

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

FABIO POSTIGLIONE MANSANI

**AVALIAÇÃO DO USO DA IMUNOCITOQUÍMICA COM KI-67 E P63 NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LESÕES PAPILARES DE MAMA EM
BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA**

CURITIBA

2010

FABIO POSTIGLIONE MANSANI

**AVALIAÇÃO DO USO DA IMUNOCITOQUÍMICA COM KI-67 E P63 NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LESÕES PAPILARES DE MAMA EM
BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii.

Co – orientador: Prof. Dr. Luiz Martins Collaço.

CURITIBA

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio Postiglione Mansani

Avaliação do uso da imunocitoquímica com KI-67 e P63 no diagnóstico das lesões papilares de mama em biópsia aspirativa por agulha fina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em de de 2010.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Toda manhã, na África, quando surge o sol, uma gazela acorda. Sabe que deverá correr mais que o leão para não ser morta. Toda manhã, na África, quando surge o sol, um leão acorda e sabe que deverá correr mais que a gazela ou morrerá de fome. Toda manhã, quando o sol se levanta, não importa que você seja um leão ou uma gazela, o importante é começar a correr.

“Ogni mattina, in Africa, quando sorge il sole, una gazzella si sveglia. Sà che dovrà correre più del leone, o verrà uccisa. Ogni mattina, in Africa, quando sorge il sole, un leone si sveglia e sà che dovrà correre più della gazzella o morirà di fame. Ogni mattina, quando il sole si sveglia, non importa che tu sia un leone o una gazzella, l'importante è che tu cominci a correre”

(Il leone e la gazzella, Aldo Giovanni)

Ao meu pai Luiz Conrado, meu amigo, professor e companheiro, que nos deixou tão cedo.

À minha mãe Neuza, exemplo de dedicação e uma vida dedicada a educar.

À minha esposa Lucianne e meus filhos Gianluca, Giordana e Giuliana, razões da minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Sérgio Ossamu Ioshii pela sua dedicação e paciência na orientação da dissertação, e no apoio e auxílio com as minhas dificuldades.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e todo o seu corpo docente por haver-me recebido e oferecido as condições necessárias de para alcançar este título de mestre.

Ao Professor Doutor Luiz Martins Colaço e ao Doutor Mario Rodrigues Montenor Neto, pelas incansáveis discussões e sugestões, apoio amigo e dedicado, responsáveis diretos pelo sucesso desta conquista.

Ao Professor Doutor Zacarias Alves de Souza Filho que me abriu as portas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e iniciou a orientação desta pesquisa.

Aos Professores Doutores Maria de Lourdes Biondo Simões e Sérgio Luiz Rocha pelas valorosas sugestões e ensinamentos na revisão desta dissertação.

À Professora Márcia Olandoski pela grande colaboração na confecção das análises e estudos estatísticos desta pesquisa.

Ao Dr. Antônio Carlos Buzaid e ao Professor Sami Arap, e suas equipes, que pela dedicação e conhecimento propiciaram esta minha conquista.

À Srta. Fabíola F. Santos pelo sempre imediato auxílio recebido nas atividades relacionadas ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Aos meus familiares, amigos e pacientes que souberam compreender as minhas ausências durante o período de dedicação a esta pesquisa.

RESUMO

Introdução: o diagnóstico das lesões papilares da glândula mamária continua sendo uma das áreas mais desafiadoras e problemáticas da patologia mamária. Em decorrência disto têm-se procurado encontrar métodos diagnósticos para aumentar a sensibilidade e a especificidade no diagnóstico pré-operatório das lesões papilares da mama. **Objetivo:** analisar o perfil clínico e diagnóstico anatomopatológico de casos identificados como lesão papilar em banco de dados de citopatologia mamária. Avaliar o desempenho da imunocitoquímica (ICQ), utilizando os marcadores Ki67 e p63 em material de biópsia aspirativa por agulha fina para o diagnóstico diferencial de lesões papilares mamárias. **Métodos:** estudo retrospectivo com análise de 1.774 casos de BAAF coletadas do banco de dados de citopatologia mamária do laboratório Patologia Mamária – Ponta Grossa (PR), realizados entre 2003 e 2009, com levantamento de 14 casos de lesões papilares da mama com diagnóstico citológico por BAAF. Foi realizado estudo ICQ dos materiais de BAAF coradas previamente por método de Papanicolaou, utilizando o marcador para célula mioepitelial p63 e o de índice proliferativo Ki67. Os casos foram separados em dois grupos de acordo com o exame anatomopatológico, benigno e atípico/maligno e executado análise comparativa entre os resultados dos imunomarcadores, de forma isolada e associada, com os diagnósticos histopatológicos. **Resultados:** o Ki67 mostrou-se negativo em todas as lesões benignas e em 25% das lesões atípicas/malignas, e positivo em 100% no sub-grupo das lesões malignas ($p=0,001$). O p63 foi positivo em 100% das lesões benignas e em 50% das lesões atípicas/malignas ($p=0,085$). A análise conjunta do Ki67 e do p63 demonstrou 100% dos casos benignos com perfil Ki67(-) e p63(+), 100% dos casos malignos com perfil Ki67(+) e p63(-), os casos atípicos/malignos apresentaram 50% com Ki67(+) e p63(-), 25% com Ki67(+) e p63 (+), 25% com Ki67(-) e p63(+), nenhum caso com Ki67 e p63 negativos. A sensibilidade para o diagnóstico de benignidade e de malignidade na associação Ki67/p63 foi de 100% e a especificidade foi de 75%. **Conclusões:** o uso combinado destes marcadores p63 e Ki67 em BAAF de lesão papilar de mama auxilia no manejo da orientação terapêutica desta doença. Novos estudos incluindo um maior número de casos devem ser realizados para melhor avaliar este método.

Descritores: Mama. Papiloma. Biópsia aspirativa por agulha fina. Imunocitoquímica. Antígeno KI-67. p63.

ABSTRACT

Introduction: the diagnosis of papillary lesions of the mammary gland remains one of the most challenging areas and issues of breast pathology. As a result it has been to find methods to increase diagnostic sensitivity and specificity in the preoperative diagnosis of papillary breast lesions. **Objective:** to analyze the clinical and pathological diagnosis of papillary lesion cases identified as in database of breast cytopathology. Evaluate the performance of immunocytochemistry using markers Ki67 and p63 in material of fine needle aspiration biopsy for the differential diagnosis of papillary breast lesions. **Method:** a retrospective analysis of 1774 cases of FNAB collected database of breast cytopathology laboratory Breast Pathology - Ponta Grossa (PR), conducted between 2003 and 2009, a survey of 14 cases of breast papillary lesions diagnosed by cytology in FNAB. Study was made with ICC of FNAB materials previously stained by the Papanicolaou method, using the myoepithelial cell marker p63 and Ki67 proliferative index. The cases were divided into two groups according to histopathology, benign and atypical / malignant and performed comparative analysis between the results of immunomarkers, isolated and associated with histopathology diagnoses. **Results:** Ki67 was negative in all benign lesions and 25% of lesions atypical / malignant and positive in 100% in the sub-group of malignant lesions ($p = 0.001$). The p63 was positive in 100% of benign lesions and 50% of lesions atypical / malignant ($p = 0.085$). A combined analysis of Ki67 and p63 showed 100% of cases with benign profile Ki67 (-) and p63 (+), 100% of cases with malignant profile Ki67 (+) and p63 (-), atypical/ malignant cases had 50% with Ki67 (+) and p63 (-), with 25% Ki67 (+) and p63 (+), 25% with Ki67 (-) and p63 (+), no cases with Ki67 and p63 negative. The sensitivity for diagnosis of benignity and malignancy in association Ki67/p63 was 100% and specificity was 75%. **Conclusions:** the combined use of markers p63 and Ki67 in FNAB or papillary lesions of the breast helps guide therapy in the management of this disease. Further studies including a large number of cases should be conducted to better evaluate this method.

Keywords: Breast. Papilloma. Fine-needle aspiration biopsy. Immunocytochemistry. Antigen KI-67. p63.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características histopatológicas do papiloma e carcinoma papilífero	11
Quadro 2 - Algoritmo da abordagem a ser programada para as lesões papilares baseada na avaliação das células mioepiteliais.....	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a - Distribuição do índice de positividade do Ki67 e os agrupamentos citopatológicos das lesões papilares.....	36
Tabela 1b - Resultado do Ki67 nos agrupamentos citopatológico das lesões papilares.....	36
Tabela 1c - Análise estatística da positividade do Ki67 à ICQ nas lesões papilares	36
Tabela 2 - Avaliação da positividade do p63 em agrupamentos celulares das lesões papilares mamárias.....	39
Tabela 3 - Avaliação da positividade do p63 em agrupamentos celulares das lesões papilares mamárias.....	39
Tabela 4 - Análise estatística da positividade do p63 em agrupamentos celulares das lesões papilares mamárias.....	39
Tabela 5 - Análise conjunta do resultado do estudo ICQ com os marcadores Ki67 e p63 nas lesões papilares mamárias.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia panorâmica de lesão papilar demonstrando eixo conjuntivo arborescente com revestimento parcial por células epiteliais.....	28
Figura 2 -	Fotomicrografia de punção aspirativa por agulha fina de lesão papilar com eixo conjuntivo revestido por células colunares monomórficas.....	29
Figura 3 -	Distribuição anual dos exames.....	29
Figura 4 -	Agrupamento das lesões papilares de acordo com o resultado anatomopatológico.....	30
Figura 5 -	Distribuição das faixas etárias de acordo com o diagnóstico anatomopatológico das lesões papilares.....	31
Figura 6 -	Distribuição das faixas etárias de acordo com o diagnóstico anatomopatológico das lesões papilares.....	31
Figura 7 -	Associação da história médica familiar câncer mama com as lesões papilares.....	31
Figura 8 -	Associação da terapia de reposição hormonal com as lesões papilares.....	32
Figura 9 -	Distribuição dos casos de lesão papilar biopsiadas por BAAF segundo a lateralidade da mama.....	32
Figura 10 -	Distribuição das lesões papilares nos quadrantes mamários.....	33
Figura 11 -	Distribuição das lesões papilares nos quadrantes mamários de acordo com o exame anatomopatológico.....	34
Figura 12 -	Classificação mamográfica (BI-RADS) das lesões papilares da mama.....	34
Figura 13 -	Classificação ultrassonográfica (BI-RADS) das lesões papilares da mama.....	34
Figura 14 -	Diâmetro médio das lesões papilares à ultrassonografia e sua relação com o agrupamento anatomopatológico.....	35

Figura 15 - Fotomicrografia de imunocitoquímica com anticorpo Ki67 de lesão papilar demonstrando grupo de células com um núcleo positivo corado em castanho e considerado como negativo.....	37
Figura 16 - Fotomicrografia de imunocitoquímica com anticorpo Ki67 de lesão papilar demonstrando alta positividade para o marcador com vários núcleos positivos corados em castanho, padrão considerado como positivo.....	38
Figura 17 - Fotomicrografia de imunocitoquímica com anticorpo p63 de lesão papilar demonstrando raras células isoladas coradas fortemente em castanho, considerado como negativo.....	40
Figura 18 - Fotomicrografia de imunocitoquímica com anticorpo p63 de lesão papilar demonstrando grande número de células isoladas coradas fortemente em castanho, considerado como positivo.....	40
Figura 19 - Correlação inversa entre os imunomarcadores Ki67 e p63 na ICQ das lesões papilares mamárias.....	41
Figura 20 - Fotomicrografia de lesão papilar. Imunocitoquímica com anticorpo p63 demonstrando bloco de células epiteliais ductais desprovido de positividade para células mioepiteliais, considerado como negativo....	42
Figura 21 - Fotomicrografia de lesão papilar. Imunocitoquímica com anticorpo p63 demonstrando bloco de células epiteliais ductais contendo na periferia células mioepiteliais coradas fortemente em castanho, considerado como positivo.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Anatomopatológico
BI-RADS	<i>Breast Image Reporting and Data System</i>
BAAF	Biópsia aspirativa por agulha fina
BR	Classificação BI-RADS
CDI	Carcinoma ductal intracístico
CK 5-6	Citoqueratina 5-6
Cm	Centímetro
DIN	<i>Ductal intraepithelial neoplasia</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HMF	História médica familiar
ICQ	Imunocitoquímica
IHQ	Imunoistoquímica(o)
MI	Mililitro
Mm	Milímetro
ND	Não disponível
NI	Não informado
NIC	<i>National Cancer Institute of United State of America</i>
PBS	Solução salina tamponada
PC	Porção central
QQLL	Quadrantes laterais
QQMM	Quadrantes mediais
RM	Ressonância magnética
Ta	Temperatura ambiente

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 TUMOR PAPILAR DA MAMA	6
2.1.1 Apresentação Clínica.....	7
2.1.2 Diagnóstico por Imagem.....	7
2.1.3 Biópsia Pré-operatória e Transoperatória.....	9
2.1.4 Macroscopia	10
2.1.5 Microscopia	10
2.1.6 Implicações Clínicas.....	11
2.2 BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (BAAF) NAS LESÕES PAPILARES DA MAMA.....	14
2.3 IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) DAS LESÕES PAPILARES DA MAMA	18
3 MÉTODO	25
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

A avaliação dos métodos de diagnóstico das lesões benignas mamárias é alvo de muitos estudos relacionados ao risco de desenvolvimento do carcinoma mamário, assim como as dificuldades do diagnóstico diferencial com neoplasias malignas¹.

As lesões mamárias benignas são atualmente divididas em duas grandes categorias: as lesões não proliferativas e as proliferativas. Consideram-se como proliferativas todas as lesões com proliferação celular não carcinomatosa. As lesões proliferativas são subsequentemente divididas em lesões sem atipias e com atipias, sendo que estas podem representar até 5% dos diagnósticos das lesões benignas mamárias. As lesões não proliferativas são aquelas com baixo índice de proliferação celular¹.

A importância do estudo destas lesões está no aumento do risco relativo para o desenvolvimento do carcinoma da mama, que varia de um e meio a duas vezes no caso das lesões proliferativas sem atipias, até quatro a cinco vezes em se tratando de lesões proliferativas com atipias¹.

As lesões proliferativas são diagnosticadas pela identificação do aumento moderado a acentuado da multiplicação celular, em especial ao longo dos ductos mamários¹. De acordo com critérios de Dupont e Page² são lesões proliferativas sem atipias: a hiperplasia ductal sem atipias (moderada e acentuada), o papiloma ou papilomatose sem atipias, a adenose esclerosante, o fibroadenoma com alterações complexas e a cicatriz radial. No grupo das lesões proliferativas com atipias encontram-se a hiperplasia ductal atípica, a hiperplasia lobular atípica e a papilomatose com atipias.

Dentre estas lesões mamárias proliferativas, o papiloma e a papilomatose são neoplasias benignas do epitélio ductal da mama, sendo que a avaliação morfológica destas lesões continua a ser uma das mais desafiadoras áreas da patologia mamária³.

Estas lesões localizam-se, mais frequentemente, na parte central da mama, nos ductos lactíferos, mas também podem ocorrer periféricamente em qualquer

quadrante. Os papilomas ductais centrais localizados no ducto terminal são geralmente únicos e as lesões periféricas localizadas em ductos lobulares terminais, na maioria das vezes múltiplas³.

Apresentam baixa incidência e acometem mulheres em qualquer idade, sendo os papilomas solitários mais comuns na sexta década de vida e os papilomas múltiplos na idade entre 40 e 55 anos³. Clinicamente é observada em 72% das pacientes descarga mamilar uniductal sanguinolenta ou serosa límpida. As lesões papilares podem ser encontradas em qualquer quadrante da mama, mas são mais comuns as de localização central (86% dos casos), associadas ou não com massas ao redor ou sob a aréola².

A secreção mamilar sanguinolenta é determinada pelas alterações degenerativas do papiloma ou pela presença do carcinoma papilífero³.

Muitas lesões periféricas são assintomáticas e detectadas apenas em exames de imagem rotineiros³.

Os papilomas solitários e centrais não apresentam risco aumentado de desenvolvimento do câncer mamário. Em contrapartida, os papilomas múltiplos têm uma associação com carcinoma ductal *in situ* e com aumento de risco para o surgimento de carcinoma invasor⁴.

As lesões papilares podem representar desde um papiloma mamário, um carcinoma papilar *in situ* e até um carcinoma papilífero, que embora raro (menos de 1% dos carcinomas mamários e mais encontrados em mulheres idosas), deve ser considerado no diagnóstico diferencial⁴.

Macroscopicamente os papilomas estão localizados em uma dilatação cística que pode conter líquido claro, sanguinolento ou sangue coagulado. Apresentam-se como um nódulo mural único, saliente na luz e na cor marrom, quando examinado a fresco. Os papilomas podem ser múltiplos ocasionalmente, separados entre si ou agrupados, friáveis e podendo obliterar toda a luz da cavidade cística. A cápsula do cisto é formada pela parede do ducto e, em geral, há alterações reativas³.

O papiloma é formado por numerosas estruturas papilares, cada uma contendo um eixo vascular no estroma, revestido por células epiteliais cúbicas ou cilíndricas e por células mioepiteliais. Projeções papilares podem se anastomosar entre si, formando espaços pseudotubulares de diversas formas, com dimensões uniformes e aspecto regular. Os núcleos são normocrômicos com nucléolos pouco

evidentes. As mitoses são raras e a lesão papilar é sempre acompanhada por células mioepiteliais^{3,4}.

Muitas vezes as células mioepiteliais são de difícil reconhecimento, havendo necessidade de técnica de imunohistoquímica (IHQ) para marcação de proteínas que as identificam, tais como a actina, a calponina, a miosina de cadeia pesada, o CD10, o p63 e a CK5/6³.

No carcinoma *in situ* a estrutura papilar é mantida e o eixo fibrovascular é recoberto, ao menos em parte, por células mioepiteliais, podendo ou não estar associada à hiperplasia epitelial. No carcinoma papilífero observa-se a estrutura papilar, polimorfismo nuclear e aumento do número de mitoses. A aparência citológica é variada e não se observam células mioepiteliais⁴.

A lesão papilar é raramente detectada pela mamografia, devido às suas pequenas dimensões e isodensidade radiológica com relação ao parênquima mamário⁵. Na ultrassonografia, embora infrequente, é possível identificá-la como área nodular vegetante ou como uma área localizada de dilatação ductal⁶. A ductogalactografia (mamografia realizada após injeção de contraste radiopaco no ducto que apresenta o derrame) é observada como uma falha de enchimento arredondada ou como um ponto de parada do meio de contraste. Neste caso é frequente o diagnóstico de neoplasia maligna⁵.

