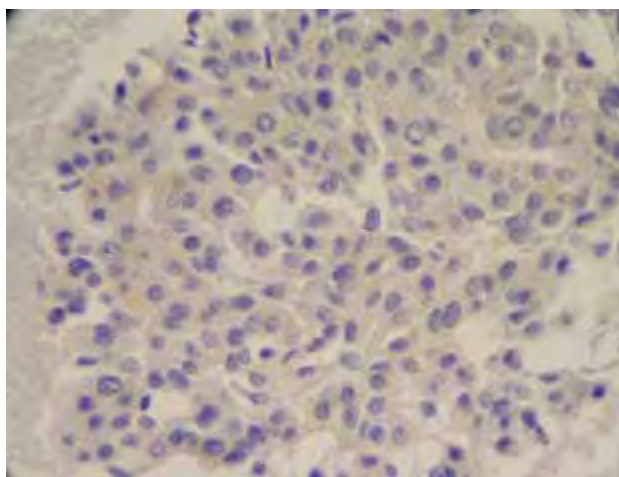
Figura 4 - Citoinclusão: (a) HE (400X); (b) Expressão fraca e focal para Ck8/18 (100X); (c) Positiva para Ck5/6 (400X).



(a) HE (40X)

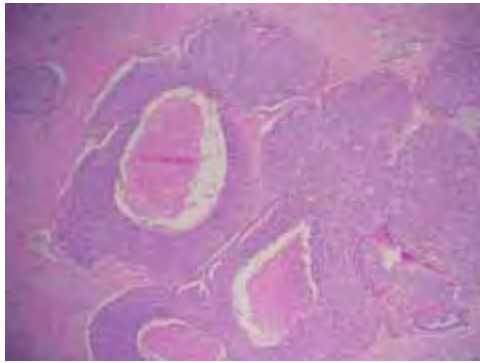


(b) Ck8/18 (400X)

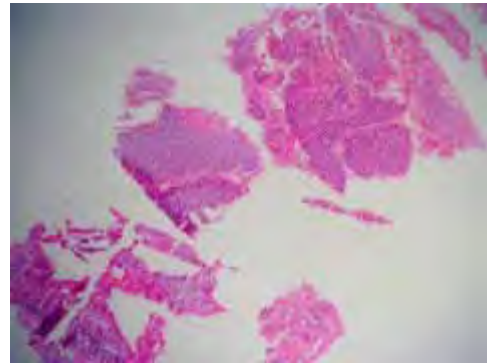


(c) Ck5/6 (400X)

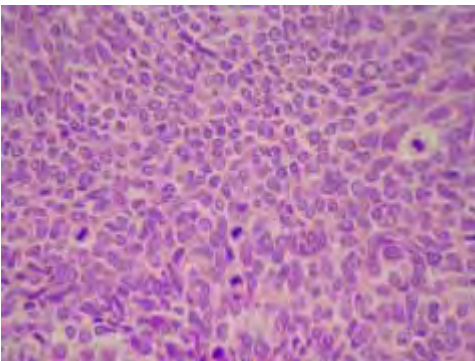
Figura 5 - Citoinclusão: (a) HE (40X); (b) Expressão forte e difusa para Ck8/18 (200X); (c) Negativa para Ck5/6 (400X).



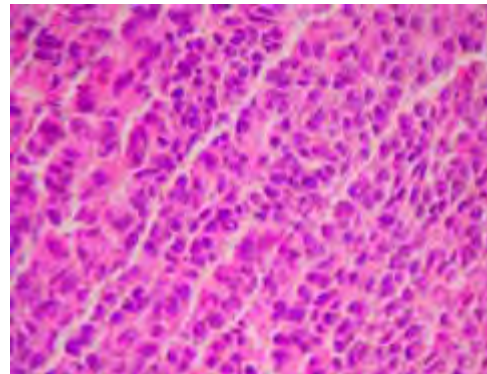
(a) Espécime cirúrgico HE (100X)



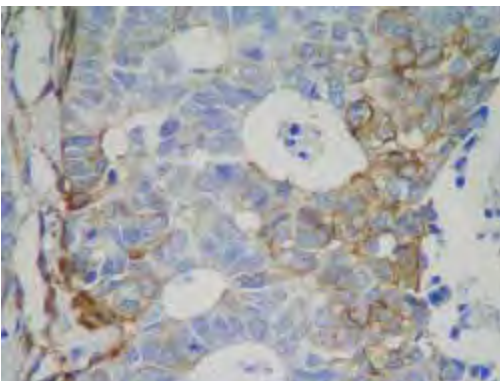
(d) Citoinclusão HE (40X)



