

**CÉSAR AUGUSTO ALVARENGA**

---

---

**TIPOS ESPECIAIS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMAS  
DA MAMA: PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO COM  
ÊNFASE NA CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

---

---

**Tese de Doutorado**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS DE LANDER SCHMITT**

**Unicamp  
2011**



---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

---

**TIPOS ESPECIAIS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMAS  
DA MAMA: PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO COM  
ÊNFASE NA CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

---

**CÉSAR AUGUSTO ALVARENGA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Tocoginecologia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde, área de concentração em Oncologia Ginecológica e Mamária, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino e co-orientação do Prof. Dr. Fernando Carlos de Landér Schmitt.

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Al86t Alvarenga, César Augusto, 1975 -  
Tipos especiais histológicos de carcinomas da mama:  
perfil imunoistoquímico com ênfase na classificação  
molecular. / César Augusto Alvarenga. -- Campinas, SP :  
[s.n.], 2011.

Orientador : Luiz Carlos Zeferino  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mamas – câncer. 2. Imunoistoquímica. 3.  
Biópsia. 4. Excisão de linfonodo. I. Zeferino, Luiz  
Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Histological special types of breast carcinomas: immunohistochemical profile with emphasis on molecular classification

**Palavra-chave em inglês:**

Breast cancer

Immunohistochemistry

Biopsy

Lymph Node Excision

**Área de concentração:** Oncologia Ginecológica e Mamária

**Titulação:** Doutor em Ciências da Saúde

**Banca examinadora:**

Luiz Carlos Zeferino [Orientador]

Renato Zocchio Torresan

Júlio César Narciso Gomes

Alfredo Ribeiro da Silva

Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade

**Data da defesa:** 16-12-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Saúde

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: CÉSAR AUGUSTO ALVARENGA**

**Orientador: PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

**Co-Orientador: PROF. DR. FERNANDO CARLOS DE LANDÉR SCHMITT**

**Membros:**

1. Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino

2. Prof. Dr. Renato Zocchio Torresan

3. Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade

4. Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva

5. Prof. Dr. Júlio César Narciso Gomes

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**Data: 16/12/2011**

***Dedico este trabalho...***

***...a minha amada Paula,  
fiel companheira de viagem  
e esposa de fibra  
que faz de mim  
um homem melhor a cada dia.***

# Agradecimentos

---

*Aos meus pais, pelo incentivo aos estudos e à formação acadêmica. Ao meu pai, por todos esses anos de convivência diária na qual pude aprender a ser uma pessoa sincera, íntegra e verdadeira. A minha mãe, por todos esses anos de amor, carinho e dedicação.*

*As minhas irmãs Cláudia e Carla e seus respectivos maridos Ricardo e Fernando. Por todos esses anos de amizade e convivência, inclusive aos domingos quando toda a família ficava reunida no almoço para conversar.*

*A toda a família de minha esposa: Paulo, Sônia Maria, Bruno, Lucimar, Ana Maria, Célio, Leana, Rafael e Zilah, por toda agradável e alegre convivência diária. Pelo apoio e incentivo a enfrentar meus desafios da vida.*

*Ao casal de amigos verdadeiros Gil, Francine e seu filho Davi, pelos ótimos momentos de amizade vividos juntos nesses últimos anos em Campos dos Goytacazes.*

*Aos meus sobrinhos queridos Felipe, Renata, Mariana, Luísa e Lara, crianças em que pude acompanhar boa parte do crescimento e que tenho muito carinho por elas.*

*Aos meus avós Dudu e Hermínia (in memoriam), pelos bons e alegres anos de convivência nas longas férias de minha infância e adolescência. Ao meu avô, por me ensinar que a vida simples é a melhor de ser vivida.*

*Ao dedicado pesquisador, patologista cirúrgico, professor e amigo Fernando Schmitt, pelo espaço cedido a mim e a minha esposa em seu grupo de pesquisa no IPATIMUP e por todo o crédito de confiança que depositaste em nosso trabalho. Que nossa união frutifique, se possível, ainda mais ao longo dos próximos anos.*

*Ao Prof Luiz Carlos Zeferino, dedicado ginecologista e pesquisador que me recebeu como aluno de doutorado e me ajudou na obtenção de minha bolsa sanduíche para a ida ao exterior (IPATIMUP, Porto – Portugal).*

*Ao professor Manoel Sobrinho-Simões, amigo agradável, verdadeiro, que admira e valoriza com muito respeito o trabalho competente dos jovens pesquisadores e patologistas do IPATIMUP, do Hospital São João e do estrangeiro (inclusive estagiários). Pelo eterno carinho e simpatia para com os patologistas do Brasil, cujo sotaque brasileiro sempre foi motivo de elogio e exaltação em conversas do dia-a-dia, inclusive entre os demais estrangeiros europeus.*

*Às competentes professoras Fátima Carneiro e Maria Emília, pelo agradável convívio quase que diário durante o estágio no Hospital São João. Obrigado pelo apoio durante o período em que estivemos no Porto.*

*Ao professor José Manuel Lopes pelo incentivo e empenho em publicar um relato de caso muito interessante. É uma pena que não conseguimos detectar a “tal da mutação” ! Quem sabe num futuro próximo, não é mesmo ?*

*A minha esposa Paula por toda e efetiva ajuda feita durante nosso estágio no IPATIMUP e na elaboração dos artigos científicos.*

*A todos os pesquisadores do grupo do Dr Fernando Schmitt, inclusive Joana, Madalena, Sílvia, Zé Luís e André, pela ótima receptividade para comigo e minha esposa, pela simpatia e pelo frutífero convívio quase que diário por 10 meses no IPATIMUP (como passou rápido...)*

*A Rozany Dufloth, dedicada pesquisadora, pela ajuda na elaboração do projeto de apoio financeiro à FAPESP.*

*Ao Instituto de Patologia de Campinas, pelo fornecimento de todo o material cirúrgico (blocos de parafina bem preservados) para realização do tissue microarray.*

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas .....	viii
Resumo .....	x
Summary .....	xii
1. Introdução .....	14
2. Objetivos .....	37
2.1. Objetivo geral da tese .....	37
2.2. Objetivo Geral do Primeiro Artigo.....	37
2.3. Objetivos Específicos do Primeiro Artigo .....	37
2.4. Objetivo Geral do Segundo Artigo.....	38
3. Sujeitos e Método .....	39
4. Publicações.....	41
4.1. Artigo 1 .....	42
4.2. Artigo 2 .....	57
5. Discussão.....	69
6. Conclusões.....	72
7. Referências Bibliográficas.....	73
8. Anexos .....	88
8.1. Anexo 1 – referente ao Artigo 1 : .....	88
8.2. Anexo 3 - referente ao Artigo 2 : .....	90



# **Símbolos, Siglas e Abreviaturas**

---

- Bcl-2** – Marcador anti-apoptótico
- CDI** – Carcinoma ductal invasivo
- CM** – Carcinoma metaplásico
- CMI** – Carcinoma micropapilar invasivo
- CPI** – Carcinoma papilar intracístico
- EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidérmico
- HER-2** – Receptor de crescimento epidérmico (Cerb-B2)
- ISH** – Hibridização *in situ*
- Ki-67** – Marcador de proliferação celular
- LS** – Linfonodo sentinela
- NTE** – Não tipo especial
- p53** – Marcador de gene supressor tumoral
- p63** – Marcador basal-like e de Carcinomas metaplásicos
- P-caderina** – Glicoproteína de adesão celular e também proliferação
- RE** – Receptor de estrogênio
- RP** – Receptor de progesterona
- SOE** – Sem outras especificações

**TEH** – Tipos especiais histológicos

# Resumo

---

A maioria dos carcinomas invasivos da mama são classificados como carcinoma ductal invasivo, sem outras especificações (CDI-SOE), enquanto que cerca de 25% são definidos como tipos especiais histológicos (TEH). Esses TEH de carcinomas da mama são categorizados em pelo menos 17 entidades patológicas distintas. Como a maioria dos estudos realizados na literatura em relação à classificação molecular (luminais A e B, sobreexpressão de HER2, “basal-like”) tenham utilizado somente CDI-SOE e lobulares invasivos, um estudo com mais TEH seria necessário. A CK19 pode ser utilizada como método de avaliação do linfonodo sentinela através de uma técnica molecular chamada de OSNA (amplificação de ácido nucléico de um passo). A expressão de sua positividade foi avaliada somente nos carcinomas ductais, lobulares, medulares e de pequenas células. Realizado tissue microarray (TMA) no IPATIMUP (Porto-Portugal) de 157 casos selecionados dos arquivos do Instituto de Patologia de Campinas. Obtido um total de 121 e 116 casos no TMA do perfil molecular e da CK19, respectivamente, estes incluíram carcinomas tubulares, mucinosos, papilares encapsulados e invasivo, lobulares, micropapilares, medulares, metaplásicos, apócrinos e mistos. Foram utilizados marcadores imunoistoquímicos tais como: RE, RP, RA (somente nos apócrinos), HER2, Ki67, P-caderina, CK5, EGFR e p63 para classificá-los quanto à classificação

molecular e CK19 para avaliar sua expressão na mama antes da realização da técnica de OSNA em linfonodo sentinela. Tubulares, papilares e mucinosos foram todos luminais A e B, dado semelhante ao perfil de expressão genética; medulares e metaplásicos foram quase todos “basais-like” (76.2% e 90%, respectivamente), enquanto que ao nível transcriptômico, todos os casos pertencem ao subtipo “basal-like”; micropapilares foram luminais A e B e sobre-expressão de HER2, sendo que ao nível transcriptômico são praticamente todos luminais B devido à alta expressão de HER2; apócrinos foram os mais heterogêneos de todos com casos luminais A e B, sobre-expressão de HER2 e “basais-like”, dado diferente ao nível transcriptômico que revela o subtipo “molecular apócrino” (RE-/RA+/HER2- ou +). O risco relativo do Ki67 aumentou entre os TEH, sendo que o carcinoma medular teve 110 vezes mais risco de aumento do Ki-67 em relação ao tubular. A CK19 foi expressa em 98.2% dos TEH de carcinomas da mama, dado idêntico ao estudo anterior de Chu et al, sendo que sua positividade aumentou nos casos em que o bloco de parafina foi inteiramente estudado, pois sua marcação foi focal em muitos casos avaliados no TMA. Isso pode produzir eventualmente resultados falso-negativos nas “core-biopsies”.

# Abstract

---

Most invasive breast carcinomas are classified as invasive ductal carcinoma, not otherwise specified (IDC-NOS), while approximately 25% are defined as special histological types (HST). These HST of breast carcinomas are categorized into at least 17 distinct pathological entities. Most studies in the literature regarding the molecular classification (luminal A and B, HER2-overexpression, "basal-like") were evaluated only in IDC-NOS and in lobular invasive carcinoma, a study with more HST of breast carcinoma would be necessary. The CK19 can be used as a method of evaluation of sentinel lymph node using a molecular technique called OSNA (one step acid nucleic amplification). The expression of CK19 positivity was assessed only in ductal, lobular, medullary and small cell carcinomas. It was performed tissue microarray (TMA) in IPATIMUP (Porto-Portugal) of 157 cases selected from the archives of the Instituto de Patologia de Campinas, a private laboratory. A total of 121 and 116 TMA cases in the molecular profiling and in the CK19 studies was obtained, respectively, including tubular, mucinous, papillary encapsulated and invasive, lobular, micropapillary, medullary, metaplastic, apocrine and mixed carcinomas. It was used immunohistochemical markers such as ER, PR, RA (only in apocrine carcinomas), HER2, Ki67, P-cadherin, CK5, EGFR and p63 to classify

them as the molecular classification and as the CK19 expression in the breast before performing the technique of OSNA in sentinel lymph node. Tubular, papillary and mucinous were all luminal A and B, as similar as the gene-expression profiling; medullary and metaplastic were almost all "basal-like" (76.2% and 90%, respectively), while at transcriptome level, all cases belong to subtype "basal-like"; micropapillary was luminal A and B and HER2-overexpression and in the transcriptomic level was virtually all luminal B due to high expression of HER2; apocrine was the most heterogeneous tumours of our study with luminal A and B, HER2-overexpression and "basal-like" cases. This data was different from transcriptomic level that revealed the "molecular apocrine" subtype (RE-/ RA+/ HER2- or +). The relative risk of Ki67 increased between HST, because medullary carcinomas had 110 times more risk of increased Ki-67 than tubular carcinomas. The CK19 was expressed in 98.2% of HST of breast carcinomas, data identical to the Chu et al study, and the positivity increased in cases where the entire paraffin block had been fully studied, because its labeling was focal in many cases evaluated on TMA. This CK19 focal expression can produce false-negative results in the breasts "core-biopsies."

# 1. Introdução

---

A heterogeneidade e complexidade do câncer de mama tem intrigado os patologistas durante muitos anos, sendo que desde 1968 existem tentativas para definir uma taxonomia morfológica padronizada para carcinomas da mama. (1-3) Por definição, tumores malignos originados em células epiteliais mamárias são considerados adenocarcinomas. Patologistas têm identificado padrões citológicos e arquiteturais específicos que são consistentemente associados com apresentações clínicas distintas e/ou sobrevida em adenocarcinomas da mama. Esses padrões são chamados “tipos especiais histológicos” e correspondem a pouco mais de 25% de todos os carcinomas da mama. (2,4) A última edição da classificação dos tumores de mama da Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a existência de ao menos 17 tipos especiais histológicos distintos (2,4). A maioria (50-80%) dos carcinomas da mama são chamados carcinomas ductais invasivos (CDI) sem outra especificação (SOE) ou não tipo especial (NTE). Esse grupo de neoplasias compreendem adenocarcinomas que falham em exibir características suficientes para garantir sua classificação em um tipo especial. Nota-se ainda, que grau e tipo histológicos proporcionam informações complementares sobre achados clinicopatológicos do tumor, sobretudo informações prognósticas. (2,4-6) Embora o

grau tumoral identifique subgrupos prognósticos de tipos especiais de câncer de mama, algumas entidades com alto grau histológico apresentam um relativo bom prognóstico (por exemplo, carcinomas medulares). (2,4)

Apesar de numerosas evidências sugerirem que tipos especiais de carcinomas da mama são associados com achados biológicos e clínicos distintos, o uso desta informação tem sido limitada na terapêutica de tais pacientes. Uma das explicações deve-se a ausência de critérios padronizados, a baixa prevalência e baixa reprodutibilidade interobservador no diagnóstico dos tipos especiais. Além disso, tipos histológicos especiais de câncer de mama têm sido amplamente negligenciados em estudos baseados em microarrays de descoberta de classes (7-10) e preditivo de classes. (11-15)

Tradicionalmente, patologistas classificam carcinomas da mama em subgrupos baseados no tipo histológico, grau histológico, presença de invasão linfovascular, metástase linfonodal e na expressão de marcadores preditivos como receptores hormonais e HER2. (4,16). A informação do tipo histológico, porém, tem sido de uso limitado na escolha da decisão terapêutica. Com a tendência para terapia individualizada dos pacientes com carcinoma da mama, a sua taxonomia tem começado a se desenvolver desde o modelo histopatológico tradicional, ao mais recente modelo molecular, no qual fenótipos são definidos em base de padrões de expressão genética. (4,16) A caracterização dos subtipos moleculares através do uso de métodos moleculares podem trazer uma melhor definição de subgrupos específicos de pacientes, no que diz respeito ao prognóstico e resposta terapêutica. (4,7-10,17) Devido ao recente conceito da existência de subtipos de câncer de



mama e de múltiplas abordagens moleculares na identificação de tais subtipos, uma taxonomia baseada nos achados moleculares ainda não tem sido totalmente implementada na prática clínica de rotina. (4,16,18)