A avaliação citológica da descarga mamilar pode sugerir um quadro de papiloma, mas a sensibilidade para o diagnóstico de carcinoma é baixa⁵.

O diagnóstico citopatológico, transoperatório e histopatológico das lesões papilares mamárias continua sendo um dos maiores desafios da patologia mamária, pois o aspecto papilar pode ser observado diversos tipos de lesões mamárias benignas e malignas⁷.

A dificuldade no diagnóstico diferencial entre as lesões papilares benignas e malignas, decorrente da baixa acurácia dos exames cito-histopatológicos percutâneos e transoperatórios, reflete-se no tratamento clínico-cirúrgico destas lesões. Devido a esta dificuldade diagnóstica lesões benignas de pequeno volume são submetidas ao tratamento cirúrgico sem necessidade, embora apenas 17% destas lesões apresentem-se como carcinoma papilífero intraductal (*in situ*) ou invasor,⁸⁻¹⁰.

Mesmo sendo um método consagrado para o diagnóstico das lesões mamárias, a biópsia aspirativa por agulha fina (BAAF) apresenta limitações para o diagnóstico diferencial entre o papiloma intraductal e o carcinoma papilífero¹¹. Alterações celulares degenerativas, tais como as decorrentes do infarto das lesões papilares, podem ocasionar hipercromasia nuclear e pleomorfismo celular, que aumentam o risco para os diagnósticos falso positivos. Assim, para melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico das lesões mamárias papilares, há necessidade de se complementar o exame citopatológico com outros métodos morfológicos³.

O exame anatomopatológico transoperatório por congelação possibilita o diagnóstico do papiloma intraductal, mas a dificuldade para o preparo adequado do material e a dificuldade para se identificar focos de carcinoma, fazem com que haja preferência pelo estudo de material processado em parafina³.

Um dos métodos complementares que pode ser de grande auxílio no diagnóstico diferencial é a imunocitoquímica (ICQ), que utiliza anticorpos específicos para identificar antígenos celulares e tissulares por meio de uma reação antígeno-anticorpo, revelada por cromógenos e que pode ser observada por microscópio ótico¹².

1.1 OBJETIVOS

1. Analisar o perfil clínico e diagnóstico anatomopatológico de casos identificados como lesão papilar em banco de dados de citopatologia mamária.
2. Avaliar o desempenho da imunocitoquímica, utilizando os marcadores Ki67 e p63 em material de biópsia aspirativa por agulha fina para o diagnóstico diferencial de lesões papilares mamárias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUMOR PAPILAR DA MAMA

Os tumores papilares da mama foram classificados inicialmente, em 1905, por Warren que em seu artigo propunha uma nova classificação dos tumores benignos da mama¹³. Anteriormente ao artigo, as lesões papilares mamárias eram consideradas malignas e tratadas por meio de cirurgia radical. Este foi o primeiro estudo que sugeriu a necessidade da multidisciplinaridade na abordagem das doenças da mama e nele foi enfatizada a importância da cooperação entre cirurgiões e patologistas¹⁴.

Warren classificava os papilomas como lesões benignas (cistadenoma papilar) e indicava como tratamento padrão a ressecção da lesão em substituição à mastectomia.

Em 1951, Haagensen *et al*¹⁵ revisaram 367 pacientes com lesões papilares intraductais benignas das mamas. O estudo determinou as características clínicas e anatomopatológicas como são bem conhecidas atualmente³.

Os critérios para distinguir os papilomas do carcinoma papilar foram propostos por Kraus e Neubecker, em 1962¹⁶, e esta classificação, com pequenas modificações, é utilizada até hoje¹⁴.

As lesões papilares das mamas são um grupo heterogêneo de lesões que se caracterizam pela grande dificuldade do diagnóstico diferencial entre benignidade ou malignidade¹⁷.

Embora seja uma doença relativamente rara, as lesões papilares têm apresentado uma maior incidência nos últimos 10 anos. Rizzo observou uma incidência de 8,1%, o que é comparativamente superior à incidência de 2% observada em publicações mais antigas¹⁸.

A característica comum a todos os tumores papilares é a formação do arranjo papilar, demonstrado como proliferação epitelial arborescente apoiada sobre um eixo fibrovascular com ou sem a presença de células mioepiteliais¹⁹. A correta

caracterização da lesão papilar é necessária para determinar o curso do tratamento a ser realizado¹⁴.

São consideradas lesões papilares da mama o papiloma intraductal, papilomatose, papiloma atípico, os carcinomas associados a papiloma e o carcinoma ductal com ou sem invasão¹⁹. Lesões atípicas sem características infiltrativas são melhores classificadas como neoplasia ductal intra-epitelial¹⁹. A distinção entre estes subtipos não é uma tarefa fácil, além de se encontrar diferentes terminologias²⁰.

Quando se utilizam os critérios clínicos dividem-se os papilomas em centrais e periféricos. Os papilomas ductais centrais localizados em ducto terminal são geralmente únicos e as lesões periféricas, localizadas em ductos lobulares terminais, na maioria das vezes são múltiplas¹³⁻⁷. A maior incidência de malignidade é encontrada nas lesões periféricas quando comparada com as lesões retro-areolares ou as da porção central da mama¹⁷⁻⁹.

2.1.1 Apresentação Clínica

As lesões papilares da mama apresentam baixa incidência e acometem mulheres em qualquer idade, sendo os papilomas solitários mais comuns na sexta década de vida e os papilomas múltiplos na idade entre os 40 e os 55 anos^{3,19}. Clinicamente é observada, em 72% dos casos, descarga mamilar uniductal sanguinolenta ou serosa límpida, sendo mais comum nas lesões centrais (86%) do que nas lesões periféricas (29%). Em alguns casos pode-se palpar uma massa ao redor ou sob a aréola, mas também em qualquer setor da mama³. Dilatações ductais retro-areolares podem ser identificadas pela mamografia e pela ultrassonografia mamária¹⁹.

As lesões de pequeno diâmetro e muitas lesões periféricas são assintomáticas e detectadas apenas em exames de imagem realizados como medida preventiva¹⁹.

2.1.2 Diagnóstico por Imagem

O encontro da lesão papilar mamária por método de imagem pode ser realizado em exames de rotina, na investigação de massa palpável ou de descarga

papilar uniductal. Quando visíveis, em mamografia, as lesões únicas são geralmente redondas ou ovais, bem definidas e com densidade semelhante à de um cisto simples. Já, a papilomatose múltipla apresenta aspecto de massa nodular ou microcalcificações agrupadas^{14,20}.

Quando observada pela ultrassonografia mamária visualiza-se área nodular bem delimitada, no interior de um cisto unicameral ou dentro de um ducto dilatado. Os papilomas múltiplos podem ser identificados dentro de um sistema ductal dilatado. Papilomas intracísticos ou intraductais apresentam um pedículo vascularizado que ocasionalmente pode ser identificado ao estudo pelo doppler colorido^{14,20}.

À mamografia e ultrassonografia, a maioria das lesões papilares é classificada pelo *Breast Image Reporting and Data System* (BI-RADS) na categoria 4²⁰. Outra consideração envolvendo análise dos resultados mamográficos e ultrassonográficos é a ausência de diferenciação na aparência das lesões papilares benignas daquelas malignas, quando utilizados estes métodos de diagnóstico²¹.

Galactografia é o método de escolha para identificar as lesões papilares localizadas próximo ao mamilo e que apresentem descarga papilar espontânea. Contraste iodado é infundido no ducto produtor da descarga e o papiloma sólido apresenta-se como uma falha de enchimento ou uma interrupção abrupta do ducto dilatado. Papilomas múltiplos determinam várias áreas com falhas de enchimento¹³.

Um novo método, a ductoscopia, abre uma nova possibilidade na investigação desta doença, possibilitando a avaliação do sistema ductal com a realização de lavado direcionado ou intervenção terapêutica²⁰.

A ressonância magnética (RM) da mama é um método altamente sensível para a detecção de papilomas intraductais, principalmente em mulheres jovens e com mamas densas, embora na injeção de contraste o realce da borda da lesão possa imitar o carcinoma invasivo²⁰. Nos casos de carcinoma *in situ* micropapilar, que se apresenta apenas como distorção do parênquima nos demais exames de imagem, a RM das mamas auxilia na análise da extensão da lesão para determinar se a cirurgia conservadora pode ser indicada¹³. A RM é uma ferramenta útil para definir a extensão pré-operatória da lesão e para excluir a multifocalidade, cuja presença influencia no planejamento cirúrgico²².

Embora o auxílio dos métodos de imagem seja grande, não são suficientemente sensíveis ou específicos para diferenciar as lesões benignas das malignas nos tumores papilares^{21,23}.

2.1.3 Biópsia Pré-operatória e Transoperatória

As técnicas empregadas para o diagnóstico pré-operatório das lesões papilares são as mesmas para qualquer tipo de apresentação clínica: a BAAF, a biópsia por agulha grossa (*core biopsy*) com ou sem uso de dispositivo para aspiração a vácuo. A técnica utilizada varia de acordo com cada serviço e está associada à experiência adquirida com o método empregado¹³.

A classificação precisa das lesões papilares mamárias, baseada na citologia, continua a ser um desafio. De particular importância é a diferenciação entre lesões benignas e malignas, para as quais vários autores descrevem técnicas que buscam auxiliar nesta determinação. Entretanto, é ainda grande a discordância entre diagnósticos citológicos e os diagnósticos efetuados com o estudo anatomopatológico de peça cirúrgica¹⁹.

Embora alguns autores sugiram que a ausência de atipias no espécime de *core biopsy* dos papilomas de mama possibilita o acompanhamento sem a necessidade da remoção cirúrgica, uma estrita correlação clínica e radiológica (mamografia e ultrassonografia) é necessária para o correto diagnóstico. A experiência do serviço é fundamental para a segurança e a acurácia do diagnóstico^{13,19}.

O exame anatomopatológico transoperatório por congelação possibilita a detecção do papiloma intraductal, mas apresenta limitações técnicas, fazendo com que haja preferência pelo estudo em tecido fixado em formol e processado em parafina³. Mesmo no encontro de sinais histopatológicos de carcinoma papilífero, principalmente na apresentação intracística, o diagnóstico pode ser suspeitado, mas não definitivo²⁴.

2.1.4 Macroscopia

O papiloma solitário é geralmente bosselado, macio e friável, cinza avermelhado a fresco, localizado dentro de cisto formado por ducto dilatado com líquido seroso ou hemorrágico, por vezes ocupando toda a cavidade, sendo envolvido pela parede do ducto onde foi formado. Varia em tamanho, desde menor que um centímetro até dois a três centímetros quando localizado nos ductos lactíferos³.

Papilomas múltiplos podem estender-se através de ductos dilatados formando massas maiores que dois centímetros. As lesões benignas e malignas não podem ser diferenciadas macroscopicamente, embora as maiores sejam mais sugestivas de malignidade²⁵.

2.1.5 Microscopia

A estrutura básica microscópica de um papiloma consiste em um eixo de estroma fibrovascular, que é revestido por uma camada de células epiteliais e mioepiteliais. As células epiteliais são colunares ou cubóides e com pouco pleomorfismo e hiper cromasia nucleares e baixa atividade mitótica^{3,14,19-20,24-5}.

O estroma papilar pode surgir de um ou de múltiplos focos da parede do ducto, e alguns papilomas desenvolvem estrutura mais complexa com crescimento excessivo do estroma e hiperplasia do epitélio ductal, o que pode ocasionar fusão dos eixos papilares que nos casos mais acentuados determina formação do papiloma intraductal sólido, onde todo o espaço entre os eixos fibrovasculares é preenchido pelo epitélio ductal proliferado^{3,14,19-20,24-5}.

O epitélio do papiloma intraductal contém camada de células mioepiteliais, que são alongadas com núcleo achatado ao longo da membrana basal. Frequentemente não são visíveis à microscopia convencional, necessitando estudo IHQ para a sua adequada identificação. Estão ausentes no carcinoma papilífero, mas nos casos em que há esclerose intensa a detecção pode estar prejudicada. A ausência das células mioepiteliais não permite o diagnóstico conclusivo de malignidade na lesão papilar^{3,14,19-20,24-5}.

A colagenização do estroma fibrovascular ocorre em alguns papilomas. Se a colagenização é acompanhada pela proliferação de miofibroblastos, estes podem tornar-se distorcidos e o aspecto morfológico pode ser de carcinoma na periferia da lesão. Quando a esclerose do estroma é muito intensa a estrutura do papiloma é eliminada e a lesão residual torna-se cicatricial com escassos elementos glandulares, tornando muito difícil a diferenciação com fibroadenomas^{3,14,19-20,24-5}.

As lesões papilares malignas acometem mulheres após os 60 anos e representam cerca de dois por cento dos casos de câncer mamário¹⁵. Embora a presença de células mioepiteliais seja utilizada como critério para o diagnóstico diferencial entre carcinoma invasivo e carcinoma in situ, estudos imunoistoquímicos revelaram que alguns carcinomas in situ podem não conter tais células²⁰.

O quadro 1 mostra de forma didática as diferenças entre as lesões no estudo por microscopia ótica¹⁴.

Quadro 1 – Características histopatológicas do papiloma e carcinoma papilífero

CARACT. HISTOPATOLÓGICA	PAPILOMA	CARCINOMA PAPILÍFERO
Nº de tipos celulares	Dois tipos	Um tipo
Núcleo	Normocromático	Hipercromático
Metaplasia apócrina	Presente	Ausente
Padrão glandular	Complexo	Cribiforme
Tecido conetivo do estroma	Proeminente	Delicado ou ausente
Ductos adjacentes	Hiperplasia intraductal	Carcinoma intraductal
Adenose esclerosante	Às vezes presente	Geralmente ausente

Modificado de Ibarra AJ. Papillary lesions of the breast. *The Breast Journal*. 2006; 12(3):237-51

2.1.6 Implicações Clínicas

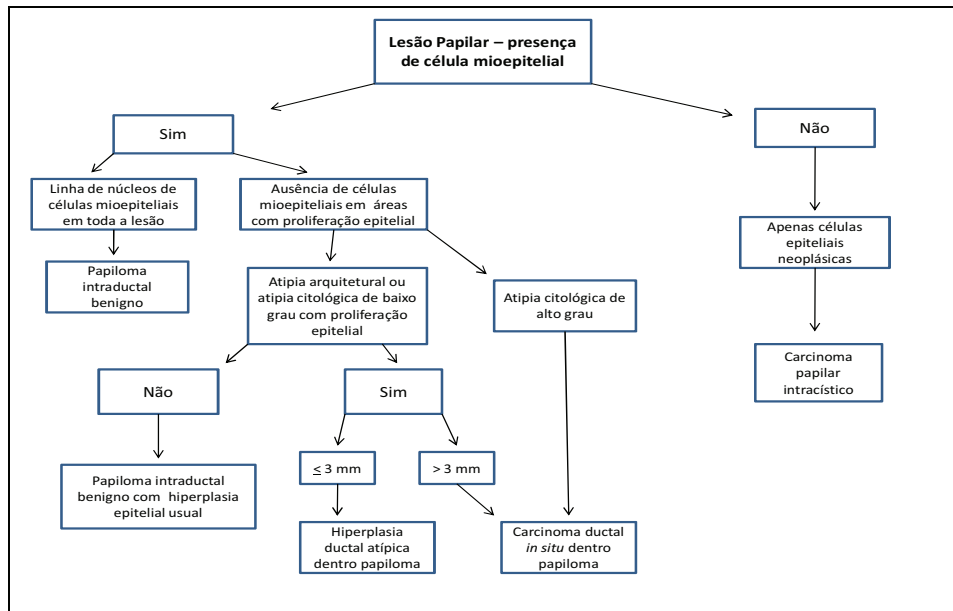
Os métodos consagrados para o diagnóstico das lesões papilares mamárias são a histopatologia, utilizando-se cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) e mais recentemente os métodos IHQs¹⁹.

Ao analisar uma série de casos com tumores papilares benignos, de malignidade incerta ou malignos, Kil *et al* não observaram alterações significativas quanto aos sintomas clínicos e a idade das pacientes¹⁰.

A presença, a ausência e a distribuição das células mioepiteliais é um dos recursos mais úteis para distinguir entre os vários tipos de tumor papilar da mama. Sua presença pode ser de difícil detecção com a coloração HE, sendo necessária a realização de técnica IHQ com a utilização de marcadores específicos para estas células, tais como a actina de músculo liso, calponina, miosina de cadeia pesada, p63 entre outros^{7,26-8}.

O algoritmo representado no quadro 2 demonstra a abordagem a ser programada para as lesões papilares baseada na avaliação das células mioepiteliais nestes tumores.

Quadro 2 - Algoritmo da abordagem a ser programada para as lesões papilares baseada na avaliação das células mioepiteliais



(Modificado de Mulligan AM, O'Malley FP. Papillary lesions of the breast, a review. *Adv Anatol Pathol.* 2007; 14:108-19)

Outro fator considerado é a ausência de metaplasia apócrina nas lesões papilares benignas, mas este detalhe anatomopatológico não é consenso entre os patologistas²⁹.

Persiste acentuada divergência entre os autores sobre o manejo cirúrgico dos casos com diagnóstico pré-operatório de lesão papilar, seja em biópsia por agulha grossa ou BAAF. Mesmo com incidência que varia entre 0 a 36% de lesões malignas ou pré-malignas encontradas nas lesões papilares com diagnóstico pré-operatório

por punção, a maioria dos estudos sugere realizar a exeresse da mesma para estudo histológico de todo o material^{7,8,18-20,30-4}.

A excisão cirúrgica dos papilomas mamários é recomendada por Sakr *et al* baseado nos dados encontrados em seu material, que demonstra incidência de 8% de malignidade nas lesões com diagnóstico pré-operatório de benignidade em biopsia por agulha grossa. A presença de microcalcificações e a idade maior que 50 anos foram os fatores independentes relacionados com o risco de malignidade nas lesões papilares mamárias³⁴.

Em estudo de Zografos *et al*, mesmo quando utilizaram biópsia por agulha grossa com aspiração à vácuo (mamotomia) foi encontrada taxa de substimação diagnóstica de 3,6%, embora tenha sido utilizada apenas a análise por microscopia ótica convencional. Os casos que apresentaram uma lesão maligna na análise da peça estavam todos associados a outras lesões proliferativas como hiperplasia ductal atípica, neoplasia lobular ou cicatriz radial. Os papilomas puros obtiveram concordância total entre a biópsia pré-operatória e o estudo anatomopatológico da peça cirúrgica³⁵.