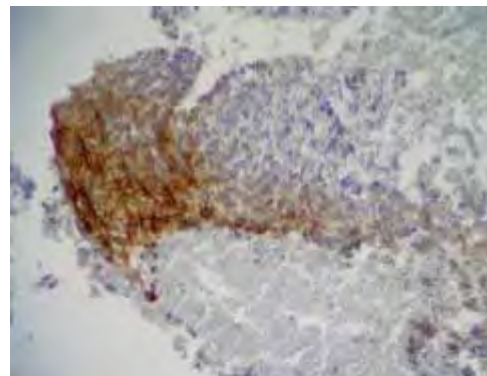
(b) Espécime cirúrgico HE (200X)



(e) Citoinclusão HE (200X)



(c) Espécime cirúrgico 1A4 (400X)



(f) Citoinclusão 1A4 (100X)

Figura 6 – Espécime cirúrgico (a, b e c): (a) carcinoma com extensa necrose, HE (100X); (b) detalhe em maior aumento (200X) e (c) positividade focal para 1A4 (400X). Citoinclusão (d, e e f): (d)HE (40X); (e) detalhe em maior aumento (200X) e (f) positividade focal para 1A4 (100X).

Análise Estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados do software Excel, pertencente ao Windows XP®. Para a análise dos resultados da reação de IQ, foram utilizados os cálculos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia (anexos 1, 2, 3, e 4) conceituados como se segue¹⁹:

- Sensibilidade: é a incidência dos resultados positivos obtidos quando um teste é aplicado a pacientes que se sabe terem a doença, ou seja é a probabilidade de um exame ser positivo na presença da doença.

- Especificidade: é a incidência de resultados verdadeiro-negativos obtida quando um teste é aplicado a pacientes que se sabe estar livre de doença, ou seja é a probabilidade de um exame ser negativo na ausência de doença.

- Falso negativo: é a percentagem de citologia de inclusão interpretados como negativos (nenhuma doença presente) quando está presente a doença.

- Falso positivo: é a percentagem de citologia de inclusão interpretados como contendo doença, quando na verdade não existe doença.

- Valor preditivo positivo: é a probabilidade da doença existir quando o teste no caso a citologia de inclusão for positiva.

- Valor preditivo negativo: é a probabilidade de não existir doença se o teste citologia de inclusão for negativo.

- Acurácia: é a proporção de casos diagnosticados corretamente pela citologia de inclusão.

Os cálculos foram realizados separadamente, para cada marcador. A peça cirúrgica foi considerada como padrão-ouro. Os dados foram expressos em percentagem.

O índice estatístico kappa (k), avaliou a concordância da expressão de CK5/6, CK8/18 e 1A4 entre a citoinclusão e o espécime cirúrgico. Os valores de K e sua força de concordância estão no anexo 5²⁰.

RESULTADOS

Prevaleceram as pacientes do sexo feminino (98%) com idade variando de 38 a 85 anos (média $58,6 \pm 12,7$). A mama direita foi acometida em 51,6%, a esquerda em 46,8% e bilateralmente em 1,6%. O quadrante súpero-externo foi o mais acometido (42%), seguido pelo súpero-interno (23%). A presença de neoplasia na transição dos quadrantes ocorreu em 22% dos casos. As localizações menos freqüentes foram a retroareolar (5%), o quadrante ínfero-externo (3%) e o ínfero-interno (3%). Em um dos casos (2%) houve acometimento extenso da mama, abrangendo todos os quadrantes.

Os tumores mediram, em média, 32,4mm e classificados de acordo com a OMS como carcinoma ductal sem outras especificações em 73% dos casos, dos quais 45% foram grau I, 36% grau II e 19% grau III, segundo a graduação de Scarff-Bloom & Richardson, modificada por Elston e Ellis¹⁸. Dois carcinomas foram lobulares, sendo um clássico e outro pleomórfico. Os carcinomas ductais especiais foram 07 casos (11%), sendo 02 apócrinos, 01 cribriforme, 01 pleomórfico, 01 com diferenciação neuroendócrina, 01 com células em anel de sinete e 01 com produção de muco. Os outros 8 casos (13%) foram: 03 colóides clássicos, 01 tubular, 01 medular, 01 neuroendócrino, 01 papilífero e 01 metaplásico com diferenciação condróide. Esta representação pode ser observada na tabela I.

