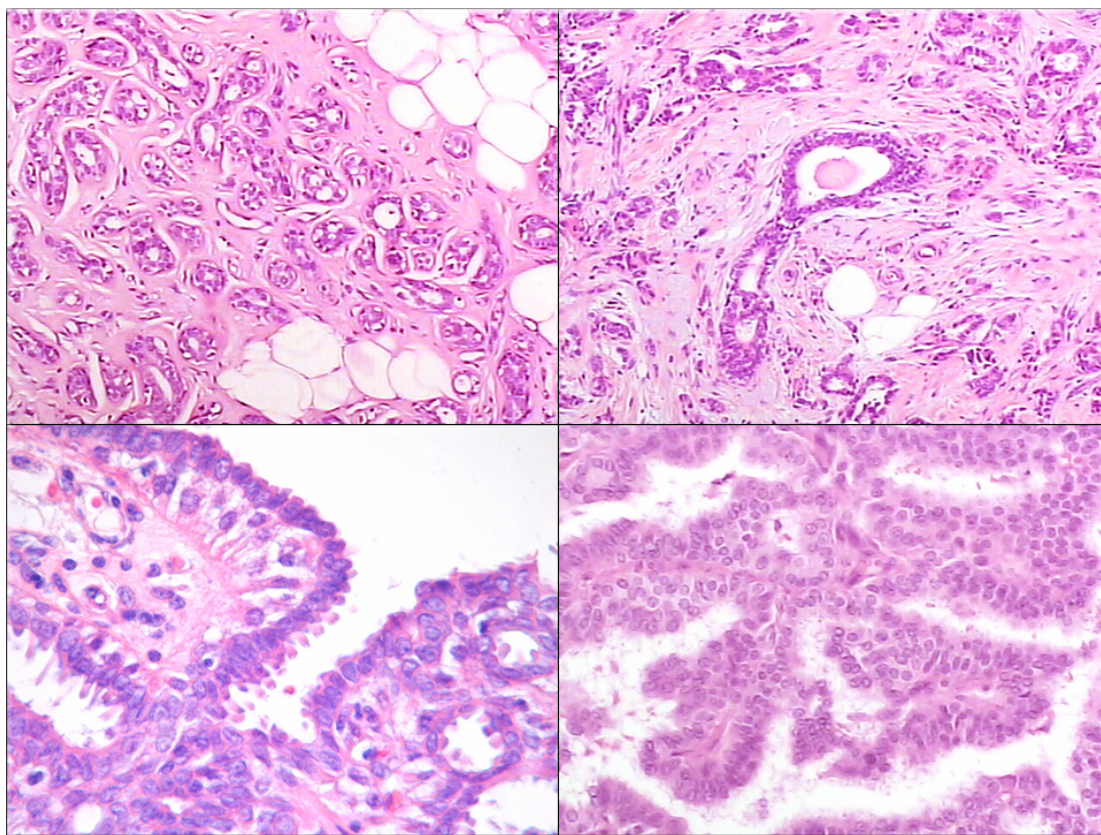


NATÁLIA GUIMARÃES DE MORAES SCHENKA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CÉLULAS
MIOEPITELIAIS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DA MAMA**



CAMPINAS

2006

NATÁLIA GUIMARÃES DE MORAES SCHENKA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CÉLULAS
MIOEPITELIAIS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DA MAMA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, Área de Concentração Anatomia
Patológica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

CAMPINAS

2006

IDADE 80
CHAMADA TI UNICAMP
Sch 27a

EX
MBO BC/ 70547
DC 16-123-06
D X
ECO 11/10
FA 08/11/06

418 ID: 390 932

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sc27a Schenka, Natália Guimarães de Moraes
Avaliação imunoistoquímica de células mioepiteliais no diagnóstico diferencial de lesões benignas e malignas da mama / Natália Guimarães de Moraes Schenka. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Vassallo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma papilar. 2. Papiloma. 3. Mama. 4. Adenose esclerosante. 5. Células mioepiteliais. 6. Imunohistoquímica. 7. Tubular Carcinoma. 8. CD10. I. Vassallo, José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : "Immunohistochemical assessment of myoepithelial cells in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the breast"

Keywords: • Papillary neoplasms
• Papilloma
• Breast
• Sclerosing Adenosis
• Myoepithelial cells
• Immunohistochemistry
• Tubular Carcinoma
• CD10

Área de concentração : Anatomia Patológica
Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Prof Dr José Vassallo
Prof Dr Fernando Augusto Soares
Prof Dr Alfredo Ribeiro da Silva
Prof Dr Luiz Carlos Zeferino
Profa. Dra. Maria Salete Costa Gurgel

Data da defesa: 30-06-2006

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientadora: Prof. Dr. José Vassallo

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

2. Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva

3. Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino

4. Prof.a Dra. Maria Salete Costa Gurgel

5. Prof. Dr. José Vassallo

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/06/06

DEDICATÓRIA

Ao meu marido André

À minha mãe Júlia, onde tudo começou...

Ao meu pai Adnei, pela presença, sempre, e pelo equilíbrio.

Ao meu marido André, por ter me transmitido a paixão pela pesquisa. E pelo amor...

Ao meu filho Eduardo, pela inspiração.

À família Schenka, pelo carinho incondicional, apoio e hospitalidade.

Ao meu orientador, Dr. José Vassallo, pela amizade, estímulo, por sempre ter acreditado neste trabalho; e pela paciência...

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Alvarenga por ter me transmitido a paixão pela patologia mamária.

Aos meus amigos (...) queridos que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado.

Ao Dr. Luciano, pelo carinho e apoio lingüístico.

Aos Drs. Stuart Schnitt e James Connolly, pela grande oportunidade e muitos conhecimentos.

Ao pessoal do Lape, colegas de “bancada”, Glauce, Marisa, Cristiano, Julius, Eduardo (e tantos outros), pelo companheirismo e ensinamentos fundamentais.

Às minhas consultoras administrativas, Do Carmo, Rose, Flávia, Ivete e Malvina, pelo apoio logístico e delicadeza.

... e, sobretudo a Deus, por ter proporcionado tudo e todos neste trabalho.

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas
que já tem a forma do nosso corpo
e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos
mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos
ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”*

FERNANDO PESSOA (1888-1935)

*“I went to the woods because I wanted to live deliberately
I wanted to live deep and suck all the marrow of life
to put to rout all that was not life
and not, when I had come to die,
discover that I had not lived.”*

HENRI DAVID THOREAU (1827-1862)

vii

Artigo 2- Use of p63 and CD10 in the differential diagnosis of papillary neoplasms of the breast.....	43
DISCUSSÃO GERAL	63
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	79
Técnica imunoistoquímica	80
Planilha de coleta de dados artigo 1	83
Planilha de coleta de dados artigo 2	85

1A4	Marcador de diferenciação muscular (actina de músculo liso humana)
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Bcl-2	Molécula com propriedades anti-apoptóticas, presente em inúmeros tecidos normais e tumorais
CD10	CALLA, Common Antigen of Acute Lymphoblastic Leukemia, Antígeno Comum da Leucemia Linfóide Aguda
CK	Citoqueratina
CME	Célula mioepitelial
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilenodiaminotetraacético
e.g.	Exempli gratia, por exemplo
DAB	3-3' Diaminobenzidina
H&E	Hematoxilina-eosina (coloração)
HHF35	Marcador de diferenciação muscular (actina muscular específica)
i.e.	Id est, isto é
p63	Proteína p63
S-100	Proteína S-100, marcador de diferenciação neural
TNF	Tumor Necrosis Factor, Fator de Necrose Tumoral
p53	Proteína p53
DNA	Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

	<i>Pág.</i>
Table 1- Artigo1- Staining protocol.....	37
Table 2- Artigo 1- Myoepithelial markers in sclerosing adenosis (n=10)....	38
Table 3- Artigo 1- Myoepithelial markers in radial scar (n=10).....	38
Table 4- Artigo 1- Myoepithelial markers in tubular carcinoma (n=10).....	39
Table 1- Artigo 2- Primary antibodies used in the present study and details of dilution and antigen retrieval methods.....	58
Table 2- Artigo 2- Expression of traditional and novel MEC markers in normal breast tissue (n=18), benign papillomas (n=5), atypical papillomas (n=6) and papillary carcinomas (n=9). N= 38.....	59

	Pág.
Figure 1- (Artigo 1) - Serial sections of a case of sclerosing adenosis. H&E staining (A,B). 1A4 (C), calponin (D), p63 (E) and CD10 (F) were strongly and consistently positive in the myoepithelial cells of proliferating and distorted tubules.....	39
Figure 2- (Artigo 1) - Serial sections of a case of radial scar. H&E staining (A,B). 1A4 (C), calponin (D), p63 (E) and CD10 (F) were strongly and consistently positive in the myoepithelial cells of proliferating and distorted tubules.....	40
Figure 3- (Artigo 1) - Serial sections of tubular carcinoma. H&E staining (A,B). 1A4 (C), calponin (D), p63 (E) and CD10 (F) were consistently negative in epithelial cells of infiltrating malignant tubules and consistently positive in MECs of remaining normal breast ducts within the tumor used as internal positive control. Note the presence of myofibroblasts in the reactive stroma around the malignant infiltrating tubules as highlighted by 1A4 and calponin.....	41
Figure 1- (Artigo 2) - Serial sections of a benign papilloma stained with H&E (a,e,i,m), 1A4 (b,f,j,n), p63 (c,g,k,o) and CD10 (d,h,l,p). Low power view (a-d, 5X, original magnification). High power fields presenting morphological variability within the same lesion (e-p, 100X, original magnification): typical papillary structures with a single MEC layer (e-h), benign proliferations of myoid MECs (i-l) epithelial ductal structures within a papillae (m-p).....	60

Figure 2- (Artigo 2) - Serial sections of an atypical papilloma stained with H&E (a,e,i,m), 1A4 (b,f,j,n), p63 (c,g,k,o) and CD10 (d,h,l,p). Low power view (a-d, 5X, original magnification). High power fields (e-p, 100X original magnification) disclosing: typical papillary structures with minimal epithelial proliferation on the tips (e-h), areas of benign ductal proliferation within the lesion (i-l), and a focal area of monotonous epithelial proliferation with nuclear atypia and cribriform architecture resembling low grade ductal carcinoma in situ (m-p). Note the characteristic staining of stromal cells with 1A4 (n), but not with p63 (o) and CD10 (p)..... 61