Mesmo enfatizando que não existe consenso e que mais estudos são necessários para comprovar a segurança do método proposto, Kil *et al* sugerem que lesões papilares centrais com até 1,5 cm e com biópsia por agulha grossa negativa para malignidade e com ausência de atipias possam ser apenas acompanhadas. Quando quaisquer destes parâmetros sejam discordantes a ressecção torna-se obrigatória¹⁰.

Em análise baseada na revisão de 21 biópsias por agulha grossa com diagnóstico de lesão papilar, onde comparam com o resultado definitivo do exame anatomopatológico do material fixado em parafina, Carder *et al* concluíram que seus resultados confirmaram a exatidão da biópsia por agulha grossa nas lesões papilares e que as lesões B3 (lesões de potencial maligno incerto na classificação do *National Coordinating Committee for Breast Screening Pathology*) não precisam ser necessariamente removidas³⁶.

Em estudo que avaliava a biópsia por agulha grossa e a mamotomia nas lesões papilares mamárias, Ashkenazi *et al* recomendavam que aqueles casos que não apresentem atipias possam ser apenas acompanhados, sem a necessidade da exeresse da lesão, desde que alguns cuidados sejam tomados: o material

anatomopatológico deve ser analisado por mais de um patologista com experiência em patologia do tecido mamário, os exames de imagem devem ser concordantes com o resultado do exame anatomopatológico, os pacientes devem concordar com um controle clínico rigoroso e por métodos de imagem repetidos por um período de dois a três anos e estarem cientes que não existe uma recomendação definitiva para a abordagem das lesões papilares³⁷.

Quando se analisou publicação sobre a abordagem das lesões papilares mamárias em trabalho de Jung *et al*, realizado com avaliação pré-operatória por agulha grossa foi observado risco de 6,3% da lesão diagnosticada como benigna, mostrou-se como maligna no material excisado em cirurgia. Os fatores mais significativos desta discordância diagnóstica foram a presença de nódulo palpável ao exame clínico e a observação de uma massa à mamografia. Sugeriram que em pacientes de baixo risco a ressecção não seja realizada, embora devam ser seguidas cuidadosamente³⁸.

2.2 BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA (BAAF) NAS LESÕES PAPILARES DA MAMA

A primeira publicação sobre a BAAF foi apresentada por Martin e Ellis, em 1930, que relatavam suas experiências no *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* de Nova Iorque³⁹. Foi, posteriormente, difundida na Escandinávia por Stewart onde a técnica foi aceita e realizada em especial pelos citopatologistas⁴⁰.

Nos Estados Unidos, houve muita relutância para a aceitação do método. De um lado, os patologistas, inseguros em emitir diagnóstico baseado apenas na aparência das células isoladas e do outro, os cirurgiões, apreensivos pelo risco do resultado falso-positivo⁴¹.

Na Europa o ritmo de desenvolvimento da BAAF foi mantido, especialmente na Suécia. Entre 1967 e 1974, Zajicek e Franzen publicaram os resultados de seus cuidadosos e abrangentes estudos, compartilhando mundialmente suas experiências⁴².

Com as mudanças na economia médica nos Estados Unidos, resultando em aumento dos métodos de controle para a redução dos custos, incentivou-se a BAAF

como método diagnóstico para os tumores mamários. Além disso, estudos prospectivos demonstraram que o trauma local, determinado pela biópsia percutânea não aumentava o risco de metástase e não alterava a sobrevivência das pacientes submetidas à BAAF⁴¹.

Em 1977, Bolmgren *et al* desenvolveram a técnica da biópsia estereotáxica para as lesões não palpáveis de mama com a utilização de agulha para a coleta de material. No mesmo ano, estudo de Nordenstrom e Zajicek comprovou que esta técnica tem a mesma acurácia da biópsia excisional⁴¹.

A biópsia aspirativa por agulha fina (BAAF) tem sido bem documentada há algumas décadas como um procedimento diagnóstico efetivo na avaliação das lesões mamárias, apresentando alta sensibilidade e especificidade para a detecção do carcinoma mamário^{11-12,43}, embora seja criticada, quando em comparação com a biópsia de agulha grossa, pela incapacidade de diagnosticar lesões específicas, como papilomas, no espectro das lesões proliferativas da mama³⁸. A mesma dificuldade é encontrada na diferenciação entre o fibroadenoma e o carcinoma de baixo grau⁴³.

A BAAF pode, mais frequentemente, apresentar material insuficiente para análise e devido a este fato dificultar o estudo por imunomarcadores (cito-histoquímicos)⁴⁴.

O exato diagnóstico das lesões papilares na BAAF torna-se um desafio pela superposição das características citológicas benignas e as proliferações epiteliais⁴⁷⁻⁸. As lesões papilares das mamas compreendem um grupo variado de proliferações epiteliais, que incluem hiperplasia epitelial ductal com componente de alteração microcística, papilomas solitários ou múltiplos (papilomatose), carcinoma *in situ* (micropapilar, sólido ou papilar intracístico) e até o carcinoma invasor (papilar puro ou como componente de carcinoma ductal)⁴⁹.

O manejo das lesões papilares mamárias identificadas em diagnóstico pré-operatório permanece controverso⁴⁷. A BAAF e a biópsia com agulha grossa apresentam armadilhas e a necessidade de remoção cirúrgica de todas as lesões papilares deve ser revista²³.

A presença e a quantidade de células mioepiteliais, núcleos bipolares nus em segundo plano e alterações na arquitetura da célula ductal foram, de acordo com

Tse *et al*, as únicas características citológicas uteis e consistentes na distinção das lesões mamárias com padrão papilar no material coletado através de BAAF⁴⁸.

Os esfregaços obtidos pela BAAF das lesões papilares apresentam alta celularidade, com grupamentos grandes constituídos pela mistura de tecido, estroma e células ductais e outros fragmentos menores, com proeminência de células mioepiteliais e núcleos nus bipolares, e algumas células isoladas⁴⁵. A presença de áreas estreladas e fragmentos de tecido com aspecto reticular sugerem lesão papilar, já a presença de estruturas tubulares está mais relacionada com outras alterações proliferativas não papilares⁴⁹.

Revisando 23 casos de papilomas e 11 casos de carcinoma papilar no diagnóstico histológico, que haviam sido avaliados com BAAF no pré-operatório, Gomes-Aracil *et al* observaram erro significativo na análise comparativa entre os dois exames, com características que se sobrepõem. A presença de atipias celulares e fragmentos com papilas longas e delgadas, com bordas ramificadas, sugeriram carcinoma papilar⁵⁰.

Em estudo prospectivo Field e Mark, avaliando BAAF nas lesões papilares, observaram que fragmentos de tecido com conformação estrelada e em malha associados a fragmentos papilares de tecido apresentavam um elevado valor preditivo positivo para papiloma mamário (0.93 – 0.98)⁴⁵.

Em análise retrospectiva de BAAFs utilizadas no diagnóstico pré-operatório e com diagnóstico anatomopatológico, Gomes-Aracil *et al* observaram vários fatores que caracterizaram diferenças entre o papiloma mamário e o carcinoma papilífero, desde o aspecto do esfregaço (hemorrágico no caso do carcinoma e seroso nos papilomas) e principalmente das características morfológicas ao estudo citológico do material. Concluíram que em muitos casos a diferenciação entre lesões benignas e malignas é possível baseada apenas no diagnóstico citológico da BAAF, mas se houver qualquer dúvida a biópsia cirúrgica deve ser realizada⁵⁰.

Dawson e Multford reavaliaram 29 casos de lesões papilares com diagnóstico pré-operatório por BAAF e observaram que os casos com maior celularidade e grande número de células isoladas favoreciam o diagnóstico de carcinoma papilífero. Hiperplasia e estratificação nuclear, algumas características das células de fundo (como por exemplo, a ausência de metaplasia apócrina) ajudaram no diagnóstico diferencial⁵¹.

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI) ao elaborar as diretrizes para a BAAF mamária colocou as lesões papilares da mama na categoria indeterminada, devido aos critérios de diferenciação citológica entre lesões benignas e malignas não estarem bem estabelecidos⁴⁷.

Em estudo prospectivo, Valdes *et al* demonstraram perda significativa na determinação de malignidade nas biopsias pré-operatórias com diagnóstico de lesão papilar quando usado biópsia estereotaxica (12%), biópsia com agulha grossa guiada por ultrassonografia (35%) ou BAAF guiada por ultrassonografia (30%) e baseado nestes dados sugeriram a obrigatoriedade da exeresse cirúrgica das lesões papilares diagnosticadas por punção-biópsia, mesmo na ausência de atipias no material³¹.

Gendler *et al* avaliaram casos de punção-biópsia utilizando BAAF ou biópsia com agulha grossa, guiados por ultrassonografia ou estereotaxia com diagnóstico de lesão papilar e observaram a presença de 36% de hiperplasia ductal atípica nos diagnósticos. Considerando estas observações, sugeriram a ressecção cirúrgica de todas as lesões papilares com diagnóstico em biópsias percutâneas⁵².

Ao avaliarem comparativamente, em estudo retrospectivo, BAAF com biópsia com agulha grossa, Masood *et al* não encontraram alterações significativas no diagnóstico das lesões papilares⁵³. Observação que é corroborada por Gendler *et al*⁵². Cheng *et al*, em estudo retrospectivo observaram maior acurácia na biópsia por agulha grossa em comparação com a BAAF no diagnóstico pré-operatório das lesões papilares mamárias⁵⁴.

Em outro estudo retrospectivo, Sohn *et al* observaram uma inaceitável taxa de malignidade no estudo anatomopatológico das lesões papilares mamárias extirpadas, quando a punção-biópsia realizada apresentava atipias. Sugeriram que seja usada biópsia por agulha grossa no lugar da BAAF para reduzir os erros de amostragem no material. Nos diagnósticos de lesões papilares mamárias benignas (ausência de atipias) em biópsia por agulha grossa associadas à mamografia padrão BI-RADS 3 indicaram realizar vigilância com mamografia seriada. Indicações para exeresse cirúrgica devem incluir casos de discordância radiológica (mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética), preferência do cirurgião ou da paciente, e associação com outros fatores de risco para neoplasia maligna mamária⁵⁵.

Estudo publicado por Cheng *et al* apresentou mudança diagnóstica, de benigno para maligno, em 9,21% das lesões papilares estudadas por biópsia com agulha grossa e BAAF. Os fatores mais significativos observados nestes casos foram a idade maior do que 45 anos e a presença de atipias celulares. Já o tamanho e o número das lesões não apresentaram significância. Ao discutirem os dados encontrados consideraram prudente a ressecção cirúrgica das lesões papilares benignas da mama identificadas no diagnóstico pré-operatório⁵⁴. Em estudo semelhante, Jayaram *et al* observaram que 49,2% das lesões papilares se mostraram malignas na histologia, e sugeriram a excisão urgente destas⁵⁶.

2.3 IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) DAS LESÕES PAPILARES DA MAMA

A ICQ e a IHQ são métodos de análise molecular, que utilizando-se da reação antígeno-anticorpo, procuram identificar marcadores específicos de cada célula ou tecido, observáveis ao microscópio óptico¹¹.

A primeira técnica de ICQ foi introduzida por Coons *et al* em 1942 e compreendia a conjugação de um anticorpo com um corante fluorescente. O primeiro composto a ser utilizado foi o isocianato de fluoresceína, sendo substituído posteriormente por isotiocianato de fluoresceína e por outros de maior facilidade de conjugação, como as enzimas peroxidase, fosfatase alcalina e glicose oxidase⁵⁷.

Esta técnica consiste em um conjunto de reações específicas, baseada na interação antígeno com anticorpo, que ao final do processo conferem cor ou eletrodensidade à estrutura em estudo. Esta metodologia permite a conjugação de um marcador a um anticorpo, como exemplo proteína ou composto sintético, sem causar dano à ligação estabelecida entre o antígeno e o anticorpo, possibilitando a observação microscópica dos locais ocupados pelos anticorpos e conseqüentemente pelo antígeno, seja em um componente normal ou patológico¹².

Este método é utilizado como adjuvante nos estudos de morfologia e na elucidação da natureza bioquímica complexa de uma variedade de doenças infecciosas e neoplásicas. Por auxiliar na identificação da origem anatômica e ou embriológica das células por meio da localização de marcadores intracelulares específicos, é especialmente utilizado nas neoplasias indiferenciadas auxiliando a

aumentar as possibilidades de diagnóstico na determinação no sítio primário do tumor⁵⁸.

A interpretação das reações dos imunomarcadores nos esfregaços para estudo citológico é mais difícil do que no material fixado em parafina. A razão para esta dificuldade é que o citoplasma das células arrancadas de seu estroma é frequentemente frágil e difusamente disperso no fundo do esfregaço. Além disso, a presença de sangue, soro ou produtos de secreção e outros resíduos, dificultam a identificação de células coradas positivamente⁵¹.

O tipo de fixação dos esfregaços citológicos interfere na coloração ICQ. A recuperação antigênica não é possível em material fixado ao ar, como os utilizados na coloração de Giemsa, principalmente na identificação da proteína Ki67. Esfregaços citológicos fixados em álcool, utilizados quando a técnica é a de Papanicolau, permite o processamento adequado para a coloração ICQ⁵⁹.

Bozzetti *et al*, com o intuito de melhorar a aplicabilidade da ICQ em esfregaços decorrentes de BAAF dos tumores mamários, sugeriram que as agulhas utilizadas na punção continham em seu interior material celular suficiente para ser utilizado na ICQ, o que melhorou a acurácia do método na BAAF. O estudo concluiu que é possível realizar avaliação de fatores prognósticos em material de BAAF, mas não comparou com os resultados do exame feito sobre o esfregaço já fixado em lâmina¹¹.

Wong *et al* demonstraram em estudo realizado em 135 casos de lesões mamárias, que a ICQ aplicada em esfregaços de BAAF auxilia no diagnóstico diferencial entre lesões malignas e benignas, principalmente nos carcinomas de baixo grau⁶⁰.

Entre os marcadores ICQs, um dos utilizados como fator prognóstico é o Ki67, que se expressa em células proliferativas nas fases G₁ tardia, S, G₂ e M, mas não na fase G₀ do ciclo celular. Pode também ser utilizado para diferenciar tumores malignos de tumores benignos⁶¹. A expressão do Ki67 em tecido normal ou lesões benignas é baixa (< 1,5-2%)⁶². Utilizado no diagnóstico diferencial de várias lesões proliferativas da linhagem linfóide como hiperplasia folicular, linfoma folicular, linfoma de Burkitt e de Hodgkin. Também pode ser aplicado como fator prognóstico em linfomas não Hodgkin, gliomas, sarcomas de partes moles e mama (neste caso seu emprego como fator prognóstico é controverso)⁶¹.

Em uma avaliação que comparou BAAF e estudo histológico para o carcinoma primário da mama, Sianesi *et al* obtiveram concordância de 93,3% para o Ki67, o que demonstrou a aplicabilidade desta imunorreação no material de BAAF⁶³.

Para o diagnóstico diferencial das lesões papilares (entre lesão benigna e maligna) utiliza-se o p63 que no tecido normal da mama apresenta imunorreatividade para células basais e co-expressão como marcador de células mioepiteliais, presentes no papiloma mamário, mas não no carcinoma papilar¹³. O p63 é um marcador do núcleo da célula mioepitelial e raramente marca o núcleo da célula epitelial da lesão papilar, não apresentando reação cruzada com a célula do estroma. Por estas razões é o marcador de escolha para detecção de células mioepiteliais³. Ainda em avaliação das neoplasias mamárias é aplicado na diferenciação de carcinoma ductal *in situ* e lobular *in situ*¹⁴. Outras aplicações podem ser realizadas em carcinoma de próstata, linfoma não Hodgkin, melanoma e glioblastoma⁶¹.

Preocupados com a reprodutibilidade dos resultados, e, portanto com a confiabilidade dos exames de ICQ, Confortini *et al* analisaram resultados de pesquisa de receptores hormonais e do Ki67 realizados em material de BAAF de mama dos arquivos do Centro de Estudos e Prevenção de Câncer em Florença, revisando-os em seis outros centros italianos. Observaram que não houve discordância com relação aos receptores hormonais, mas grande discrepância com o Ki67 foi encontrada⁶⁴.

Os motivos da baixa concordância entre os exames de ICQ na determinação do antígeno Ki67 estariam relacionados a resultados falsos positivos na coloração do citoplasma durante o processo de fixação e coloração, presença acentuada de células de gordura e eritrócitos, coloração heterogênea do núcleo, a procura de campos microscópicos que tenham apenas as células malignas e a não utilização de critérios pré-definidos⁶⁴.

Segundo Confortini *et al*, para melhorar a qualidade do exame ICQ e aumentar a concordância do diagnóstico entre os laboratórios é necessário a padronização dos métodos, estabelecer pontos de corte comuns para os resultados positivos e negativos, promover intercâmbio entre os laboratórios como controle de

qualidade dos exames, implementar o uso de sistema computadorizado de análise das imagens⁶⁴.

Na confirmação diagnóstica das lesões papilares o uso de imunomarcadores auxilia tanto nas biópsias percutâneas (BAAF e biópsia por agulha grossa) como no estudo anatomopatológico das peças cirúrgicas⁶⁵.

Nos estudos que utilizaram a IHQ como critérios diagnósticos e na distinção entre benignidade ou malignidade das lesões papilares, sejam no diagnóstico pré-operatório como no anatomopatológico da peça cirúrgica, podem ser utilizados diferentes marcadores celulares de superfície. Os mais usados foram CD44, CD10, p63, actina de músculo liso, citoqueratinas CK5 e CK6, sempre buscando a identificação da presença de células mioepiteliais^{7,9,13,19-20,24,28,37}.

Para definir fatores prognósticos, Bozzetti *et al* utilizaram exclusivamente ICQ nas BAAF realizadas nas lesões mamárias. Foram realizados dois marcadores, qual sejam o Ki67 com ponto de corte 8,4% e p53 com ponto de corte 1% das células analisadas. Os resultados foram satisfatórios, mas a sua aplicabilidade no diagnóstico pré-operatório não foi avaliada⁴³.

Leal *et al*, em estudo sobre carcinoma ductal intracístico (CDI), analisaram a determinação de Ki67 em BAAF e também no material incluído em parafina, avaliaram a positividade deste marcador no CDI isolado que foi de 8,8% (3,7 a 22,1%), no CDI associado a carcinoma ductal *in situ* de 9,8% (3,6 a 16,7%) e CDI associado a carcinoma invasor de 11,2% (3,0 a 18%). Não observaram diferença significativa na análise dos dados⁶⁶.