### **O estudo pioneiro de Perou et al**

O estudo pioneiro de Perou et al. (1,7) utilizando “cDNA microarray” de 38 carcinomas invasivos (36 carcinomas ductais e 2 carcinomas lobulares), 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 amostras de mama normal, definiu uma lista de genes “intrínsecos” (isto é, genes que variam mais entre tumores de diferentes pacientes comparados com amostras do mesmo tumor/paciente). Análise agrupada hierarquizada usando esta “lista de genes intrínsecos” revelou a existência de quatro subtipos moleculares de câncer de mama: luminal, mama “normal-like”, HER2 e “basal-like”. (1,7) Um estudo subsequente do mesmo grupo através de uma coorte estendida de pacientes, alguns deles com informação de seguimento disponível, revelou que o subgrupo luminal poderia ser dividido em pelo menos 2 grupos, luminal A e luminal B e que subtipos moleculares diferentes estariam associados com comportamento clínico distinto. (1,8) Esses subtipos moleculares de câncer de mama foram confirmados e expandidos em outros estudos, (1,9,10) inclusive por grupos independentes. (1,19)

A mais robusta distinção observada na análise dos microarrays é entre os transcriptômicos carcinomas da mama receptor de estrogênio (RE), RE-positivo e RE-negativo. (1,11,16,21,22) Os tumores RE-positivo continham genes originalmente descritos como padrões de expressão reminiscentes das “células epiteliais

luminais normais” da glândula mamária, incluindo citoqueratinas de baixo peso molecular 8/18, RE e genes associados com uma via RE ativa. (1,7,8,10,22,23) Este grupo foi conseqüentemente dividido em luminal A e B. Tumores luminais A têm sido caracterizados por apresentar altos níveis de expressão de genes RE-ativados e baixos níveis de genes relacionados a proliferação, sendo geralmente de baixo grau histológico e com excelente prognóstico, enquanto tumores luminais B são mais freqüentemente de alto grau histológico, tem maiores taxas de proliferação e um significativo pior prognóstico em relação aos tumores luminais A. (1,7,8,10,16,20,22,23) O subtipo luminal B é caracterizado por ter uma expressão aumentada dos genes associados ao HER2 (isto é, *ERBB2* e *GRB7*) e uma assinatura de proliferação celular que inclui a expressão de *MK167*, *CCNB1* e *MYBL2*, que tem sido associada à resistência ao tamoxifeno. Identificação clínica eficiente dos carcinomas luminais B poderia isolar um subgrupo de pior prognóstico que eventualmente se beneficiaria de uma terapia sistêmica adicional. Como sugerido no perfil de expressão genética, coexpressão de HER2, RE e/ou RP podem identificar alguns tumores luminais B (isto é, grupo HER2-positivo-luminal). Entretanto, somente aproximadamente 30% dos tumores luminais B são HER2 positivos, indicando que esse marcador clínico isoladamente não é sensível o suficiente para identificar a maioria dos carcinomas luminais B. (24)

### **Avaliação do Ki-67 como marcador de luminais A e B**

Ki-67 é um marcador de proliferação bem estabelecido em câncer e é um excelente candidato para marcar os tumores luminais B. Duas recentes meta-análises têm relatado uma associação estatística significativa entre expressão

de Ki-67 e risco aumentado de recidiva do câncer de mama e óbito. (25,26) Entretanto, o uso do Ki-67 tem sido controverso na literatura e alguns estudos têm usado “cutoffs” de 10% (27,28), 20% (29,30), enquanto outros dicotomizaram em relação aos valores de média (31) ou mediana (32,33). O estudo de Cheang et al. (24) é o primeiro a aplicar escores imunoistoquímicos visuais quantitativos do Ki-67 em subtipos de câncer de mama que foram classificados pelo perfil de expressão genética. Uma vantagem deste método é que o “cutoff” do Ki-67 por imunoistoquímica (neste caso 14%) foi determinado em relação a uma distinção importante na biologia básica do câncer de mama, e não em relação ao resultado clínico ou ao valor da média ou mediana do índice do Ki-67 na população de estudo. Através deste método, o “cutoff” será mais provável de ser diretamente aplicável em outros coortes de pacientes com diferentes regimes de tratamentos e distribuições de riscos. Embora, o perfil de expressão genética ainda seja o método mais sensível, Cheang et al. (24) têm demonstrado que o Ki-67 pode ser utilizado associado ao painel de biomarcadores como RE, RP e HER2 para identificar tumores luminais B adicionais que não foram classificados por esses 3 marcadores. (24)

A separação de tumores luminais em 2 subgrupos de significado prognóstico distinto tem sido repetidamente demonstrado pelos autores dessa classificação. Uma recente meta-análise sugeriu que tumores luminais formam um contínuo e que a separação desses tumores em 2 subgrupos baseados na proliferação pode ser arbitrária. (1,12,34)

### **Avaliação de bcl-2 nas neoplasias mamárias**

No estudo de Bertolo et al. (35), as neoplasias luminais apresentaram tendência a não mostrar metástases à distância durante o seguimento e a serem ciclina D1 (+) e bcl-2 (+), sendo que todos os tumores luminais foram positivos para esta última proteína. (36) A expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2 varia em câncer de mama e parece estar associada com prognóstico favorável. (36) Em carcinomas da mama, tumores que não expressam a proteína anti-apoptótica bcl-2, são de alto grau e têm altas taxas de proliferação celular e morte celular indicando a existência de um “turnover” celular rápido sendo frequentemente associados com pior sobrevida. (37).

### **Classificação molecular por perfil de expressão genética do subgrupo RE negativo**

O grupo de carcinomas mamários RE-negativo parece ser significativamente mais heterogêneo. Em estudos realizados pelo grupo de Stanford, 3 diferentes subtipos foram identificados: mama “normal-like”, HER2 e “basal-like”. Tumores de mama “normal-like”, que são ainda pouco caracterizados, têm sido associados consistentemente a agrupamentos de amostras de fibroadenoma e mama normal e são enriquecidos por genes geralmente expressos no tecido adiposo. (1,38) O significado clínico dos tumores mama “normal-like” ainda deve ser determinado (1,16,20,39) – os autores dessa classificação molecular agora sugerem que este subgrupo possa ser um mero artefato de representação da amostra (isto é, contaminação por tecido normal). (1,23,38)

Os subtipos HER2 e “basal-like” têm em comum um comportamento clínico agressivo. Tumores com sobre-expressão de HER2 expressam genes associados a via HER2 e/ou a amplificação do HER2 no 17q12 (isto é, *GRB7*). Embora a maioria (>80%) dos carcinomas HER2 definidos pelos microarrays contêm amplificação do gene HER2, (1,40) nem todos os casos com amplificação do HER2 detectado por ISH (hibridização *in situ*) e/ou por imunohistoquímica (com escore para HER2 de 3+) inserem-se no grupo HER2 por análise de expressão gênica. (1,23,40) Um significativo número de carcinomas HER2-amplificado, RE-positivo atualmente entram no subtipo luminal B, em vez do subtipo HER2. (1,23,40)

Tumores “basal-like” compreendem o terceiro subtipo RE-negativo e têm esse nome porque as células neoplásicas desses tumores expressam genes geralmente encontrados nas células basal/mioepitelial normais da mama, incluindo citoqueratinas de alto peso molecular 5 e 14, (7,34) P-caderina, (41,42) p63, (42) caveolinas 1 e 2, (44-51) nestina, (52) CD44, (53), e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). (46) Em uma minoria de casos, eles apresentam amplificação do gene *EGFR* (1,22) ou aneussomia. (1,54) Tumores “basal-like” podem expressar genes característicos do epitélio luminal, incluindo citoqueratinas 8/18, também gene *KIT*, que é expresso por tumores do epitélio luminal RE-negativo. (1,55) Carcinomas “basal-like” são geralmente de alto grau histológico, tendo alto índice mitótico, zonas de necrose central, bordas compressivas, infiltrado linfocitário evidente, achados medulares típico/atípico e áreas metaplásicas. (1,56-59) Eles são mais prevalentes em mulheres jovens descendentes africanas e hispânicas, sendo associados a fatores de risco distintos e paradoxalmente

mostram alta taxa de resposta aos regimes de quimioterapia tradicional quando pior prognóstico. (1,60-62)

Os achados morfológicos e imunoistoquímicos dos carcinomas “basal-like” são semelhantes aqueles descritos em tumores originando-se em pacientes portadores de mutação germinativa do gene de suscetibilidade ao câncer de mama, *BRCA1*. (1,50) Existe evidência de que a via *BRCA1* é disfuncional nos carcinomas esporádicos “basal-like”. (1,59) Modelos experimentais com camundongos tendo como alvo os genes *Brca1* e *Trp53* em células luminais e basais da glândula mamária destes resultaram em desenvolvimento de tumores mostrando achados morfológicos e imunoistoquímicos semelhantes aqueles vistos em carcinomas de mama humano “basal-like”. (1,63,64)

Em adição a esses 3 subtipos, ao menos 3 outros grupos moleculares de câncer RE-negativo têm sido descritos: o grupo de tumores “molecular apócrino”, que tem sido referido por alguns autores ser semelhante ao subtipo HER2-positivo/RE-negativo e parece ter ativação da sinalização do receptor de androgênio; (1,17,65) o subtipo “interferon”, que é caracterizado pela alta expressão de genes reguladores de interferon, incluindo *STAT1* ;(1,9) e o subgrupo “claudin-low”, que compreende tumores que têm achados transcriptômicos sugestivos de um fenótipo “cancer stem cell-like”. (1,66,67) Deve ser notado que os significados clínicos e biológicos dos tumores pertencentes a essas novas classes descritas ainda estão por serem determinados. (1)

### **A taxonomia do câncer de mama**

As primeiras classificações do câncer de mama foram baseadas somente em descrições morfológicas, com concordância limitada entre as entidades descritas na Europa e América do Norte. (68-71) O meticoloso trabalho de John Azzopardi, (68) que definiu muitas das entidades atualmente aceitas pela última classificação da OMS, seguido pelo influente trabalho de Page e Anderson, (70) tiveram um impacto dramático na taxonomia do câncer de mama. (4)

A maioria dos esquemas de classificação falharam devido ao fato de que os carcinomas de mama são frequentemente compostos por áreas de padrões morfológicos distintos. Ellis et al. (72) usaram a mesma abordagem para demonstrar que tipos histológicos proporcionavam importante informação clínica em relação a sobrevida das pacientes com câncer de mama e demonstraram que algumas entidades (por exemplo, o carcinoma tubular) estiveram associadas a excepcional bom prognóstico e não deveriam requerer terapia adjuvante na maioria dos casos. (4)

A última classificação da OMS (2) proporcionou uma precisa definição do CDI-SOE e tipos mistos de câncer de mama. CDI-SOE são definidos como tumores nos quais mais de 50% de sua massa mostram um padrão não especial. Tipos especiais puros são definidos como carcinomas que contém achados morfológicos de uma das entidades reconhecidas em mais de 90% da sua massa tumoral. Os carcinomas invasivos remanescentes são definidos como carcinomas mistos. Essa classificação reconhece a existência de 18 tipos de câncer de mama, incluindo CDI-SOE e 17 tipos especiais. (2) Em adição, 4 variantes do CDI-SOE são identificadas: carcinoma com células gigantes “osteoclasto-like”, carcinoma

com achados coriocarcinomas, carcinoma com achados melanóticos e carcinoma pleomórfico. Alguns tipos especiais são subclassificados, incluindo carcinomas lobular (alveolar, sólido, pleomórfico e tubulolobular), mucinoso (cistadenocarcinoma, células colunares e anel de sinete), neuroendócrino (sólido, carcinóide atípico, pequenas células ou “oat-cell” e grandes células) e metaplásico (epitelial e mesenquimal misto e puro epitelial que é subseqüentemente subdividido em 4 subgrupos).(2) Wargotz et al. (73) sugeriram 5 variantes de carcinomas metaplásicos, incluindo carcinoma produtor de matriz, carcinoma de células escamosas (epidermóide), carcinoma de células fusiformes, carcinosarcoma e carcinoma metaplásico com células gigantes osteoclásticas.

A subclassificação dos carcinomas metaplásicos é complexa do ponto de vista em definir seu uso na prática clínica, e controvérsias existem sobre o diagnóstico dos carcinomas medulares. (2) Após essa classificação da OMS de 2003, surgiram algumas novas entidades, como por exemplo o tumor da mama semelhante a carcinoma papilar da tireóide, variante de células altas, (74) e o adenocarcinoma polimórfico da mama (75); entretanto, o significado clínico e biológico dessas novas entidades ainda não foi determinado. Além disso, algumas variantes do carcinoma papilar, previamente definidos como por exemplo, o carcinoma papilar *in situ*, sabe-se hoje, que são invasivos e têm potencial de metastatizar. (76,77) Trata-se do carcinoma papilar intracístico (CPI) cuja literatura é um pouco controversa em relação a sua categorização e nomenclatura. Em 1980, um sistema de classificação foi desenvolvido por Leal et al. (78) dividindo carcinomas papilares em formas invasivas e não-invasivas. A forma não-invasiva foi



então, posteriormente subdividida em forma difusa, a variante papilar do carcinoma ductal *in situ* (envolvendo múltiplos ductos de tamanho pequeno a médio), e a forma localizada, também chamada de carcinoma papilar “intracístico” ou “encistada”. Essa forma localizada descreve um tumor solitário em um ducto dilatado ou encistado. A presença de uma camada de células mioepiteliais na periferia das áreas de carcinoma papilar tem historicamente sido usada para definir uma lesão semelhante a um carcinoma *in situ* e não invasivo. Estudos recentes têm mostrado que, em contraste ao carcinoma papilar *in situ*, CPI não parece demonstrar uma camada de células mioepiteliais circundando os nódulos tumorais. Esta observação tem levado a idéia de que, em alguns casos, o CPI não pode ser considerado um carcinoma *in situ*, mas um nódulo encapsulado de carcinoma invasivo de baixo grau ou parte de um espectro de progressão intermediária entre carcinoma *in situ* e doença invasiva. Alguns patologistas preferem agora o termo de “carcinoma papilar encapsulado” em relação ao mais tradicional “carcinoma papilar intracístico”. (79) Não há relatos na literatura quanto ao perfil molecular dos CPI.

### **A real validação do perfil de expressão genética**

Apesar da enorme aceitação pela comunidade científica de que o perfil de expressão genética poderia ser o padrão ouro (“gold standard”) na taxonomia do câncer de mama, (4,38) a validade desta taxonomia tem sido recentemente questionada, (4,80,81) dado que citoqueratinas luminais 8 e 18 são consistentemente expressas em carcinomas “basal-like”, (4,47,57) e um substancial número de tumores classificados como pertencentes ao subtipo HER2 por

análise de microarray não revelam expressão de HER2 e/ou amplificação de *HER2*. (4,23,40) Além disso, nem todos os carcinomas da mama podem ser sistematicamente classificados em subgrupos moleculares descritos, (4,10) e a estabilidade de alguns desses grupos é subestimada, opondo-se a sua identificação sistemática por análise agrupada hierárquica. (12) Traduzindo tudo o que foi mencionado anteriormente, essa taxonomia molecular proporcionou pouco avanço a uma subdivisão padronizada do câncer de mama para objetivos terapêuticos (que é, câncer de mama de subtipo luminal-RE- positivo, HER2-positivo, e de subtipo basal-like-RE-negativo, HER2-negativo). (12)

Finalmente, outros pesquisadores independentes que tentaram elaborar uma taxonomia molecular baseada na tecnologia de expressão genética, mas usaram diferente avaliação de bioinformática, falharam em identificar os mesmos 5 subgrupos fenotípicos. (17,65) Somente os subtipos luminais e “basal-like” puderam ser confirmados. Surpreendentemente, entretanto, esses estudos independentes demonstraram a existência de um subgrupo de câncers de mama RE-negativo caracterizado pelo aumento da expressão e sinalização do receptor de androgênio, que foram chamados de carcinomas “moleculares apócrinos”, (17) como mencionado anteriormente.