Figure 3- (Artigo 2) - Serial sections illustrating different cases of papillary carcinoma. Low (a-d, 5X) and high (e-h) power fields displaying the usual staining pattern of 1A4 (b,f), p63 (c,g) and CD10 (d,h) in normal (a-d) and neoplastic tissue (a-h). Note that 1A4 (but not p63 or CD10) clearly highlights the vascular structures within papillary cores. Since the vascular structures are not juxtaposed to the epithelial lining, such cross-reaction with 1A4 is not expected to cause any diagnostic problems. In the second case (i-l), however, the proximity of 1A4-positive vessels with the epithelial layer could be misleading if the marker had been interpreted alone. Finally, in the last example (m-p), all markers disclosed the presence of MECs layer beneath the atypical epithelial proliferation of every papillary structure (a true case of papillary carcinoma with MECs)..... 62



RESUMO

O sistema ductal da mama é revestido por duas camadas de células: uma constituída de células epiteliais lumbais e outra de células mioepiteliais (CME). A identificação das CMEs é de grande importância na rotina em patologia cirúrgica, já que estas estão presentes em lesões benignas e geralmente ausentes nas malignas. Contudo, esta identificação morfológica (i.e., à hematoxilina-eosina) pode tornar-se difícil, sendo necessários marcadores imunoistoquímicos mioepiteliais. Até o momento, nenhum marcador mostrou-se, isoladamente, sensível e específico o bastante para auxiliar de maneira fidedigna em dilemas diagnósticos específicos, especialmente em: (1) lesões esclerosantes benignas vs. carcinoma tubular e (2) neoplasias papilíferas. No presente trabalho, dois novos marcadores mioepiteliais (p63 e CD10) foram testados e comparados com marcadores tradicionalmente empregados em patologia cirúrgica (1A4 e calponina). No primeiro dilema diagnóstico, foram estudados 10 casos de adenose esclerosante, 10 casos de cicatriz radiada e 10 casos de carcinoma tubular. Todos os marcadores demonstraram expressão nas CMEs de todas as lesões benignas e foram consistentemente negativos nos casos de carcinoma tubular, porém, p63 e CD10 mostraram maior especificidade. Os marcadores tradicionais mostraram positividade em células estromais em todos os casos de carcinoma tubular, sendo que esta reação-cruzada poderia causar problemas de interpretação ao simular uma camada de CMEs em quatro casos. Contudo, 1A4 mostrou uma positividade mais intensa e reprodutível nas CME. Concluimos, assim, que p63 e CD10 devem ser usados como anticorpos complementares ao 1A4 na distinção entre lesões esclerosantes benignas e carcinoma tubular da mama. No estudo das neoplasias papilíferas, foram avaliados 20 casos incluindo papilomas, papilomas atípicos e carcinomas papilíferos, além do tecido mamário normal adjacente. Todos os marcadores foram difusamente positivos no tecido mamário normal e papilomas, indicando sensibilidades semelhantes na identificação de CME. Uma positividade intensa foi encontrada em 100% dos casos corados para 1A4 e CD10, mas em apenas 76% e 60,5% dos corados para calponina e p63, respectivamente, sendo as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$). Este dado sugere que os dois primeiros são tecnicamente mais reprodutíveis. Os marcadores mais específicos foram o p63 e CD10, mostrando reação-cruzada com células estromais em 0 e até 33% dos casos, respectivamente. Já os marcadores 1A4 e calponina mostraram reação-cruzada difusa em todos os casos. O CD10 mostrou uma

combinação de uma maior especificidade e reprodutibilidade, com uma boa sensibilidade. Apesar de ser o mais específico, o p63 apresentou a menor sensibilidade e a impressão de uma camada de CMEs variavelmente interrompida (mesmo em tecido normal e lesões benignas), o que poderia causar problemas de interpretação. Além disto, o 1A4 mostrou-se também neste contexto, como o mais reprodutível tecnicamente. Assim sendo, no dilema diagnóstico das neoplasias papilíferas, defendemos o uso combinado do marcador CD10 com o 1A4. Em resumo, apesar de variarem em acurácia diagnóstica quando comparados entre si e com marcadores tradicionais, na dependência do dilema considerado, os novos marcadores testados neste trabalho parecem promissores no diagnóstico diferencial de lesões benignas e malignas da mama.



ABSTRACT

The myoepithelial cell (MEC) layer is usually present and continuous in normal breast tissue/benign lesions, and discontinuous to absent in atypical/malignant counterparts. Identifying MECs can be difficult on morphological grounds alone and currently relies on immunomarkers. So far, this detection has been carried out using antibodies such as alpha-smooth muscle actin (1A4) and calponin, but no immunomarker has proved to be accurate enough to identify MECs, particularly in specific diagnostic dilemmas such as: (1) benign sclerosing lesions vs. tubular carcinoma and (2) papillary neoplasms. The specificity of these markers has been questioned because they may be expressed in stromal myofibroblasts and vascular smooth muscle. Two novel myoepithelial markers have been described: the nuclear protein p63 and the surface antigen CD10. In the present study, we assessed the use of p63 and CD10 in comparison to the traditional markers in the specific diagnostic dilemmas specified above. In the first diagnostic problem, we studied 30 cases including sclerosing adenosis, radial scars and tubular carcinomas. All markers were expressed in MECs of all benign lesions and negative in all cases of tubular carcinoma. p63 and CD10 were mostly confined to MECs and thus more specific. Stromal positivity for 1A4 was present in all cases of tubular carcinoma and was misleading in 4 cases, as it simulated a MEC layer around malignant tubules. However, 1A4 was consistently more intensely expressed and thus more technically reproducible than the novel markers. So, we concluded that p63 and CD10 should be used as a complement to 1A4 in distinguishing benign sclerosing lesions from tubular carcinoma of the breast. Concerning the other diagnostic dilemma, we studied 20 cases of papillary neoplasms (including benign papillomas, atypical papillomas and papillary carcinomas), and adjacent normal breast tissue. All markers were diffusely positive in all samples of normal tissue and benign papillomas indicating similar sensitivities in the identification of MECs. Intense positivity was found in 100% of the cases stained with 1A4 and CD10, but in only 76% and 60,5% of those stained with calponin and p63, respectively; the differences were statistically significant ($p < 0.05$), suggesting that the former two rendered more reproducible results. The most specific markers were p63 and CD10 which showed cross-reactivity in 0% and in up to 33% of the cases, respectively. 1A4 and calponin showed diffuse cross-reactivity in all cases. CD10 seems to combine the highest specificity and reproducibility with a good sensitivity. In spite of being the most specific, p63 was the least sensitive, also giving the

impression of a discontinuous MEC layer even in normal tissue/benign lesions, which could potentially cause diagnostic problems. Moreover, in this context, 1A4 proved to be the most reproducible. Thus, a minimum panel for immunodetection of MEC to assess papillary lesions should include both markers. In conclusion, in spite of the variable accuracy depending on the diagnostic dilemma considered, the novel markers seem to be promising tools in the differential diagnosis between benign and malignant lesions of the breast.



INTRODUÇÃO GERAL

Células mioepiteliais

Todo o sistema ductal da mama é revestido por duas camadas de células, que podem assumir aparência muito variada: uma camada interna de células epiteliais luminais e uma externa de células mioepiteliais (**Tavassoli, 1999**). Envolvendo a camada de células mioepiteliais observa-se ainda uma lâmina basal, constituindo toda esta estrutura a unidade funcional da mama. O sistema ductal da mama, bem como as regiões interlobulares, encontram-se circundadas por estroma fibroadiposo. No sistema intralobular, o estroma é frouxo e mais celular, possuindo capilares delicados e fibroblastos.

A camada de células mioepiteliais é contínua em ductos maiores e normalmente torna-se alternada e descontínua nas ramificações terminais do sistema ductal. Quaisquer anomalias no número dessas camadas celulares constituem alterações patológicas (**Tavassoli, 1999**).

Alguns autores acreditam na existência de um terceiro tipo de célula, a chamada célula intermediária (célula basal ou clara) (**Smith et al., 1984**). Este subtipo hipotético poderia corresponder a uma espécie de “*stem cell*” na mama, com ampla distribuição pelo sistema ductal e maior concentração em lóbulos (**Tavassoli, 1999**). Outros autores, contudo, a consideram como uma mera variação fenotípica de um dos dois subtipos consagrados (células luminais e mioepiteliais), tendo em vista a grande variação morfológica assumida por estes, tanto em condições fisiológicas, quanto em situações patológicas (**Tavassoli, 1999**).

As células epiteliais e mioepiteliais têm características imunofenotípicas distintas, apesar da origem comum e da íntima relação. As células epiteliais expressam variavelmente várias citoqueratinas (CKs 7, 8, 18 e 19) (**Moll et al., 1982; Nagle et al., 1986; Steinert & Roop, 1988; Moll, 1991; Böcker et al., 1992; Heatley et al. 1995; Moinfar et al., 1999**), receptores de estrógeno e progesterona, bem como a proteína Bcl-2 (**Rosen, 2001**). As células mioepiteliais, por sua vez, mostram positividade variável para algumas citoqueratinas (CK 5/6, 14 e 17) (**Moll et al., 1982; Nagle et al., 1986; Steinert & Roop, 1988; Moll, 1991; Böcker et al., 1992; Heatley et al. 1995; Moinfar et al., 1999**), além de vários anticorpos relacionados com as actinas de músculo liso (e.g. 1A4, calponina,

HHF35) (Gugliotta *et al.*, 1988; Gottlieb *et al.*, 1990; Lazard *et al.*, 1993; Mosunjac *et al.*, 2000).

Essas características bifenotípicas das células mioepiteliais estão diretamente relacionadas à sua natureza epitelial e contrátil, bem como seu papel fisiológico no favorecimento de secreção. Ultraestruturalmente, essas características são representadas pela presença simultânea de desmossomos e feixes de tonofilamentos (características epiteliais), ao lado de feixes de microfilamentos com “corpos densos” (características musculares lisas) (Tavassoli, 1999).