Para melhorar o diagnóstico citológico nas BAAFs das lesões papilares, considerada por muitos como zona cinzenta, Midulla *et al* realizaram estudo retrospectivo de 37 casos com resultados citológicos incertos e com diagnóstico firmado com a histologia. Utilizaram estudo ICQ com Ki67 e bcl-2, encontraram resultados altamente significativos ($p < 0,001$) para positividade nos casos malignos com o Ki67. Com bcl-2 não foi observada nenhuma associação⁶⁷.

Ao revisar biópsias percutâneas com diagnóstico de lesões papilares em três centros de patologia e submeter o material a avaliação com estudo IHQ (painel utilizando p63, calponina e citoqueratina 5-6 (CK 5-6)), Douglas-Jones *et al* observaram uma melhora altamente significativa na acurácia do diagnóstico pré-operatório, de 44% na avaliação convencional corada pela hematoxilina-eosina, para

91% no exame com IHQ, ao se comparar com o diagnóstico definitivo do material removido cirurgicamente⁶⁵.

Em estudo IHQ de material de biópsias percutânea com agulha grossa, Shah *et al* utilizaram CK 5-6, calponina e p63. Embora não tenham definido os critérios adotados para a positividade destes imunomarcadores, a análise dos dados demonstrou que a associação da microscopia ótica convencional e a IHQ foi capaz de aumentar o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo, a especificidade, a sensibilidade e acuracidade do diagnóstico. Embora não houvesse no estudo análise estatística que avaliasse a significância do método empregado, os autores concluíram que lesões papilares mamárias com biópsia percutânea sem sinais de atipias histológicas (associadas ao painel de IHQ) e sem sinais suspeitos ao estudo radiológico não requerem excisão cirúrgica, apenas controle⁶⁸.

Ao avaliarem material submetido a processamento em parafina cujo diagnóstico era de lesão papilar, Troxell *et al* reafirmaram a dificuldade na diferenciação das lesões papilares benignas e malignas, mesmo no exame da peça cirúrgica, e propuseram teste com IHQ utilizando actina de músculo liso (que identifica presença de actina nas células e, portanto não exclusiva de células mioepiteliais), painel de marcadores de células mioepiteliais (calponina, p63 e P-cadherina) e CD44 (marca componentes epiteliais e mioepiteliais das lesões papilares). Consideraram positivos os exames com expressão 1+. Concluíram que a associação de calponina com p63 são mais efetivos para auxiliar nos casos onde encontra-se dificuldade no distinguir a presença de malignidade nas lesões papilares⁶⁹.

Hill *et al* avaliaram, em estudo, a presença de células mioepiteliais em biópsias por agulha grossa em lesões papilares com IHQ, utilizando o p63, calponina e miosina de músculo liso, no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas. Observaram alta sensibilidade e especificidade na determinação das células mioepiteliais com a marcação pelo p63, sem reação cruzada com miofibroblastos ou músculo liso da parede vascular. Apesar desta capacidade de determinação da célula mioepitelial, os autores não recomendaram a sua utilização na forma isolada devido a apresentar uma coloração nuclear muito descontínua, sugeriram a sua associação com calponina ou miosina de músculo liso. A diferenciação entre carcinoma *in situ* e invasor não foi recomendada pelos autores

em material de punção biópsia, devido à amostragem do material não conter adequadamente as margens da lesão²⁶.

Propondo um novo painel de IHQ, Moritani *et al* associaram três grupos de imunomarcadores para diferenciar carcinoma intraductal papilífero de papiloma intraductal com hiperplasia ductal, em material fixado em parafina. Na composição do painel foram utilizados marcadores de células mioepiteliais (p63, calponina e CD10), marcadores neuroendócrinos (cromogranina A e sinaptofisina) e citoqueratinas de alto peso molecular (CK 34βE-12). Concluíram os autores que apresentam alta probabilidade de malignidade quando dois dos seguintes critérios estiverem presentes: ausência de células mioepiteliais (<10% de positividade), citoqueratina de alto peso molecular negativa (<10%), marcadores neuroendócrinos positivos (>10%)²⁷.

Em revisão realizada por Moriya *et al*, sobre avanços em IHQ, os autores reafirmaram que a utilização dos marcadores de células mioepiteliais (p63, calponina, miosina, CD10, actina de músculo liso) não são suficientes quando utilizados de maneira isolada na diferenciação das lesões papilares benignas e malignas⁷⁰, afirmação corroborada por Schenka *et al*⁷¹. A utilização de citoqueratinas (CK 5-6 e CK 34βE12) foi bastante seletiva na avaliação das lesões papilares e na hiperplasia ductal atípica⁷⁰.

Quando avaliaram lesões papilares com diagnóstico pré-operatório realizado com biópsia de agulha grossa e compararam com resultado de exame anatomopatológico, Tse *et al* utilizaram três marcadores IHQs (receptores de estrógeno, citoqueratina 14 e p63) conseguindo reduzir de 79% para 30% a discordância entre os exames. Observaram, entretanto que os falsos positivos e os falsos negativos não foram totalmente eliminados⁷².

Estudo prospectivo realizado por Harton *et al* com obtenção de BAAF de lesões papilares no que foi avaliada a expressão do p63 e comparada com o estudo do material ressecado e fixado em parafina. Analisaram a imunorreação citoquímica separadamente nas células agrupadas (*clusters*) e nas células isoladas obtendo os mesmos resultados dentro do mesmo material. Concluíram no artigo que as lesões malignas e benignas apresentam uma significativa diferença na coloração do p63 nas lâminas de BAAF. Também afirmaram que o uso da ICQ com p63 quando aplicada nas BAAFs, nas quais o diagnóstico não pode ser conclusivo quando

baseado apenas na morfologia, aumenta a especificidade e os valores preditivos positivos e negativos⁴³.

No futuro, o desenvolvimento de novos marcadores específicos para descarga ou lavado mamilar, podem aumentar a detecção das lesões papilares mamárias malignas antes da cirurgia⁵⁴.

3 MÉTODO

Projeto de pesquisa avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, protocolo CEP 5372 e aprovado através do parecer número 0003492/09 de 04 de novembro de 2009.

Estudo retrospectivo com análise de 1.774 casos de BAAF, coletados entre janeiro de 2003 e setembro de 2009 no banco de citopatologia mamária do laboratório de Patologia Médica em Ponta Grossa (PR), com levantamento de 32 casos de lesões papilares da mama com diagnóstico através de Biópsia aspirativa por agulha fina (BAAF). Material e diagnósticos revisados no mesmo laboratório, validados 14 casos como amostra da pesquisa.

Dados e história clínica, exame físico e exames complementares levantados dos prontuários dos pacientes. Para a análise e classificação dos exames de mamografia e ultrassonografia mamária foram utilizados os critérios do sistema *Breast Image Reporting and Data System* (BI-RADS) do Colégio Americano de Radiologia, versão 2003⁷³.

Realizado estudo imunocitoquímico (ICQ) do material contido nas lâminas de BAAF utilizando o marcador para célula mioepitelial p63⁴³ (marca DAKO Clone 4A4) e o índice proliferativo Ki67¹¹ (marca DAKO Clone MIB-1). Exame (coloração) realizado no laboratório referência de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, São Paulo - SP. Interpretação das lâminas e emissão do diagnóstico ICQ realizados no laboratório Patologia Médica, Ponta Grossa - PR.

Foram revisadas as lâminas dos exames anatomopatológicos dos casos removidos cirurgicamente referentes às BAAF (com recorte dos blocos quando necessário), estudadas em microscópio óptico Olympus modelo BX41 no laboratório Patologia Médica em Ponta Grossa - PR.

Foram critérios de inclusão, BAAF com diagnóstico pré-operatório de lesão papilar, realizadas entre janeiro de 2003 e setembro de 2009, e cujas pacientes tenham sido submetidas à ressecção cirúrgica com análise histológica do material.

Foram critérios de exclusão pacientes cujas lâminas de BAAF tenham sido coradas apenas pelo método de Giemsa⁶⁰, os casos que todas as lâminas de BAAF

tenham sido consideradas insatisfatórias na revisão pelo patologista do laboratório de anatomia patológica e os casos em que houve descolamento do material fixado da lâmina no processo de coloração da ICQ.

Realizou-se a coleta do material da BAAF à mão livre nos casos de nódulos palpáveis ou guiada por ultrassonografia nas lesões nodulares impalpáveis. Utilizou-se agulha hipodérmica descartável 25 x 7 mm (22 gauge) ou 40 x 8 mm (21 gauge) acoplada a seringa descartável de 20 ml e como dispositivo auxiliar para realização da aspiração usou-se a pistola de Cameco^{42,74}. O esfregaço do material aspirado foi realizado em número variável de lâminas, com mínimo de seis, e o material fixado em álcool 70-90% ou secos ao ar^{42,74}. Para a análise ICQ foram utilizadas apenas os materiais fixados no álcool, sendo os secas ao ar (coradas pelo método de Giemsa) excluídos do estudo⁵⁹.

Descrição da técnica de coloração por imunocitoquímica empregada⁷⁵:

- a) hidratação das lâminas em água corrente;
- b) bloqueio da peroxidase endógena: banho por cinco minutos em Peróxido de hidrogênio/Metanol (50% Peróxido de Hidrogênio 10 volumes, 50% metanol);
- c) lavagem em solução salina tamponada (PBS);
- d) bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- e) incubação do anticorpo primário por duas horas à temperatura ambiente (Ta) em câmara úmida;
- f) lavagem em PBS;
- g) incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link -DAKO) por 30 minutos (Ta);
- h) lavagem em PBS;
- i) incubação com polímero (Advance HRP enzyme- DAKO) por 30 minutos(Ta);
- j) lavagem em PBS;
- k) revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) por cinco minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California);
- l) lavagem em água corrente;

- m) contra-coloração com Hematoxilina de Harris por dois minutos;
- n) lavagem em água corrente por cinco minutos;
- o) desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente (meio de montagem sintético para IHQ).

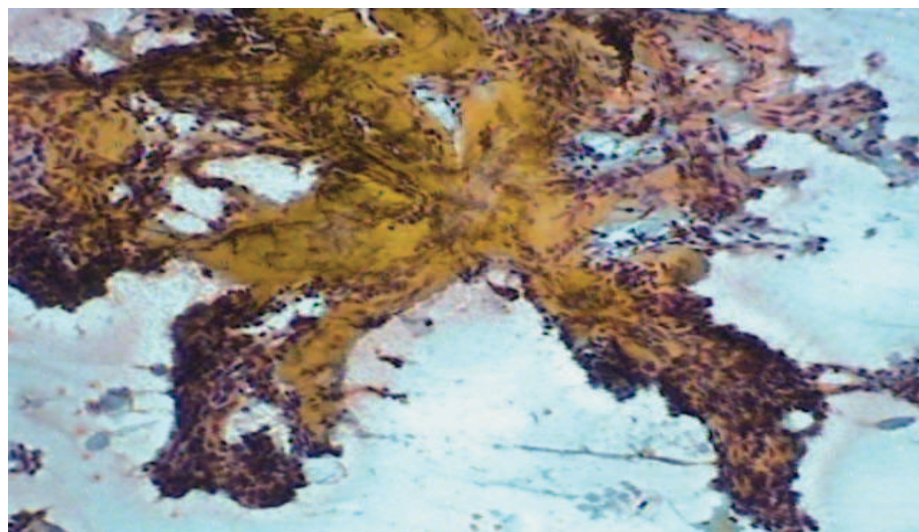
Na avaliação dos dados obtidos pela ICQ, o material marcado com Ki67 foi definido como negativo quando o marcador foi expresso em até 10% das células analisadas e positivo quando o número de células marcadas foi maior que 10%^{43,66}. A análise do p63 foi realizada separadamente nas células soltas e nos agrupamentos celulares, sendo considerado positivo quando foram marcadas 25% ou mais células no material avaliado (maior que 1+)^{27,43,69}. Foi realizada análise dos resultados dos imunomarcadores individualmente e comparativamente. Estes resultados foram relacionados com os diagnósticos anatomopatológicos dos blocos cirúrgicos.

Para análise o material foi dividido, de acordo com o resultado do exame histopatológico, em benigno (lesões proliferativas sem atipias e as neoplasias benignas), atípico (lesões proliferativas com atipias ou as de comportamento incerto) e maligno (diagnóstico de neoplasia maligna). Em decorrência do pequeno número de casos e para aumentar a expressão da amostra, foram agrupados segundo critérios clínicos os casos atípicos e malignos. Os resultados foram avaliados utilizando-se desta divisão.

Na análise estatística os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou frequências e percentuais (variáveis categóricas). Para avaliar a associação entre variáveis categóricas foi considerado o teste exato de Fisher. A comparação de grupos definidos pelo tipo de lesão, em relação a variáveis quantitativas, foi feita usando-se o teste t de *Student* para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado. Para avaliação da qualidade dos marcadores, foram estimados os valores de sensibilidade e especificidade. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

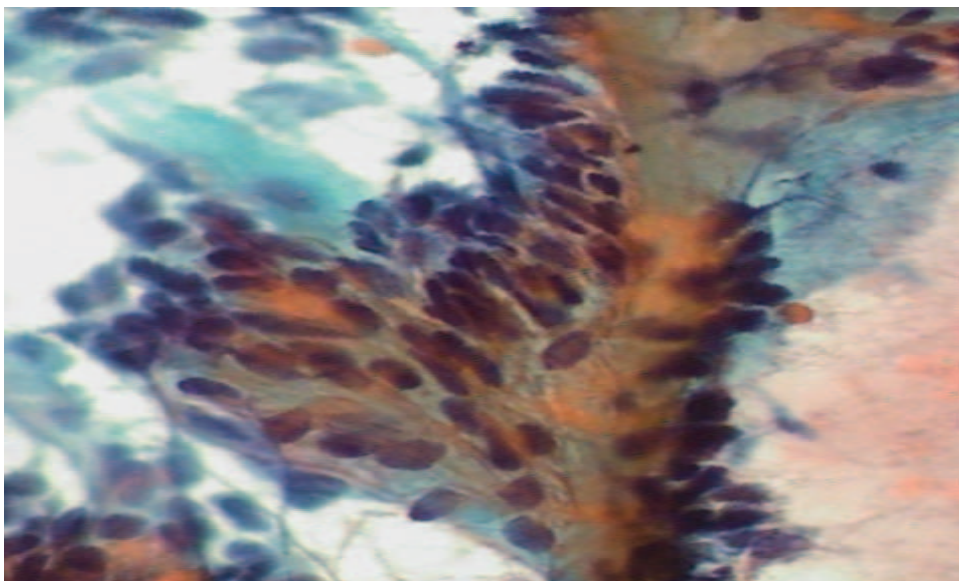
4 RESULTADOS

Na análise do banco de dados da citopatologia mamária do laboratório Patologia Mamária de um total de 1.774 casos foram localizados 32 com diagnóstico citológico pré-operatório com biópsia aspirativa por agulha fina (BAAF) de tumor papilar, representando 1,8% (figuras 1 e 2). Foram excluídos 18 casos seguindo os critérios determinados no método da pesquisa, perfazendo o total da amostra de 14 casos.



Fonte: Lab. Patologia Médica

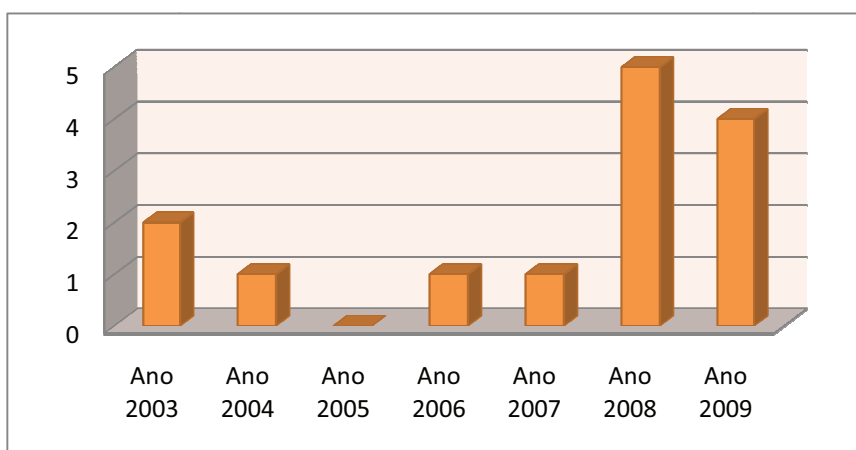
Figura 1 – Fotomicrografia de lesão papilar demonstrando eixo conjuntivo arborescente com revestimento parcial por células epiteliais (coloração de Papanicolau, 100x)



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 2 – Fotomicrografia de material obtido de biópsia aspirativa por agulha fina de lesão papilar com eixo conjuntivo revestido por células colunares monomórficas (coloração de Papanicolaou, 400x)

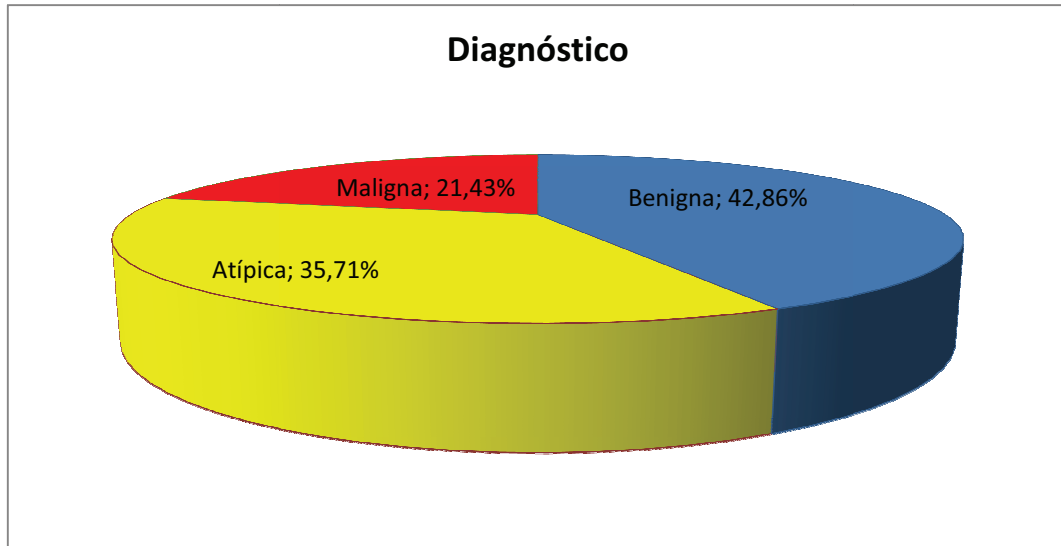
A distribuição temporal dos dados concentra-se em 2008 e 2009, nos anos anteriores desde 2003 uma parcela significativa dos casos foi corada apenas pelo método de Giemsa o que é inviável ao estudo ICQ (figura 3).