Tabela I – Distribuição dos casos de acordo com os tipos tumorais.

	Número de Casos	%
Ductal sem especificações	45	72,6
Lobular	2	3,22
Ductais especiais	7	11,29
Colóide	3	4,8
Tubular	1	1,6
Medular	1	1,6
Neuroendócrino	1	1,6
Papilífero	1	1,6
Metaplásico	1	1,6

Os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia de CK5/6, CK8/18 e 1A4 estão expressos separadamente nos gráficos 1, 2 e 3 e conjuntamente na tabela II. O número de verdadeiro-positivo, verdadeiro-negativo, falso-positivo e falso-negativo encontram-se na tabela III. O gráfico 4 demonstra os valores de FP e FN expressos em percentagem, comparados com o número total de casos. As tabelas IV, V e VI mostram os dados relativos a expressão de Ck 5/6, Ck 8/18 e 1A4 na citoinclusão, espécime cirúrgico e os índices de concordância, kappa (k)²⁰, com intervalo de confiança (IC) de 0,83, 0,70 e 0,85, nesta ordem. A positividade concomitante entre Ck5/6 e Ck8/18 e entre Ck5/6 e 1A4 está representada nas tabelas VII e VIII, respectivamente.

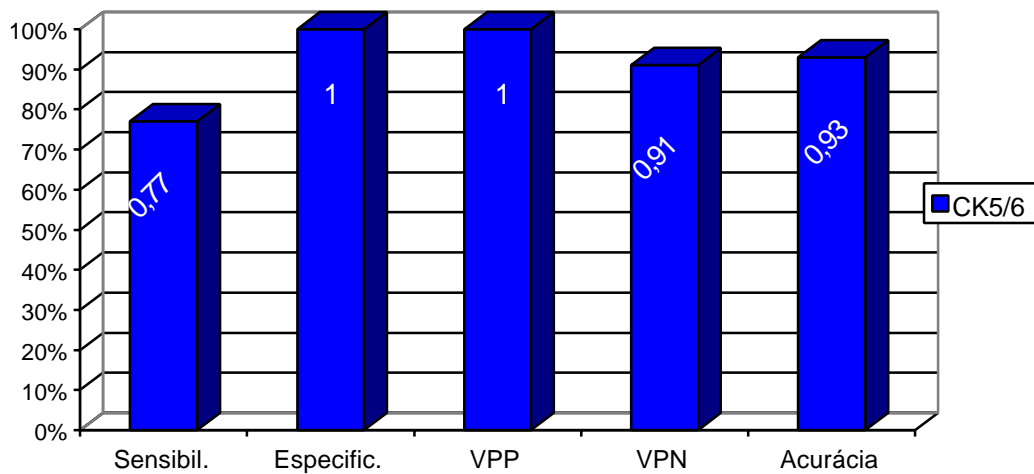


Gráfico 1 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e Acurácia de CK5/6 na Citoinclusão

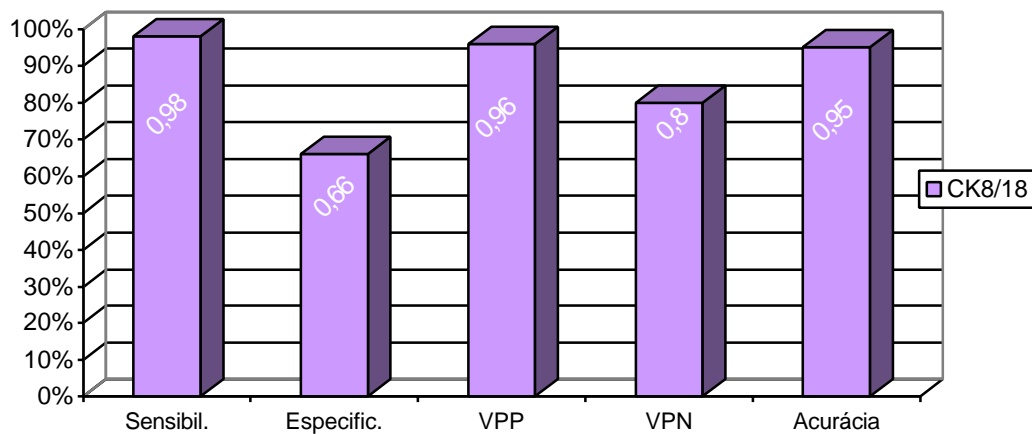


Gráfico 2 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e Acurácia de CK8/18 na Citoinclusão