A presença ou não de camada de células mioepiteliais intacta em lesões mamárias pode ser de grande valia no diagnóstico diferencial em lesões hiperplásicas (presente e contínua), carcinoma *in situ* (presente, porém descontínua) e carcinoma invasor (ausente). Todavia, a identificação das células mioepiteliais pode ser muito difícil baseando-se apenas em critérios puramente histológicos (i.e., a hematoxilina-eosina) (Wang *et al.*, 1997; Tavassoli, 1999; Lele *et al.*, 2000; Rosen, 2001; Werling *et al.*, 2003).

A marcação imunoistoquímica das células mioepiteliais tem contribuído muito para a identificação destas células, muito embora os marcadores existentes ainda não exibam a especificidade desejada para um diagnóstico preciso. As actinas musculares são os anticorpos mais popularmente utilizados, marcando as células mioepiteliais com um padrão de membrana citoplasmática. Contudo, estes marcadores reagem também com miofibroblastos e células musculares lisas de vasos, dificultando a realização de um diagnóstico preciso em algumas situações específicas (Wang *et al.*, 1997; Lele *et al.*, 2000; Barbareschi *et al.*, 2001; Troxell *et al.*, 2002; Werling *et al.*, 2003). É o caso do diagnóstico diferencial entre lesões proliferativas esclerosantes benignas e carcinomas tubulares. Aquelas, representadas pela adenose esclerosante e a cicatriz radiada, não raramente simulam estes (especialmente em amostras limitadas), por serem constituídas de túbulos pequenos e dispostos em arranjo pseudo-infiltrativo. O diagnóstico diferencial, em geral, é firmado pela identificação da camada de células mioepiteliais (actina positivas) ao redor das estruturas pseudoinfiltrativas. Em alguns casos, contudo, a presença de células estromais actina-positivas (componente usual da reação desmoplásica do carcinoma invasivo) em justaposição a estruturas ductais malignas do carcinoma tubular, pode simular

a dupla camada dos ácinos tortuosos de uma lesão esclerosante, levando a um falso diagnóstico de benignidade. Nas lesões papilíferas da mama, o diagnóstico pode ser até mais problemático, uma vez que a presença de células mioepiteliais pode ser caracterizada em raros casos até mesmo no pólo maligno (carcinoma papilífero) (**Tavassoli, 1999**), sem mencionar o fato dos critérios de diagnóstico e classificação aplicados a estas entidades serem controversos e de baixa reprodutibilidade (**Douglas-Jones et al., 2005**).

Estes problemas relacionados à identificação imunofenotípica das células mioepiteliais têm estimulado a busca de novos marcadores mais específicos. **Wang et al. (1997)**, por exemplo, estudaram a calponina e a miosina de músculo liso (cadeia pesada) em tecido mamário normal, lesões mamárias benignas, carcinoma *in situ* e carcinomas invasivos. Apesar de confirmar a utilidade destes marcadores no diagnóstico diferencial de lesões benignas e malignas, os autores mostraram que um subtipo de miofibroblastos considerado minoria, ainda reage positivamente com estes marcadores. Estes achados sugerem que, embora altamente sensíveis, estes marcadores não sejam restritos ao mioepitélio.

Lele et al. (2000) compararam o uso da maspina como possível marcador de células mioepiteliais no diagnóstico diferencial entre cicatriz radiada (11 casos) e carcinoma tubular (10 casos) em comparação com outros marcadores (e.g. actina). O trabalho mostra que a maspina é um marcador sensível, porém pouco específico para células mioepiteliais já que, em dois casos de carcinoma tubular, revelou-se positivo nas células epiteliais malignas, o que poderia causar erros de interpretação.

Mais recentemente, o receptor de neurotrofina p75, uma glicoproteína de transmembrana membro da família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF) foi testado como possível marcador para células mioepiteliais na mama (**Popnikolov et al., 2005**). Os autores utilizaram tecido mamário normal e um espectro de lesões benignas e malignas e demonstraram uma alta sensibilidade do marcador na identificação das células mioepiteliais nos diferentes tipos de tecido mamário. Contudo, foi encontrada uma positividade significativa deste marcador em vasos, nervos e componente estromal, provando que este é, também, um marcador pouco específico.

O gene *p53* é considerado um gene supressor tumoral que regula o ciclo celular, sendo responsável pela morte celular programada (apoptose), em resposta a estímulos nocivos como alterações do DNA e hipóxia (**Royds & Iacopetta, 2006**). Ainda que o *p53* seja responsável por modular esses processos celulares críticos para o desenvolvimento, camundongos que não têm este gene desenvolvem-se normalmente.

Contudo, o gene *p63*, homólogo do gene *p53*, localizado no cromossomo 3q27-28, é essencial em vários aspectos da diferenciação ectodérmica durante a embriogênese. Quando deletado em camundongos, estes nascem vivos, mas com defeitos do desenvolvimento. Os membros ficam truncados ou ausentes, por falha na diferenciação apical ectodérmica. A pele dos camundongos *p63*-deficientes não se desenvolve apropriadamente, com parada nos estágios iniciais de diferenciação e com falta de estratificação. Estruturas derivadas das interações epidérmicas/mesenquimatosas, como folículos pilosos, dentes e glândulas mamárias mostram-se ausentes (**Mills et al., 1999**).

Na investigação da distribuição do *p63* nos tecidos humanos normais e tumorais pela imunoistoquímica, utilizando o anticorpo monoclonal 4A4, **Di Como et al. (2002)** observaram que a imunoreatividade deste marcador é restrita a células de epitélios estratificados (tais como pele, esôfago, ectocérvice, tonsila e bexiga). Além disso, o anticorpo marcou uma subpopulação de células basais de estruturas glandulares como próstata e mama. Seu padrão de positividade é exclusivamente nuclear. Além disso, o mesmo padrão de positividade foi encontrado predominantemente em carcinoma basocelular, carcinoma epidermóide, carcinoma transicional da bexiga, porém negativo em adenocarcinomas de mama e próstata (**Di Como et al., 2002**).

Barbareschi et al. (2001) descreveram o *p63* como marcador de células mioepiteliais no tecido mamário. Os autores estudaram lesões mamárias benignas, tecido mamário normal e carcinomas invasores. Em todas as lesões benignas, as células *p63* positivas de padrão nuclear formaram uma rima ao redor das células epiteliais, sendo que as células estromais e particularmente miofibroblastos foram consistentemente negativos. Nos casos de carcinoma *in situ* observou-se uma rima descontínua de células mioepiteliais

(comparado com tecido mamário normal). Em carcinomas invasivos, observou-se uma positividade de 5-15%, porém restrita às células neoplásicas (que são de fácil distinção morfológica). Estes achados, quando comparados com o uso de outros marcadores, sugerem que o p63 seja um anticorpo mais específico para células mioepiteliais.

Troxell et al. (2002) estudaram 48 lesões papilíferas benignas e malignas com actina, calponina e p63, sendo confirmadas as características de cada marcador. Os autores encontraram positividade restrita aos núcleos das células mioepiteliais, essencialmente sem reação de fundo (ausência de positividade estromal e vascular), e concluíram que o p63 é um marcador superior na identificação de células mioepiteliais em lesões papilíferas quando comparado a calponina e actina.

Werling et al. (2003) estudaram 58 lesões de mama benignas e malignas com calponina, actina e p63 e concluíram que o último oferece excelente sensibilidade e especificidade na detecção de células mioepiteliais. Os autores sugeriram ainda que o p63 pode complementar ou substituir a actina e/ou a calponina na análise de lesões mamárias difíceis, em casos de rotina de patologia cirúrgica.

Por outro lado, **Hill & Yeh (2005)** estudando lesões papilíferas com os mesmos marcadores mioepiteliais, observaram que, apesar de muito específico, o p63 exibe um padrão nuclear, portanto descontínuo (nem todos os núcleos de uma camada de células mioepiteliais aparecem em um mesmo nível de corte), tornando a caracterização de uma camada de células mioepiteliais contínua/intacta problemática e de difícil interpretação.

Outros autores (**Douglas-Jones et al., 2005**) observaram um aumento considerável da reprodutibilidade inter-observadores em biópsias de agulha (“*core biopsies*”) de lesões papilíferas quando estas foram estudadas através de um painel de imunoistoquímica incluindo CK5/6, calponina e p63, recomendando o uso da imunoistoquímica diante deste problema diagnóstico.

Pavlakakis et al. (2005) recentemente propuseram uma dupla-marcação com um coquetel mioepitelial p63/1A4 em lesões esclerosantes benignas da mama. Utilizaram p63, tido como o marcador mais específico (apesar da rara expressão em uma pequena porção de

carcinomas ductais invasivos pouco diferenciados ou metaplásicos) e o 1A4 como um marcador muito sensível. Os autores concluíram que o coquetel p63/1A4 pode ser útil em alguns casos, especialmente em cicatriz radiada, sendo uma reação mais densa em células mioepiteliais em comparação com as células estromais e vasos.

CD10

Também chamado de antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA), o CD10 foi originalmente descrito como uma molécula expressa na mencionada leucemia, bem como em precursores linfóides e em linfócitos B de centros germinativos (**Greaves *et al.*, 1983; Shipp *et al.*, 1989**). Apenas recentemente foi descrita por **Moritani *et al.* (2002)** sua utilização em patologia mamária na identificação de células mioepiteliais, mostrando-se um marcador altamente sensível para estas células e negativo em células musculares lisas da parede vascular. Neste trabalho, uma positividade fraca e focal foi identificada em células estromais para este marcador, porém numa quantidade bem menor do que à evidenciada pela actina de músculo liso (1A4) e sendo, portanto incapaz de causar confusão diagnóstica. Estes dados foram também confirmados por **Kalof *et al.* (2004)**.

Da mesma forma que o p63, o marcador CD10 também mostrou positividade fraca e focal em uma minoria dos carcinomas mamários, indicando provavelmente que a diferenciação mioepitelial é uma característica incomum em tumores mamários malignos (**Igawa *et al.*, 2002**). Os autores enfatizaram que estes fenômenos parecem não causar problemas de interpretação, não afetando a importância diagnóstica deste marcador na identificação de células mioepiteliais, em material incluído em parafina.