Fonte: o autor.

Figura 3 – Distribuição anual dos exames

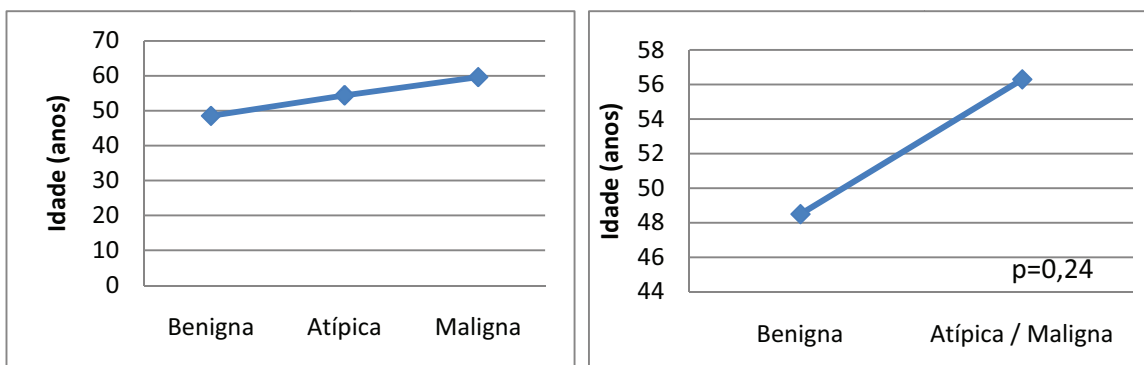
De acordo com o diagnóstico definitivo obtido pelo exame anatomopatológico dos segmentos mamários removidos cirurgicamente, as lesões foram divididas em três grupos: seis benignas (42,86%), cinco atípicas (35,71%) e três malignas (21,43%) (figura 4).



Fonte: o autor

Figura 4 - Agrupamento das lesões papilares de acordo com o resultado anatomopatológico

No grupo estudado todos os casos (100%) foram do sexo feminino e apresentaram idade mediana de 51 anos (30-82 anos) e média de 53,5 anos, com desvio padrão de 13,4 anos. Quando se separou os dados de acordo com resultado anatomopatológico da peça cirúrgica observou-se um aumento progressivo da média da faixa etária correspondendo a 48,5 anos para as lesões benignas, 54,4 anos para as lesões proliferativas com atipias e 59,6 anos para as lesões malignas (figura 5). Esta diferença foi mais visível quando se dividiu as lesões em dois grupos, as lesões benignas com 48,5 anos de média, e o grupo das lesões com atipias e as lesões malignas com média de idade de 56,3 anos. A análise estatística não demonstrou significância com valor de $p=0,240$ (teste t de *Student* para amostras independentes) (figura 6).

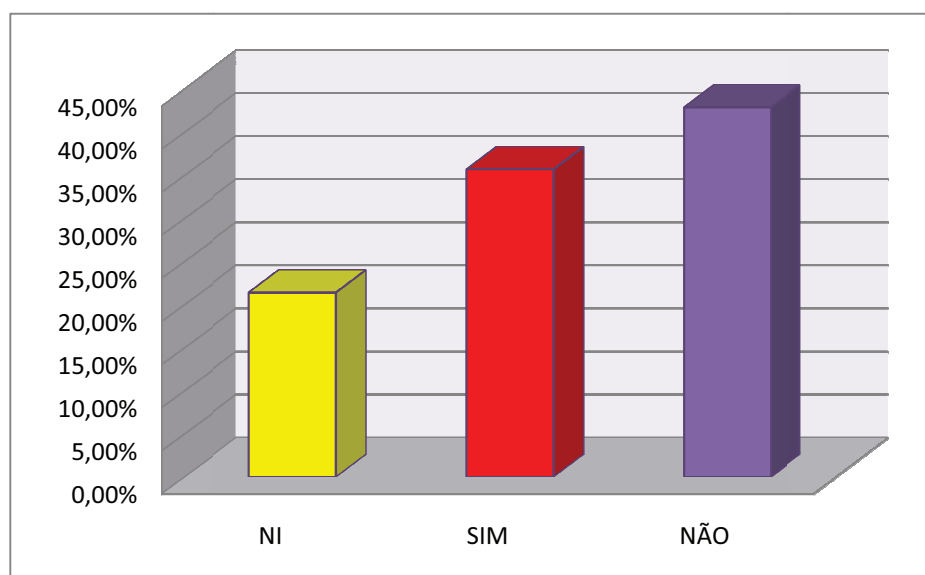


Fonte: o autor

Figuras 5 e 6 - Distribuição das faixas etárias de acordo com o diagnóstico anatomopatológico das lesões papilares

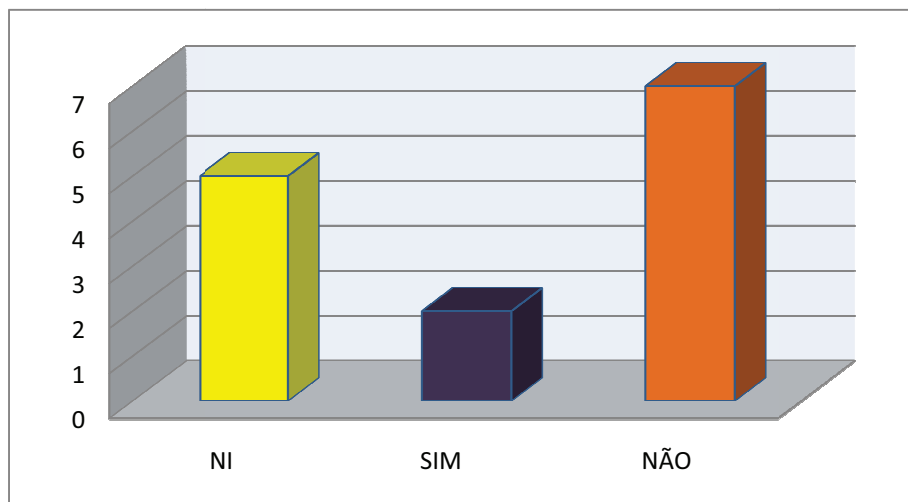
A presença de história médica familiar foi positiva para câncer de mama em cinco casos (35,7%), negativa em seis casos (42,9%) e em três casos (21,4%) o histórico não estava disponível (figura 7). Na análise de acordo com o resultado do exame anatomopatológico da peça cirúrgica, a presença da história médica familiar positiva no grupo atípico/maligno foi de 33% e no grupo benigno em 60% dos casos. Dados analisados através do teste exato de Fisher não mostrou significância com $p=0,567$.

O uso de terapia de reposição hormonal na pós menopausa estava sendo realizada em apenas dois casos (28%) no momento do diagnóstico (figura 8).



Fonte: o autor

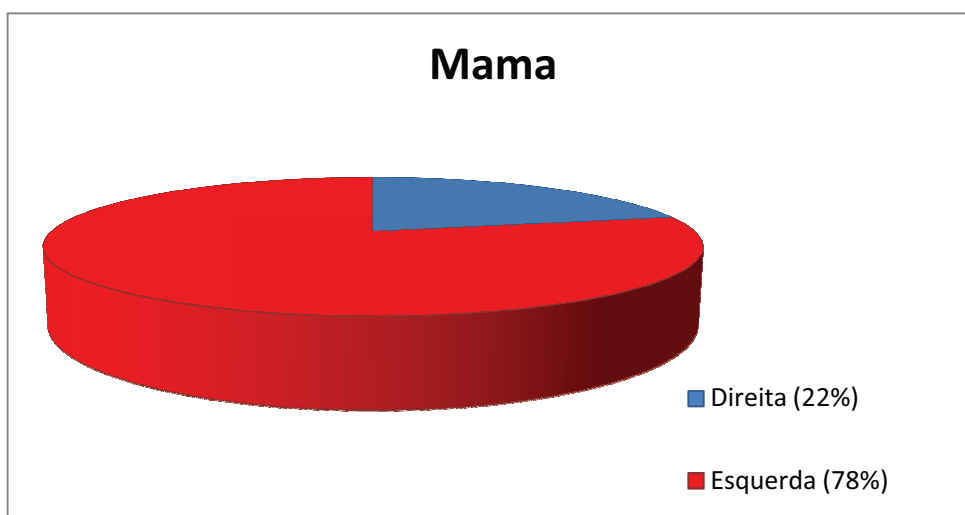
Figura 7 - Associação da história médica familiar câncer mama com as lesões papilares



Fonte: o autor

Figura 8 – Associação da terapia de reposição hormonal com as lesões papilares (Número de casos; NI – não informado; SIM – em terapia de reposição Hormonal; NÃO – sem terapia de reposição hormonal)

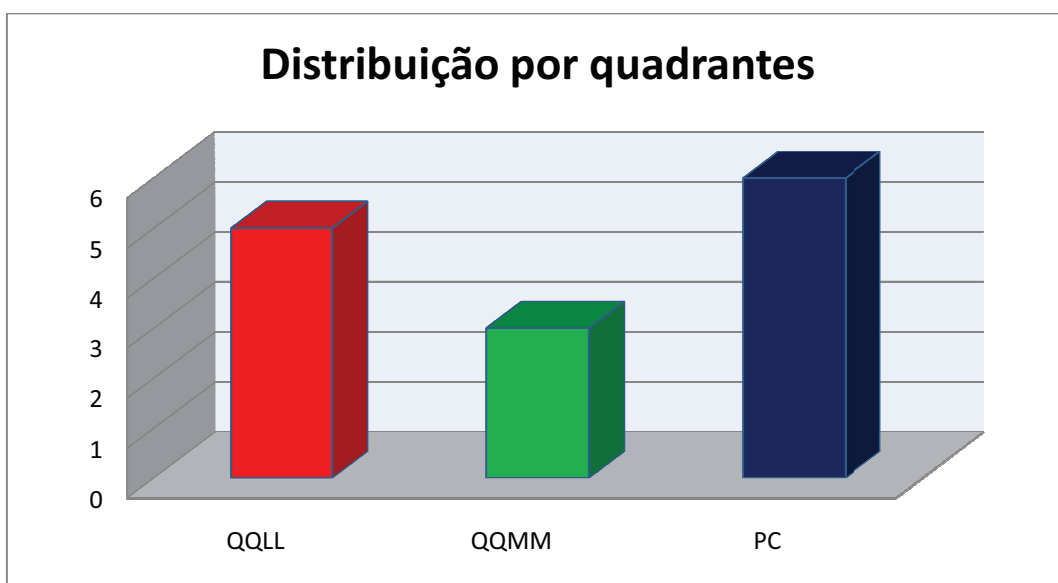
Os casos avaliados foram distribuídos, 12 (78%) estavam localizados na mama esquerda e dois (22%) na mama a direita (figura 09).



Fonte: o autor

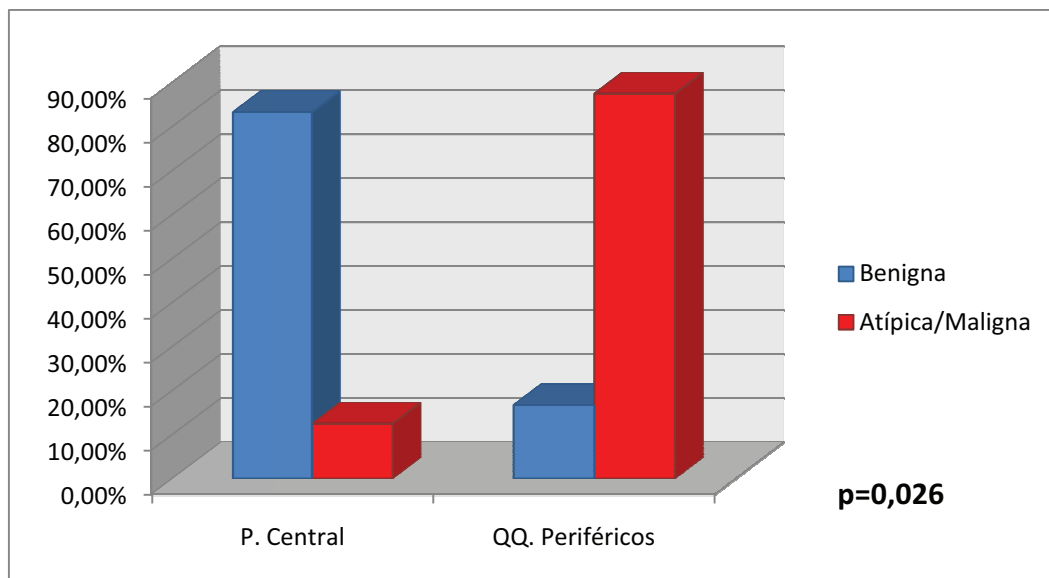
Figura 09 – Distribuição dos casos de lesão papilar biopsiadas por BAAF segundo a lateralidade da mama

A distribuição das lesões nodulares nos quadrantes mamários mostrou seis casos na porção central (42%), cinco casos em quadrantes laterais (36%) e três casos em quadrantes mediais (22%) (figura 10). As lesões centrais foram representadas na maioria pelas lesões benignas (83,3%) e as lesões periféricas pelas lesões atípicas e malignas (87,5%). A análise estatística agrupando as lesões periféricas e comparando com as da porção central, mostrou significativa relação entre as lesões papilares benignas e a localização central, e as atípicas/malignas com a localização nos quadrantes periféricos com $p=0,026$ (teste exato de Fisher) (figura 11).



Fonte: o autor

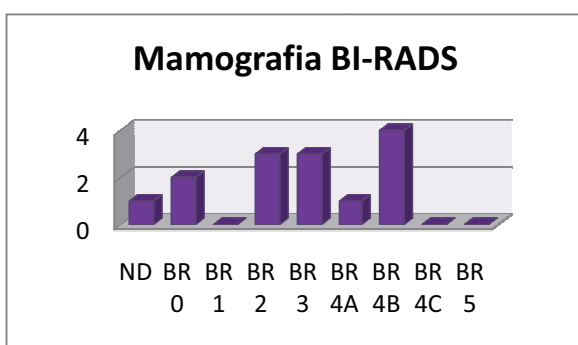
Figura 10 – Distribuição das lesões papilares nos quadrantes mamários (QQLL – quadrantes laterais; QQMM – quadrantes mediais; PC – porção central)



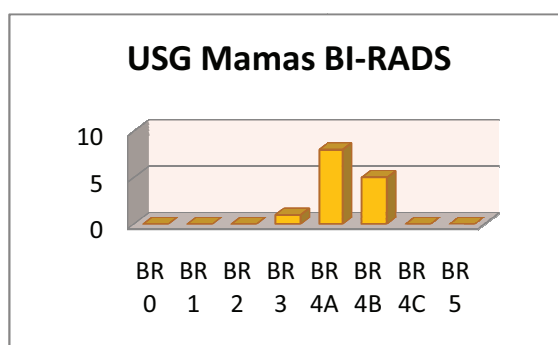
Fonte: o autor

Figura 11 – Distribuição das lesões papilares nos quadrantes mamários de acordo com o exame anatomopatológico

A avaliação por meio da mamografia apresentou suspeita para malignidade em quatro casos (35%) (figura 12), enquanto o uso da ultrassonografia mamária classificou como suspeito (classificação de BI-RADS 4A, B ou C) treze casos (93%) (figura 13).



Fonte: o autor

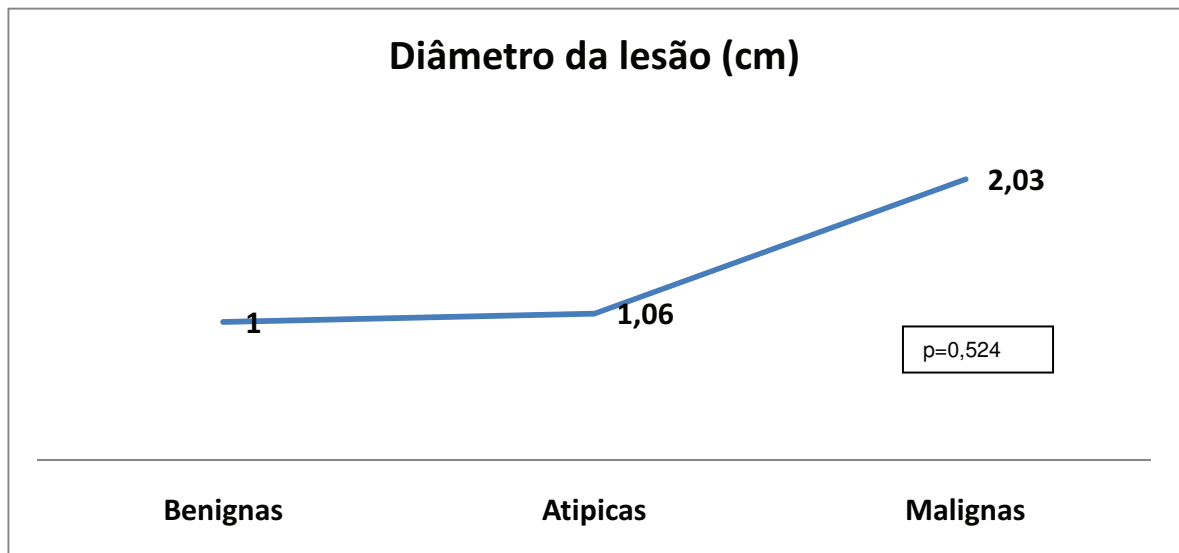


Fonte: o autor

Figura 12 – Classificação mamográfica (BI-RADS) das lesões papilares da mama (BR – classificação BI-RADS)

Figura 13 – Classificação ultrassonográfica (BI-RADS) das lesões papilares da mama (BR – classificação BI-RADS)

As lesões papilares estudadas ao exame de ultrassonografia mamária apresentaram um diâmetro médio de 1,26 cm (0,5 – 4,0 cm). As lesões benignas com diâmetro médio de 1,0 cm (0,6 – 1,8 cm), as com atípicas diâmetro médio de 1,06 cm (0,5 – 1,6 cm) e as malignas com 2,03 cm de diâmetro médio (0,8 – 4,0 cm) (figura 14). Quando agrupou-se os dados das lesões atípicas e malignas obteve-se um diâmetro médio de 1,4 cm (0,5 – 4,0 cm), que comparados com os valores das lesões benignas não houve significância estatística ($p=0,524$ – teste paramétrico de Mann-Whitney).