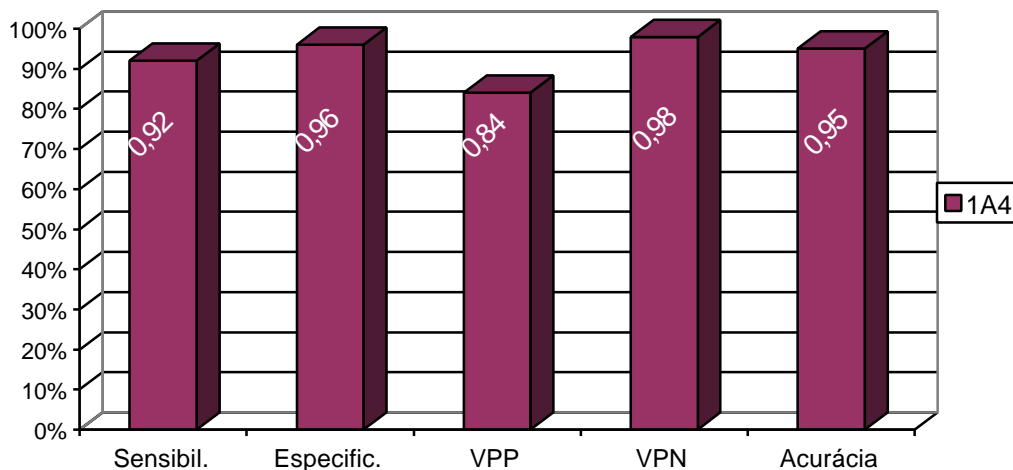


Gráfico 3 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e Acurácia de 1A4 na Citoinclusão

Tabela II – Valores (%) de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de CK5/6, CK8/18 e 1A4 na citoinclusão.

	CK 5/6	CK 8/18	1A4
Sensibilidade	77%	98%	92%
Especificidade	100%	66%	96%
VPP	100%	96%	85%
VPN	91,6%	80%	98%
Acurácia	94%	95%	95%

Tabela III - Número de verdadeiro-positivos, verdadeiro-negativos, falso-positivos e falso-negativos entre citoinclusão e espécime cirúrgico.

	Verdadeiro-positivos	Verdadeiro-negativos	Falso-positivos	Falso-negativos
CK 5/6	14	44	0	4
CK 8/18	55	4	2	1
1A4	11	48	2	1