A taxonomia molecular tem sido descrita como uma classificação que proporciona um preciso “retrato” (portrait) do câncer de mama que contém enorme diversidade fenotípica; entretanto, tipos especiais histológicos têm sido quase que completamente negligenciados. De fato, Perou et al. (7) analisaram somente CDI-SOE e 2 carcinomas lobulares invasivos. A questão na qual a taxonomia

molecular pode ser aplicada a tipos especiais de câncer de mama tem sido recentemente investigada. (4,81-89) Uma análise imunoistoquímica e molecular de 11 tipos especiais de câncer de mama demonstrou que cada tipo especial de câncer de mama é composto por tumores que são mais homogêneos que CDI-SOE e carcinomas lobulares invasivos. (4,82) Com a exceção dos carcinomas apócrinos e lobulares, cada tipo especial de câncer de mama pertence a somente um subtipo molecular. Por exemplo, carcinomas tubular, mucinoso e neuroendócrino consistentemente apresentam um fenótipo luminal; carcinomas adenóide-cístico, medular e metaplásico apresentam um fenótipo “basal-like”. (4,82) De fato, esses achados estão em concordância com aqueles de estudos prévios. (4,57,58,88-90) Quando sujeitos a um agrupamento hierárquico não supervisionado, nenhum dos tipos histológicos especiais foram de um fenótipo mama “normal-like”, e 6% deles revelaram um fenótipo apócrino molecular. (4,81)

### **Classificação dos tipos especiais histológicos de acordo com o perfil de expressão genética**

Embora tipos especiais de câncer de mama possam ser classificados em subgrupos moleculares, análise supervisionada que comparou tipos especiais de um determinado subtipo molecular com CDI-SOE do mesmo subtipo molecular tem consistentemente revelado importantes diferenças transcriptômicas e genéticas. Por exemplo, quando carcinomas metaplásicos (CM) foram comparados com CDI-SOE “basal-like”, vias e genes relatados ao reparo do DNA e resposta a quimioterapia, tais como *BRCA1*, *PTEN* e *TOP2A*, estavam significativamente “downregulated” em carcinomas metaplásicos. (4,86) Esses achados podem

explicar os relatos da fraca resposta à quimioterapia deste subtipo histológico. Em adição, CM mostraram significativa maior expressão de genes relacionados a diferenciação mioepitelial e a transição epitelial-mesenquimal do que CDI-SOE de subtipo molecular “basal-like”. (4,83,86) Além disso, mutações da  $\beta$ -catenina e ativação genética da via Wnt são mais prevalentes nos CM do que nos CDI-SOE e outros tipos especiais de câncer de mama. (4,91) O perfil transcricional dos CM está relacionado ao subgrupo “claudin-low” que é claramente diferente dos carcinomas “basal-like” e através da avaliação do perfil de hibridização genômica comparativa foi constatado uma riqueza em marcadores “stem cell-like”. Além disso, CM apresentam ativação da via PI3K/AKT devido a mutação e amplificação dos genes desses tumores, diferentemente dos carcinomas “basal-like” em que mutações genômicas dessa via é um fenômeno incomum. (92) CM, como carcinomas “claudin-low”, expressam altos níveis de marcadores de transição epitelial-a-mesenquimal e mostram elevadas taxas de CD44+/CD24- e CD29+/CD24-, caracterizando assim a proposta de que tais tumores representem os marcadores de carcinomas de mama “stem cell-like”. Achados “claudin-low”, incluindo propriedades de transição epitelial-a-mesenquimal e “stem cell-like”, contribuem para que esses CM apresentem um fenótipo agressivo e de resistência ao tratamento quimioterápico. (92)

Durante muitos anos, os carcinomas medulares têm sido um entidade fascinante e controversa. (88) São definidos como carcinomas bem circunscritos compostos de células pouco diferenciadas crescendo num padrão sincicial, sem nenhuma estrutura glandular, apresentando esparsa necrose tumoral, estroma

escasso e um proeminente infiltrado linfoplasmocitário (carcinomas medulares típicos). Tumores mostrando associação da arquitetura sincicial predominantemente com somente 2 ou 3 dos outros critérios são geralmente designados como carcinomas medulares atípicos ou carcinomas ductais invasivos com achados medulares. (93)

Carcinomas medulares e CDI-SOE de fenótipo “basal-like” têm distintas características moleculares. (4,81,87-89) Uma análise do perfil de expressão genética dos carcinomas medulares revelou uma “upregulation” dos genes envolvidos na apoptose e resposta imune, tais como interleucinas, citocinas  $T_H1$  e genes envolvidos na diferenciação  $T_H1$  comparados com CDI-SOE “basal-like”. (4,81,87) Reciprocamente, genes envolvidos na arquitetura do citoesqueleto e remodelamento, e invasividade celular foram “downregulated” nos carcinomas medulares, o que pode explicar a sobrevida favorável relatada desse tipo especial histológico RE-negativo. (4,81,87)

Carcinomas adenóide-císticos, que consistentemente mostram um fenótipo “basal-like”, (4,82,90) têm achados morfológicos distintos, (2) apresentação clínica e mostram “downregulation” de genes relacionados à migração celular, proliferação e resposta imune, (82) que associam-se ao seu baixo grau histológico, explicando seu excelente prognóstico. (4)

O estudo de Weigelt et al. (82) demonstrou que alguns subtipos histológicos não constituem entidades distintas. Alguns tipos especiais têm mostrado similaridades ao nível transcriptômico, enquanto outros têm perfis transcriptômicos

distintos. Como exemplo, o carcinoma micropapilar invasivo (CMI) puro constitui um grupo distinto de tumores RE positivos. A propósito, tumores micropapilares têm recentemente sido relatados por apresentarem perfis genéticos moleculares distintos do CDI-SOE, confirmando que CMI da mama constituem uma entidade patológica distinta. (94) São caracterizados por um padrão de crescimento distinto de agrupamentos celulares com “polaridade invertida” circundando espaços vazios no estroma. A identificação objetiva deste subtipo histológico se deve ao fato de apresentar um padrão característico “inside-out” de expressão da análise imunohistoquímica de EMA. A identificação do fenótipo micropapilar não é meramente acadêmica, desde que tais tumores são associados com peculiar invasão linfovascular, uma alta incidência de metástases para linfonodos axilares, e um pior prognóstico em relação aos CDI-SOE. (95) Estudos conflitantes em relação ao perfil imunohistoquímico dos CMI têm sido relatados. Expressão do RE tem sido encontrado em 25% a 91% dos CMI puros, enquanto que a sobreexpressão de HER2 tem sido observada em 36-100%. Interessantemente, Vargas et al, (95) relataram que 72% do CMI expressaram HER2, entretanto, amplificação do gene HER2 ocorreu em apenas 45% dos casos.

Por outro lado, o estudo de Weigelt et al. (82) mostrou forte evidência sobre dois subgrupos grandes de tipos especiais de câncer de mama RE positivos: um caracterizado por diferenciação neuroendócrina e outro composto por tipos especiais apresentando comportamento clínico indolente. Neste estudo, tumores neuroendócrinos, mucinosos celulares e hipocelulares RE-positivos pertencem a um único subgrupo molecular, pois mostraram alta semelhança em relação a

expressão genética global e foram subtipos moleculares luminais. Não nos surpreende devido ao fato destes tipos especiais de câncer de mama terem semelhança na distribuição da idade, ocasionalmente mostrarem sobreposição nos aspectos morfológicos e terem comportamento clínico semelhantes. (2) Além disso, o mesmo estudo, (82) identificou genes de invasão e proliferação “*down-regulated*” em ambos carcinomas mucinosos e neuroendócrinos, o que pode explicar a baixa incidência de metástases em pacientes com carcinomas mucinosos.

Os carcinomas apócrinos invasivos foram inicialmente considerados uma variante do CDI-SOE, mais do que um subtipo distinto. Entretanto, essa suposição tem sido questionada recentemente. (96) Microscopicamente, carcinomas apócrinos invasivos demonstram o mesmo padrão de crescimento arquitetural do CDI-SOE, diferenciando somente pela aparência citológica. As células são caracterizadas pelos achados apócrinos típicos como citoplasma abundante eosinofílico granular, nucléolos proeminentes múltiplos. (96) A incidência de carcinoma apócrino puro varia de 1-4%. Esta variabilidade na incidência é provável resultar da falta de um critério diagnóstico bem definido. Rosen estipulou que o termo deveria ser reservado para neoplasias na qual quase todo o epitélio apresentasse aspectos citológicos apócrinos. (96,97)

Estudos transcriptômicos e genômicos têm demonstrado que alguns tipos especiais histológicos de câncer de mama são, de fato, entidades moleculares distintas. (4,94) Carcinomas micropapilares invasivos preferencialmente têm um fenótipo luminal B; (4,82,94) entretanto, quando esses tumores são avaliados por análise agrupada hierárquica de expressão genética baseada em microarray,

associados com amostras de outros tipos especiais de câncer de mama, carcinomas micropapilares parecem formar um agrupamento quase que exclusivo. (4,82) Além disso, análise genômica revelou que tumores micropapilares são caracterizados por um grupo de aberrações no número de cópias de DNA que são diferentes daqueles encontrados nos CDI-SOE com RE e grau semelhantes. (4,94,98) Avaliando-se em conjunto, esses achados proporcionam forte evidência circunstancial a sugerir que a histologia micropapilar não é simplesmente um padrão histológico peculiar, mas é de fato, uma entidade morfológica e molecular distinta. (4)

O grupo desses e outros autores (58,86,99) têm demonstrado que mais de 90% dos carcinomas metaplásicos não expressam RE e HER2, e mostram um perfil imunistoquímico e transcriptômico “basal-like”. Semelhante ao CDI-SOE de fenótipo “basal-like”, carcinomas metaplásicos parecem ter a via *BRCA1* disfuncional, (50,59) e em mais de 60% desses tumores, *BRCA1* é “downregulated” devido a metilação do promotor do gene. (59) Dado que a maioria dos carcinomas de mama “basal-like” mostram uma disfunção da via *BRCA1* e apresentam mutações no gene *TP53*, (100) foi construído o modelo condicionado experimental *Blg-Cre; Brca1<sup>F22-24/F22-24</sup> ; p53<sup>+/-</sup>*, no qual o gene *Brca1* é inativado nas células que expressam β-lactoglobulina (que são, células epiteliais luminiais da glândula mamária do rato), e todas as células do animal têm somente um alelo “wild-type” de *Trp53*. (101) Análises patológicas dos tumores destes ratos revelaram que 78% deles não expressavam receptores hormonais e HER2 e expressavam marcadores basais (citoqueratina 14 e/ou EGFR) e 88% mostravam elementos metaplásicos homólogos (metaplasia



escamosa e/ou fusocelular). (101) Esse modelo de rato proporcionou outra linha de evidência (59) para a conexão entre fenótipo “basal-like” e disfunção da via BRCA1 e pode ser um bom modelo para utilizar novas terapias para carcinomas “basal-like”. Outro modelo condicionado de rato (63) tem mostrado que a inativação do *Brca1* e *Trp53* nas células positivas para citoqueratina 14 da glândula mamária do rato leva ao desenvolvimento de tumores com características morfológicas e fenotípicas idênticas aquelas observadas no estudo anterior. (101) Avaliando-se em conjunto, esses achados sugerem que a inativação concomitante desses genes pode levar ao desenvolvimento de câncer de mama “basal-like” com elementos metaplásicos, independentemente do tipo celular no qual *Brca1* e *Trp53* estão inativados. (4)

Muitos estudos têm procurado identificar genes implicados na sobrevivência e crescimento de células cancerosas (“drivers”), tanto quanto alvos terapêuticos novos; tais estudos têm sido desafiadores devido a heterogeneidade das aberrações cromossômicas presentes em grupos de tumores da mama. (3,15,102-104)

Tipos especiais de câncer de mama têm padrões transcriptômicos mais homogêneos que CDI-SOE, (82) indicando que cada tipo especial histológico deve ser dirigido (“driven”) por uma pequena constelação diversa de eventos genéticos e epigenéticos. (3,82) A análise genética dos carcinomas lobular, tubular, lobular pleomórfico e micropapilar têm demonstrado que tumores pertencentes a cada um desses tipos histológicos são relativamente homogêneos no padrão de lesões genéticas, em particular quando comparados com a

heterogeneidade genética exibida pelos CDI-SOE. (94,102,105-107) Além disso, carcinomas micropapilares têm padrões de alterações genéticas que são distintas dos CDI-SOE com grau e RE semelhantes. (94,107) Carcinomas de histologia mista, nos quais um dos componentes tem achados micropapilares, revelam aberrações genéticas semelhantes aos carcinomas micropapilares *bona fide*, sugerindo que a histologia de alguns reflete as aberrações genéticas adjacentes em subgrupos de câncer de mama. (107)

Um dos fatores limitantes em identificar novos alvos terapêuticos em câncer de mama é a heterogeneidade desses tumores. (7,15,16,38,102,108) Com base nos dados mencionados acima, estudar cada tipo histológico especial de câncer de mama separadamente poderia ser um caminho efetivo em reduzir *a priori* “viés” eventualmente associada a complexidade transcriptômica e genética destes tumores. Essa abordagem poderia promover a identificação de genes, vias moleculares e/ou redes que poderiam ser exploradas terapêuticamente no manuseio de pacientes com câncer de mama. (3,15)

### **Os “drivers” biológicos**

Genes que são sobre-expressos quando amplificados poderiam constituir “drivers” biológicos (por exemplo, HER2 em mais de 20% dos câncers de mama) e serem explorados terapêuticamente. (104,108-110) Devido a sua heterogeneidade, quando CDI-SOE consecutivos são investigados quanto a presença de amplificações recorrentes, regiões de amplificação diferentes do locus HER2 são encontradas em somente uma pequena minoria de tumores. Reis-

Filho et al. (110) testaram em um tipo histológico específico de câncer de mama que poderia levar a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Uma análise de séries de carcinoma lobular clássico através de hibridização genômica comparativa por alta resolução e hibridização *in situ* revelaram amplificações recorrentes na região cromossômica 8p11.2-p12, que englobam o loco do gene *FGFR1*. (110) Posteriormente, foi identificado um modelo experimental para carcinoma lobular que apresenta essa amplificação, sendo usado uma combinação de RNA de interferência e inibição química para demonstrar que o silenciamento do gene *FGFR1* é seletivamente letal nessas linhas celulares com essa amplificação e sobreexpressão, sugerindo que o *FGFR1* é um potencial alvo terapêutico para o subgrupo de carcinomas lobulares. (110) Análise de estudos de coorte de pacientes com câncer de mama através de Southern blotting (111) ou hibridização *in situ* cromogênica (112) revelaram que amplificação do *FGFR1* está presente em aproximadamente 10% de todos os carcinomas de mama, sendo encontrado com mais frequência em casos RE-positivos. Amplificação do gene *FGFR1* é um fator prognóstico independente de tamanho, grau e estado nodal e um preditor independente de recidiva tumoral seguido de terapia endócrina em doença RE-positiva. (112)

Entendendo os achados genéticos e os “drivers” biológicos dos tipos especiais de câncer de mama podemos também proporcionar melhoria na terapia sistêmica adjuvante oferecida a esses pacientes. (4) O conceito de tipos especiais de câncer de mama têm recentemente sido incorporado pelo International Cancer Genome Consortium, e o tipo, padrão e complexidade das

aberrações genéticas e transcriptômicas desses tumores irão brevemente tornar-se disponíveis. Até então, patologistas devem esforçar-se a desenvolver uma classificação padronizada para essas fascinantes entidades, que nos levarão a um melhor entendimento dos seus comportamentos clínicos. (4)

Portanto, a classificação imunohistoquímica molecular dos carcinomas invasivos da mama tem sido desenvolvida baseada no perfil de expressão genética dos dois tipos histológicos mais freqüentes de carcinomas invasivos da mama, os ductais e menos frequentemente os lobulares, que correspondem a 85-90% de todos os carcinomas mamários invasivos existentes.

Neste momento, há poucos trabalhos na literatura que busquem avaliar o perfil imunohistoquímico dos diferentes tipos especiais histológicos de carcinomas invasivos da mama que não sejam carcinomas ductais e lobulares em *tissue microarrays*, tais como tubulares, mucinosos, papilares encapsulados e invasivo, lobulares, micropapilares, medulares típicos e atípicos, metaplásicos, apócrinos e mistos. Portanto, é necessário caracterizar do ponto de vista imunohistoquímico os diferentes subtipos histológicos de carcinomas invasivos da mama em subtipos moleculares, tais como: luminal A, luminal B, sobreexpressão de HER2, “basal-like” e triplo negativo não-basal ou inclassificável.