Cicatriz radiada, adenose esclerosante e carcinoma tubular

A cicatriz radiada ("radial scar") é considerada uma lesão benigna que pode mimetizar carcinoma invasor mamograficamente, bem como macro e microscopicamente (**Semb, 1928; Fisher *et al.*, 1979; Wellings & Alpers, 1984; Anderson & Battersby,**

1985; Nielsen *et al.* 1985; Ciatto *et al.*, 1993; Sloane & Mayers, 1993; Tukul *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 1999b). Foi inicialmente descrita por Semb *et al.* (1928) e seu nome foi proposto posteriormente por Linell *et al.* (1980) como tradução do nome “strahlige narben” introduzido por Hamperl (1975).

A grande maioria das cicatrizes radiadas é representada por lesões pequenas, não visíveis a mamografia (Tukul *et al.*, 1997) e incidentalmente encontradas em biópsias mamárias indicadas por outros motivos, embora algumas destas lesões sejam maiores e detectáveis mamograficamente (Fisher *et al.*, 1979; Anderson & Battersby, 1985; Sloane & Mayers, 1993; Jacobs *et al.*, 1999a,b; Jacobs *et al.*, 2002). Sua incidência varia na literatura entre 4 a 28% dos espécimes mamários (Fisher *et al.*, 1979; Wellings & Alpers, 1984; Nielsen *et al.*, 1985). O termo lesão esclerosante complexa às vezes é usado para lesões similares à cicatriz radiada, porém maiores que 1 cm de tamanho ou para lesões com várias áreas contíguas de fibroelastose (Jacobs *et al.*, 1999b).

Microscopicamente, a entidade caracteriza-se por uma lesão dotada de zona central de fibroelastose, de onde irradiam ductos e lóbulos exibindo alterações benignas variáveis, como hiperplasia ductal e papilomatose. Na área central fibroelastótica, encontram-se ductos seqüestrados de aparência angular e distorcida, os quais são revestidos por uma ou mais camadas interna de células epiteliais luminas e uma camada externa de células mioepiteliais (Rosen, 2001; Tavassoli & Devilee, 2003). Além das alterações benignas mencionadas, as cicatrizes radiadas também podem ser envolvidas por processos outros tais como hiperplasias atípicas (ductal ou lobular), Carcinoma *in situ* (ductal ou lobular) ou até mesmo carcinoma invasor (Sloane & Mayers, 1993; Jacobs *et al.*, 1999a,b).

A patogênese da cicatriz radiada ainda é incerta, assim como as razões para a sua associação com um risco aumentado de câncer de mama (Jacobs *et al.*, 1999a,b; Jacobs *et al.*, 2002). Wellings & Alpers (1984) sugerem que a lesão possa representar uma espécie de cicatrização elastótica, estimulada pelo dano tecidual de uma citologia aspirativa por agulha. Segundo esta hipótese, o centro fibroelastótico deslocaria os ductos e lóbulos adjacentes para formar um arranjo radiado. Jacobs *et al.* (2002), no entanto, acreditam que

a cicatriz radiada represente uma alteração da interação normal estroma-epitélio no tecido mamário.

A relação entre cicatriz radiada e câncer de mama tem interessado muitos pesquisadores. Os ductos seqüestrados e distorcidos localizados no centro fibroelástico destas lesões podem ser confundidos com carcinoma tubular (**Anderson & Battersby, 1985; Sloane & Mayers, 1993; Ruiz-Sauri *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1999a,b; Jacobs *et al.*, 2002**) especialmente em citologias aspirativas (**de la Torre *et al.*, 1994; Vazquez *et al.*, 1994**) e biópsias de pequena amostragem (“core biopsies”) (**Jacobs *et al.*, 1999b**). Além disso, a associação topográfica da cicatriz radiada com lesões como o carcinoma “in situ” e tubular leva alguns autores a questionar se a cicatriz radiada não poderia ser uma lesão com algum potencial maligno (**Sloane & Mayers, 1993; Frouge *et al.*, 1995; Douglas-Jones & Pace, 1997**) ou mesmo uma fase precoce de alguns carcinomas (**Semb, 1928; Fisher *et al.*, 1979; Linell *et al.*, 1980; Fisher *et al.*, 1983; Andersen *et al.*, 1986**).

A adenose esclerosante é uma lesão derivada da unidade terminal ducto-lobular, reconhecia desde 1940, como lesão lobulocêntrica benigna (**Urban & Adair, 1949; Dawson, 1954**). Alguns autores especulam como etiologia, um processo regressivo anormal relacionado com a idade ou a lactação (**Bonser *et al.*, 1961; Symmers, 1978**). Outros autores, por outro lado, consideram a adenose esclerosante como um processo proliferativo (**Tanaka & Oota, 1970; Azzopardi, 1979; Rosai, 1981**). Adenose esclerosante é observada em 3.1% das mamas femininas em autópsia. Em material de patologia cirúrgica, foi observada em 12.2-12.5% de mamas sem carcinomas e 5.3-7% de mamas dotadas de lesão carcinomatosa (**Foot & Stewart, 1945; Jensen *et al.*, 1989**).

Microscopicamente, a adenose esclerosante pode ser focal ou difusa/florida (**Tavassoli, 1999**). No último caso, quando a adenose esclerosante forma uma lesão grande nodular que pode ser clinicamente palpável, também é chamada de adenose esclerosante forma tumoral ou nodular (“*adenosis tumor*”) (**Nielsen, 1987**). Histologicamente, caracteriza-se pela proliferação lobulada e compacta de ductos que se apresentam alongados e distorcidos pela compressão do colágeno estromal. Nota-se uma preservação da dupla camada celular epitelial/mioepitelial juntamente com a membrana basal

envolvente (**Tavassoli & Devilee, 2003**). As células mioepiteliais podem estar proeminentes ou hiperplásicas conferindo um aspecto sólido, nodular ou até fusocelular (mióide) para estas lesões. Com o aumento da esclerose, os lumens ductais tornam-se progressivamente obliterados até a oclusão, quando não podem mais ser identificados. Ductos cisticamente dilatados podem ser encontrados, estando variavelmente associados a ductos proliferados de aspecto papilomatoso e metaplasia apócrina. Calcificações estão presentes em cerca de 50% dos casos, tornando-se progressivamente mais numerosas com o aumento da esclerose (**Tavassoli, 1999**).

Em alguns casos de adenose esclerosante, os ductos distorcidos e alongados podem conferir um caráter pseudo-invasivo e a lesão pode ser confundida com carcinoma invasor macro e microscopicamente (**Urban & Adair, 1949**). O padrão mamográfico de microcalcificações também pode simular carcinoma (**MacErlean & Nathan, 1972**). Invasão peri-neural, um critério seguro de malignidade para algumas neoplasias, pode ser encontrada em 2% dos casos comprovados de adenose esclerosante (**Taylor & Norris, 1967**). Eventualmente a adenose esclerosante pode estar envolvida por carcinoma lobular *in situ* ou carcinoma ductal *in situ* (**Fechner, 1981; Chan & Ng, 1987; Nielsen, 1987; Gottlieb et al. 1990**), sendo ainda mais difícil excluir uma área de invasão. Nestes casos, em especial, o estudo imunoistoquímico para detecção de células mioepiteliais torna-se fundamental para o estabelecimento do diagnóstico definitivo (**Tavassoli & Devilee, 2003**).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o carcinoma tubular consiste em um tipo distinto de carcinoma ductal invasivo bem diferenciado, constituído por túbulos revestidos por uma única camada de células e envolvidos por estroma fibroso abundante (**Tavassoli & Devilee, 2003**). Formações tubulares podem ser encontradas focalmente em alguns carcinomas ductais invasivos, mas poucos tumores (menos de 2% de todos os carcinomas) são compostos somente por túbulos, podendo ser chamados de carcinomas tubulares "puros". Esses tumores tendem a ser pequenos e mais freqüentemente detectados no estágio I (**Rosen, 2001**).

Mamograficamente, o carcinoma tubular não tem características distintas das outras formas de carcinoma, sendo a maioria espiculada e sem microcalcificações (**Elson et al., 1993**). A cicatriz radiada também manifesta estas características, sendo ambos

mamograficamente indistinguíveis (Vega & Garijo, 1993). Microscopicamente, o carcinoma tubular é caracterizado pela proliferação de túbulos angulados, ovais e alongados infiltrando tecido adiposo e mamário. Os túbulos possuem o lúmen aberto e revestido por uma camada única de células epiteliais com atipia citológica pouco significativa e baixa atividade mitótica. O estroma é frequentemente fibroblástico jovem, de aspecto reacional, mas pode apresentar-se densamente colágeno ou até elastótico (Tavassoli, 1999; Tavassoli & Deville, 2003).

Neoplasias papilíferas

As neoplasias papilíferas da mama são lesões relativamente incomuns que podem ser definidas como uma proliferação epitelial sobre eixos conjuntivos vasculares possuindo ou não camada de células mioepiteliais. Formam um espectro de lesões que incluem entidades benignas, indeterminadas e malignas. Apesar da falta de consenso na classificação destas lesões, as seguintes entidades são reconhecidas: 1) Papiloma intraductal benigno 2) Papiloma intraductal atípico 3) Carcinoma papilífero intracístico 4) Carcinoma papilífero invasivo (Tavassoli & Devilee, 2003).

Papilomas intraductais são lesões geralmente solitárias localizadas na região sub-areolar de ductos principais, podendo envolver um único ducto ou numerosos ductos contíguos (Tavassoli, 1999). Microscopicamente são caracterizados pela proliferação de células epiteliais acompanhada por uma camada contínua de células mioepiteliais revestindo estroma fibrovascular arborescente no lúmen de ducto dilatado (Azzopardi, 1979; Tavassoli, 1999; Tavassoli & Devilee, 2003). Estas lesões podem apresentar áreas de metaplasia apócrina, hiperplasia ductal típica florida e áreas de esclerose/hialinização. Estas áreas podem exibir túbulos distorcidos pseudo-invasivos, que também podem ser confundidos histologicamente com carcinomas invasores (Fenoglio & Lattes, 1974). Os papilomas intraductais atípicos são caracterizados pela presença de área (<90%) de proliferação epitelial atípica de baixo grau nuclear, similar à hiperplasia ductal atípica ou carcinoma ductal *in situ* de baixo grau.