Fonte: o autor

Figura 14 – Diâmetro médio das lesões papilares à ultrassonografia e sua relação com o agrupamento anatomopatológico

Foi elaborada uma tabela que se encontra junto aos anexos, contemplando todos os parâmetros analisados no estudo, posicionando os dados lado a lado para possibilitar uma análise global e simultânea dos resultados encontrados, inclusive agrupando as lesões atípicas e malignas e comparando com as lesões benignas.

Na análise dos resultados dos exames ICQ as pacientes foram separadas em dois grupos de acordo com o diagnóstico anatomopatológico da peça cirúrgica após a ressecção: as lesões benignas e as lesões atípicas e malignas.

Quando se separou os resultados do Ki67 em faixas de percentagem nuclear (tabela 1) e analisou-se os resultados agrupando as lesões atípicas e malignas, comparando com lesões benignas, observou-se alta significância ($p=0,001$) com a expressão do marcador sendo maior nas lesões não benignas que foram agrupadas.

Tabela 1a – Distribuição do índice de positividade do Ki67 e os agrupamentos citopatológicos das lesões papilares

KI67 – ÍNDICE	LESÃO	
	Maligna + Atípica	Benigna
1: Até 10%	2 25%	6 100%
2: 10 a 25%	2 25%	
3: 25 a 50%	4 50%	
4: 50 a 75%		
5: 75 a 100%		
TOTAL	8	6

Tabela 1b - Resultado do Ki67 nos agrupamentos citopatológicos das lesões papilares

Ki67	Maligna/atípica	Benigna	Valor de p*
Negativo (até 10%)	2 (25%)	6 (100%)	
Positivo (> 10%)	6 (75%)		
TOTAL	8 (100%)	6 (100%)	0,01

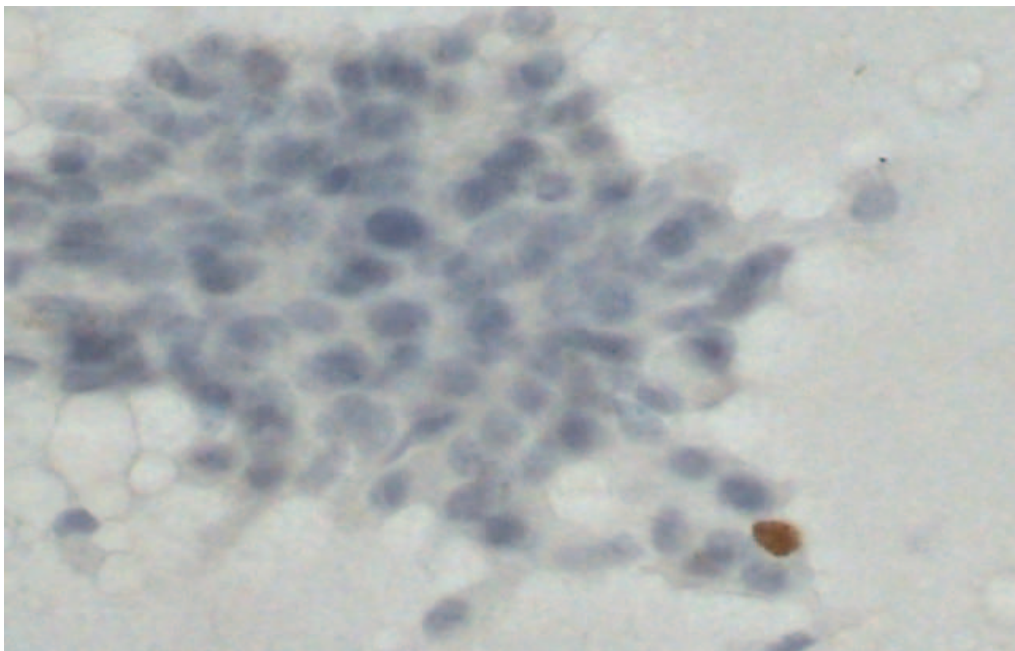
*Teste exato de Fisher

Tabela 1c – Análise estatística da positividade do Ki67 à ICQ nas lesões papilares

LESÃO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
Benigna	6	2,0	1,0	1,0	5,0	1,7	
Maligna/atípica	8	23,1	25,0	5,0	40,0	12,5	0,001

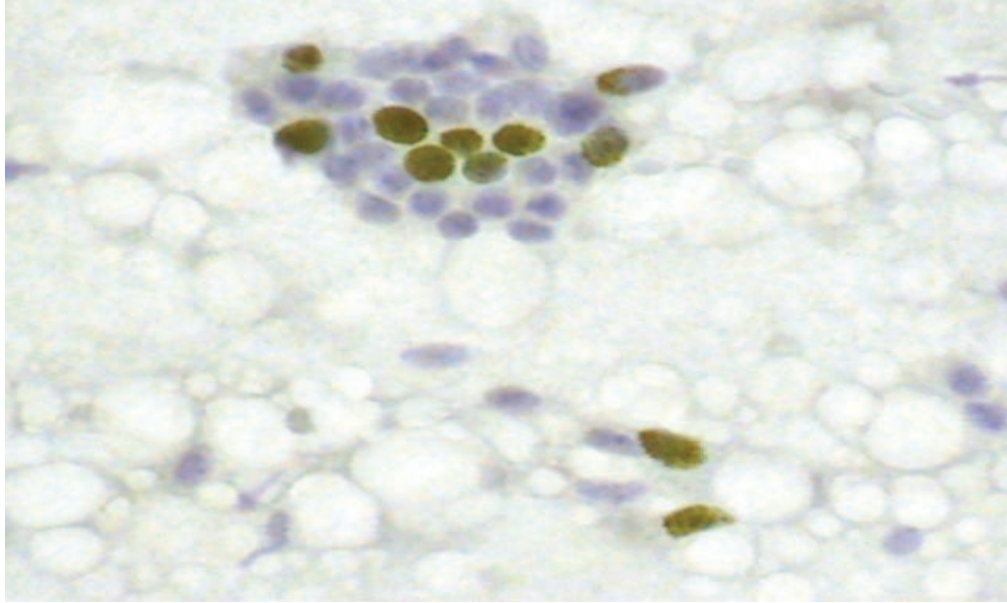
Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$

O Ki67 foi negativo em todas as lesões benignas e em dois casos (25%) do grupo com lesões atípicas e malignas (figura 15). As lesões benignas não apresentaram expressão nuclear do Ki67, detectável em mais de 10% das células e, portanto nenhum caso foi considerado como positivo segundo critério de corte empregado. No grupo de casos com atipias e malignos, seis casos (75%) mostram positividade do Ki67. Na análise isolada observou-se que 100% dos casos malignos expressam o Ki67 positivo (figura 16).



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 15 – Fotomicrografia de material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo Ki67 de lesão papilar demonstrando grupo de células com um núcleo positivo corado em castanho. Exame considerado como negativo (400x).



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 16 – Fotomicrografia de material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo Ki67 de lesão papilar demonstrando alta positividade para o marcador com vários núcleos positivos corados em castanho, padrão considerado como positivo (400x)

A sensibilidade estimada do Ki67 foi de 75% (probabilidade de resultado positivo no Ki67 dado que a lesão é maligna/atípica). A especificidade estimada do Ki67 foi de 100% (probabilidade de resultado ausente ou raro no Ki67 dado que a lesão é benigna).

A ICQ com uso de p63 para marcação de células mioepiteliais está representada nas figuras 17 e 18 quando realizada nas células isoladas e nas figuras 20 e 21 nos agrupamentos celulares. Foi avaliada expressão do marcador nos agrupamentos celulares, observando-se a distribuição entre os dois grupos estudados (benignos e atípicos + malignos) cujos resultados encontram-se relacionados na tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do p63 entre os diversos tipos de lesão ($p=0,228$) (tabela 3).

Tabela 2 – Avaliação da positividade do p63 em agrupamentos celulares das lesões papilares mamárias

P63 – CLUSTERS CELULARES	LESÃO BENIGNA	LESÃO ATÍPICA/MALIGNA
1: 0%	-	1 (12,5%)
2: 1 a 24%	-	3 (37,5%)
3: 25 a 49%	-	-
4: 50 a 74%	-	1 (12,5%)
5: > 74%	6 (100%)	3 (37,5%)
TOTAL	6	8

Tabela 3 – Avaliação da positividade do p63 em células isoladas das lesões papilares mamárias

p63 – CÉLULAS ISOLADAS							
LESÃO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p*
Benigna	6	35,0	30,0	30,0	50,0	8,4	
Atp/malg	8	24,1	20,0	1,0	75,0	25,4	0,228

* Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

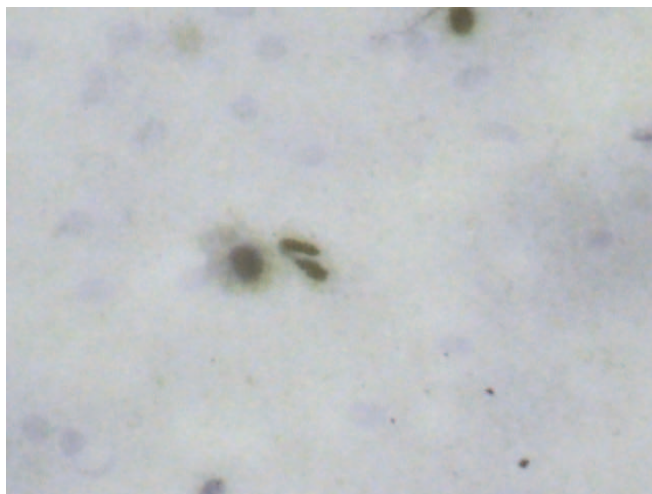
A ICQ realizada nas células isoladas e nos *clusters* celulares apresentaram o mesmo resultado. O p63 foi positivo nos seis casos das lesões benignas e em quatro (50%) dos casos, atípicos e malignos e negativos em todos os casos benignos e em quatro (50%) dos casos, atípicos e malignos. A análise de hipóteses não determinou diferenças significativas nos resultados dos dois grupos ($p=0,085$) (tabela 4).

Tabela 4 – Análise estatística da positividade do p63 em agrupamentos celulares das lesões papilares mamárias

p63 clusters	LESÃO	
	Maligna/atípica	Benigna
1+ (até 25%)	4 100,00%	0 0,00%
>1+ (>25%)	4 40,00%	6 60,00%
TOTAL	8	6

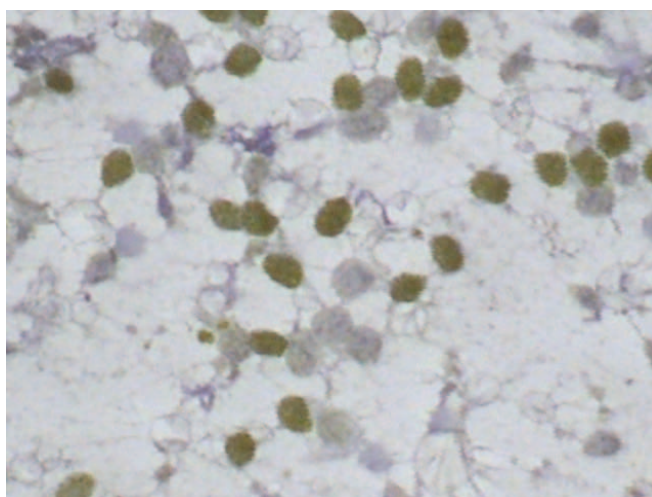
Teste exato de Fisher $p=0,085$

A sensibilidade estimada do p63: 100% (probabilidade de resultado “>1+” no p63 dado que a lesão é benigna). A especificidade estimada do p63: 50% (probabilidade de resultado “1+” no p63 dado que a lesão é maligna/atípica).



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 17 – Fotomicrografia de material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo p63 de lesão papilar demonstrando raras células isoladas coradas fortemente em castanho, considerado com negativo (400x).



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 18 – Fotomicrografia de material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo p63 de lesão papilar demonstrando grande número de células isoladas coradas fortemente em castanho, considerado como positivo (400x)

Realizou análise conjunta da ICQ do Ki67 e p63 que mostrou todos os casos benignos com Ki67 negativo e p63 positivo. Os casos atípicos e malignos

apresentaram 50% com Ki67 positivo e p63 negativo, 25% com Ki67 e p63 positivos, 25% com Ki67 negativo e p63 positivo. Nenhum caso com Ki67 e p63 negativos (tabela 5).

Tabela 5 – Análise conjunta do resultado do estudo ICQ com os marcadores Ki67 e p63 nas lesões papilares mamárias

	BENIGNA	ATIPIAS	MALIGNA	Total		BENIGNA	A + M	p.
Ki-67 (+) p63 (-)		1 (20%)	3 (100%)	4 (29%)			4 (50%)	0,25
Ki-67 (+) p63 (+)		2 (40%)		2 (14%)			2 (25%)	
Ki-67 (-) p63 (+)	6 (100%)	2 (40%)		8 (57%)		6 (100%)	2 (25%)	0,25
Ki-67 (-) p63 (-)				0 (0%)			0 (0%)	
Total	6	5	3	14		6	8	

Avaliou-se a existência de relação entre os dois marcadores e observou-se um coeficiente de correlação (r) de -0,59 e com $p=0,027$, mostrando significância na correlação inversa (pelo valor negativo de r) entre os elementos em análise. O gráfico de dispersão (figura 19) demonstra estes resultados.

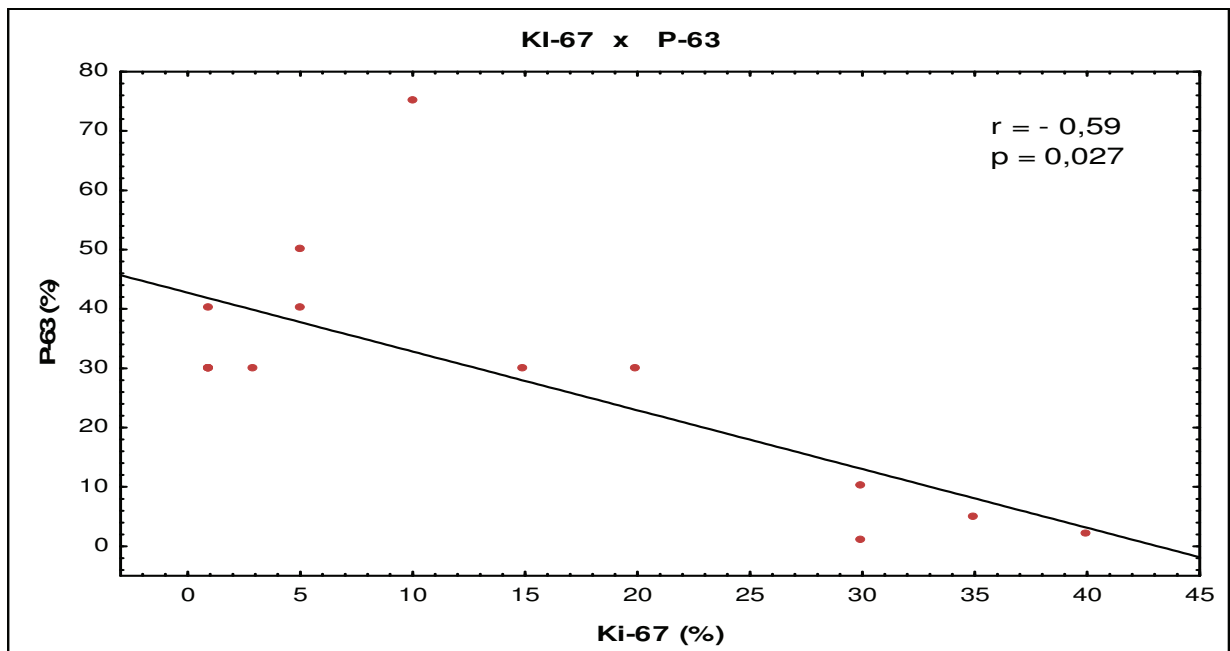
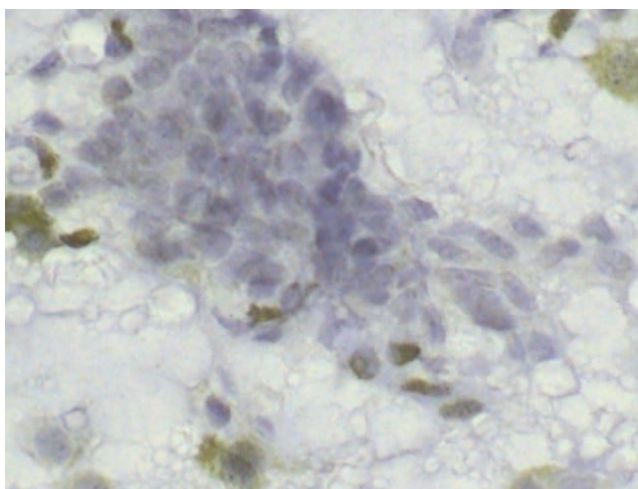


Figura 19 – Correlação inversa entre os imunomarcadores Ki67 e p63 na ICQ das lesões papilares mamárias

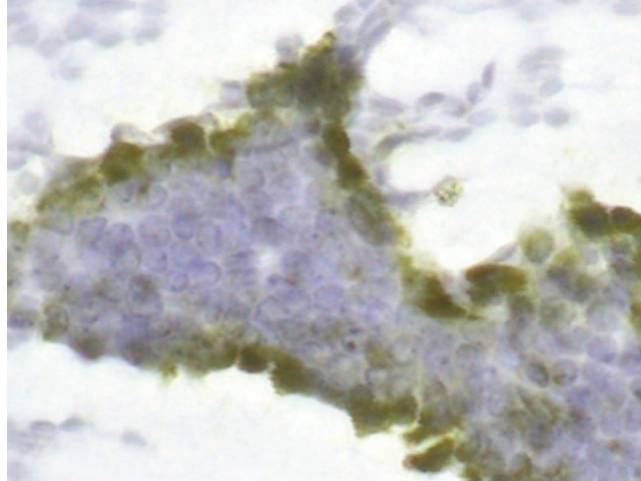
A análise dos dados demonstrou que todos os casos benignos, têm o mesmo perfil ICQ com Ki67 negativo e p63 positivo e que todos os casos malignos têm

resultado positivo em pelo menos um dos marcadores. Nenhum caso negativo nos dois marcadores foi observado. Considerando-se a associação dos dois marcadores no diagnóstico de benignidade, a sensibilidade do método, ou seja, a probabilidade de lesão benigna apresentar um perfil p63(-) e Ki67(+) está estimada em 100%. A especificidade, que avalia a probabilidade de uma lesão maligna/ atípica ter um perfil diferente deste, está estimada em 75%.