## **Avaliação da expressão imunoistoquímica da CK19 nos carcinomas da mama**

É interessante ressaltar que a CK19 é um importante marcador para carcinomas de mama, sendo positivo em 98.2% dos adenocarcinomas mamários. (113) Após esse conhecimento, um grupo de Kobe no Japão criou um método molecular para diagnóstico intraoperatório de metástases no linfonodo de pacientes com câncer de mama chamado de amplificação de ácido nucléico em um passo (OSNA). (114-116) O método semiautomático de OSNA (Sysmex, Kobe, Japão) dura cerca de 30-40 minutos para avaliação de 3-4 linfonodos no total. Esse acesso molecular quantitativo também permite a distinção do tamanho da metástase. (114-115) No futuro próximo, essa metodologia poderá substituir o estudo tradicional do linfonodo sentinela (LS) que só utiliza a morfologia. Entretanto, é importante saber se o tumor primário da mama é realmente positivo para CK19 antes de avaliar o LS pelo método de OSNA para evitar taxas falso-negativas no exame do LS. Os estudos prévios somente avaliaram taxas de positividade para a CK19 em carcinomas ductais, lobulares, medulares e de pequenas células. Os carcinomas tubulares, mucinosos, micropapilares, metaplásicos, apócrinos, papilares encapsulados e invasivos e outros mesmos como mistos, não foram avaliados por Chu et al. (121) e demais autores. (117-120)

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral da tese

Avaliar o perfil imunohistoquímico com ênfase na classificação molecular dos tipos especiais histológicos de carcinomas da mama, incluindo a expressão da CK19.

### 2.2. Objetivo Geral do Primeiro Artigo

Caracterizar segundo o perfil imunohistoquímico, os tipos especiais histológicos de carcinomas da mama de acordo com a classificação molecular: luminal A, luminal B, sobre-expressão de HER2, basal-like e triplo negativo não-basal ou inclassificável.

### 2.3. Objetivos Específicos do Primeiro Artigo

- Avaliar o grau histológico, o tamanho do tumor mamário, o estado nodal de acordo com os diferentes tipos especiais histológicos de carcinomas da mama.

- Através dos marcadores RE, RP, RA (somente nos carcinomas apócrinos), HER2, Ki-67, P-caderina, CK5, EGFR, p63, caracterizar os diferentes tipos especiais histológicos de carcinomas da mama em luminal A, luminal B, sobreexpressão de HER2, basal-like e triplo negativo não-basal ou inclassificável.
- Avaliar a porcentagem de positividade dos marcadores “basais-like”, tais como P-caderina, CK5, EGFR, p63, em relação aos carcinomas “basal-like”.
- Avaliar o risco relativo do Ki-67 nos diferentes tipos especiais histológicos de carcinomas da mama em relação ao carcinoma tubular.

#### **2.4. Objetivo Geral do Segundo Artigo**

Avaliar a imunexpressão da CK19 nos diferentes tipos especiais histológicos de carcinomas da mama tanto no *tissue microarray* (TMA) quanto no bloco de parafina dos casos negativos, relatando a porcentagem de positividade de cada subtipo histológico para tal marcador.

## 3. Sujeitos e Método

---

Foram selecionados dos arquivos do laboratório privado Instituto de Patologia de Campinas, 157 blocos de parafina referentes à tumores mamários provenientes de biópsias excisionais de tipos especiais histológicos de carcinomas invasivos da mama, incluindo 14 carcinomas ductais invasivos durante o período de janeiro de 2004 a agosto de 2009. As amostras foram obtidas apenas de um laboratório com o intuito de torná-las bastante homogêneas para a realização do *tissue microarray* (TMA) na cidade do Porto, em Portugal. Foi realizado TMA contendo: 16 tubulares, 27 mucinosos, 8 papilares encapsulados e 1 papilar invasivo, 8 lobulares invasivos (5 clássicos e 3 pleomórficos), 8 micropapilares, 16 medulares atípicos e 5 medulares típicos, 10 metaplásicos, 24 apócrinos invasivos e 6 mistos. A primeira lâmina obtida do *tissue microarray* foi corada pela coloração de hematoxilina-eosina para avaliação da morfologia, sendo que o grau histológico já havia sido feito anteriormente e as demais lâminas do TMA foram submetidas a estudos imunistoquímicos referentes ao trabalho. Após a técnica do TMA foram ‘perdidos’ 14 cilindros no trabalho da classificação molecular, sendo que os lobulares foram excluídos do estudo por falta de casuística suficiente (TOTAL :



121 casos) e 27 cilindros no trabalho da CK19 (TOTAL : 116 casos), pois o TMA já estava bastante aprofundado ('desgastado').

A classificação imunoistoquímica molecular ficou demonstrada da seguinte maneira:

1- Luminal A: RE+/HER2-/Ki-67<14%;

2- Luminal B: RE+/HER2-/Ki-67≥14%;

3- Sobreexpressão de HER2: RE-/HER2+ (3+);

4- "Basal-like": RE-/HER2-/marcadores basais + (P-caderina+ e/ou CK5+ e/ou EGFR+ e/ou p63+);

5- Triplo negativo "não-basal" (inclassificável): RE-/HER2-/marcadores basais -.

## 4. Publicações

---

Artigo 1 -

Artigo 2 -

## 4.1. Artigo 1

### ***IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILING OF SPECIAL SUBTYPES OF BREAST CARCINOMAS WITH EMPHASIS ON MOLECULAR CLASSIFICATION***

**Authors:** César Augusto Alvarenga, Paula Itagyba Paravidino, Marcelo Alvarenga, Madalena Gomes, Rozany Dufloth, Sirlei Siani Morais, Luiz Carlos Zeferino, José Vassalo e Fernando Schmitt

#### **Abstract**

**Introduction:** Most invasive breast cancers are classified as invasive ductal carcinomas NOS, whereas about 25% are defined as histological special types (HST). These HST of breast cancers are categorized into at least 17 pathological entities; however, whether these also constitute different molecular entities remains to be determined. **Material and methods:** Seven of 17 HST of breast carcinomas (121 cases) were selected, including tubular, mucinous, papillary, micropapillary, medullary, metaplastic and apocrine carcinomas. Using immunohistochemistry markers like ER, PR, AR (only for apocrine carcinomas), HER2, Ki67, P-cadherin, CK5, EGFR and p63, those tumours were classified according the so-called molecular subtypes. This is the first paper that odds to compare gene expression profile (GEP) and immunohistochemical molecular classification (IMC) in HST of breast carcinomas. **Results:** Tubular, mucinous and papillary were all luminal A and B; medullary and metaplastic were almost basal-like tumours; micropapillary were luminal A, luminal B (50%) and HER2 overexpression. Apocrine carcinomas were the most heterogeneous of them with examples of luminal A, luminal B, HER2 overexpression and basal-like cases. The relative risks of Ki67 increased between the HST of breast carcinomas. The medullary carcinomas had the higher odds ratio (the risk increases to 110 times when compared with tubular carcinomas). **Discussion:** The IMC of HST of breast carcinomas was different from GEP in most cases, with the exception of tubular, mucinous and papillary that were the same; medullary and metaplastic were almost basal-like tumours (76.2% and 90%, respectively), although in GEP they were 100% basal-like tumours; micropapillary were luminal A, luminal B (50%) and HER2 overexpression, data different from GEP that showed almost all cases luminal B. Apocrine carcinomas had examples of luminal A, luminal B, HER2 overexpression and basal-like cases with high AR expression (91%). In Farmer's study those tumors belong to "apocrine molecular" group with ER-/AR+/HER2+or-. The immunostain expression did not correspond to GEP because there was a difference between genetic mutations and their protein expression.

## Introduction

Breast cancer is the most common non-skin malignancy in women and is a heterogeneous disease, comprising numerous distinct entities that have different biological features and clinical behavior. (1-3,4-6) There are the “histological special types” (HST) that account for up to 25% of all breast cancers, in contrast with the large majority (50-80%) of breast carcinomas that are called invasive ductal carcinomas not otherwise specified (IDC-NOS). (7)

The invasive breast cancers have been classified into subgroups based on histological grade, histological type, and on the expression of some predictive markers, including hormone receptors and HER2. (3,8) Ellis et al (7), in 2003, has proposed the World Health Organization classification of tumors by HST, using morphological criteria, genetic alterations and clinical information to demonstrate those different types of breast carcinomas with distinctive clinical presentations and outcomes.

Tubular carcinoma is composed of distinct, well differentiated tubular structures with open lumens that are lined by a single layer of epithelial cells. (9) Mucinous carcinoma is a well-differentiated adenocarcinoma characterized by abundant accumulation of extracellular epithelial mucus secreted by tumor cells. (10) Intracystic papillary carcinoma (IPC) is a distinctive variant of papillary ductal carcinoma confined to a dilated cystic space and surrounded by a fibrous capsule, and it has been suggested that finding only very few or absent myoepithelial cells (MEC) around IPC indicates that this tumor is invasive..[11-14] Pure micropapillary carcinomas is characterized by a distinctive growth pattern of cell clusters with ‘inverted polarity’, surrounded by empty spaces in a spongy stroma. [15] Medullary carcinoma (MC) is defined as a well circumscribed carcinoma composed of poorly differentiated cells growing in a syncytial pattern, with no glandular structures, sparse tumour necrosis (< 25%), scant stroma, and a prominent lymphoplasmacytic infiltrate. [16] Metaplastic carcinoma is a histologically heterogeneous and unique group of tumours defined by the presence of a glandular and a nonglandular component, that shows component derived from mesenchymal differentiation, including cells with spindle, osseous, or cartilaginous features. [17] Invasive apocrine carcinoma (IAC) has been regarded as a morphological variant of IDC-NOS, rather than a distinct subtype, but microscopically, these tumors only differ in their cytological appearance, characterizing by the typical apocrine features of abundant eosinophilic granular cytoplasm and prominent, and often multiple, nucleoli. [18]

This long-appreciated morphological and clinical heterogeneity in breast cancer was rediscovered at the molecular level in the study by Perou et al. [19,20] Breast carcinomas can be classified by hierarchical cluster analysis, into one of five molecular subtypes: luminal A, luminal B, basal-like, HER2 overexpressing and normal breast-like. (19-25) The most robust distinction observed by microarray analysis is between the estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative breast cancers. [8,9,26-28] The ER-positive branch of the cluster dendograms contained the luminal tumors, originally described as those that show expression patterns

reminiscent of 'normal luminal epithelial cells' of the mammary gland, including low molecular weight cytokeratins 8/18, ER and genes associated with an active ER pathway. [19-22,24,29] The ER-negative branch appears to be more heterogeneous: normal breast-like, HER2 and basal-like. Normal breast-like cancers, which are most probably an array artifact, have been shown to cluster together with fibroadenoma and normal breast samples and to be enriched for genes usually expressed in adipose tissue. [30] The HER2 and basal-like subtypes have in common an aggressive clinical behavior. The majority of microarray-defined HER2 cancers harbour *HER2* gene amplification or HER2 3+ immunohistochemical expression. [19,20,22] However, significant number of *HER2*-amplified, ER-positive cancers, actually fall into the luminal B subtype, rather than in the HER2-microarray subtype. [31,32]

Basal-like tumors comprise the third ER-negative subtype and were thus named because the neoplastic cells of these tumors consistently express genes usually found in normal basal/myoepithelial cells of the breast, including high molecular weight cytokeratins (5 and 17), P-cadherin and epidermal growth factor receptor (EGFR). [33] Basal-like tumours may express genes characteristic of luminal epithelia, including cytokeratins 8/18, albeit at lower levels than luminal carcinomas. [34]

Although extensively studied in IDC-NOS there are few studies using immunohistochemistry surrogate markers to classify special types of breast carcinomas according the so-called molecular subtypes. Therefore the aim of this study was to characterize a series of HST of breast carcinomas using immunohistochemistry and then compare the results with the current knowledge of gene-expression profiling (GEP) of the same HST of breast carcinomas.

## **Material and methods**

### **Breast tumour samples**

We selected from lumpectomies, 121 invasive breast carcinomas of special types: 16 tubular carcinomas, 27 mucinous carcinomas, 9 papillary carcinomas (8 encapsulated papillary carcinomas and 1 invasive papillary carcinoma), 8 pure micropapillary carcinomas, 21 medullary carcinomas (16 typical and 5 atypical), 10 metaplastic carcinomas (4 matrix production, 4 squamous cell carcinomas, 1 adenosquamous cell carcinoma and 1 spindle cell carcinoma), 24 apocrine carcinomas and 6 mixed carcinomas (2 ductal and micropapillary, 1 tubular and micropapillary, 1 tubulo-lobular, 1 ductal and tubular and 1 ductolobular carcinoma). There were also selected 14 invasive ductal carcinomas for appropriate negative and positive controls, to ensure the quality and adequacy of immunostain markers that are mentioned below. These tumours were consecutively retrieved from the histopathology files of the same laboratory of pathology in Campinas, São Paulo, Brazil. All cases were reviewed by three pathologists (CA, PP and FS) on hematoxylin and eosin-stained (H&E) sections.

### **TMA construction**

Representative areas of the invasive breast carcinomas were carefully selected on the H&E-stained sections and marked on individual paraffin blocks. Two tissue cores (2mm in diameter) were obtained from each specimen and precisely deposited into a recipient paraffin block using a TMA workstation (TMA builder 20010.02, Histopathology Ltd., Hungary). Fourteen TMA blocks were constructed, each one containing 24 tissue cores, arranged in a 4x6 sector. In each TMA block, normal breast and testicular tissue were included as a guide reading of the slides. After construction, 2µm tissue sections were cut and adhered to glass slides (Polysine™, Menzel-Glasser, Germany) for the immunohistochemical studies and a H&E-stained section from each TMA block was reviewed in order to confirm the presence of morphological representative areas of the original lesions. All immunostain markers were already validated in TMA series of the literature. [35-37]

### **Immunohistochemistry**

Slides were incubated with primary monoclonal antibodies against ER, PR, AR (only for apocrine carcinoma), HER2, Ki-67, CK5, EGFR, P-cadherin and p63. Details about primary antibodies, antigen retrieval and IHC detection systems are described in Table 1. Briefly, from the TMAs, 3µm serial sections were deparaffinised and rehydrated. Antigen retrieval was heat-induced at 98°C in a water-bath, using a commercially available citrate buffer solution (Lab vision, USA), 1:100, pH=6,0, or an ethylenediaminetetraacetic (EDTA) solution (Novocastra, UK), 1:10, pH=9. Except for EGFR, which antigen unmasking was performed by proteolytic enzyme digestion for 30 minutes (pepsin A, 4 g/L; Sigma-Aldrich, USA) at 37°C. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% (v/v) hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes, after the slides were then incubated with the primary antibodies. After washes, the slides were incubated with biotinylated secondary antibody, followed by streptavidin-conjugated peroxidase (Lab Vision, USA) or HRP labeled polymer (Dako, Denmark). Subsequently, the color was developed with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and the slides were counterstained with Gill's haematoxylin, dehydrated and mounted for evaluation by light microscopy.

The evaluation of the immunohistochemical results was performed by three pathologists (CA, PP and FS).

Positive nuclear staining of ER, PR and AR were evaluated according to the College of American Pathologists (CAP) guidelines (score above more or equal than 1% of positive cells). For p63, samples were scored as positive when at least 10% of nuclei were immunoreactive. Similarly the same cut off was used for CK5 cytoplasmic staining, as well P-cadherin membrane staining. [38,39] Membrane expression for HER-2 and EGFR was evaluated according to the

CAP and ASCO (ASCO/CAP 2007) guidelines. Breast carcinomas were considered HER2-overexpression when 3+ was attributed, and for EGFR was considered positive whenever the immunostaining was 2+ or 3+. The HER2 2+ cases in TMA were selected to repeat the immunostain in the entire paraffin tissue block. Ki-67 immunostaining was evaluated by estimating the percentage of tumour cells with positive nuclear staining, counting 1000 neoplastic cells in areas with highest positivity.