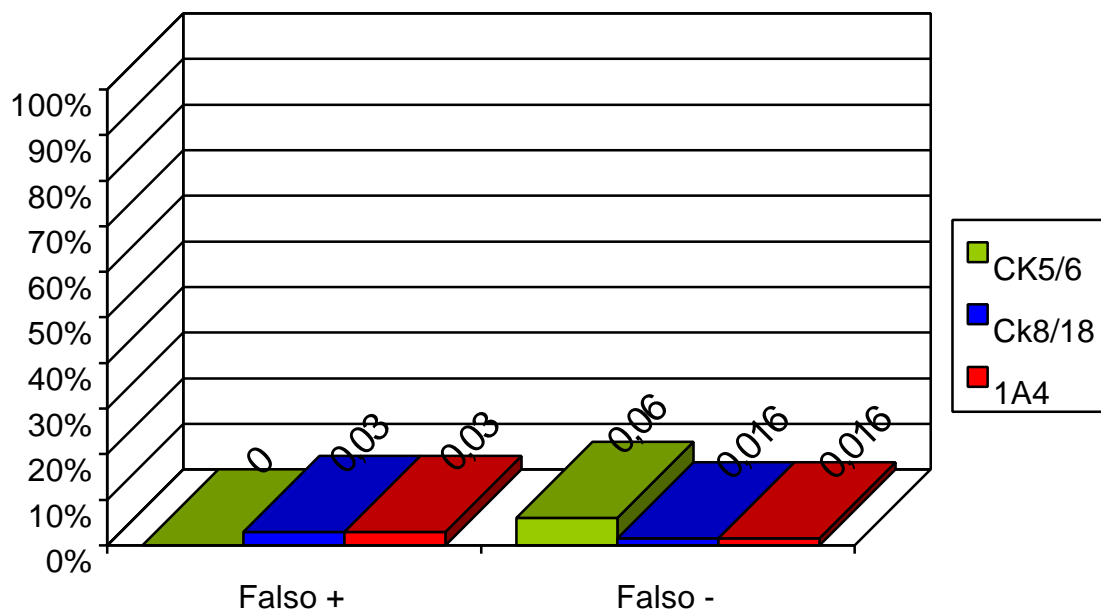


Gráfico 4- Percentagem de Falso-Positivos e Falso-Negativos na Citologia de Inclusão para CK5/6, CK8/18 e 1A4

Tabela IV – Índice de concordância Kappa e intervalo de 95% de confiança para expressão de citoceratinas CK5/6 no espécime cirúrgico e citoinclusão.

CK 5/6	Espécime Cirúrgico (+)	Espécime Cirúrgico (-)	TOTAL
Citoinclusão (+)	14	0	14
Citoinclusão (-)	4	44	48
Kappa (K) – 0,83		IC [0,67 – 0,99]	

Tabela V - Índice de concordância Kappa e intervalo de 95% de confiança para expressão de citoceratinas CK8/18 no espécime cirúrgico e citoinclusão.

CK 8/18	Espécime Cirúrgico (+)	Espécime Cirúrgico (-)	TOTAL
Citoinclusão (+)	55	2	57
Citoinclusão (-)	1	4	5
Kappa (K) – 0,70		IC [0,37 – 1,00]	

Tabela VI - Índice de concordância Kappa e intervalo de 95% de confiança para expressão de actina de músculo liso 1A4 no espécime cirúrgico e citoinclusão.

ACTINA (1A4)	Espécime Cirúrgico (+)	Espécime Cirúrgico (-)	TOTAL
Citoinclusão (+)	11	2	13
Citoinclusão (-)	1	48	49
Kappa (K) – 0,85		IC [0,68 – 1,00]	

Tabela VII - Expressão concomitante de CK5/6 e CK 8/18 em material de citoinclusão.

		CK 5/6	
		<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
CK 8/18	<i>Positivo</i>	16	40
	<i>Negativo</i>	2	4

Tabela VIII - Expressão concomitante de CK5/6 e 1A4 em material de citoinclusão.

ACTINA		
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<i>Positivo</i>	10	8
CK 5/6		
<i>Negativo</i>	2	42

DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma neoplasia comum, porém muito heterogênea, tanto na sua apresentação morfológica quanto no seu comportamento clínico. Estudos recentes com “cDNA microarray” têm identificado subtipos distintos de carcinoma de mama baseado no perfil de expressão global de mRNA^{1,2}.

São pelo menos cinco grupos distintos que podem ser identificados por IQ, usando-se marcadores para citoceratinas, RE e Her-2/neu^{1,2,3,4,5}. Esse material pode ser obtido através da punção aspirativa de agulha fina.

A PAAF é um método de baixo custo e seguro para o diagnóstico das lesões de mama. A realização de citoinclusão em material de PAAF é facilmente obtida e fornece uma grande quantidade de material com alto índice de celularidade, o que permite estudos imunoistoquímicos e moleculares com resultados semelhantes aos obtidos em material de espécime cirúrgico^{14,21,22,23,24,25,26,27,28}.

Este método também é utilizado para avaliação e diagnóstico de outros órgãos, como fígado, pulmão e tireóide, com boa acurácia^{27,29,30}. Em patologia mamária, a técnica vinha sendo realizada, mas a IQ com marcadores para citoceratinas em citoinclusão para tumores mamários é desconhecida na literatura médica. As citoceratinas de alto e baixo peso molecular são

capazes de auxiliar na classificação dos subtipos de carcinoma de mama de padrão basal e luminal^{1,2,3,4,5,17}.