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 20 – Fotomicrografia de lesão papilar. Material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo p63 demonstrando bloco de células epiteliais ductais desprovido de positividade para células mioepiteliais, exame considerado como negativo (400x) .



Fonte: Lab. Patologia Médica

Figura 21 – Fotomicrografia de lesão papilar. Material tratado pela imunocitoquímica com anticorpo p63 demonstrando bloco de células epiteliais ductais contendo na periferia células mioepiteliais coradas fortemente em castanho, exame considerado como positivo (400x).

A sensibilidade para o diagnóstico de benignidade, considerando os dois marcadores juntos é 100% (probabilidade de p63 positivo e Ki67 negativo, dado que a lesão é benigna). A especificidade para o diagnóstico de benignidade, considerando os dois marcadores juntos é 75% (probabilidade “outros resultados”, dado que a lesão é maligna / atípica).

5 DISCUSSÃO

São grandes as dificuldades no diagnóstico pré-operatório das lesões papilares da mama, sejam por meio de BAAF ou de biópsia percutânea por agulha grossa, dificuldades estas também encontradas na biópsia transoperatória^{3,7-10,17}. Estes problemas demonstrados nos estudos que envolvem as lesões papilares mamárias levaram a busca de uma alternativa que pudesse auxiliar, para separando os casos onde a exeresse cirúrgica fosse obrigatória daquelas que poderiam ser apenas acompanhados clinicamente. Outra consideração importante é a possibilidade de transformação maligna da lesão papilar mamária durante o controle²¹.

No estudo realizado em uma população de 1774 BAAF de mama, os 32 casos encontrados representaram 1,8% das biopsias realizadas com uma incidência comparável à encontrada na maioria dos estudos que analisam lesões papilares da mama, variáveis entre 1,7% e 2,0%, embora um estudo tenha mostrado que esta incidência pode chegar até a mais do que 8%¹⁸. A incidência encontrada neste estudo está, portanto, de acordo com a média dos estudos desta doença.

A amostra estudada apresentou perda elevada de casos, em especial os exames mais antigos, que foram fixados ao ar, o que impossibilitou o estudo ICQ⁵⁹. Algumas lâminas tiveram a sua qualidade danificada pelo processo de coloração para fixação do imunomarcador, o que determinou descolamento do material, principalmente em lâminas que estavam armazenadas há mais tempo. Portanto, os 14 casos validados foram mais numerosos nos últimos anos da amostra.

Com o objetivo de avaliar os dados pesquisados os casos foram divididos em três grupos: lesões benignas (papiloma intraductal – 42,86%), lesões atípicas (lesões proliferativas com atipias e as lesões de comportamento incerto – 35,7%) e as lesões malignas (21,43%). Como estas lesões atípicas têm indicação de remoção cirúrgica¹, estes casos foram agrupados com as lesões malignas para buscar uma maior representatividade do material.

Ao se comparar as características do material com o de outros estudos, foi observada uma correlação aproximada na distribuição dos casos atípicos (33% na literatura para 35,17% no material) e dos casos malignos (17% para 21,43%), demonstrando semelhança nas amostras.^{8,19-20}

Ao se comparar a média da idade entre o grupo com resultado definitivo de lesão benigna e o grupo formado pelas lesões atípicas e malignas observou-se maior média etária no grupo atípico/maligno (48,5 e 56,5 anos), porém esta diferença das médias não mostrou significância estatística ($p=0,24$). Portanto, este dado não apresenta relevância quando observado isoladamente. A amostra em estudo apresentou faixa etária mais baixa que a relatada nas publicações, geralmente após os 50 anos, para os casos de lesões papilares da mama¹⁹⁻²⁰.

A análise da HMF para carcinoma de mama neste estudo não mostrou relação com o resultado definitivo do estudo anatomopatológico ($p >0,05$), o que corresponde ao encontrado nas revisões sobre este assunto, onde foi relatado que apenas 20 a 49% dos casos de câncer de mama apresentam história familiar desta neoplasia, ou seja, a maioria são casos isolados^{1,77}.

Foi observada a predominância das lesões em mama a esquerda (78%) e a presença de apenas dois casos (28% dos casos que informaram este dado) em uso de terapia hormonal substitutiva.

A localização da lesão na mama quando dividida em dois grupos, sendo um a porção central da mama e outro as porções periféricas. Este dado foi relacionado com o grupo de lesões benignas e o grupo de lesões atípicas/malignas. As lesões benignas estavam em 83% dos casos localizadas na porção central e apenas 12,5% das lesões atípicas/malignas diagnosticadas nesta localização. Observou-se o inverso com as lesões de distribuição periférica. Esta diferença na distribuição dos dois grupos mostrou significância estatística ($p=0,026$) e dever ser considerada no planejamento terapêutico da lesão papilar. Este resultado era esperado, pois a maioria das lesões malignas é encontrada fora da região retroareolar¹⁹.

Quando foram avaliados os resultados do diagnóstico por imagem, a mamografia detectou apenas sete dos quatorze nódulos (50%), e a ultrassonografia mamária só não visualizou um nódulo, sendo observada a lesão papilar em 93% dos exames realizados, mostrando uma maior efetividade deste exame^{13,20}. A quase totalidade dos diagnósticos (93%) foi BI-RADS quatro, semelhante com as

observações realizadas por Mulligan²⁰ e Bode²¹. O exame mamográfico mostrou-se falho na detecção das lesões papilares da mama no atual estudo.

A análise do tamanho das lesões demonstrou um diâmetro médio progressivo entre as lesões benignas, atípicas e malignas, de conformidade com as publicações que avaliaram este parâmetro^{3,25}. Foram analisadas estatisticamente, separadas em dois grupos, as benignas com diâmetro médio de 1,0 cm e as atípicas/malignas com 1,4 cm. O resultado da análise demonstrou ausência de significância estatística. Quando se observou apenas as lesões malignas esta diferença de diâmetro médio é ainda mais visível (2,03 cm).

Na busca de uma melhora na avaliação pré-operatória das lesões papilares mamárias e como método complementar ao estudo citológico convencional das BAAF realizadas, foi proposto o uso de ICQ, que com uso de marcadores imunológicos específicos, poderia auxiliar na seleção dos casos que devem ser removidos cirurgicamente e daqueles que poderiam ser apenas acompanhados.

Esta dificuldade foi presente em muitos estudos, retrospectivos na grande maioria, que buscaram soluções, utilizando este mesmo processo de ICQ, e que não conseguiram apresentar uma conclusão positiva que possibilite o acompanhamento seguro^{11,27-8,43,60,67-8,71}.

A escolha do imunomarcador foi principalmente amparada na detecção das células mioepiteliais, ausentes ou com baixa expressão nas lesões papilares malignas e sempre presente nas lesões benignas^{7,9,13,19,20,25,28,37}. Deste grupo de marcadores, optou-se pelo p63 com alta sensibilidade nesta detecção^{3,61}. Todos os estudos que utilizaram marcadores de células mioepiteliais, de maneira isolada ou associando alguns destes marcadores (p63, CD10, calponina, actina de músculo liso, P-cadherina), reforçaram que a determinação isolada das células mioepiteliais por ICQ ou IHQ não são suficientes na separação das lesões papilares benignas e malignas^{26-7,65,68-71}.

Embora exista relação que possibilite a separação entre as lesões benignas que expressam os marcadores de células mioepiteliais e lesões malignas nas quais estas células estão ausentes ou são raramente detectadas, não apresentam uma relação segura nas biopsias percutâneas pré-operatórias e o resultado no exame anatomopatológico da peça cirúrgica, tanto por problemas na expressão do

marcador de ICQ ou IHQ, como na amostra coletada que não contempla toda a lesão a ser analisada²⁶.

A aferição do p63 pode ser feita nas células isoladas e nos agrupamentos celulares e realizou-se a determinação do imunomarcador nas duas formas separadamente, que mostrou o mesmo resultado, comparável ao trabalho de Harton *et al*⁴³.

A positividade do marcador p63 é considerada como maior que 1+ (maior ou igual a 25% das células coradas pela ICQ)^{27,43,69}. Realizou-se a avaliação considerando o valor real dos dados determinados em percentagem e aplicando um teste paramétrico, não foi observada significância estatística nesta análise.

A alta sensibilidade do p63 nas lesões papilares benignas (100% na análise realizada neste estudo) não foi suficiente para separar as lesões benignas, que poderiam ser apenas acompanhadas, das atípicas/malignas, devido à baixa especificidade (de apenas 50%) do método. Exatos 50% das lesões atípicas/malignas apresentaram o mesmo resultado das lesões benignas.

Estes dados confirmaram a análise de grande parte dos trabalhos sobre punção-biópsia de lesões papilares mamárias^{26-7,65,68-71}, que afirmaram ser a marcação das células mioepiteliais por imunomarcador isoladamente insuficiente para selecionar os casos que poderiam ser apenas acompanhados, separando daqueles que necessitariam análise anatomopatológica de toda a lesão.

Para aumentar a acurácia do método de BAAF associado à ICQ na tipificação das lesões papilares mamárias, foi proposta a associação de um marcador que detectasse a proliferação epitelial da lesão; optado pelo Ki67. Com esta associação de marcadores que identificam expressões diferentes nas células das lesões papilares, busca-se uma alternativa para determinar um teste que seja capaz de diferenciar as lesões benignas daquelas de potencial maligno.

Nos resultados encontrados na determinação do Ki67 houve concordância em que todas as lesões benignas apresentaram expressão abaixo do plano de corte (10% das células marcadas pelo imunomarcador^{11,66}). Quando se analisaram os casos atípicos/malignos esta separação não foi tão clara, visto que 25% destas lesões foram negativas para o Ki67. Estes dados foram menos específicos que os encontrados por Sianesi *et al*⁶⁸, aonde apenas 6,7% das lesões malignas não apresentavam positividade para este marcador. Apenas salienta-se que no material

de Sianesi não havia casos atípicos, todos eram representados por carcinoma invasor.

Quando foram tabulados os dados da expressão do Ki67 nas lâminas em estudo utilizando os números proporcionais absolutos das células positivas, esta diferença de expressão entre as lesões benignas e as atípicas / malignas mostrou alta significância estatística, o que demonstrou a aplicabilidade do método. Estes dados foram idênticos aos obtidos por Midulla *et al* (2002)⁶⁷.

O Ki67 nas lesões papilares mamárias mostrou sensibilidade de 75% e especificidade de 100%, dados que embora provocadores, não possibilitaram segura separação entre as lesões benignas e atípicas/malignas para fins de conduta definitiva.

Os dados de p63 e Ki67 encontrados neste material reforçaram a afirmação da grande parcela dos autores, de que uso de marcadores isolados não são suficientemente seletivos para separar as lesões benignas das malignas e das com atipias (lesões proliferativas mamárias com atipias)^{26-7,68-70,72}.

Mesmo utilizando painéis de ICQ nas BAAF's e de IHQ nas biópsias de agulha grossa pré-operatórias, não existe consenso sobre a determinação da conduta em realizar ou não a exérese cirúrgica de toda a lesão para um adequado estudo anatomopatológico^{9-11,18,21,27-37,45,48,52-5,60-1,65-71,76}. Devido a esta dificuldade é que foi proposto este estudo, com associação ainda não relatada na literatura, sendo utilizado p63 e Ki67 em BAAF de lesões papilares da mama.

O perfil ICQ das lesões benignas apresentou em 100% dos casos positividade para p63 e negatividade na expressão do Ki67, e as lesões comprovadamente malignas nos anatomopatológicos da peça cirúrgica demonstraram uma relação também de 100% com a ICQ com p63 negativo e Ki67 positivo. Esta associação de forma inversa com os marcadores em estudo, em que quanto maior a expressão do p63 menor a do Ki67 e vice-versa, foi analisada em estudo estatístico de correlação o qual demonstrou significância estatística.

A dificuldade na interpretação dos dados foi presente nas lesões atípicas ou de comportamento incerto que fazem parte do material em estudo. Destas lesões 40% apresentaram o mesmo perfil das lesões benignas (p63 positivo e Ki67 negativo), e quando foram agrupadas as lesões atípicas com as malignas o índice reduziu para 25%.

Na análise dos resultados, a associação do p63 com o Ki67 na BAAF das lesões papilares mamárias mostraram sensibilidade de 100% para as lesões malignas, mas especificidade de 75%. Quando se analisou a sensibilidade para o diagnóstico das lesões benignas, usando esta mesma associação de imunomarcadores, esta é de 100%, mas com especificidade de 75%.

Quando se transferiram as informações obtidas no estudo para o contexto clínico apresentaram-se dificuldades. Observou-se que o perfil p63(+) e Ki67(-) continha todos os casos benignos, mas também 25% das lesões do grupo atípico/maligno (e 40% das lesões atípicas ou de comportamento incerto), e portanto ao propor-se tratamento conservador estas lesões de comportamento incerto não seriam ressecadas.

Avaliaram-se outros parâmetros do estudo e não foram encontrados, nestes casos de lesões atípicas com perfil ICQ igual ao dos casos benignos, diferenças que permitissem selecionar estes pacientes das demais portadoras de lesões benignas quanto à idade, história médica familiar para câncer de mama, BI-RADS na mamografia e ultrassonografia mamária, localização em quadrantes centrais ou periféricos.

Quando se avaliou o auxílio da ICQ na conduta das lesões papilares mamárias diagnosticadas por BAAF, observou-se que ao propor ação apropriada para as lesões com perfil maligno estar-se-ia tratando de maneira exagerada estas pacientes em 25% dos casos, representadas por lesões atípicas ou com comportamento incerto, que receberiam tratamento para neoplasia mamária maligna. Optando-se apenas por acompanhar aquelas que apresentaram perfil benigno à ICQ, deixar-se-ia de tratar 40% das portadoras de lesões atípicas ou de comportamento incerto, as quais seriam melhor conduzidas por ressecção completa da lesão^{10,37,52,56,64,72}.

Portanto os casos com perfil ICQ em BAAF de lesões papilares com Ki67(-) e p63(+) poderiam ser acompanhados rigorosamente com avaliação clínica e exames de imagem, mas apenas em situações especiais e com a concordância expressa das pacientes.

Quando da abordagem cirúrgica, portadoras de perfil Ki67(+) e p63(-) devem ser consideradas como provavelmente malignas e abordadas com rigorosos critérios

oncológicos. As demais pacientes com outras associações de Ki67 e p63 podem ser submetidas à exereses simples dos nódulos por não incluírem as lesões malignas.

Embora o perfil ICQ com Ki67 e p63 nas BAAF's das lesões papilares mamárias auxilie na orientação terapêutica destas pacientes, elas seriam melhor avaliadas com a remoção cirúrgica para que seja evitado prejuízo no tratamento necessário.

Devido ao pequeno número de casos incluídos neste estudo (14 casos), novos ensaios precisam ser realizados com maior número de lesões para buscar uma representatividade estatística que possibilite a avaliação segura do método.

6 CONCLUSÕES

Pelo presente estudo podemos concluir:

1. As lesões com diagnóstico benigno foram mais numerosas na porção central da mama, as lesões com diagnóstico atípico/maligno foram encontradas em maior número nos quadrantes periféricos da mama. A ultrassonografia mostrou-se mais efetiva para identificar as lesões papilares mamárias que a mamografia.
2. A análise do estudo ICQ dos materiais de lesões papilares mamárias com os imunomarcadores Ki67 e p63 apresentou sensibilidade 100% na identificação das lesões malignas e benignas e especificidade de 75% para estas mesmas lesões.
O uso combinado destes marcadores em BAAF de lesão papilar mamária auxilia na orientação terapêutica desta doença, mas novos estudos incluindo um maior número de casos devem ser realizados para melhor avaliar este método.

REFERÊNCIAS

1. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K et al. Benign breast diseases and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(3):229-37.
2. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med.* 1985; 312(3):146-51.
3. Rosen PP. Papilloma and related benign tumors. In: Rosen PP. *Rosen's breast pathology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2009; p.85-136.
4. Ellis IO, Pinder SE, Lee AS, Elston CS. Tumors of the breast. In: Fletcher CM. *Diagnostic histopathology of tumors.* 5th ed. London: Churchill Livingstone. 2000; p.878-99.
5. Zervoudis S, Iatrakis G, Economides P, Polyzos D, Navrozoglou I. Nipple discharge screening. *Womens Health (Lond Engl).* 2010; 6(1):135-51.
6. Ganesan S, Karthik G, Joshi M, Damodaran V. Ultrasound spectrum in intraductal papillary neoplasms of breast. *Br J Radiol.* 2006; 79(946):843-9.
7. Collins LC, Schnitt SJ. Papillary lesions of the breast: selected diagnostic and management issues. *Histopathology.* 2008; 52(1):20-9.
8. Hungermann D, Decker T, Bürger H, Kersting C, Böcker W. Papillary tumors of the breast. *Pathologe.* 2006; 27(5):350-7.
9. Skandarajah AR, Field L, Yuen Larn Mou A, Buchanan M, Evans J, Hart S, et al. Benign papilloma on core biopsy requires surgical excision. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(8):2272-7.

10. Kil WH, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Yang JH. Is surgical excision necessary in benign papillary lesions initially diagnosed at core biopsy? *Breast*. 2008; 17(3):258-62.
11. Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, Manotti L, Savoldi L, Camisa R, et al. Fine-needle aspiration technique for the concurrent immunocytochemical evaluation of multiple biologic parameters in primary breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 32(2):221-8.
12. Lunedo SN. Imunocitoquímica e imunohistoquímica para o diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007. Internet. Disponível: <http://hdl.handle.net/1884/16032>. Acesso em: 23 set 2009.
13. Warren JC. The surgeon and the pathologist. *JAMA*. 1905; 45(3):149-65.
14. Ibarra JA. Papillary lesions of the breast. *Breast J*. 2006; 12(3):237-51.
15. Haagensen CD, Stout AP, Phillips JS. The papillary neoplasms of the breast. *Ann Surg*. 1951; 133(1):18-36.
16. Kraus FT, Neubecker RD. The differential diagnosis of papillary tumors of the breast. *Cancer*. 1962; 15:444-55.
17. Muttarak M, Lerttumnongtum P, Chaiwun B, Peh WCG. Spectrum of papillary lesions of the breast: clinical, imaging and pathological correlation. *AJR Am J Roentgenol*. 2008; 191(3):700-7.
18. Rizzo M, Lund MJ, Oprea G, Schniederjan M, Wood WC, Mosunjac M. Surgical follow-up and clinical presentation of 142 breast papillary lesions diagnosed by ultrasound-guided core-needle biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15(4):1040-7.
19. Ueng SH, Mezzetti T, Tavassoli FA. Papillary neoplasms of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133(6):893-907.
20. Mulligan AM, O'Malley FP. Papillary lesions of the breast, a review. *Adv Anatol Pathol*. 2007; 14(2):108-19.