Tumors were classified as Luminal A (ER+,PR+,HER2-,low ki67), Luminal B (ER+,PR+,HER2+,high ki67), HER2 overexpressing (ER-, PR-,HER2+). The cut off for low Ki67 was lower than 14% of positivity and high ki67 was higher or equal than 14% of positivity. [40] Cases (ER-,PR-,HER2-) with immunoreactivity for CK5 or EGFR or P-cadherin or p63 were considered basal-like tumors and cases without expression of those basal markers were considered triple negative non-basal like or unclassified. [41] The Ki67 index (high and low also) was evaluated according to the histological subtypes of breast carcinomas, using tubular carcinomas like reference.

## Results

The patient mean age for mixed breast carcinoma was 48 years (42-52), for mucinous and papillary carcinomas were 64 years (40-88) and 65 years (35-87), respectively, and for the others types the patient mean age ranged between 55 and 59 years. All tubular carcinomas were histologic grade 1, and all micropapillary, medullary, metaplastic and apocrine carcinomas were histologic grade 2 or 3. Micropapillary and mixed carcinomas showed 71.4% and 66.7%, respectively, of prevalence of metastases in axillary lymph nodes (Table 2).

The Table 3 showed the immunohistochemical molecular classification (IMC) of HST of breast carcinomas. All tubular, mucinous and papillary carcinomas were estrogen receptor (ER) positivity, i.e., were luminal tumors. Most of the micropapillary and mixed carcinomas were luminal.

The estrogen receptor (ER) positivity ranged between 100% for tubular and papillary carcinomas and 10% for metaplastic carcinomas (Chi-square:  $p < 0.00001$ ). The progesterone receptor (PR) positivity ranged between 100% for papillary carcinoma, 80% for tubular carcinoma, 9% for medullary carcinoma and 0% for metaplastic carcinoma (Chi-square:  $p < 0.00001$ ). We observed also that 76.2% of medullary and 90% metaplastic were classified as basal-like. The apocrine carcinomas classified as luminal or HER2 overexpression or basal-like. There were no cases of triple negative non-basal.

Among the basal-like markers expression, P-cadherin [38] was positive in 100% of metaplastic carcinomas, 100% of medullary carcinomas and 57.1% in apocrine carcinomas. CK 5 was positive in 88.8% of metaplastic, 81.2% of medullary and 85.7% of apocrine carcinomas. EGFR was positive in 66.6% of metaplastic, 81.2% of medullary and 42.8% of

apocrine carcinomas. p63 was positive in only 6 basal-like cases, most of them metaplastic carcinomas (5 out 9 cases) (Table 4).

The Ki-67 protein expression in special histological types of breast carcinomas was evaluated (Table 5). The mean percentage of positive cell for Ki-67 protein ranged from 5% for tubular carcinoma to 74.6% to medullary carcinoma), and this percentage variation was statistically significant (Kruskal-Wallis Test:  $p < 0.00001$ ). The analysis Ki-67 protein expression considered tubular carcinoma as reference because it showed the lowest mean percentage of positive cells, and the lowest percentage of cases (13.3%) classified as high expression level. The medullary and mixed carcinomas revealed the highest percentage of high ki-67 expression level (OR: 110.50; CI95%: 9.01-1355.31), but this percentage was high also for apocrine (OR: 29.25; CI95%: 4.64-184.40) micropapillary (OR: 32.50; CI95%: 2.38-443.17), metaplastic (OR: 52.00; CI95%: 4.03-670.63) and mixed carcinomas (OR: 59.40; CI95%: 2.44-1448.80).

## Discussion

According to the results of this study, tubular carcinomas were all luminal A and luminal B, with high expression of ER, PR and low expression of Ki-67 index (5.5% of positivity). Mucinous and papillary carcinomas had almost the same immunostain profile than tubular, being all of them luminal A and luminal B. But they show a higher expression of Ki-67 index (17% for mucinous and 10% for papillary). They also showed cases of higher histological grade (2 and 3). Tubular, papillary and mucinous tumours had the same IMC than gene-expression profiling (GEP). [41] Micropapillary were luminal A, luminal B (50%) and HER2 overexpression, data different from GEP that showed almost all luminal B examples. [41]

Basal-like breast cancers were shown to encompass all metaplastic, and the good outcome medullary and adenoid cystic carcinomas in genetic profile expression arrays. [41] In our study, most cases, but not all of them, medullary and metaplastic carcinomas were basal-like tumours in IMC (76.2% and 90% respectively) with higher Ki-67 index than the others HST breast carcinomas, and the majority of them had high histological grade. Metaplastic carcinomas were almost all basal-like tumours by immunostain because they showed significantly higher expression of genes related to myoepithelial differentiation and epithelial-to-mesenchymal transition than invasive ductal carcinoma of a basal-like molecular subtype. [3]

Apocrine carcinomas were the most heterogeneous tumours of our study with luminal A, luminal B, HER2 overexpression and basal-like examples. The expression of AR in apocrine carcinomas was 91% and these tumours could belong to the 'apocrine molecular' group created by Farmer et al., [42] that showed upregulation of *AR* genes. Apocrine carcinomas had the highest levels of positivity for HER2 with 8 out 24 cases (33.3%) and 72% of all HER2 3+ cases of our study. This number is slightly higher than the invasive ductal carcinomas of English literature that varies between 25 and 30%. [43] In molecular profile microarrays they correspond



the molecular apocrine tumours with upregulation of genes for *HER2* amplification and downregulated of genes for *ER* and *PR*. [42]

We had 66.2% luminal (A and B) cases of IMC in our study, data higher than the majority of studies with ductal and lobular carcinomas, like Sousa et al reported, [44] with 58% of positivity. Just 7% were HER2-overexpression cancers, the majority of them being apocrine carcinomas (7 out 11 cases of HER2 3+ positive) with one case micropapillary and one case mixed carcinoma.

Morfologic aspects of the tumours, ER, PR and HER2 expression are important data for patients treatment [45] but we can not exclude the IMC because it can behave as a tool to classify the HST of breast carcinomas. The immunostain expression does not correspond to genetic expression profile arrays because there is a difference between genetic mutations and their protein expression.

**Funding:** Supported by *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, grant number 2010/00815-6), CAPES- Ministry of Education, Brazil (César A Alvarenga: PhD grant 3420-09-04) and *Fundação para a Ciência e Tecnologia*, Portugal (Madalena Gomes: PIC/IC/83264/2007).

**Competing interests:** None.

#### References:

- 1- Botha JL, Bray F, Snkila R, et al. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1718-1729.
- 2- Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 414-424.
- 3- Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy ? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 718-730.
- 4- Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother ? *J Pathol* 2008; 216: 394-398.
- 5- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, et al. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205: 248-254.
- 6- Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 659-672.

- 7- Ellis P, Schnitt SJ, Sastre-Garau, et al. Invasive breast carcinoma. In WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (eds Tavassoli FA, Devilee P) 13-59 (Lyon Press, Lyon, 2003).
- 8- Correa Geyer FC, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet ? *Int J Surg Pathol* 2008; 17: 285-302.
- 9- Shin HJ, Lim HH, Kim SM et al. Pure and mixed tubular carcinoma of the breast: mammographic and sonographic differential features. *Korean J Radiol* 2007; 8: 103-110.
- 10- Monzawa S, Yokokawa M, Sakuma T et al. Mucinous carcinoma of the breast: MRI features of pure and mixed forms with histopathologic correlation. *Am J Roentgen* 2009; 192: 125-131.
- 11- Wynveen C, Nehhozina T, Akram M et al. Intracystic papillary carcinoma of the breast: an in situ or invasive tumour ? Results of immunohistochemical analysis of clinical follow-up. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1-14.
- 12- Calderaro J, Espie M, Duclos J et al. Breast intracystic papillary carcinoma: an update. *Breast J* 2009; 15: 639-644.
- 13- Collins LC, Carlo VP, Hwang H et al. Intracystic papillary carcinomas of the breast: a reevaluation using a panel of myoepithelial cell markers. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1002-1007.
- 14- Esposito NN, Dabs DJ, Bhargava R. Are encapsulated papillary carcinomas of the breast in situ or invasive ? A basement membrane study of 27 cases. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 228-242.
- 15- Marchiò C, Irvani M, Natrajan R et al. Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol* 2008; 215: 398-410.
- 16- Rodriguez-Pinilla SC, Rodriguez-Gil Y, Moreno-Bueno G et al. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 501-508.
- 17- Hayes MJ, Thomas D, Emmons A et al. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4038-4044.
- 18- O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology* 2008; 52: 3-10.
- 19- Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010; 220: 263-280.
- 20- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.

- 21- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
- 22- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-8423.
- 23- Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumours are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: 96.
- 24- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167.
- 25- Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010; 220: 263-280.
- 26- Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
- 27- Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, et al. Genetic characterisation of breast cancer and implications for clinical management. *J Cell Mol Med* 2009
- 28- Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001; 61: 5979-5984.
- 29- Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 225-231.
- 30- Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 2008; 26: 1-10.
- 31- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167.
- 32- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-5685.
- 33- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-5374.
- 34- Westbury CB, Reis-Filho JS, Dexter T, et al. Genome-wide transcriptomic profiling of microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor- $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) in response to therapeutic radiation. *J Pathol* 2009; 219: 131-140.
- 35- Ronald Simon. Tissue microarrays: methods and protocols, methods in molecular biology.
- 36- Eckel-Passow JE, Lohse CM, Sheinin Y, et al. Tissue microarrays: one size does not fit all. *Diag Pathol* 2010;5: 48-57.

- 37- Turashvili G, McKinney SE, Goktepe O, et al. P-cadherin expression as a prognostic biomarker in a 3992 case tissue microarray series of breast cancer. *Mod Pathol* 2011; 24: 64-81.
- 38- Sousa B, Paredes J, Milanezi F et al. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Hist Histopathol* 2010; 25: 963-974.
- 39- Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino L, Schmitt F. P63, cytokeratin 5 and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virch Arch* 2005; 447: 688-694.
- 40- Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736-750.
- 41- Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008; 216: 141-150.
- 42- Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 4660-4671.
- 43- Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Applied Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17: 1-7.
- 44- Sousa B, Paredes J, Milanezi F et al. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Hist Histopathol* 2010; 25: 963-974.
- 45- Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Research* 2010; 12: 55-58.

**Table 1:** Immunostain markers in our study

<b>Primary antibody</b>	<b>Clone</b>	<b>Supplier</b>	<b>Incubation time (min)</b>	<b>Dilution</b>	<b>Antigen retrieval</b>	<b>Detection method</b>
<b>ER</b>	SP1	Neomarkers	60	1:100	Citrate	HRP-polymer
<b>PR</b>	1A6	Novocastra	60	1:40	Citrate	HRP-polymer
<b>HER2</b>	SP3	Neomarkers	30	1:80	Citrate	SABC
<b>EGFR</b>	31G7	Zymed	60	1:100	Pepsin	HRP-polymer
<b>CK5</b>	XM26	Neomarkers	60	1:50	EDTA	SABC
<b>P-cadherin</b>	56	BD Transduction	60	1:50	EDTA	HRP-polymer
<b>p63</b>	4A4	Neomarkers	60	1:150	Citrate	SABC
<b>Ki-67</b>	SP6	Neomarkers	60	1:200	Citrate	HRP-polymer
<b>AR</b>	AR27	Novocastra	60	1:50	EDTA	HRP-polymer

**Table 2:** Characteristics of patients and breast cancers according to histologic types: age, histologic grade, tumor size and lymph node status

Histologic types	n	Mean age	Histologic grade			Tumor size (mm) n (%)	Lymph node status	
			1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)		Negative n (%)	Positive n (%)
Tubular	16	55 (39-75)	16 (100.0)	-	-	10 (6-18)	10 (91.0)	1 ( 9.0)
Mucinous	27	64 (40-88)	19 (70.3)	6 (22.3)	2 ( 7.4)	26 (1-120)	12 (75.0)	4 (25.0)
Papillary	9	65 (35-87)	1 (11.1)	5 (55.6)	3 (33.3)	23 (3-35)	6 (86.0)	1 (14.0)
Micropapillary	8	57 (47-77)	-	4 (50.0)	4 (50.0)	17 (5-35)	2 (28.6)	5 (71.4)
Medullary	21	56 (35-85)	-	2 ( 9.6)	19 (90.4)	24 (4-50)	9 (64.3)	5 (35.7)
Metaplastic	10	57 (55-59)	-	4 (40.0)	6 (60.0)	16 (11-25)	3 (100.0)	0 ( 0.0)
Apocrine	24	59 (30-90)	-	4 (16.7)	20 (83.3)	17 (8-30)	11 (61.1)	7 (38.9)
Mixed	6	48 (42-52)	2 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.7)	31 (30-32)	1 (33.3)	2 (66.7)

**Table 3:** Molecular classification of histological types of breast carcinomas.

<b>Molecular classification</b>	<b>Tubular n (%)</b>	<b>Mucinous n (%)</b>	<b>Papillary n (%)</b>	<b>Micropapillary n (%)</b>	<b>Medullary n (%)</b>	<b>Metaplastic n (%)</b>	<b>Apocrine n (%)</b>	<b>Mixed n (%)</b>
<b>Luminal A</b>	14 (87.5)	13 (46.1)	6 (66.7)	3 (37.5)	2 ( 9.5)	–	2 ( 8.3)	1 (16.7)
<b>Luminal B</b>	2 (12.5)	14 (51.9)	3 (33.3)	4 (50.0)	3 (14.3)	1 (10.0)	8 (33.3)	4 (66.6)
<b>HER2-overexpression</b>	–	–	–	1 (12.5)	–	–	7 (29.2)	1 (16.7)
<b>Basal-like</b>	–	–	–	–	16 (76.2)	9 (90.0)	7 (29.2)	–
<b>Triple negative non-basal</b>	–	–	–	–	–	–	–	–

**Table 4:** Basal-like markers in metaplastic, medullary and apocrine carcinomas.

<b>Basal-like markers</b>	<b>Metaplastic n=9 (%)</b>	<b>Medullary n=16 (%)</b>	<b>Apocrine n=7 (%)</b>
<b>P-cadherin</b>	9/9 (100%)	16/16 (100%)	4/7 (57.1%)
<b>CK5</b>	8/9 (88.8%)	13/16 (81.2%)	6/7 (85.7%)
<b>EGFR</b>	6/9 (66.6%)	13/16 (81.2%)	3/7 (42.8%)
<b>P63</b>	5/9 (55.5%)	0 (0%)	1/7 (14.2%)



**Table 5:** Ki-67 protein expression in special histological types of breast carcinomas

Invasive breast carcinomas	Percentage of Positive tumor cells <sup>1</sup>					Ki67 expression level <sup>2</sup>
	Mean	Std Dev	Median	High	Low	OR (CI95%)
Tubular	5,5	4,7	4,0	2 13,3	13 86,7	Reference
Papillary	10,0	11,0	5,0	3 42,9	4 57,1	4,88 (0,59 a 40,26)
Mucinous	16,8	14,4	15,0	14 51,9	13 48,1	7,00 (1,32 a 37,16)
Apocrine	48,4	34,3	42,5	18 81,8	4 18,2	29,25 (4,64 a 184,40)
Micropapillary	29,3	18,6	27,5	5 83,3	1 16,7	32,5 (2,38 a 443,17)
Metaplastic	49,3	36,9	40,0	8 88,9	1 11,1	52,00 (4,03 a 670,63)
Mixed	41,0	27,0	35,0	5 100,0	0 0,0	59,40 (2,44 a 1448,80)
Medullary	74,6	34,6	92,5	17 94,4	1 5,6	110,50 (9,01 s 1355,31)

1. Kruskal-Wallis Test: <0.00001. 2. High Ki67 expression:  $\geq 14\%$  positive tumor cells.

## 4.2. Artigo 2

**Title: “The expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of OSNA assay”**

Authors: César A Alvarenga,<sup>1,2</sup> Paula I Paravidino,<sup>1,2</sup> Marcelo Alvarenga,<sup>1,3</sup> Rozany Dufloth,<sup>4</sup> Madalena Gomes,<sup>2</sup> Luiz C Zeferino,<sup>3</sup> Fernando Schmitt<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Patologia de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

<sup>3</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>PUC-Campinas University, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Medical Faculty of Porto University, Porto, Portugal

\*Corresponding author

Fernando Schmitt

IPATIMUP

Rua Dr. Roberto Frias s/n

4200-465 Porto, Portugal

E-mail: [fschmitt@ipatimup.pt](mailto:fschmitt@ipatimup.pt)

**Keywords:** CK 19, breast cancer, histological special types, OSNA

## ABSTRACT

**Background** The sentinel lymph node (SLN) is the first lymph node (LN) to receive the lymphatic drainage of a primary tumour and based on the knowledge that CK19 is positive in more than 95% of breast carcinomas cases, it was developed a molecular method for intraoperative diagnosis of SLN metastases (OSNA assay). **Aims** To evaluate CK19 immunoreactivity in a series of special histological types of breast carcinomas to verify if OSNA assay can be used in all breast cancer cases independently of the histological type. **Methods** One hundred and sixteen samples of invasive breast carcinomas of special type were investigated for CK19 immunoreactivity in tissue microarrays (TMA) and those negative cases were evaluated in the entire tissue tumour tissue. **Results** In the 116 cases of special types of breast carcinoma we found 88.9% positive cases for CK19 by TMA examination. Micropapillary and apocrine carcinomas were all positive for CK19 in TMAs. The tubular (93%), mucinous (86%), medullary typical and atypical (84%), mixed carcinomas (83%) had rose the rate of positivity for this marker to 100% after repeating the immunostain in whole tissue of negative TMA cases, because the expression of those cases were focal. **Conclusion** Most of breast cancer cases were positive for CK19, independently of the histological type and therefore OSNA assay can be used in all breast cancer cases with a potential low rate of false negative for CK19 detection of micrometastasis. Observed an important variation between the positivity assessed on TMAs and the entire tissue, these findings can be clinically relevant because in some cases CK19 is evaluated on core-needle biopsy previously the surgery.