O carcinoma papilífero intracístico representa cerca de 2% de todos os carcinomas mamários, acometendo pacientes de 34 a 92 anos, sendo a média ao redor dos 65 anos

(Tavassoli & Devilee, 2003). Apresenta-se no interior de um ducto grande cisticamente dilatado e é caracterizado microscopicamente por eixos conjuntivos-vasculares finos revestidos por (1) uma proliferação epitelial atípica semelhante ao carcinoma ductal *in situ* em mais de 90% da lesão ou (2) camada de células mioepiteliais presente em menos de 10% das estruturas papilíferas (Tavassoli & Devilee, 2003). A proliferação pode exibir arquitetura sólida, cribriforme, micropapilífera, ou com padrão estratificado e fusocelular. Alguns podem exibir uma população celular dimórfica, com muita semelhança à epitelial/mioepitelial, o que pode causar dificuldades na interpretação (Lefkowitz *et al.*, 1994; Maluf & Koerner, 1995; Rosen, 2001).

Os carcinomas papilíferos intracísticos geralmente invadem como um carcinoma ductal invasivo sem outras especificações. Os carcinomas papilíferos invasivos verdadeiros são diagnosticados predominantemente em mulheres pós-menopausa e representam menos de 1-2% de todos os carcinomas invasivos na mama. Caracterizam-se histologicamente por lesões circunscritas, porém de crescimento expansivo no estroma, exibindo estruturas papilares delicadas e áreas sólidas, atipias nucleares geralmente de grau intermediário, por vezes com proeminência apical do citoplasma e secreção do tipo decapitação, geralmente associadas a focos de carcinoma ductal *in situ* frequentemente papilífero (Rosen 2001; Tavassoli & Devilee, 2003).

Justificativa

Apesar do grande número de trabalhos investigando a identificação imunoistoquímica das células mioepiteliais, nenhum demonstrou um marcador com sensibilidades e especificidades ideais. Atualmente, ainda existem controvérsias na escolha dos marcadores a serem utilizados na rotina em patologia cirúrgica, especialmente no diagnóstico diferencial de dilemas diagnósticos específicos como adenose esclerosante/cicatriz radiada vs. carcinoma tubular e neoplasias papilíferas. Os novos marcadores p63 e CD10 foram testados por vários autores em um espectro de lesões benignas e malignas. Até o momento, não foi descrita uma comparação dos novos marcadores com os tradicionais (1A4 e calponina) na avaliação de problemas diagnósticos específicos.



OBJETIVOS

Lesões esclerosantes benignas (cicatriz radiada, adenose esclerosante) vs. carcinoma tubular

Objetivos gerais

- Avaliar a importância e a aplicabilidade de p63 e CD10 como possíveis marcadores de células mioepiteliais no diagnóstico diferencial entre lesões esclerosantes benignas (cicatriz radiada e adenose esclerosante) e carcinoma tubular da mama em casos de rotina de patologia cirúrgica.

Objetivos específicos

- Avaliar a frequência e intensidade de positividade para 1A4, calponina, p63 e CD10 em tecido mamário normal, lesões esclerosantes benignas (cicatriz radiada, adenose esclerosante) e carcinoma tubular presentes em espécimes mamários de “core biopsy” e biópsias excisionais.
- Comparar a frequência de positividade dos diferentes marcadores tradicionais (1A4 e calponina) e novos (p63 e CD10) nos diferentes contextos descritos acima (tecido mamário normal, lesões esclerosantes benignas e carcinoma tubular).

Neoplasias papilíferas

Objetivos gerais

- Avaliar a importância e a aplicabilidade de p63 e CD10 como possíveis marcadores de células mioepiteliais no diagnóstico diferencial entre neoplasias papilíferas da mama (papiloma intraductal benigno, papiloma atípico e carcinoma papilífero) em casos de rotina de patologia cirúrgica.

Objetivos específicos

- Avaliar a positividade para 1A4, calponina, p63 e CD10 em tecido mamário normal e neoplasias papilíferas da mama (papiloma intraductal benigno, papiloma atípico e carcinoma papilífero) presentes em espécimes mamários de “core biopsy” e biópsias excisionais, através das seguintes variáveis:
 - Intensidade de positividade da reação;
 - Frequência de supostas células mioepiteliais positivas;
 - Continuidade da camada de supostas células mioepiteliais;
 - Reação cruzada com outros tipos celulares estromais (miofibroblastos e células musculares lisas de vasos).
- Avaliar quais variáveis/marcadores permitem a distinção entre as diferentes entidades analisadas (tecido mamário normal, papiloma intraductal benigno, papiloma atípico e carcinoma papilífero), nos seguintes dilemas diagnósticos:
 - Papiloma intraductal benigno vs. papiloma atípico
 - Papiloma intraductal benigno vs. carcinoma papilífero
 - Papiloma atípico vs. carcinoma papilífero
- Avaliar a possível contribuição dos novos marcadores mioepiteliais na re-classificação de lesões papilíferas.



CAPÍTULOS

Capítulo 1

Artigo 1- p63 and CD10: reliable markers in discriminating benign sclerosing lesions from tubular carcinoma of the breast?

Referência:

de Moraes Schenka NG, Schenka AA, de Souza Queiroz L, de Almeida Matsura M, Alvarenga M, Vassallo J. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2006 Mar;14(1):71-7.

p63 and CD10: Reliable Markers in Discriminating Benign Sclerosing Lesions From Tubular Carcinoma of the Breast?

Natalia Guimarães de Moraes Schenka, MD,* André Almeida Schenka, MD,*
Luciano de Souza Queiroz, PhD,* Marisa de Almeida Matsura, BS,
Marcelo Alvarenga, PhD and José Vassallo, PhD*

Abstract: The immunohistochemical detection of myoepithelial cells in benign sclerosing lesions of the breast is useful in distinguishing them from tubular carcinoma. So far, this detection has been carried out using antibodies against cytoskeletal proteins, such as alpha-smooth muscle actin (1A4) and calponin. However, the specificity of these markers has been questioned since they may be expressed in stromal myofibroblasts and vascular smooth muscle. Recently, two novel myoepithelial markers have been described: the nuclear protein p63, a member of the p53 family, and the surface antigen CD10, also known as common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA). The authors assessed the use of p63 and CD10 in the differential diagnosis between benign sclerosing lesions, such as sclerosing adenosis and radial scar, and tubular carcinoma, in comparison to the traditional myoepithelial markers 1A4 and calponin. p63, CD10, 1A4, and calponin were expressed in myoepithelial cells of all benign lesions and were consistently negative in all cases of tubular carcinoma. In contrast to cytoskeletal proteins, p63 and CD10 were mostly confined to myoepithelial cells and thus were more specific than the traditional counterparts. However, 1A4 was more intensely expressed and more reproducible than the novel markers. In conclusion, p63 and CD10 may be used as a complement to 1A4 in distinguishing benign sclerosing lesions from tubular carcinoma of the breast.

Key Words: p63, CD10, myoepithelial cells, benign sclerosing lesions of the breast, tubular carcinoma

(Appl Immunohistochem Mol Morphol 2006;14:71-77)

The normal ductal and lobular system of the breast is lined by two distinct cell layers: one of epithelial nature (the inner or luminal layer) and an outer layer composed of myoepithelial cells (MECs). Such double-

layered architecture is also present in epithelial proliferations such as radial scars/complex sclerosing lesions and sclerosing adenosis and is a marker of benignity.²

Radial scars and other complex sclerosing lesions are composed of a central zone of fibroelastosis with small irregular entrapped benign double-layered tubules and lobules, admixed with a range of benign epithelial alterations such as adenosis, apocrine metaplasia, and florid hyperplasia. On the other hand, sclerosing adenosis is characterized by a compact proliferation of compressed and distorted benign double-layered lobules usually surrounded by some degree of fibrosis, nearly always retaining a lobulated configuration, and sometimes showing areas of apocrine metaplasia and microcalcifications.³

The most important differential diagnosis to be considered when studying these lesions is tubular carcinoma.³⁻⁵ In both radial scar and sclerosing adenosis, the stellate and "pseudoinvasive" configuration given by the distorted tubules and lobules may closely mimic tubular carcinoma, thus representing a challenge for surgical pathologists. In this context, the identification of MECs is crucial once tubular carcinoma is composed of a single layer of well-differentiated malignant epithelial cells.

The identification of MECs may be difficult on morphology alone since they are not always easily identifiable in hematoxylin and eosin (H&E).^{4,5} In cases of diagnostic difficulty, particularly in limited samples like core needle biopsies,³ immunohistochemical (IHC) markers are fundamental in the identification of MECs and consequently in the distinction between benign and malignant entities.⁶⁻¹⁵

So far, the IHC detection of MECs has relied on antibodies against cytoskeletal proteins such as alpha-smooth muscle actin and calponin. Although they have been reported as highly sensitive markers of mammary MECs, they can be also expressed in stromal myofibroblasts (SMFs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs). These cells may be closely apposed to malignant tubular structures, simulating benignity.^{4,5,16}

Recently, two novel myoepithelial markers have been proposed: the nuclear protein p63 and the surface antigen CD10. The former is a member of the p53 family, related to the maintenance of epithelium-specific stem cells, it has been suggested to be superior to all traditional myoepithelial markers in terms of sensitivity

Received for publication August 2, 2004; accepted September 16, 2004.
From the *Department of Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil; and wLaboratory of Experimental Pathology, Women's Hospital, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Reprints: José Vassallo, Departamento de Anatomia Patológica, FCM-UNICAMP, Caixa Postal 6111, CEP 13084-971, Campinas-SP, Brazil (e-mail: glaujv@fcm.unicamp.br).