Neste trabalho, observa-se boa correlação entre citoinclusão e espécime cirúrgico para os três marcadores (tabela I). Para Ck5/6 observamos boa sensibilidade (77%), com alta especificidade (100%) e acurácia de 94%. Para a Ck8/18, observou-se alta sensibilidade: 98%, VPP de 96% e acurácia de 95%. O índice de concordância kappa, aplicado para cada marcador, mostrou que a força de concordância para CK5/6 foi de 0,83, Ck8/18 de 0,70 e 1A4 de 0,85, consideradas como muito boa, boa e muito boa respectivamente (anexo 5). Estes valores indicam que estatisticamente é possível fazer uma boa avaliação desses marcadores através do estudo imunoistoquímico no material de citoinclusão.

Os casos falso-positivos provavelmente estão associados às diferenças de fixação entre a citoinclusão e espécime cirúrgico. A primeira com álcool 95% e formalina 10% tamponada e a segunda somente com formalina o que pode ter ocasionado alterações estruturais dos antígenos e, conseqüentemente, reação inespecífica do anti-corpo com outros componentes celulares no material de citoinclusão. Os valores falso-negativos podem estar associados com a menor amostragem do material de citoinclusão comparada ao espécime cirúrgico.

Observamos 18 de 62 casos positivos (29%) para Ck5/6 na citoinclusão (tabela VII). Desses, dezesseis foram também

positivos para Ck8/18 (tabela VII). Tais dados são concordantes com a literatura, indicando que são raros (aproximadamente 5%) os casos de carcinoma puramente Ck5+¹⁰. Entretanto, nota-se que a expressão de Ck8/18 nos casos Ck5/6+ foi focal e/ou fracamente positiva (figura 4). Quando houve positividade somente para Ck8/18 (40/62 – 65%) (tabela VII), o padrão de coloração para este marcador foi geralmente difuso e de grande intensidade (figura 5).

Em relação à expressão concomitante de Ck5/6 e 1A4 no material de citoinclusão, foi observado que 12/62 (19%) foram positivos para 1A4. Deles, dez também foram positivos para Ck5/6 (Tabela VIII). A positividade para Ck5/6 mostrou-se como forte e difusa ou focalmente positiva. A positividade para 1A4, em geral, foi focal (figura 6).

Estudo com 776 casos consecutivos de carcinoma de mama mostrou que 114 (14%) são de tipo basal; 345 (44,5%) são do tipo Luminal; 133 (17,1%) HER2/neu+; 61(7,8%) são Luminal B e 125 (15,9%) não expressavam nenhum desses marcadores (“null”)⁸. Também, em carcinomas de mama, para avaliação da expressão de citoceratina 14, mostra que a mesma está presente em 19,4% dos casos²⁰. Em outro estudo com 245 casos de carcinoma mamário “in situ”, a prevalência dos padrões foi: luminal A 149 (61%), luminal B 23 (9%), tipo basal 19 (8%), hiperexpressão do Her2/neu 38 (16%) e nenhum deles (“null”) em 16 (6%)¹.

Em nossa avaliação, houve 18 casos (29%) com expressão de Ck5/6 e 12 (19%) com expressão de marcador mioepitelial (1A4) (tabelas VII e VIII). Houve 10 casos (16%) com concomitância de positividade entre Ck5/6 e 1A4 (Tabela VIII). A expressão somente de citoceratinas de padrão luminal (Ck8/18) foi em 40 casos (65%). Em quatro casos (6%) não houve expressão de nenhum dos marcadores ("null"). Esses dados estão próximos dos obtidos na literatura acima referida. Os autores desconhecem trabalhos semelhantes na literatura com material citoinclusão, usando os referidos marcadores, para que pudessem ser comparados aos dados obtidos.

Observou-se alto índice de expressão de Ck8/18 em carcinomas Ck5/6 positivos (16/18, 89%) (Tabela VII). Isso provavelmente se deve à maior indiferenciação das células tumorais, com expressão de ambos os marcadores, já que carcinomas com expressão de Ck5/6 em geral são carcinomas pouco diferenciados, com alto índice mitótico e, por vezes, com diferenciação escamosa ou metaplásica⁵. Por outro lado, somente 29% (16/56) dos carcinomas Ck8/18 positivos expressaram Ck5/6. Em geral, carcinomas de padrão luminal, principalmente os do tipo A (RE+, Her2/neu-) e que correspondem à maioria dos carcinomas mamários (aproximadamente 60%)⁸, são carcinomas bem diferenciados, de baixo grau citológico e de índice mitótico. Esses dados também estão semelhantes aos da literatura⁸.