### What the paper adds

The paper showed that majority of special types of breast carcinomas was positive for CK19. Thus, OSNA assay can be performed in all breast cancers with low false-negative rates for detection of breast cancer metastasis on sentinel lymph nodes. TMA method was not as accurate as the whole section method for evaluating the CK19 because the tumours exhibited focal expression patterns. This problem may occur when we assess CK19 on core-needle biopsy with the possibility of false-negative.

## INTRODUCTION

Breast cancer is a heterogeneous disease, comprising numerous entities that have different biological features and clinical behaviour.[1,4] The large majority (50-80%) of breast carcinomas are invasive ductal carcinoma not otherwise specified (IDC-NOS). This group of carcinomas comprises adenocarcinomas that fail to exhibit sufficient characteristics to warrant their classification into one of the special types.[1,5] These “histological special types” account for up to 25% of all breast carcinomas.[4] The latest edition of the WHO breast carcinoma classification accepts at least 17 distinct “histological special types”.[1,5]

An important marker for breast carcinomas is CK19 that was described as positive in 98.2% of breast adenocarcinomas.[6] After this, a group from Kobe created a molecular method

for intraoperative diagnosis of lymph node (LN) metastases in breast cancer patients called one-step nucleic acid amplification (OSNA).[7-9] The semiautomated OSNA assay consists of a short sample preparation step and real-time amplification of CK19 mRNA directly from the homogenate, without RNA purification steps. The time to perform the assay is 30-40 min for 3-4 LNs. This quantitative molecular assessment also allows to assess the metastasis size.[7,8] In a near future, this methodology may replace the traditional study of sentinel lymph node (SLN) just using morphology. However, it is important to know if the primary tumour is really positive for CK19 before the evaluation of SLN by OSNA assay to avoid false-negative rates in the SLN examination.

The studies showing high rate of positivity for CK19 in breast adenocarcinomas (98.2%)[6] evaluate only the medullary and the small cell carcinoma between the different "histological special types" of breast cancer. The tubular, mucinous, metaplastic, apocrine, micropapillary, encapsulated and invasive papillary and other breast carcinomas were not evaluated in Chu et al study.[6]

The aim of this study was to evaluate CK19 immunoreactivity in the different histological types of breast carcinomas by tissue microarray (TMA) and in the entire tissue of negative TMA cases to compare the results before the use of OSNA method in the practice routine.

## **METHODS**

### **Histological examination**

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 116 invasive special type breast carcinomas were consecutively retrieved from the histopathology files of a private Pathology Laboratory in Campinas, São Paulo, Brazil. All cases were reviewed by three pathologists on hematoxylin and eosin-stained (H&E) sections. This study was conducted under the national regulative law for the usage of biological specimens from archives, where the samples are exclusively available for research purposes in the case of retrospective studies.

### **Tissue microarray**

Representative areas of the invasive breast carcinomas were selected on the H&E-stained sections and marked on individual paraffin blocks. Two tissue cores were obtained from each specimen and deposited into a recipient paraffin block using a TMA workstation (Histopathology Ltd., Hungary). Fourteen TMA blocks were constructed, each one containing 24 tissue cores, arranged in a 4x6 sector. After construction, 2µm tissue sections were cut and adhered to glass slides for the immunohistochemical studies and the H&E-stained section from each TMA block was reviewed in order to confirm the presence of morphological representative areas of the original lesions.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase technique (LabVision, USA). Antigen retrieval was performed by proteolytic enzyme digestion (pepsin A, 4g/L; Sigma –Aldrich, Germany) at 37°C for 30 minutes. After washes in a phosphate buffer solution, slides were submitted to endogenous peroxidase activity blockage by incubation in a commercial solution (Dako, Denmark). Sections were incubated with blocking serum (LabVision) for 15 min. Anti-CK19 monoclonal antibody (clone b170, Novocastra, UK) was applied at a dilution of 1:100 for 1h at room temperature. After washes, the slides were incubated with biotinylated secondary antibody, followed by streptavidin-conjugated peroxidase (Lab Vision) and revealed with diaminobenzidine (Dako). The tissues were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and coverslipped using a permanent mounting solution (Zymed, USA). The evaluation of immunostainings was done by three pathologists (FS, CA and PP). Positive cytoplasmic staining for CK19 was considered if a tumour presented at least 10% positive cells, regardless of intensity of the reaction. The negative cases were selected to repeat the CK19 antibody in the whole paraffin-tissue block.

## RESULTS

In this study, 116 samples of invasive breast carcinomas of special type (lobular classic and pleomorphic, tubular, mucinous, micropapillary, encapsulated and invasive papillary, medullary typical and atypical, metaplastic and apocrine) were investigated for CK19 immunoreactivity in TMAs.

The results are summarized on Table 1 and Figures 1 and 2. Micropapillary and apocrine carcinomas were all positive for CK19 in TMAs. Tubular and mucinous carcinomas were almost totally positive for CK19 in TMA (93% and 86% of positivity) with a percentage of positivity that rose to 100% after the immunostain for CK19 in the whole tissue. Encapsulated and invasive papillary carcinomas were negative in only one case of TMA evaluation (85%) that remained negative after the whole tissue evaluation. Medullary carcinomas were negative by TMA examination in 3 cases. All these cases were focally positive when we evaluated the whole tissue (Figure 2).

There were six cases of mixed carcinomas: two cases of ductal and micropapillary carcinomas, one case of tubulo-lobular, one case of ductal and tubular carcinoma, one case of ductal and lobular carcinoma and one case of ductal, tubular and micropapillary carcinoma. On TMAs there was only one negative case for CK19, the ductal and micropapillary carcinoma, but this case also showed focal positivity when stained for the whole tissue.

In 10 cases of lobular carcinomas we had two negative cases for CK19 by TMA examination (both classic lobular carcinomas). These two negative cases did not show enough tumour material, so we could not evaluate these results. There were 6 cases of metaplastic carcinomas: 2 matrix-producing carcinomas, 2 squamous cell carcinomas, 1 adenosquamous cell carcinoma and 1

spindle cell carcinoma. When the entire tissues of two negative cases by TMA (one squamous cell carcinoma and one spindle cell carcinoma) were examined, the squamous cell carcinoma became positive (focal), but the spindle cell carcinoma remained negative (Figure 2).

In the 116 cases of special types of breast carcinomas we found 103 cases positive for CK19 by TMA examination (88.9%). Ninety seven cases were positive with diffuse pattern for CK19 and 6 cases were positive with focal pattern (around 10% of cells stained). Metaplastic and lobular carcinomas were the subtypes with higher figures of negative cases on TMAs. When we evaluated the whole sections of those 13 negative cases, 9 cases became positive for CK19 (one or more foci of positive cells, in all cases with percentage between 10 to 20% of the tumour section) and only the spindle cell carcinoma (metaplastic) and the papillary encapsulated carcinoma remained negative, with the percentage of positivity for CK19 in special histological types of breast cancer reaching 98.2%. The two cases of lobular carcinoma were not evaluated in whole tissue because of lacking of enough material.

## DISCUSSION

The sentinel lymph node (SLN) is the first lymph node (LN) to receive the lymphatic drainage of a primary tumour, playing an important role in the evaluation of nodal status and providing important prognostic information for planning systemic therapy. Its evaluation provides a better locoregional disease control, being less aggressive than complete axillary lymph node dissection, with less morbidity and cost, although with little or no impact on survival.[10-12]

Molecular approaches such as real-time PCR have been applied for the detection of tumour deposits in SLN of breast cancer patients and indicated higher sensitivity than histological investigations.[9,13-15] Results obtained with RT-PCR correlated with traditional predictors of prognosis.[9,14]

CK19 mRNA is a suitable marker for identifying breast cancer deposits in SLN because virtually all breast cancers express this cytoskeleton protein.[6] According the work of Lan Su et al.[16] there are a high concordance between positivity for the mRNA and protein of CK19 in malignant breast epithelial cells. Recently, a new semi-automated molecular method for rapid intra-operative diagnosis of SLN metastases in breast cancer patients was developed using One step nucleic acid amplification (OSNA method).[8]

This study is the first one, as far as we know, that evaluates CK19 positivity in the majority of different special types of breast carcinomas, because the previous published studies in the literature[6,17-19] reported CK19 positivity in ductal, lobular, medullary and small cell carcinomas. The overall CK19 positivity in our study was the same reported by Chu *et al* study for breast adenocarcinomas (invasive ductal carcinomas) (98.20%).[6] We also studied only 15 selected cases of invasive ductal carcinomas by TMA (data not shown). Only one case was negative on TMA but it was positive in the whole tissue examination. So, we found a 100% of positivity for CK19 immunostain in this small setting of invasive ductal carcinomas.

All micropapillary and apocrine carcinomas in our study were positive for CK19 on TMAs because the majority of them had a diffuse and strong staining and probably the results could be the same in breast core-needle biopsy (CNB) of these subtypes of breast cancer. A tubular, mucinous, medullary and mixed (including ductal also) carcinomas rose the rate of positivity for CK19 to 100% after repeating this immunostaining in whole tissue of negative TMA cases. Our results of positivity for this marker in medullary carcinomas were higher than Chu *et al* report[6] and Tot *et al* also[19] (100% x 90.2% and 87%, respectively).

Lobular and metaplastic carcinomas presented the lowest positive for CK19 on TMA (78% and 67%, respectively), but after the examination of whole tissue of negative TMA cases, we found one more focal positive case of squamous cell carcinoma (metaplastic carcinoma) and the positivity of CK19 rose to 80% on metaplastic carcinoma. When we studied the entire tissue of two negative TMA cases of classic lobular carcinomas, there was not enough material, so we could not evaluate these cases.

The TMA technique is an efficient and economic method to study many different tumours at the same time, but because it does not evaluate the entire tumour section, it could be compared with breast CNB that shows just a small sample of the primary tumour. The finding that in most of the tumours negative for CK19 on the TMA evaluation, it was possible to demonstrate focal positivity in whole tissue, should highlight that CK19 evaluation on CNB of special types of breast carcinoma can bring some false negative results. We found that almost all histological special types of breast invasive carcinomas showed the same results reported for IDC-NOS, with almost 100% of positivity for this marker when evaluated in whole tissue, with exception of metaplastic (spindle cell carcinoma) and papillary encapsulated carcinoma that showed lower rates of positivity for this marker (80% and 85%, respectively), because the positive tissue cases were focal or multifocal immunostain in the majority of the eleven studied cases.

In conclusion, most of breast cancer cases were positive for CK19, independently of the histological type and therefore OSNA assay can be used in all breast cancer cases with a potential low rate of false negative for CK19 detection of micrometastasis. However, a word of caution should be added, because as in those cases with only focal positivity, the small metastases may not harbour the CK19 positive component.

#### **TAKE HOME MESSAGES:**

Most of histological special types of breast carcinomas were positive for CK19 and therefore OSNA assay can be used in all breast cancer cases with a potential low rate of false negative for CK19 detection of micrometastasis.

The positivity for CK19 assessed on TMAs and the whole tissue session was discordant, because the positivity can be focal probably these can produce false-negative results in core-needle biopsy.

**Funding:** Supported by *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, grant number 2010/00815-6), CAPES- Ministry of Education, Brazil (César A Alvarenga: PhD grant 3420-09-04) and *Fundação para a Ciência e Tecnologia*, Portugal (Madalena Gomes: PIC/IC/83264/2007).

**Competing interests:** None.

#### REFERENCES:

1. **Weigelt B**, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy ? *Nat Rev Clin Oncol* 2010;**6**: 718-730.
2. **Reis-Filho JS**, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother ? *J Pathol* 2008;**216**: 394-398.
3. **Simpson PT**, Reis-Filho JS, Gale T, *et al.* Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; **205**:248-254.
4. **Vargo-Gogola T**, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**: 659-672.
5. **Ellis P**, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, *et al.* Invasive breast carcinoma. In *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, Tavassoli FA, Devilee P. Lyon Press: Lyon; 2003.
6. **Chu PG**, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;**40**: 403-439.
7. **Schem C**, Maass N, Bauerslag DO, *et al.* One-step nucleic acid amplification – a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch* 2009; **454**: 203-210.
8. **Tsujimoto M**, Nakabayashi K, Yoshidome K, *et al.* One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Can Res* 2007;**13**: 4807-4816.
9. **Visser M**, Jiwa M, Horstman A, *et al.* Intra-operative rapid diagnostic method based on CK 19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;**122**: 2562-2567.
10. **Noguchi M**. Sentinel lymph node biopsy as an alternative to routine axillary lymph node dissection in breast cancer patients. *J Surg Oncol* 2001;**76**: 144-156.
11. **Veronesi U**, Paganelli G, Vialle G, *et al.* A randomized comparacion of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;**349**: 546-553.



12. **Fisher B**, Anderson S, Bryant J, *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;**347**: 1233-1241.
13. **Weigelt B**, Verduijn P, Bosma A, *et al.* Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer* 2004;**39**: 1654-1667.
14. **Gillander WE**, Mikhitarian K, Hebert R, *et al.* Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg* 2004;**239**: 828-837; discussion 837-840.
15. **Abdul-Rassol S**, Kidson SH, Panieri E, *et al.* An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *J Clin Pathol* 2006;**59**: 289-297.
16. **Lan Su**, Morgan P, Lane B. Expression of cytokeratin messenger RNA versus protein in the normal mammary gland and in breast cancer. *Hum Pathol* 1996; **27**: 800-806.
17. **Heatley M**, Maxwell P, Whiteside C, *et al.* Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. *J Clin Pathol* 1995;**48**: 26-32.
18. **Kwaspen FHL**, Smedts FMM, Broos A, *et al.* Reproducible and highly sensitive detection of the broad spectrum epithelial marker keratin 19 in routine cancer diagnosis. *Histopathology* 1997;**31**: 503-516.
19. **Tot T**. The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. *Histopathology* 2000;**37**: 175-181.