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

and specificity.^{17–19} The latter, also known as common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), was only recently shown in nonhematopoietic tissues.²⁰ To our knowledge, only one publication has investigated the expression of this marker in MECs, and it suggested that CD10 could highlight these cells better than smooth muscle actin.²⁰

In most publications^{16–24} these molecules have been studied in a pool of mammary specimens (including normal parenchyma and benign and malignant lesions). These studies have stressed the capacity of these antibodies to identify MECs, leaving the question open as to whether they can distinguish between benign and malignant lesions. Thus, the value of p63 and CD10 in current diagnostic practice awaits investigation.

The purpose of our study was to evaluate p63 and CD10 in the differential diagnosis of benign sclerosing lesions and tubular carcinoma by comparing their sensitivity and specificity, and contrasting them with those of the routinely used myoepithelial markers 1A4 and calponin. Sensitivity in this context is defined as the ability of the marker to demonstrate MECs in formalin-fixed breast specimens.²⁶ Specificity is defined as the degree to which the marker distinguishes between MECs and other cells likely to be found in the vicinity of ductal/lobular structures (ie, SMFs and VSMCs).¹⁶

MATERIALS AND METHODS

Case Selection/Tissues

We evaluated histologic sections from 30 difficult breast lesions seen in consultation at the State University of Campinas (UNICAMP), Brazil, between January 2000 and 2004. Specimens included 10 cases of sclerosing adenosis (all excisional biopsies), 10 cases of radial scar (3 core and 7 excisional biopsies), and 10 cases of tubular carcinoma (1 core and 9 excisional biopsies). All cases were reviewed by two consultant breast pathologists to confirm the previous histologic diagnosis of radial scar, sclerosing adenosis, and tubular carcinoma. A representative paraffin block from each case of excisional biopsy was selected so that in addition to the lesion, there was at least a small amount of benign breast parenchyma in each section, serving as internal positive control.

Morphology and IHC

All specimens had been previously formalin-fixed and paraffin-embedded. Deparaffinized 4- to 5- μ m sections of the selected blocks were rehydrated and either

stained with H&E or subjected to antigen retrieval, optimized for each antibody as summarized in Table 1 (along with antibody specifications and staining protocols). Sequential slides from each case were incubated for 2 hours at room temperature with each primary antibody, thoroughly washed, and treated for 30 minutes with ready-to-use Envision (DAKO, Carpinteria, CA), and using standard manual procedures. The reactions were developed with diaminobenzidine (DAB) as chromogen. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody, whereas benign breast parenchyma in each section served as an internal positive control. Additional biologically positive controls were also run with each batch of slides.

Scoring of Immunoreactivity Patterns

All H&E-stained and immunostained slides were reviewed by at least two observers (N.G.M.S., M.A., A.A.S.), with the scoring results released by consensus. The reactivity of each antibody was assessed separately on myoepithelia (inside and outside the lesions), stromal cells (fibroblasts/myofibroblasts), vascular smooth muscle, and luminal epithelial cells in each case and was assigned a score of negative (0), 1 (25% of target cells positive), 2 (26–75%), or 3 (76–100%). In addition, the intensity of positivity was qualitatively classified as absent (0), low (+), moderate (++), or high (+++).

RESULTS

The immunostaining patterns of 1A4, calponin, and CD10 in MECs were very similar, showing a membrane/cytoplasmic pattern, whereas p63 showed a selective nuclear pattern.

CD10 was strong (+++) and diffusely positive (>75%) in MECs of normal lobules and acini. While no VSMCs were immunostained for CD10, rare SMFs were weakly positive. Similarly, p63 was intensely positive in more than 75% of normal ductal/lobular MECs but consistently negative in both VSMCs and SMFs. 1A4 was strongly (+++) and diffusely (>75%) expressed in MECs of normal breast parenchyma in all cases but also consistently and strongly expressed in VSMCs and scattered SMFs. Antibodies to calponin did not react with all MECs surrounding benign ducts and acini, ranging from 25% to 75%. The intensity of immunostaining for calponin was also weaker compared with 1A4. The same variable pattern of positivity and intensity was also observed in VSMCs and SMFs (Tables 2, 3 and 4).

TABLE 1. Staining Protocol

Antibody (clone)	Clonality	Company/Product No.	Antibody Dilution	Antigen Retrieval
ASMA ¹ (1A4)	mc ²	DAKO/M0851	1:50	10 mM citrate buffer, pH 6.0, at 100°C, 30

ASMA, alpha smooth muscle actin; mc, monoclonal.

Calponin (CALP)	mc	DAKO/M3556	1:50	Proteinase K, 1:500 in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 30 ⁰
p63 (4A4)	mc	DAKO/M7247	1:50	10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, 30 ⁰
CD10 (56C6)	mc	Serotec/MCA1806	1:80	10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, 30 ⁰

TABLE 2. Myoepithelial Markers in Sclerosing Adenosis (n = 10)

Ab	MEC Inside Lesion		MEC Outside Lesion		SMF/F		VSMC		Luminal Epithelium	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
1A4	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	2 (n = 8)	+++ (n = 8)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
Calp	2 (n = 1)	+	2 (n = 1)	++ (n = 5)	1 (n = 8)	+++ (n = 8)	+	2 (n = 1)	++ (n = 1)	0 (n = 10)
	3 (n = 9)	++ (n = 6)	3 (n = 9)	+++ (n = 5)	2 (n = 1)	+++ (n = 8)	3 (n = 9)	+++ (n = 9)		
p63	3 (n = 10)	+++ (n = 3)	3 (n = 10)	++ (n = 7)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
		+++ (n = 3)		+++ (n = 3)						
CD10	3 (n = 10)	++ (n = 2)	3 (n = 10)	++ (n = 3)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
		+++ (n = 8)		+++ (n = 7)						

Ab, antibody; MEC, myoepithelial cell; SMF, stromal myofibroblast; F, fibroblast; VSMC, vascular smooth muscle cell; S, score; I, intensity.

In all cases of sclerosing adenosis and radial scar (n = 20), the MECs surrounding all "pseudoinvasive" benign tubules and lobules also reacted strongly (+++) and diffusely for 1A4 (Figs. 1 and 2). VSMCs within these lesions were also strongly and diffusely positive for 1A4, as opposed to SMF, which showed a more focal (25–75%) and less intense (++/+++) immunostaining. Calponin was expressed in MECs of sclerosing adenosis and radial scar diffusely (in >75%), in variable intensity, ranging from weak (+) to strong (+++) but mostly commonly moderate (++) . Some SMFs within these lesions were also focally immunostained for calponin (<25% of stromal cells), with a variable intensity of reaction, but mostly moderate (++) . More than 75% of VSMCs, on the other hand, were strongly positive for this marker (see Tables 2 and 3 and Figs. 1 and 2).

CD10 immunostained a wide range of MECs within benign tubules and lobules of benign sclerosing lesions, in a diffuse fashion (>75%) and with moderate to strong intensity (++/+++). SMFs within these lesions, however, showed only a very weak and focal positivity for CD10 in only three cases of radial scar, and negativity in all cases of sclerosing adenosis.

p63 also immunostained diffusely MECs within the benign distorted tubules of radial scar and sclerosing adenosis (>75%) with moderate to strong intensity (++/+++). SMFs and VSMCs were consistently

negative in all cases (see Tables 2 and 3 and Figs. 1 and 2).

All cases of tubular carcinoma (n = 10) showed a reactive cellular fibroblastic stroma (Fig. 3) in which a considerable proportion of cells reacted with 1A4 and calponin with a strong to moderate intensity (see Table 4 and Fig. 3). In 4 of 10 cases of tubular carcinoma, the myofibroblasts immunostained for 1A4 within the lesion were in close apposition to malignant infiltrating tubules, simulating an MEC layer. Those SMFs were negative for p63 in all cases and weak and focal for CD10 in a single case of tubular carcinoma (see Table 4 and Fig. 3).

Luminal epithelial cells from benign distorted tubular structures and malignant stromal infiltrating tubules were consistently negative for all markers in all benign and malignant cases.

DISCUSSION

Benign sclerosing lesions and malignant invasive tubular carcinoma may show very similar mammographic, macroscopic, and histologic appearances. The tubular structures usually appear compressed and angulated due to fibrosis, causing a "pseudoinvasive" pattern. In such cases, identification of an outer layer of MECs by IHC means is helpful to achieve an accurate diagnosis.^{1–5,16}

Over the past decade, many efforts have been made to establish an ideal myoepithelial marker with

TABLE 3. Myoepithelial Markers in Radial Scar (n = 10)

Ab	MEC Inside Lesion		MEC Outside Lesion		SMF/F		VSMC		Luminal Epithelium	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
1A4	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	2 (n = 9)	++ (n = 1)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
					3 (n = 1)	+++ (n = 9)				
Calp	2 (n = 4)	++ (n = 7)	2 (n = 2)	++ (n = 7)	1 (n = 7)	++ (n = 10)	2 (n = 3)	++ (n = 7)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
	3 (n = 6)	+++ (n = 3)	3 (n = 8)	+++ (n = 3)	2 (n = 3)		3 (n = 7)	+++ (n = 3)		
p63	2 (n = 2)	++ (n = 5)	3 (n = 10)	++ (n = 2)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
	3 (n = 8)	+++ (n = 5)		+++ (n = 8)						
CD10	1 (n = 1)	++ (n = 4)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	0 (n = 7)	0 (n = 7)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
	2 (n = 3)	+++ (n = 6)			1 (n = 3)	1 (n = 3)				
	3 (n = 6)									

Ab, antibody; MEC, myoepithelial cell; SMF, stromal myofibroblast; F, fibroblast; VSMC, vascular smooth muscle cell; S, score; I, intensity.