Por meio de esfregaços é possível analisar o grau citológico, o índice mitótico e a presença de necrose. Já através de IQ ou métodos moleculares é possível avaliar os receptores hormonais (RE e RP) em esfregaços ou em material de citoinclusão^{21,15,31}. Observou-se, no presente estudo, que a identificação de citoceratinas de padrão basal, luminal e 1A4 também pode ser realizada de modo confiável em material de citoinclusão. Isso permite argumentar que é possível classificar os carcinomas mamários nestes vários grupos, através de estudo imunohistoquímico em material de citoinclusão obtido por PAAF e, assim, fornecer informações importantes que possam orientar a melhor conduta através de procedimento de menor custo. Para o mastologista é relevante que a avaliação de um carcinoma de mama possa lhe fornecer dados mais abrangentes sobre o mesmo, podendo interferir na terapêutica de tumores altamente agressivos.

A amostragem dos 62 casos descritos evidenciou estatisticamente que a citologia de inclusão é capaz de identificar as citoceratinas de alto e baixo peso molecular e pode contribuir de forma significativa para melhor caracterização dos carcinomas de mama, fornecendo dados para estudos posteriores na definição do comportamento dos tumores quanto à agressividade e resposta terapêutica.

CONCLUSÃO

A identificação Ck5/6, Ck8/18 e 1A4 é método confiável através de estudo imunoistoquímico em material da citoinclusão, com resultados muito próximos dos obtidos no espécime cirúrgico e pode contribuir para a classificação dos carcinomas mamários de expressão luminal e basal, fornecendo informações importantes que possam orientar na escolha do melhor tratamento, bem como a avaliação dos fatores prognósticos e preditivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Livasy CA, Perou CM, Karaca G, Cowan DW, Maia D, Jackson S, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Human Pathol.* 2007; 38: 197-204.
- 2- Hannemann J, Velds A, Halfwerk JBG, Kreike B, Peterse JL, Vijver MJV. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Research.* 2006; 8 (5):
- 3- Finak G, Sadekova S, Pepin F, Hallet M, Meterissian S, Halwani F, et al. Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors. *Breast Cancer Research.* 2006. 8 (5):
- 4- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: Three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005; 447: 688-94.
- 5- Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillet CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* 2006; 49: 22-44.
- 6- Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Oncol Pathol.* 2006; 59 (7): 729-35.
- 7- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillet CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research.* 2007; 9 (1):

- 8- Kim M J, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basallike subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human Pathology*. 2006; 37: 1217-26.
- 9- Torsten ON, Forrest DH, Kristin J, Maggie C, Gamze K, Zhiyuan H, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Resear*. 2004; 10: 5367-74.
- 10- Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Diest PJV, Dervan P, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept. *Labortat Investig*; 2002, 82 (6): 737-45.
- 11- Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Proliferation*. 2003; 36 (1): 73-84.
- 12- Petersen OW, Gudjonsson T, Villadsen R, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Proliferation*. 2003; 36 (1): 33-44.
- 13- Bánkfalvi A, Ludwig A, Hessele B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in begin proliferative and early malignant breast diseases. *Modern Pathology*. 2004; 17: 1051-61.
- 14- Vargas HI, Masood S. Implementation of a minimally invasive breast biopsy program in countries with limited resources. *Breast J*. 2003; 9 (2): S81-5.
- 15- Jayaram G, Elysayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol*. 2005; 49 (6): 605-10.

- 16- Oliveira MA, Santos GS, Kanamura CT, Alves VAF. Immunoexpression of Her-2 protein in fine-needle aspirates of breast carcinoma: correlation with surgical specimens. *Rev Bras Ginecol Obst.* 2003; 25 (1): 23-8.
- 17- Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry of Breast. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry.* New York: Churchill Livingstone; 2002. p. 536-58.
- 18- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre –Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. Tumors of the breast. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *Tumors of breast and female genital organs.* Lyon: IARC Press; 2003. p. 9-112.
- 19- Reis AFF, Silva RJO, Chaves Neto H. Utilização dos modelos diagnósticos na prática clínica. *Femina.* 1999; 27 (5): 397-400.
- 20- Altman DG. *Practical statistics for medical research.* London: Chapman e Hall; 1996. p.611.
- 21- Schmitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. PCR amplification of DNA obtained from archived hematoxylin-eosin- and giemsa-stained breast cancer aspirates. *Diagn Cytopathol.* 1998; 19 (5): 395-7.
- 22- Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J Clin Pathol.* 2000; 53 (6): 451-7.
- 23- Carlson RW, Anderson BO, Chopra R, Eniu AE, Jakesz R, Love RR, et al. Treatment of breast cancer in countries with limited resources. *Breast J.* 2003; 9 (2): S67-4.
- 24- Annema JT, Versteegh MI, Veselic M, Voight P, Rabe KF. Endoscopic ultrassound-guided fine needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer and its impact on surgical staging. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (33): 8283-5.