**Tabela 1: Expressão da CK19 em casos do *tissue* microarray e no bloco de parafina dos tipos especiais histológicos de carcinomas da mama.**

<b>CARCINOMAS INVASIVOS DA MAMA</b>	<b>TOTAL DE CASOS (N=116)</b>	<b>POSITIVIDADE DA CK19 NO TMA N (%)</b>	<b>POSITIVIDADE DA CK19 NO BLOCO DE PARAFINA N (%)</b>
MICROPAPILAR	7	7 (100)	7 (100)
APOCRINO	21	21 (100)	21 (100)
TUBULAR	14	13 ( 93)	14 (100)
MUCINOSO	26	23 ( 86)	26 (100)
PAPILAR	7	6 ( 85)	6 ( 85)
MEDULAR	19	16 ( 84)	19 (100)
MISTO <sup>#</sup>	6	5 ( 83)	6 (100)
LOBULAR	10	8 ( 78)	N.A*
METAPLASICO	6	4 ( 67)	5 ( 80)

# Mais de um tipo diferente de carcinoma invasivo estava presente, como: ductal, lobular, tubular and micropapilar.

\*Não acessado, pois não havia mais tumor residual no tecido (bloco de parafina).

Artigo aceito no **Journal of Clinical Pathology**. Logo abaixo o e-mail dos revisores:

RE: JCP/2011/089862

Dear Professor Schmitt

I have pleasure to inform you that your article "The expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of OSNA assay" has been accepted for publication in the Journal of Clinical Pathology. In addition, your article has also been selected for the journal's online learning section, and you are invited to submit a minimum 5 questions and up to 10 multiple choice questions (MCQs) with 5 options each, based on your article for the online learning programme. You may choose to include images as well. The questions need to be submitted to the journal within 4-6 weeks. Please see below for some more helpful guidelines:

Please include in your MCQ file:

- The title and authors of the article to which the MCQs are associated with must be provided
- The author of the MCQs (even if the same) must be clearly stated
- The MCQs set must contain at least 5 questions
- Each question must have 5 possible answers, with only \*one\* answer being correct (the correct answer must be marked with an asterisk)
- Additional explanation text (for user to see after taking the test) can be submitted for \*each individual answer\* if appropriate. It is ok to have some answers with explanation and some without.
- Figures if applicable can be included in questions (must be submitted as gif/jpg files)

Please will you indicate as soon as possible whether you are able to provide us with MCQs (including answers), as we have to work to a tight deadline for these.

If your main manuscript contains colour figures then please indicate in writing your willingness to pay the £150 + VAT required for each image.

Providing your article is accepted in advance of its scheduled publication in an issue, it will be published Online First.

We have now changing our online publication model from unedited author raw manuscript PDFs to edited typeset PDFs and searchable full text. This will improve the presentation and accessibility of articles published online. This initial version is also indexed by PubMed and the article is fully citable.

We try and ensure online publication within 3 – 6 weeks after final acceptance (although this is not always possible and depends on the quantity of manuscripts waiting for publication). We publish online via Online First, thereby preventing any delays to publication encountered when awaiting allocation to an issue. Which may or may not be in printed format. Advanced publication establishes primacy for the work, with the initial online publication date included on the final print version (if so published in print)

When you receive your proof please check it carefully, corrections cannot be made after it has been approved for publication, irrespective of whether it is

Online First or published directly into a print issue. The only difference between Online First and issue publication will be the citation details and the addition of the Online First publication date to the second version.

Thank you for submitting to Journal of Clinical Pathology.

With best wishes

Professor C. Soon Lee, MD BS, FRCPath, FRCPA  
Editor-in-Chief

Professor Dhiren Govender  
Web Editor  
Journal of Clinical Pathology

Please see below for sample MCQs:

1. Which of the following is true about where circulating glucose originates from

- a. Adipose tissue synthesis of glucose in situ
- b. Hepatic conversion of fatty acids to glucose
- c. Adipose tissue lipolysis contributes to circulating glucose
- d. Dietary fat is a major source of glucose
- e. Proteins cannot be used to produce glucose

Mark correct answer with an asterisk

**NEW SERVICE:** On publication of your paper, you will be automatically emailed a TOLL FREE link to the full text of the article on the Journal of Clinical Pathology website.\* This link gives you unfettered access to the paper, both full text and PDF, and can be distributed to colleagues and/or posted on your own website. This link replaces the complementary paper copy of the journal usually sent to the corresponding author. The terms and conditions governing use of the work (accessed via the Toll Free link) are given in the Licence Agreement form.

\*To receive an automatic email alerting you to the online publication of the latest issue click on <http://jcp.bmj.com/cgi/alerts/etoc> and enter your email address in the available field.

The BMJ Group is one of the world's most trusted providers of medical information for doctors, researchers, health care workers and patients [www.bmjgroup.bmj.com](http://www.bmjgroup.bmj.com). This email and any attachments are confidential. If you have received this email in error, please delete it and kindly notify us. The recipient should check this email and attachments for viruses because the BMJ Group accepts no liability for any damage caused by viruses. Emails sent or received by the BMJ Group may be monitored for size, traffic, distribution and content.

BMJ Publishing Group Limited  
A private limited company, registered in England and Wales under registered number 03102371  
Registered office: BMA House, Tavistock Square, London WC1H 9JR, UK.

<http://bmjgroup.bmj.com>

## 5. Discussão

---

- **Artigo 1:**

- Carcinomas tubulares são todos grau 1 histológico, enquanto que carcinomas mucinosos, papilares e mistos foram grau 1, 2 e 3 histológicos. Carcinomas micropapilares, medulares, metaplásicos e apócrinos foram de pior grau histológico (2 e 3).
- Carcinomas micropapilares metastatizaram mais para a axila (75% dos casos), enquanto que os metaplásicos não (0%).
- A classificação imunoistoquímica molecular (CIM) dos TEH de carcinomas da mama é diferente da classificação dos tumores por perfil de expressão genética.
- Carcinomas tubular, mucinoso e papilar foram todos luminais (A e B). Dado semelhante ao perfil de expressão genética.
- Carcinomas micropapilares e mistos foram luminal A, luminal B (50% apenas) e sobre-expressão de HER2. Dado um pouco diferente do nível transcriptômico que demonstra altos níveis RE+/HER2+ (luminal B) com altas cópias de DNA.

- Carcinoma medular e metaplásico: “basais-like” ao nível imunoistoquímico em 76.2% e 90%, respectivamente com alto Ki-67 e grau histológico. Pouco diferente do nível transcriptômico que classifica esses tumores em “basais-like” na sua totalidade.
- Carcinoma apócrino: mais heterogêneo dos tumores com casos luminais A e B, sobre-expressão de HER2 e “basais-like”. Expressão elevada de RA=91% (receptor de androgênio) e de HER2 (33.3%), dado semelhante a literatura. Pertencem ao grupo “molecular apócrino” do ponto de vista de perfil de expressão genética (Farmer et al) com genes *RA upregulated* e RE-/HER2+ ou menos frequentemente -.

- **Artigo 2:**

- CK19 RNAm: bom marcador para detectar depósitos de CA mama no LS (alta detecção em seu citoesqueleto).
- Lan Su et al: alta concordância entre + RNAm e proteína CK19 em células epiteliais da mama malignas.
- Em 2007, novo método de amplificação de ácido nucléico de um passo (OSNA) usado em congelação de linfonodo axilar para câncer de mama.
- Chu et al: ductal, lobular, pequenas células e medular apenas. Nosso estudo: maioria dos tipos especiais histológicos (TEH) de carcinomas de mama. Chu

et al: 98.2% de positividade para a CK19 nos adenocarcinomas. Nosso estudo teve positividade idêntica de 98.2%.

- *TMA*: 100% de positividade da CK19 nos apócrinos e micropapilares (+ forte e difusa).
- Tubular, mucinoso, medular e misto: positividade da CK19 aumentada para 100%.
- Lobular: 78% (positividade final comprometida pela falta de tecido tumoral residual nos 2 blocos de parafina).
- Metaplásico: 67% no *TMA*. 1 caso de Carcinoma Fusocelular negativo na avaliação do bloco de parafina (5/6 ou 80%).
- Papilares encapsulados e invasivo: 1 caso negativo no *TMA* e na avaliação do bloco de parafina (6/7 ou 85%).



## 6. Conclusões

---

### ■ Artigo 1:

- A classificação imunoistoquímica molecular (CIM) dos TEH de carcinomas da mama é diferente da classificação dos tumores por perfil de expressão genética, pois expressão de proteína é diferente de alterações genéticas.

### ■ Artigo 2:

- Maioria dos TEH de carcinomas da mama foram positivos para CK19 (98.2%, dado idêntico ao de Chu et al.) e além disso OSNA pode ser usado em todos os casos de CA de mama, com baixas taxas de falso negativo para detecção de micrometástases.
- A positividade da CK19 nos *TMA* e no bloco inteiro de parafina foi discordante, pois a positividade pode ser focal; isso pode produzir resultados falso-negativos nas core-biopsies.

## 7. Referências Bibliográficas

---

1. Weigelt B, Baehner FL e Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. **Journal of Pathology** 2010; 220: 263-280.
2. Ellis P, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. Invasive breast carcinoma. In *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, Tavassoli FA, Devilee P. Lyon Press: Lyon, 2003.
3. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother ? **Journal of Pathology** 2008; 216: 394-398.
4. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy ? **Nat Rev Clin Oncol** 2009; 6: 718-730.
5. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **J Clin Oncol** 2008; 26: 3153-3158.
6. Rakha EA, El-Sayed ME, Menon S, Green AR, Lee AH, Ellis IO. Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res** 2008; 111: 121-127.

7. Perou CM, Sorlie T, Elisen MB, van de Rijn M, Jeffreys SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406: 747-752.
8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98: 10869-10874.
9. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genom** 2006; 7: 96.
10. Sorlie T, 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; 100: 8418-8423.
11. 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: 530-536.
12. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. **Breast Cancer Res** 2008; 10: R65.
13. van de Vijver M, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskui DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002; 347: 1999-2009.
14. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98: 262-272.

15. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet** 2005; 365: 671-679.
16. Geyer FC, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet ? **Int J Surg Pathol** 2008; 17: 285-302.
17. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larismont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene** 2005; 24: 4660-4571.
18. Abdullah-Sayani A, Bueno-de-Mesquita JM, van de Vijver, MJ. Technology insight: tuning into the genetic orchestra using microarrays: limitations of DNA microarrays in clinical practice. **Nat Clin Pract Oncol** 2006; 3: 501-516.
19. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100: 10393-10398.
20. Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, Reis-Filho JS. Genetic characterisation of breast cancer and implications for clinical management. **J Cell Mol Med** 2009; 13: 4090-4103.
21. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. **Cancer Res** 2001; 61: 5979-5984.
22. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **J Clin Pathol** 2006; 59: 225-231.
23. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol** 2009; 27: 1160-1167.

24. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J et al. Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101: 736-750.
25. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br J Cancer** 2007; 96: 1504-1513.
26. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. **Breast** 2008; 17: 323-334.
27. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferation cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. **Am J Clin Pathol** 1995; 104: 42-49.
28. Bevilacqua P, Verderio P, Barbareschi M, Bonoldi E, Boracchi P, Dalla Palma P, et al. Lack of prognostic significance of the monoclonal antibody Ki-S1, a novel marker of proliferative activity, in node-negative breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat** 1996; 37: 123-133.
29. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. **Eur J Surg Oncol** 1999; 25: 356-363.
30. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, et al. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. **Clin Cancer Res** 2003; 9: 923-930.
31. Goodson WH III, Moore DH II, Ljung BM, Chew K, Mayall B, Smith HS, et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. **Breast Cancer Res Treat** 2000; 59: 113-123.

- 32.Liu S, Edgerton SM, Moore DH II, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2001; 7: 1716-1723.
- 33.Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100: 207-212.
- 34.Shak S, Baehner FL, Palmer G, Ballard JT, Baker J, Watson D. Subtypes of breast cancer defined by standardized quantitative RT-PCR analysis of 10.618 tumors. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100: S295-295.
- 35.Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, Cordoba A, Esteller M, Ropero S, et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. **Am J Clin Pathol** 2008; 130: 414-424.
- 36.Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast câncer. **Cancer Lett** 2007; 247: 48-55.
- 37.Rolland P, Spendlove I, Madjid Z, Rakha EA, Poulam P, Ellis IO et al. The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer. **Int J Cancer** 2007; 120: 1311-1317.
- 38.Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. **Cancer Invest** 2008; 26: 1-10.
- 39.Pusztai I, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. **Oncologist** 2006; 11: 868-877.
- 40.Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanili M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2005; 11: 5678-5685.

41. 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: 688-694.
42. Sousa B, Paredes J, Milanezi F, Lopes N, Martins D, Dufloth R et al. P-cadherin, vimentin and CK 14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. **Histol Histopathol** 2010; 25: 963-974.
43. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, et al. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with *CDH3* promoter hypomethylation. **Clin Cancer Reser** 2005; 11: 5869-5877.
44. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blaney RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **Journal of Pathology** 2004; 203: 661-671.
45. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2005; 7: 143-148.
46. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10: 5367-5374.
47. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinoma with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol** 2006; 208: 495-506.
48. Savage K, Lambros MB, Robertson D, Jones RL, Mackay A, et al. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinoma: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and *in situ* hybridization analysis. **Clin Cancer Res** 2007; 13: 90-101.

49. Savage k, Leung S, Todd SK, Brown LA, Jones RL, Robertson D, et al. Distribution and significance of caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 110: 245-256.
50. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene** 2006; 25: 5846-5853.
51. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **Am J Pathol** 2002; 161: 1991-1996.
52. Parry S, Savage K, Marchio C, Reis-Filho JS. Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. **J Clin Pathol** 2008; 61: 1045-1050.
53. Klingbeil P, Natrajan R, Everitt G, Vatcheva R, Marchio C, Palacios J, et al. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120: 95-109.
54. Gilbert JA, Goetz MP, Reynolds CA, Ingle JN, Giordano KF, Suman VJ, et al. Molecular analysis of metaplastic breast carcinoma: high *EGFR* copy number via aneusomy. **Mol Cancer Ther** 2008; 7: 944-951.
55. Westburry CB, Reis-Filho JS, Dexter T, Mahler-Araujo B, Fenwick K, Iravani M, et al. Genome-wide transcriptomic profiling of microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in response to therapeutic radiation. **Journal of Pathology** 2009; 219: 131-140.
56. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology** 2006; 49: 22-34.



57. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol** 2006; 19: 264-271.
58. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. **Histopathology** 2006; 49: 10-21.
59. Turner NC, Reis-Filho JS, Russel AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene** 2007; 26: 2126-2132.
60. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Oncol** 2008; 26: 2568-2581.
61. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology** 2008; 52: 108-118.
62. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **J Am Med Assoc** 2006; 295: 2492-2502.
63. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, Treur-Mulder M, Zevenhoven J, Velds A, et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104: 12111-12116.
64. McCarthy A, Savage K, Gabriel A, Nasceur C, Reis-Filho JS, Ashworth A. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. **Journal of Pathology** 2007; 211: 389-398.

65. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. **Oncogene** 2006; 25: 3994-4008.
66. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol** 2007; 8: R76.
67. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Res** 2009; 69: 4116-4124.
68. Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR. Problems in breast pathology (WB Saunders Company Ltd, London, 1979).
69. Azzopardi JG. The World Health Organization histological typing of breast tumors: second edition. The World Health Organization. **Am J Clin Pathol** 1982; 78: 806-816.
70. Page DL, Anderson TJ. Diagnostic Histopathology of the Breast (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987).
71. Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the Mammary Gland (Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1993).
72. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type: relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1992; 20: 479-489.
73. Wargotz ES, Deos OH, Norris HJ. Metaplastic carcinomas of the breast. II. Spindle cell carcinoma. **Human Pathology** 1989; 20: 732-740.