TABLE 4. Myoepithelial Markers in Tubular Carcinoma (n = 10)

Ab	MEC Inside Lesion		MEC Outside Lesion		SMF/F		VSMC		Luminal Epithelium		
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	
1A4	0 (n = 10)	0 (n = 10)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	2 (n = 10)	+	(n = 1) ++ (n = 7) +++ (n = 2)	3 (n = 10)	+++ (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
Calp	0 (n = 10)	0 (n = 10)	3 (n = 10)	++ (n = 2) +++ (n = 8)	1 (n = 10)	+	(n = 5) +++ (n = 5)	3 (n = 10)	++ (n = 2) +++ (n = 8)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
p63	0 (n = 10)	0 (n = 10)	3 (n = 10)	++ (n = 2) +++ (n = 8)	0 (n = 10)	0	(n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)
CD10	0 (n = 10)	0 (n = 10)	1 (n = 1) 3 (n = 9)	+	(n = 1) ++ (n = 1) +++ (n = 8)	0 (n = 9) 1 (n = 1)	0 (n = 9) +	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)	0 (n = 10)

Ab, antibody; MEC, myoepithelial cell; SMF, stromal myofibroblast; F, fibroblast; VSMC, vascular smooth muscle cell; S, score; I, intensity.

satisfactory sensitivity and specificity.⁶⁻¹⁵ The traditional myoepithelial markers still currently in wide use—calponin, 1A4, and HHF35—have drawbacks because of cross-reactivity with SMFs and VSMCs. This may cause diagnostic difficulties, particularly in the setting of cellular fibrotic and/or vascular stromal responses to

tubular carcinoma, as SMFs and VSMCs lying just adjacent to the basal membrane of tubular structures may be difficult to distinguish from true MECs.

Anti-p63 is a recently described selective nuclear marker that proved to be highly sensitive and specific in identifying MECs both in normal and pathologic breast

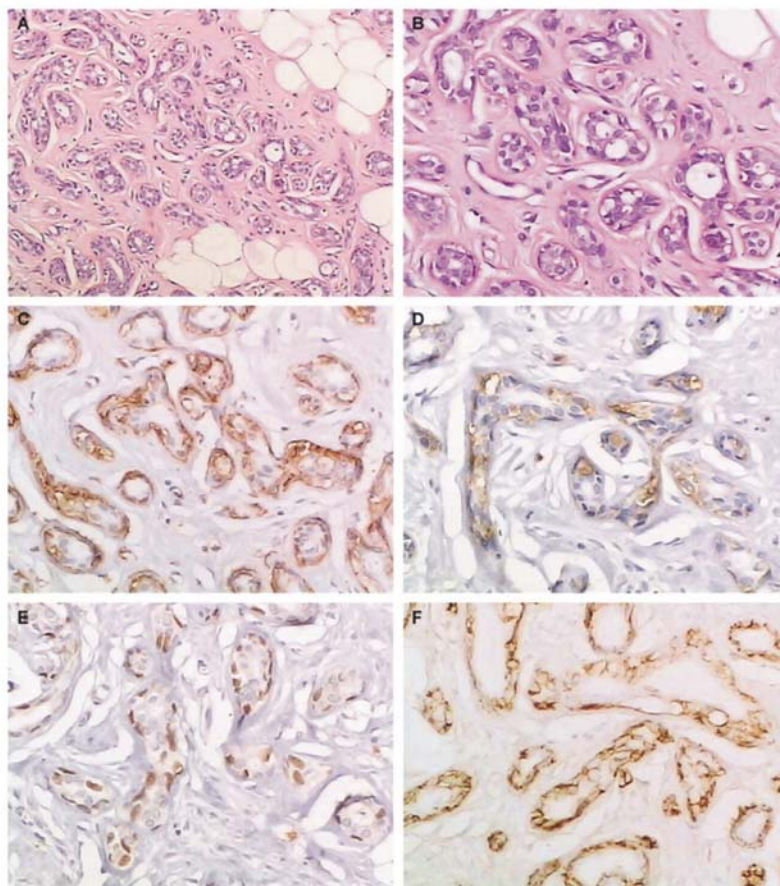


FIGURE 1. Serial sections of a case of sclerosing adenosis. H&E staining (A, B). 1A4 (C), calponin (D), p63 (E), and CD10 (F) were strongly and consistently positive in the MECs of proliferating and distorted tubules.

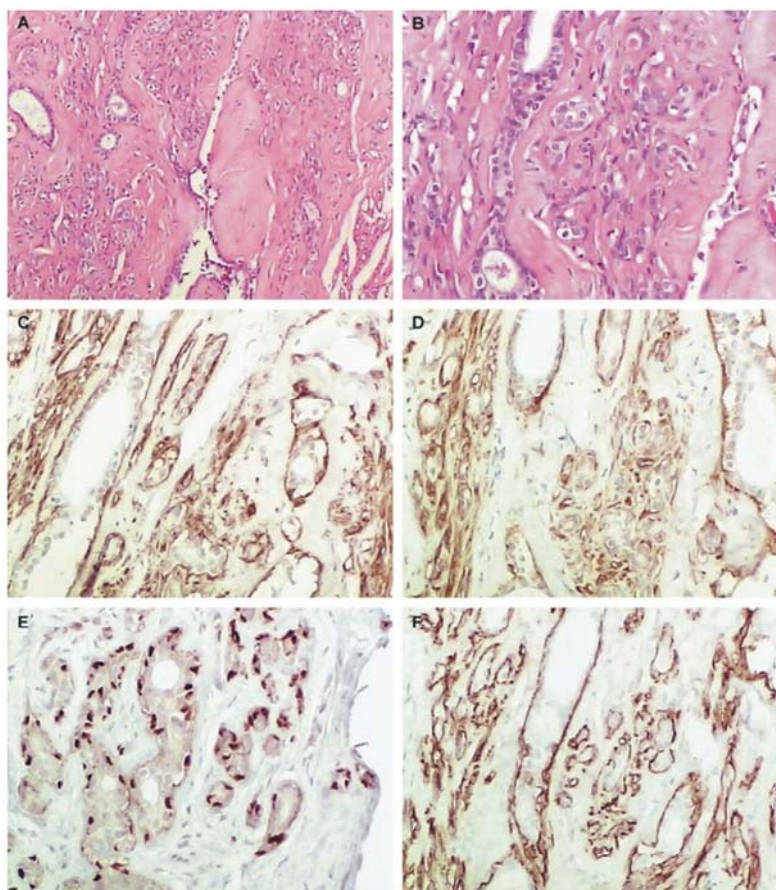


FIGURE 2. Serial sections of a case of radial scar. H&E staining (A, B). 1A4 (C), calponin (D), p63 (E), and CD10 (F) were strongly and consistently positive in the MECs of proliferating and distorted tubules.

tissue, without concurrent staining of SMFs and VSMCs.^{17–19} It has been shown that p63 can react with a small subset of invasive ductal carcinomas, but usually in a minor fraction of neoplastic cells. These findings may suggest that these tumors have a basal/myoepithelial phenotype and may rarely cause diagnostic difficulty.²³ In our study, none of the tubular carcinomas presented p63-positive malignant epithelial cells.

Anti-CD 10 is the most recently described antibody that can also identify breast MECs in normal and pathologic tissue. It seems to offer excellent specificity and sensibility to MECs, being completely negative in VSMCs.^{20–22} Nevertheless, as previously reported²⁰, we have shown that SMFs do show focal and weak positivity for CD10. Given the focality of the phenomenon, however, it should rarely cause any problems of interpretation.

Some studies have addressed p63 and CD10 as markers of MECs in normal breast and in various breast lesions (benign and malignant).^{16–24} So far, there has been little conclusive information on the utility of these novel markers for distinguishing benign sclerosing lesions from

tubular carcinoma. This was the aim of the present study, using commonly employed anti-myoeptithelial antibodies for comparison.

We found that all cases of benign sclerosiologi lesions (n = 20) showed moderate to strong immunostaining of MECs for 1A4, calponin, CD10, and p63 within the lesion. However, 1A4 and calponin reacted variably with myofibroblasts and VSMCs inside and outside the lesion in all cases. On the other hand, p63 and CD10 were consistently negative in myofibroblasts and VSMCs in all cases.

Consistent with previous reports,^{16,17,23,24} of the four markers examined, anti-p63 staining was the best in discriminating MECs from SMFs when compared with CD10 and the traditional cytoskeletal proteins. Antibodies to p63 and CD10 showed at least an equal, if not better, sensitivity for MECs than that of 1A4, but at the same time exhibited a much higher specificity when cross-reactivity with SMFs was taken into consideration.

In contrast to the strong and uniform immunostaining of SMFs by 1A4 and weaker and less uniform immunostaining of SMFs by calponin in the 10 cases of

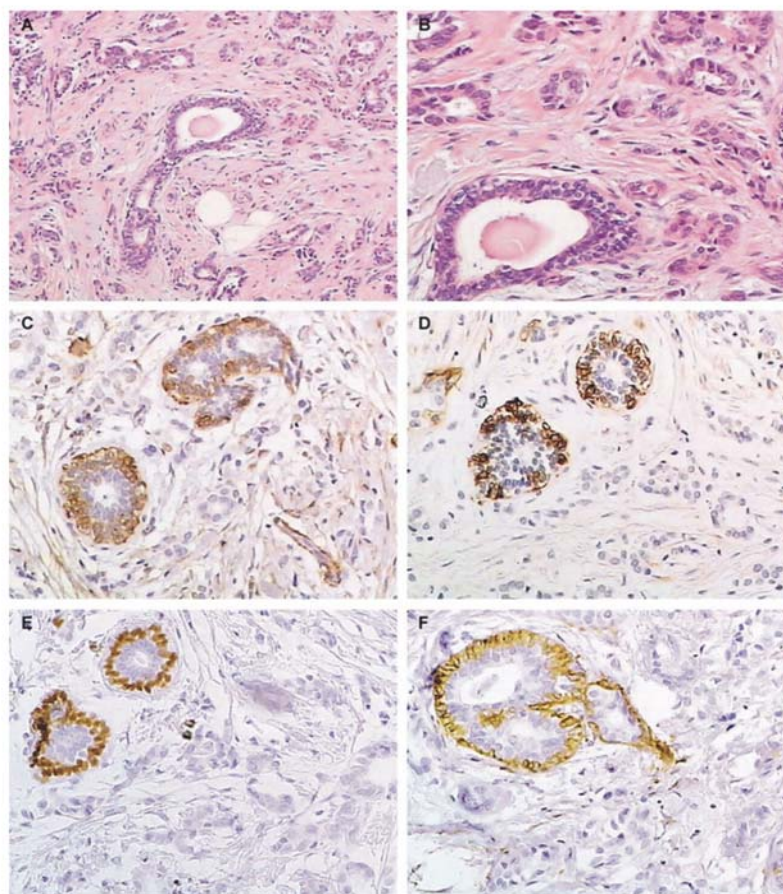


FIGURE 3. Serial sections of tubular carcinoma. H&E staining (A, B). 1A (C), calponin (D), p63 (E), and CD10 (F) were consistently negative in epithelial cells of infiltrating malignant tubules and consistently positive in MECs of remaining normal breast ducts within the tumor used as internal positive control. Note the presence of myofibroblasts in the reactive stroma around the malignant infiltrating tubules, as highlighted by 1A4 and calponin.

tubular carcinoma, the antibody to CD10 interacted with SMFs only rarely and, when positive, stained only very few cells.