- 25- Briffod M, Hacene K, Le Doussal V. Immunohistochemistry on Cell Blocks From Fine-Needle Cytopunctures of primary Breast Carcinomas and Lymph Node Metastases. *Modern Pathology*. 2000; 13(8): 841-50.
- 26- Wu M, Szporn AH, Zhang D, Wasserman P, Gan L, Miller L, et al. Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. *Diagn Cytopathol*. 2005; 33(4): 223-7.
- 27- Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell-block preparations. *Cancer*. 2004; 102(2): 109-14.
- 28- Varadarajulu S, Eloubeidi M. Can endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration predict response to chemoradiation in non-small cell lung cancer? A pilot study. *Respiration*. 2006; 73 (2): 213-20.
- 29- Levine PH, Joutovsky A, Cangiarella J, Yee H, Simsirr A. CDX-2 expression in pulmonary fine-needle aspiration specimens: a useful adjunct for the diagnosis of metastatic colorectal adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2006; 34(3): 191-5.
- 30- Lee BH, Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117(5): 745-50.
- 31- Bueno SP. Receptores hormonais e Her2-neu em câncer de mama. Estudo comparativo entre citoinclusão e espécime cirúrgico [dissertação]. Botucatu (SP): UNESP. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2007.

Anexo 1: Cálculo da Sensibilidade e Falso Negativo

		Espécime Cirúrgico		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS a + b
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS c + d
TOTAL		PRESENÇA DE DOENÇA a + c	AUSÊNCIA DE DOENÇA b + d	TOTAL DE CASOS a + b + c + d

SENSIBILIDADE	FALSO NEGATIVO
$\frac{a}{a + c}$	$\frac{c}{a + c}$

Anexo 2: Cálculo da Especificidade e Falso Positivo

		Espécime Cirúrgico		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS a + b
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS c + d
TOTAL		PRESENÇA DE DOENÇA a + c	AUSÊNCIA DE DOENÇA b + d	TOTAL DE CASOS a + b + c + d

ESPECIFICIDADE

d

b + d

FALSO POSITIVO

b

b + d

Anexo 3: Cálculo do Valor Preditivo Positivo

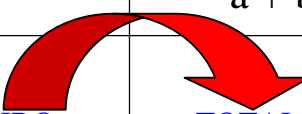
		Espécime Cirúrgico		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS a + b
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS c + d
TOTAL		PRESENÇA DE DOENÇA a + c	AUSÊNCIA DE DOENÇA b + d	TOTAL DE CASOS a + b + c + d

VALOR PREDITIVO POSITIVO

$$\frac{a}{a + b}$$

Anexo 4: Cálculo do Valor Preditivo Negativo e Acurácia

		Espécime Cirúrgico		
		+	-	
CITOINCLUSÃO	+	VERDADEIRO POSITIVO a	FALSO POSITIVO b	TOTAL DE POSITIVOS a + b
	-	FALSO NEGATIVO c	VERDADEIRO NEGATIVO d	TOTAL DE NEGATIVOS c + d
TOTAL		PRESENÇA DE DOENÇA a + c	AUSÊNCIA DE DOENÇA b + d	TOTAL DE CASOS a + b + c + d



VALOR PREDITIVO NEGATIVO

$$\frac{d}{c + d}$$

ACURÁCIA

$$\frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Anexo 5: Valores de Kappa (K) e força de concordância

Valores de K	Força de Concordância
Menor 0,20	Pobre
0,21 – 0,40	Satisfatório
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 1,00	Muito boa

Fonte: Altman DG. Practical statistics for medical research. 1996.