74. Eusebi V, Damiani S, Ellis IO, Azzopardi JG, Rosai J. Breast tumor resembling the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: report of 5 cases. **Am J Surg Pathol** 2003; 27: 1114-1118.
75. Asioli S, Marucci G, Ficarra G, Stephens M, Foschini MP, Ellis IO, et al. Polymorphous adenocarcinoma of the breast: report of three cases. **Virchows Arch** 2006; 448: 29-34.
76. Collins LC, Carlo VP, Hwang H, Barry TS, Gown, AM, Schnitt SJ. Intracystic papillary carcinomas of the breast: a reevaluation using a panel of myoepithelial cell markers. **Am J Surg Pathol** 2006; 30: 1002-1007.
77. Mulligan AM, O'Malley FP. Metastatic potential of encapsulated (intracystic) papillary carcinoma of the breast: a report of 2 cases with axillary lymph node micrometastasis. **Int J Surg Pathol** 2007; 15: 143-147.
78. Leal C, Costa I, Fonseca D. Intracystic (encysted) papillary carcinoma of the breast: a clinical, pathological, and immunohistochemical study. **Human Pathol** 1998; 29: 1097-1104.
79. Grabowski J, Saltzstein SL, Sadler GR, Blair S. Intracystic papillary carcinoma. A review of 917 cases. **Cancer** 2008; 113: 916-920.
80. Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist ? **Nat Rev Cancer** 2009; 9: 128-134.
81. Moinfar F. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity ? **Pathobiology** 2008; 75: 119-131.
82. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **Journal of Pathology** 2008; 216: 141-150.

83. Lien HC, Hsiao YH, Lin YS, Yao YT, Juan HF, Kuo WH, et al. Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene** 2007; 26: 7859-7871.
84. Bertucci F, Orsetti B, Nègre V, Finetti P, Rougé C, Ahomadegbe JC, et al. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. **Oncogene** 2008; 27: 5359-5372.
85. Korkola J, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, et al. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. **Cancer Res** 2003; 63: 7167-7175.
86. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 117: 273-280.
87. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Mamessier E, Adelaide J, et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. **Cancer Res** 2006; 66: 4636-4644.
88. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Denoux Y, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. **Journal of Pathology** 2005; 207: 260-268.
89. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. **Breast Cancer Res** 2007; 9: R24.
90. Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al-Ghuzlan A, Chnecker C, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. **Mod Pathol** 2005; 18: 1623-1631.

91. Hayes MJ, Thomas D, Emmons A, Giordano TJ, Kleer CG. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. **Clin Cancer Res** 2008; 14: 4038-4044.
92. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Res** 2009; 69: 4116-4124.
93. Rodriguez-Pinilla SM, Rodriguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Martín-Guijarro MC, Hernandez L, et al. Sporadic invasive breast carcinoma with medullary features display a basal-like phenotype. **Am J Surg Pathol** 2007; 31: 501-508.
94. Marchiò C, Iravani M, Natrajan R, Lambros MB, Savage K, Tamber N, et al. Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. **Journal of Pathology** 2008; 215: 398-551.
95. Vargas Z, Zhao J, Ohlschlegel C, Odermatt B, Heitz PU. Preferential HER-2/neu overexpression and/or amplification in aggressive histological subtypes of invasive breast cancer. **Histopathology** 2004; 44: 332-338.
96. O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. **Histopathology** 2008; 52: 3-10.
97. Wells CA, El-Ayat GA. Non-operative breast pathology: apocrine lesions. **J Clin Pathol** 2007; 60: 1313-1320.
98. Thor AD, Eng C, Devries S, Paterakos M, Watkin WG, Edgerton S, et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. **Hum Pathol** 2002; 33: 628-631.

99. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. **Journal of Pathology** 2006; 209: 445-453.
100. Lien HC, Lin CW, Mao TW, Kuo SH, Hsiao CH, Huang CS. p53 overexpression and mutation in metaplastic carcinoma of the breast: genetic evidence for a monoclonal origin of both the carcinomatous and the heterogeneous sarcomatous components. **Journal of Pathology** 2004; 204: 131-139.
101. McCarthy A, Savage K, Gabriel A, Naceur C, Reis-Filho JS, Ashworth A. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. **Journal of Pathology** 2007; 211: 389-398.
102. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. **Journal of Pathology** 2005; 205: 248-254.
103. Chin K, Devries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. **Cancer Cell** 2006; 10: 529-541.
104. Natrajan R, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DS, Marchió C, et al. Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. **Clin Cancer Res** 2009; 15: 2711-2722.
105. Simpson PT, Gale T, Reis-Filho JS, Jones C, Parry S, Sloane JP, et al. Columnar cell lesions of the breast: missing link in breast cancer progression? A morphological and molecular analysis. **Am J Surg Pathol** 2005; 29: 734-746.
106. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2007; 31: 417-426.

107. Marchió C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Savage K, et al. Mixed micropapillary-ductal carcinomas of the breast: a genomic and immunohistochemical analysis of morphologically distinct components. **Journal of Pathology** 2009; 218: 301-315.
108. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235: 177-182.
109. Bernard-Pierrot I, Gruel N, Stransky N, Vincent-Salomon A, Reyal F, Raynal V, et al. Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. **Cancer Res** 2008; 68: 7165-7175.
110. Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, Mackay A, et al. *FGFR1* emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12: 6652-6662.
111. Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. **Cancer Res** 2000; 60: 1077-1083.
112. Elbauomy Elsheikh S, Green AR, Lambros MB, Turner NC, Grainge MJ, Powe D, et al. *FGFR1* amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R23.
113. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. **Histopathology** 2002; 40: 403-439.
114. Schem C, Maass N, Bauerslag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, et al. One-step nucleic acid amplification – a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. **Virchows Arch** 2009; 454: 203-210.

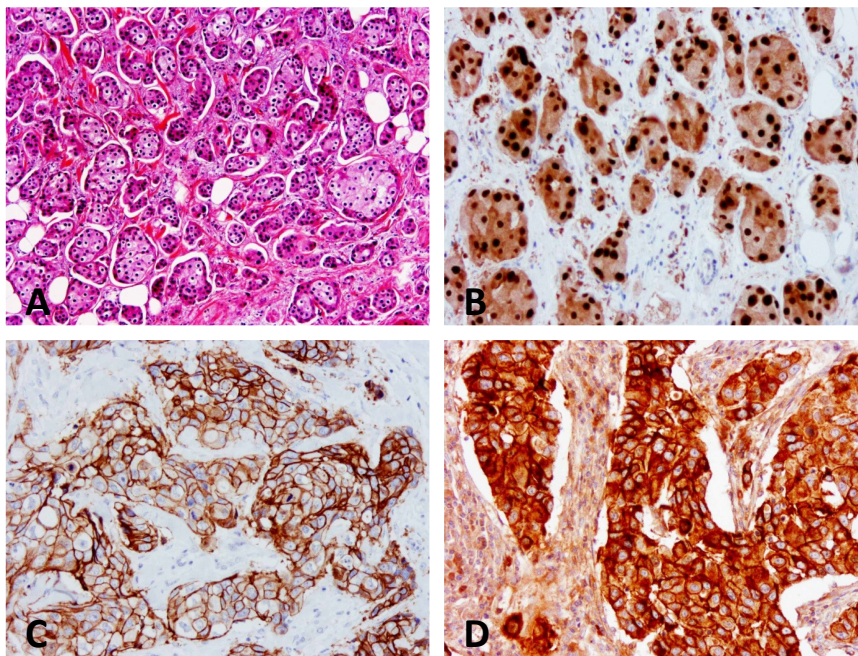
115. Tsujimoto M, Nakabayshi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. **Clin Can Res** 2007; 13: 4807-4816.
116. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intraoperative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. **Int J Cancer** 2008; 122: 2562-2567.
117. Abdul-Rassol S, Kidson SH, Panieri E, Dent D, Pillay K, Hanekom GS, et al. An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. **J Clin Pathol** 2006; 59: 289-297.
118. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. **J Clin Pathol** 1995, 48: 26-32.
119. Kwaspen FHL, Smedts FMM, Broos A, Bulten H, Debie WM, Ramaekers FC. Reproducible and highly sensitive detection of the broad spectrum epithelial marker keratin 19 in routine cancer diagnosis. **Histopathology** 1997; 31: 503-516.
120. Tot T. The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. **Histopathology** 2000; 37: 175-181.



# 8. Anexos

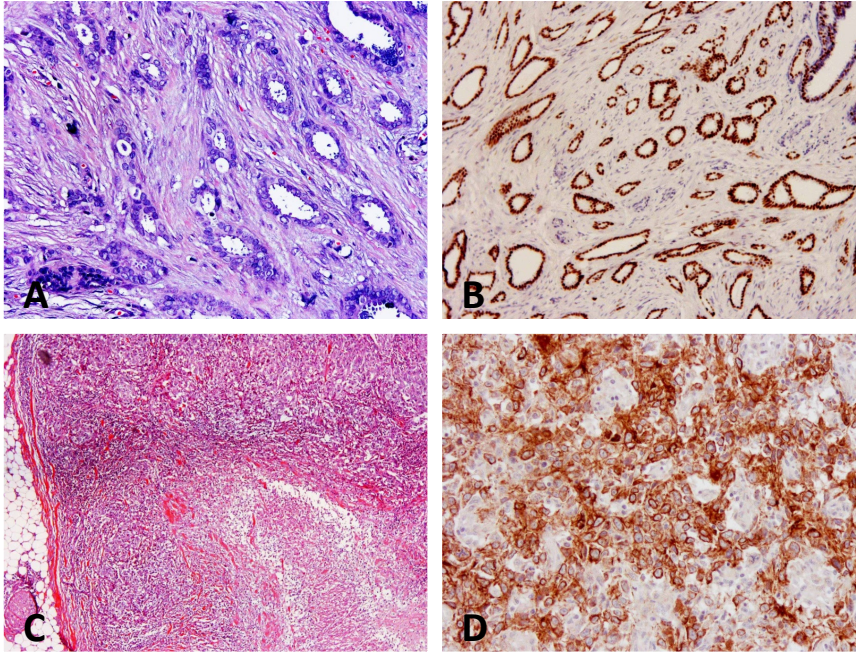
---

## 8.1. Anexo 1 – referente ao Artigo 1 :



**Figura 1: H&E staining (A) and immunohistochemistry for AR (B), HER2 (C) and P-cadherin in Apocrine carcinoma (magnification X200).**

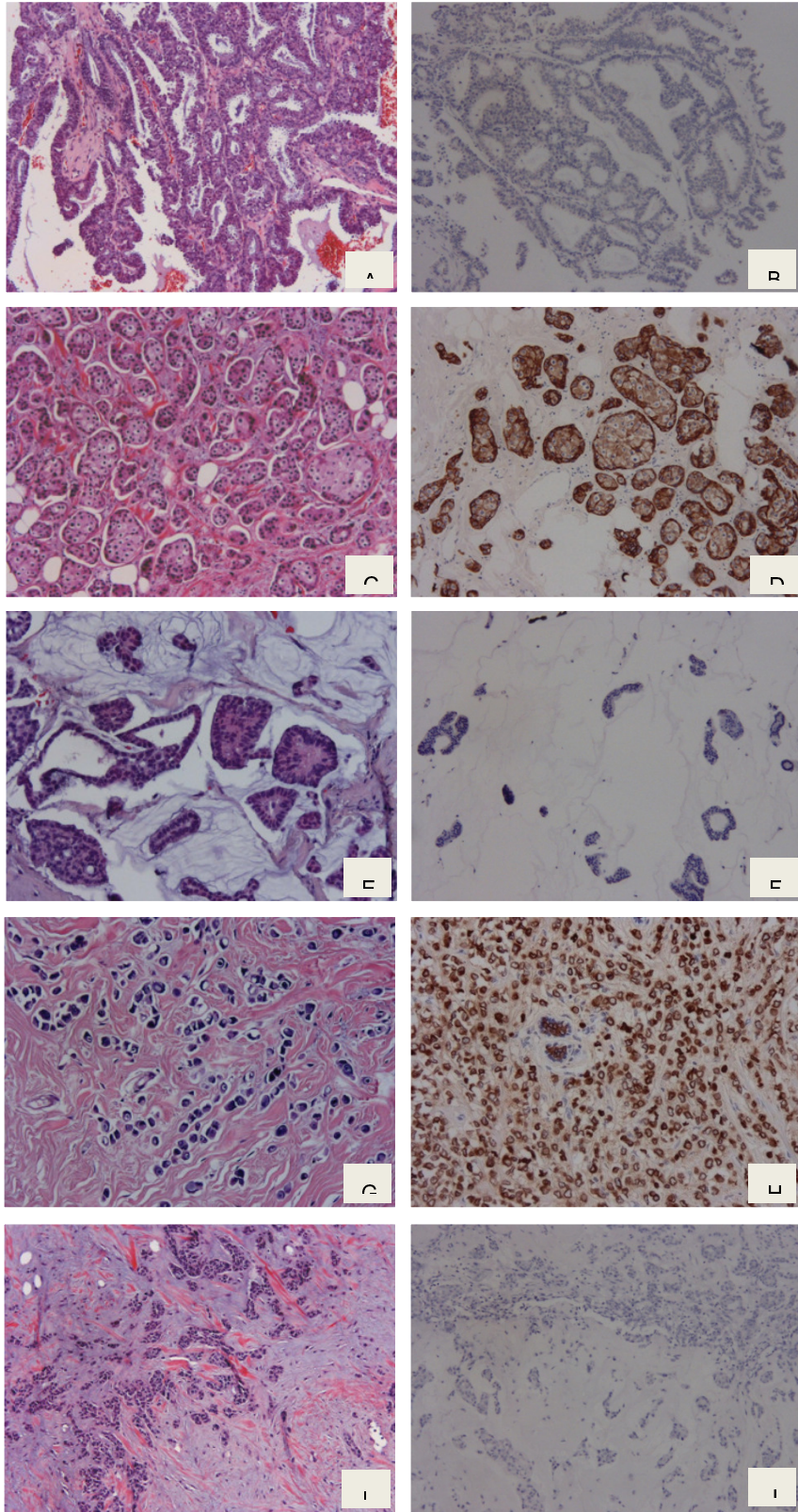
## 8.2 Anexo 2 - referente ao Artigo 1 :



**Figura 2 : Tubular carcinoma (A and B) and Medullary carcinoma (C and D) of the breast. H&E staining (A and C), ) and immunohistochemistry for ER (B) and CK5 (D) (magnification X200).**

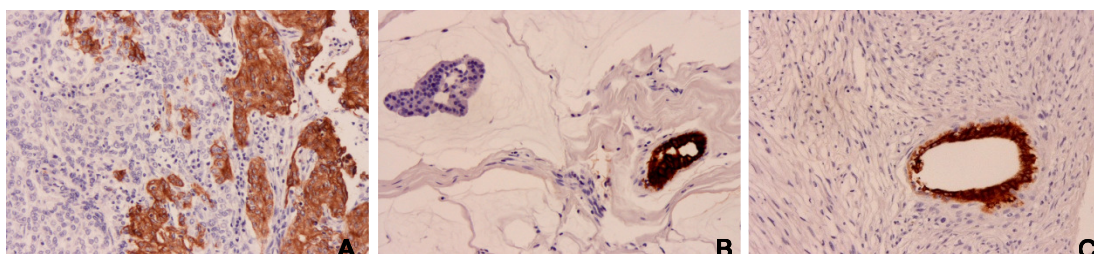


## 8.2. Anexo 3 - referente ao Artigo 2 :



**Figura 1: Coloração de H&E (A,C,E,G,I) e painel imunohistoquímico mostrando expressão de CK19 (B,D,F,H,J) em diferentes tipos histológicos especiais de carcinoma da mama: Papilar (A,B); Apocrino (C,D); Mucinoso (E,F); Lobular (G,H); Metaplasico (I,J). Imunohistoquímica positiva (D,H) e negativa (B,F and J) para CK19.**

#### 8.4 Anexo 4 – referente ao Artigo 2:



**Figura 2: Coloração imunohistoquímica da CK19 nos blocos de parafina dos casos negativos por exame de *tissue microarray*. Carcinoma medular e mucinoso mostrando positividade focal (A e B), e carcinoma metaplásico (fusocelular) mostrando negatividade para CK19 (C).**