21. Bode MK, Rissanen T, Apaja-Sarkkinen M. Ultrasonography-guided core needle biopsy in differential diagnosis of papillary breast tumors. *Acta Radiol.* 2009; 50(7):722-9.
22. Adrada B, Arribas E, Gilcrease M, Yang WT. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: mammographic, sonographic and MRI features. *ARJ Am J Roentgenol.* 2009; 193(1):W58-63.
23. Lam WW, Chu WC, Tang AP, Tse G, Ma TK. Role of radiologic features in the management of papillary lesions of the breast. *ARJ Am J Roentgenol.* 2006; 186(5):1322-7.
24. Calderaro J, Espie M, Duclos J, Giachetti S, Wehrer D, Sandid W, et al. Breast intracystic papillary carcinoma: an update. *Breast J.* 2009; 15(6):639-44.
25. McGrogan G, Moinfar F, Raju U. Intraductal papillary neoplasms. In: Travassoli FA, Devilee P editors: *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* Lyon: IARC Press; 2003. p.76-80.
26. Hill CB, Yeh IT. Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(1):36-44.
27. Moritani S, Ichihara S, Kushima R, Okabe H, Bamba M, Kobayashi TK, et al. Myoepithelial cells in solid variant in solid of intraductal papillary carcinoma of the breast: a potential diagnostic pitfall and a proposal of an immunohistochemical panel in the differential diagnosis with intraductal papilloma with usual hyperplasia. *Virchows Arch.* 2007; 450(5):539-47.
28. Stefanou D, Batistatou A, Nonni A, Arkoumani E, Agnantis NJ. p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol.* 2004; 19(2):465-71.
29. Gore CR, Panicker NK, Karve PP. A cytological and histomorphological case study of an uncommon breast carcinoma: invasive papillary type. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009; 52(3):411-3.
30. Valdes EK, Tartter PI, Genelus-Dominique E, Guilbault D-A, Rosembaum-Smith S, Estrabrook A. Significance of papillary lesions at percutaneous breast biopsy. *Ann Surg Oncol.* 2006; 13(4):480-2.

31. Ahmadiyeh N, Stoleru MA, Raza S, Lester SC, Golshan M. Management of intraductal papillomas of the breast: an analysis of 129 cases and their outcome. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16(8):2264-9.
32. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies: to excise or not to excise? *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(9):1095-110.
33. Bernik SF, Troob S, Yin BL, Simpson SA, Axelrod DM, Siegel B, et al. Papillary lesions of the breast diagnosed by core needle biopsy: 71 cases with surgical follow-up. *Am J Surg*. 2009; 197(4):473-8.
34. Sakr R, Rouzier R, Salem C, Antoine M, Chopier J, Darai E, et al. Risk of breast cancer associated with papilloma. *Eur J Surg Oncol*. 2008; 34(12):1304-8.
35. Zografos GC, Zagouri F, Sergentanis TN, Nonni A, Michalopoulos NV, Kontogianni P, et al. Diagnosing papillary lesions using vacuum-assisted breast biopsy: should conservative or surgical management follow? *Onkologie*. 2008; 31(12):653-6.
36. Carder PJ, Garvican J, Haigh I, Liston JC. Needle core biopsy can reliably distinguish between benign and malignant papillary lesions of the breast. *Histopathology*. 2005; 46(3):320-7.
37. Ashkenazi I, Ferrer K, Sekosan M, Marcus E, Bork J, Aiti T, et al. Papillary lesions of the breast discovered in percutaneous large core and vacuum-assisted biopsy: reliability of clinical and pathological parameters in identifying benign lesions. *Am J Surg*. 2007; 194(2):183-8.
38. Jung SY, Kang HS, Kwon Y, Min SY, Kim EA, Ko KL. Risk factors of malignancy in benign papillomas of the breast on core biopsy needle biopsy. *World J Surg*. 2010; 34(2):261-5.
39. Martin HE, Ellis EB. Biopsy of needle puncture and aspiration. *Ann Surg*. 1930; 92(2):169-181.
40. Stewart FW. The diagnosis of tumors by aspiration. *Am J Pathol*. 1933; 9:801-13.

41. Masood S. Introduction of fine needle aspiration biopsy. In: *Cytopathology of the breast*. Chicago: American Society of Clinical Pathologist; 1996. P.1-10.
42. Franzen S, Zajicek J. Aspiration biopsy in diagnosis of palpable lesions of the breast. Critical review of 3479 consecutive biopsies. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 1968; 7(4):241-62.
43. Harton AM, Wang HH, Schnitt SJ, Jacobs T. p63 Immunocytochemistry improves accuracy of diagnosis with fine-needle aspiration of the breast. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128(1):80-5.
44. Johnson NB, Collins LC. Update on percutaneous needle biopsy of nonmalignant breast lesions. *Adv Anat Pathol*. 2009; 16(4):183-95.
45. Haji BE, Das DK, Al-Ayadhy B, Pathan SK, George SG, Mallik MK, et al. Fine-needle aspiration cytologic features of four special types of breast cancer: mucinous, medullary, apocrine and papillary. *Diagn Cytopathol*. 2007; 35(7):408-16.
46. Abati A. Uniform approach to breast aspirates: the quest becomes reality. *Diagn Cytopathol*. 1996; 15(1):vii-viii.
47. Tse GM, Ma TK, Lui PC, Ng DC, Yu AM, Vong JS, et al. Fine needle aspiration cytology of papillary lesions of the breast: how accurate is the diagnosis? *J Clin Pathol*. 2008; 61(8):945-9. (Abstract).
48. Field A, Mak A. The fine needle aspiration biopsy diagnostic criteria of proliferative breast lesions: a retrospective statistical analysis of criteria for papillomas and radial scar lesions. *Diagn Cytopathol* 2007; 35(7):386-97.
49. Gomez-Aracil V, Mayayo E, Azua J, Arraiza A. Papillary neoplasms of the breast: clues in fine needle aspiration cytology. *Cytopathology*. 2002; 13(1):22-30.
50. Dawson AE, Multford DK. Benign versus malignant papillary neoplasms of the breast. Diagnostic clues in fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol*. 1994; 38(1):23-8.

51. Gendler LS, Feldeman SM, Balassanian R, Riker MA, Frencher SK, Whelan DB, et al. Association of breast cancer with papillary lesions identified at percutaneous image-guided breast biopsy. *Am J Surg*. 2004; 188(4):365-70.
52. Masood S, Loya A, Khalbuss W. Is core needle biopsy superior to fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of papillary breast lesions? *Diagn Cytopathol*. 2003; 28(6):329-34.
53. Cheng TY, Chen CM, Lee MY, Lin KJ, Hung CF, Yang PS, et al. Risk factors associated with conversion from nonmalignant to malignant diagnosis after surgical excision of breast papillary lesions. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16(12):3375-9.
54. Sohn V, Keylock J, Arthurs Z, Wilson A, Herbert G, Perry J, et al. Breast papillomas in the era of percutaneous needle biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14(10):2979-84.
55. Jayaram G, Elsayed EM, Yaccob RB. Papillary breast lesions diagnosed on cytology. Profile 65 cases. *Acta Cytol*. 2007; 51(1):3-8.
56. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol*. 1942; 45:159-70.
57. Myers JD. Development and application of immunocytochemical staining techniques: a review. *Diagn Cytopathol*. 1989; 5(3):318-30.
58. Nordgård S, Bofin A, Hagmar B. Ki-67 antigen detection in unstained and destained cytologic samples. *Anal Quant Cytol Histol*. 2002; 24(4):198-204.
59. Di F, Wong NL. Role of immunocytochemistry in fine needle aspiration cytology diagnosis of mammary lesions of breast. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2006; 35(12):738-43. (Abstract).
60. Bishop PW. An immunohistochemical vade mecum, South Manchester, UK, 2009, Internet. Disponível: http://www.e-immunohistochemistry.info/web/histopathology_help.htm. Acesso em: 14 jul 2009.

61. Khan QJ, Kimler BF, Clark J, Metheny T, Zalles CM, Fabian CJ. Ki-67 expression in benign breast ductal cells obtained by random periareolar fine needle aspiration. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(9):2278-9.
62. Sianesi M, Bozzetti C, Del Rio P, Nizzoli R, Cascinu S. Primary breast carcinoma: immunocytochemical and immunohistochemical evaluation of biological parameters. *Chir Ital.* 2000; 52(6):643-5.
63. Confortini M, Carozzi F, Bozzola L, Miccinesi G, Mirri F, Mottolise M, et al. Interlaboratory reproducibility of the immunocytochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors and proliferative activity in fine needle aspiration of breast cancer. *Cytopathology.* 2002; 13(2):92-100.
64. Douglas-Jones A, Saha V, Morgan J, Dallimore N, Rashid M. Observer variability in the histopathological reporting of core biopsy of papillary breast lesions is reduced by the use of immunohistochemistry for CK5/6, calponin and p63. *Histopathology.* 2005; 47(2):202-8.
65. Leal C, Costa I, Fonseca D, Lopes P, Bento M-J, Lopes C. Intracystic (encysted) papillary carcinoma of the Breast: a clinical, pathological and immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1998; 29(10):1097-104.
66. Midulla C, Pisani T, De Iorio P, Cenci M, Divizia E, Noforni I, et al. Cytological analysis and immunocytochemical expression of Ki67 and Bcl-2 in breast proliferative lesions. *Anticancer Res.* 2002; 22(2B):1341-5.
67. Shah VI, Flowers CI, Douglas-Jones AG, Dallimore NS, Rashid M. Immunohistochemistry increases the accuracy of diagnosis of benign papillary lesions in breast core needle biopsy specimens. *Histopathology.* 2006; 48(6):683-91.
68. Troxell ML, Masek M, Sibley RK. Immunohistochemical staining of papillary breast lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007; 15(2):145-53.
69. Moriya T, Kasajima A, Ishida K, Kariya Y, Akahira J-I, Endoh M, et al. New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions. *Med Mol Morphol.* 2006; 39(1):8-13.
70. De Moraes Schenka NG, Schenka AA, De Souza Queiroz L, De Almeida Matura M, Vassalo J, Alvarenga M. Use of p63 and CD10 in the differential diagnosis of papillary neoplasms of the breast. *Breast J.* 2008; 14(1):68-75.

71. Tse GM, Tan PH, Lacambra MD, Jara-Lazaro AR, Chan SK, Lui PC, et al. Papillary lesions of the breast – accuracy of core biopsy. *Histopathology*. 2010; 56(4):481-8.
72. American College of Radiologic. Breast Image Reporting and Data System (BI-RADS). Reston, VA: ACR, 2003.
73. The uniform approach to breast fine-needle aspiration biopsy. NIH Consensus Development Conference. *Am J Surg*. 1997; 174(4):371-85.
74. Fetsch PA, Abati A. Immunocytochemistry in effusion cytology. A contemporary review. *Cancer*. 2001; 93(5):293-308.
75. Derossi DR, Ito K, Couto Filho JO, Bacchi CE. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em Biópsia aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(3):229-35.
76. Newman B, Mu H, Butler LM, Milikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of american women. *JAMA*. 1998; 279(12):915-21.
77. Simsir A, Waisman J, Thorner K, Cangiarella J. Mammary lesions diagnosed as “papillary” by aspiration biopsy: 70 cases with follow-up. *Cancer* 2003; 99(3):156-65.

Normas adotadas e base de dados consultados.

1. Normas adotadas
 - a. Normativa de Vancouver
 - b. Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 14.724).

2. Base de dados consultados
 - a. MEDLINE
 - b. SicELO
 - c. Biblioteca Cochrane.

3. Ferramentas de consulta empregadas
 - a. BIREME (Biblioteca Virtual em Saúde, Organização Pan-americana da Saúde)
 - b. Portal da CAPES (Portal Brasileiro da Informação Científica, Ministério da Educação do Brasil)
 - c. PubMed (United State National Library of Medicine, National Institute of Health)
 - d. Google (www.google.com.br).

4. Dicionários consultados
 - a. Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, quinta edição, 2009 (disponível em <http://www.academia.org.br/abl>)
 - b. Dicionário Houaiss de língua portuguesa, versão *online* (disponível em <http://houaiss.uol.com.br>)
 - c. Acordo ortográfico da língua portuguesa, 2008 (disponível em <http://www.academia.org.br/abl>).

ANEXOS

Anexo 1 – Dados epidemiológicos e morfológicos dos casos em estudo

		BENIGNA	ATIPIAS	MALIGNA	Total (100%)	p.	BENIGNA	A + M	p.
Idade (anos)	(mediana)	50	48	59			50	55	
	(média)	48,5	54,4	59,6			48,5	56,3	0,240
HMF CA mama	sim	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	5		3 (60%)	2 (40%)	
	não	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,6%)	6		2 (33,3%)	4 (66,6%)	
	NI	1	1	1	3		1	2	0,567
TH reposição	sim	0	0	2	2		0	2	
	não	4 (57,2%)	3 (42,8%)	0	7		7	0	
	NI	2	2	1	5		2	3	
Quadrantes	central	5 (83,3%)	1 (16,6%)	0	6		5 (83,3%)	1 (16,6)	
	periféricos	1 (12,5%)	4 (50%)	3 (37,5%)	8		1 (12,5%)	7 (87,5%)	0,026
Mamografia	BI-RADS 0	0	1	1	2		0	2	
	BI-RADS 1-3	3	3	0	6		3	3	
	BI-RADS 4	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	5		2 (40%)	3 (60%)	
USG mamária	BI-RADS 1-3	1	0	0	1		1	0	
	BI-RADS 4A	3 (37,5%)	4 (50%)	1 (12,5%)	8		3 (37,5%)	5 (62,5%)	
	BI-RADS 4B	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	5		2 (40%)	3 (60%)	
Diametro lesão	(média) cm	1	1,06	2,03			1	1,42	0,524



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003492/09**

Protocolo CEP Nº **5372**

Título do projeto **"AVALIAÇÃO DO AUXÍLIO DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DAS LESÕES PAPILARES DE MAMA EM PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA"**

Grupo
Versão **1**

Protocolo CONEP **4630.0.000.084-09**

Pesquisador responsável **FABIO POSTIGLIONE MANSANI**

Instituição **Outros (Instituições externas à PUCPR)**

Objetivos

Análise de lâminas de banco citopatológico com diagnóstico citológico de lesões /tumores papilares da mama, comparando a técnica da punção aspirativa com agulha fina (PAAF) pré-operatórias com a análise anatomicopatológica do material removido cirurgicamente complementadas através de estudo imunocitoquímico (ICQ) pelos marcadores Ki67 e p53.

Objetivo específico:

Verificar a concordância no diagnóstico entre os dois materiais, medindo a sensibilidade e especificidade desse método (PAAF), e assim determinando a acurácia dos marcadores utilizados na imunohistoquímica no diagnóstico diferencial e na orientação da conduta das lesões / tumores papilares da mama.

Comentários e considerações

Estudo de relevância no sentido de diminuir os casos tratados cirurgicamente de forma desnecessária, aumentando-se a acurácia de um diagnóstico de malignidade em neoplasias mamárias. Estudo retrospectivo com revisão em materiais de banco de tumores de mama do laboratório Patologia Médica, localizado em Ponta Grossa (PR). O período analisado será de janeiro de 2003 a setembro de 2009. Instrução completa do processo.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

Presença de TCUD assinado pelo pesquisador Fabio Postiglione Mansani com análise do material armazenado de janeiro de 2003 a setembro de 2009.

Conclusões

Aprovado sob o quesito ético.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **04/11/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.



CERTIFICADO



20 a 23 de junho de 2010
Gran Marquise Hotel
Fortaleza - CE



Certificamos que o trabalho


AVALIAÇÃO DO USO DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DAS LESÕES PAPILARES DE MAMA EM PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA.


foi apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Citopatologia
na forma de APRESENTAÇÃO ORAL, tendo como autor(es):


**FABIO POSTIGLIONE MANSANI; MARIO RODRIGUES MONTEMOR NETTO; LUIZ
MARTINS COLLACO**

Fortaleza, 23 de junho de 2010.




Dra. Estefânia Mota Araripe Pereira
Presidente do Congresso


Dr. Lázaro Marcos de Medeiros
Presidente de Honra do Congresso


Dr. Luís Martins Collaço
Presidente da SBC



CERTIFICADO



XXI
CONGRESSO BRASILEIRO
DE CITOPATOLOGIA
20 a 23 de junho de 2010
Gran Marquise Hotel
Fortaleza - CE

Certificamos que o trabalho

AVALIAÇÃO DO USO DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DAS
LESÕES PAPILARES DE MAMA EM PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA
FINA.

tendo como autor(es):

FABIO POSTIGLIONE MANSANI; MARIO RODRIGUES MONTEOM NETTO; LUIZ MARTINS
COLLAÇO

foi apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Citopatologia realizado em Fortaleza de 20 a 23 de junho de 2010 na forma de Trabalho Científico - ORAL, classificando-se em **1º lugar**

Fortaleza, 23 de junho de 2010.



Dra. Estefânia Mota Araripe Pereira
Presidente do Congresso

Dr. Lázaro Marcos de Medeiros
Presidente de Honra do Congresso

Dr. Luís Martins Collaço
Presidente da SBC



SBC - Cap. Ceará



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

Rua Dois de Dezembro, 78/909 Catete
Rio de Janeiro RJ Brasil
CE P 22220-040

Rio de Janeiro, quinta-feira, 15 de julho de 2010

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) Fabio Postiglione Mansani

Referente ao código de fluxo: 375
Classificação: Artigo Original

Informamos que recebemos o manuscrito Avaliação da Imunocitoquímica com Ki-67 e p63 nas Lesões Papilares de Mama em Biópsia Aspirativa por Agulha Fina. será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

O (s) autor (es) declara(m) que o presente trabalho é original, sendo que o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, brasileiro ou do Exterior, seja no formato impresso ou eletrônico.

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

Atenciosamente,

Adagmar Andriolo
Editor

ANTONIO LUIZ ALMADA HORTA - Citopatologia
Editor