Cross-reactivity with SMFs, when using 1A4, was misleading in four cases. At the moment, however, since 1A4 was more intensely positive and reproducible in MECs, we do not advise the use of p63 and CD10 as alternatives to cytoskeletal proteins, but rather as complementary markers.

We also noticed considerable variation in the expression of the different markers for MECs and SMFs, suggesting that they may be composed of immunophenotypically distinct subgroups. Whether such subsets may have different functional roles (in physiologic or pathologic circumstances) is yet to be determined. It would be of great interest for future studies to investigate the co-expression of the MEC traditional and novel markers in an attempt to better characterize these subsets of MECs of the breast, since they are an integral part of benign and some malignant breast lesions.

In conclusion, a safe approach to differentiate difficult benign sclerosing lesions of the breast and their

malignant counterparts should be based on a panel of antibodies including not only anti-1A4, but also anti-p63 and/or anti-CD10.

REFERENCES

1. Tavassoli FA. Pathology of the Breast 2nd ed. New York: MacGraw-Hill; 1999.
2. Tavassoli FA, Devilee P, eds. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC Press; 2003.
3. Kennedy M, Masterson AV, Kerin M, et al. Pathology and clinical relevance of radial scars: a review. Clin Pathol. 2003;56:721-724.
4. Lele SM, Graves K, Gatalica Z, et al. Immunohistochemical detection of maspin is a useful adjunct in distinguishing radial sclerosing lesion from tubular carcinoma of the breast. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2000;8:32-36.
5. Wang NP, Wan BC, Skelly M, et al. Antibodies to novel myoepithelium-associated proteins distinguish benign lesions and carcinoma in situ from invasive carcinoma of the breast. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 1997;5:141-151.
6. Böcker W, Bier B, Broomelkamp B, et al. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin collagen IV and laminin. Part I: Normal breast and benign proliferative lesions. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1992;421:315-322.

7. Moll R. Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation *Acta Histochem Suppl.* 1991;41:117–127.
8. Nagle RB, Bockä W, Davis JR, et al. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1986;34:869–881.
9. Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments *Annu Rev Biochem* 1988;57:593–625.
10. Moinfar F, Man YG, Lininger RA, et al. Use of keratin 34 bE12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type-benign and malignant intraductal proliferations. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:1048–1058.
11. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, et al. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast diseases *Clin Pathol.* 1995;48:26–32.
12. Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982;31:11–24.
13. Raju UB, Lee MW, Zarbo RJ, et al. Papillary neoplasia of the breast: immunohistochemically defined myoepithelial cells in the diagnosis of benign and malignant papillary breast neoplasms *Mod Pathol.* 1989;2:569–576.
14. Egan MJ, Newman J, Crocker J, et al. Immunohistochemical localization of S100 protein in benign malignant conditions of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 1987;111:28–31.
15. Jarasch ED, Nagle RB, Kaufmann M, et al. Differential diagnosis of benign epithelial proliferations and carcinomas of the breast using antibodies to cytokeratins. *Hum Pathol.* 1988;19:276–289.
16. Werling RW, Hwang H, Yaziji H, et al. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:82–90.
17. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1054–1060.
18. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, et al. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis *Nature.* 1999;398:708–713.
19. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8:494–501.
20. Moritani S, Kushima R, Sugihara H, et al. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections *Mod Pathol.* 2002;15:397–405.
21. Zhang RR, Man YG, Vang R, et al. A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers *Breast Cancer Res* 2003;5:R151–R156.
22. Popnikolov NK, Ayala AG, Graves K, et al. Benign myoepithelial tumors of the breast have immunophenotypic characteristics similar to metaplastic matrix-producing and spindle cell carcinomas *Am J Clin Pathol.* 2003;120:161–167.
23. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, et al. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 2003;443:122–132.
24. Ribeiro-Silva A, Zamzelli Ramalho LN, Garcia SB, et al. Is p63 reliable in detecting microinvasion in ductal carcinoma in situ of the breast? *Pathol Oncol Res* 2003;9:20–23.

Capítulo 2

Artigo 2- Use of p63 and CD10 in the differential diagnosis of papillary neoplasms of the breast (Submetido a The Breast Journal – TBJ00203-2006)

Use of p63 and CD10 in the differential diagnosis of papillary neoplasms of the breast

Natália Guimarães de Moraes Schenka¹ M.D., André Almeida Schenka¹ M.D. Ph.D, Luciano de Souza Queiroz¹ M.D. Ph.D., Marisa de Almeida Matsura² B.S., José Vassallo¹ M.D. Ph.D., Marcelo Alvarenga² M.D. Ph.D.

¹Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

²Laboratory of Experimental Pathology, Women's Hospital, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to: Natália Guimarães de Moraes Schenka M.D., Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, Caixa Postal 6111, CEP 13084-971, Campinas – SP, Brazil, Phone/Fax: 00-55-19-3289-3897. E-mail: nataliamoraes@hotmail.com

E-mails: schenka@hotmail.com, gradanat@fcm.unicamp.br, marisamatsura@uol.com.br, glaujv@fcm.unicamp.br, alvarengamarcelo@uol.com.br

Key words: 1A4, calponin, p63, CD10, myoepithelial cells, breast, papilloma, atypical papilloma, papillary carcinoma, immunohistochemistry.

Running title: Immunomarkers in papillary neoplasms of the breast

Abstract

Introduction: Papillary neoplasms of the breast represent a complex spectrum ranging from benign to malignant lesions. The myoepithelial cell (MEC) layer is generally continuous in papillomas and increasingly discontinuous to absent in atypical and malignant counterparts. Identification of MECs can be difficult on morphological grounds alone and currently relies on immunomarkers. **Methods:** We investigated the potential role of the novel immunomarkers p63 and CD10 in 20 papillary lesions and compared them with 1A4 and calponin. In 18 cases, adjacent normal breast tissue was available for study. **Results:** All four markers were diffusely positive in all samples of normal tissue and benign papillomas indicating similar sensitivity in the identification of MECs. Intense positivity was found in 100% of the cases with 1A4 and CD10, but in only 76% with calponin and in 60,5% with p63; the differences were statistically significant ($p < 0.05$), suggesting that the former two render more reproducible results. The most specific markers were p63 and CD10 which showed cross-reactivity in 0% and in up to 33% of the cases, respectively. 1A4 and calponin showed diffuse cross-reactivity in all cases. When assessing benign vs. atypical papillomas, the best parameters were diffuse positivity using CD10 or p63, and continuous MEC layer, mainly using CD10. When comparing benign papillomas with carcinomas all parameters were equally useful with 1A4 and CD10. Regardless of the marker, intense positivity was the only parameter that could distinguish atypical papillomas from papillary carcinomas. p63 staining, which renders a nuclear and mostly discontinuous reactivity, was not as useful as the other markers when the parameter continuous MEC layer was evaluated. **Conclusions:** Although CD10 seems to combine the highest specificity and reproducibility with a good sensitivity, reproducibility of 1A4 is higher. Thus, a minimum panel for immunodetection of MEC to assess papillary lesions should include both markers. Although p63 is the most specific marker, its nuclear and discontinuous pattern of staining may lead to erroneous diagnosis, especially in the differentiation between benign papillomas and atypical/malignant lesions.

Introduction

Papillary neoplasms of the breast are relatively uncommon and can be defined as epithelial proliferations supported by fibrovascular stalks with or without an intervening myoepithelial cell (MEC) layer¹⁻³. They form a spectrum encompassing benign, indeterminate and malignant entities. Despite lack of consensus as regards terminology, the following are generally recognized: 1) intraductal (benign) papilloma, 2) atypical intraductal papilloma, 3) intracystic papillary carcinoma, and 4) invasive papillary carcinoma¹.

Papillary neoplasms may represent a challenge for pathologists in defining benign or malignant behavior²⁻⁵. One of the most important tasks is to properly characterize MECs⁴⁻⁶. A continuous layer of MECs is generally expected in benign lesions, such as intracystic papillomas, whereas decreased numbers or absence of these cells usually characterize intermediate and malignant counterparts¹⁻⁶. It is often difficult to identify these cells with routine stains (*e.g.*, H&E), particularly in limited samples like core needle biopsies^{4,7,8}. Another problem lies in determining the cutoff point at which the number of MECs exceeds acceptable criteria for carcinoma². For these reasons, immunohistochemical markers have become fundamental for identification of MECs^{1,2,4,6,8} and therefore in the evaluation of malignancy.

Over the past 20 years few studies have addressed the capacity of immunohistochemical markers to identify MECs and to help distinguishing papillary lesions of the breast. S100 protein⁹⁻¹⁰, calponin¹¹, and p75 neurotrophin receptor¹² have been used, but none have permitted clear distinction between benign and malignant. Smooth muscle actin (1A4)¹³ has been reported as a highly sensitive marker of mammary MECs and has allowed correct discrimination in most instances^{2,6-8}. However 1A4 can be also expressed in stromal myofibroblasts (SMF) and vascular smooth muscle cells (VSMC) present in the fibrovascular core of papillary lesions and which may be closely apposed to the lining epithelium, simulating a MEC layer and, thus, benignity¹⁴.

Two novel markers have shown to be more specific for MECs: the nuclear protein p63 and the surface antigen CD10. The former is a member of the p53 family, related to the maintenance of epithelium-specific stem cells, and has been found superior to all traditional MEC markers regarding sensitivity and specificity¹⁵. The latter, also known as Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA), was only recently demonstrated in nonhematopoietic tissues¹⁴. They were found useful in diagnostic dilemmas, such as benign sclerosing lesions vs tubular carcinoma¹⁶ and could improve diagnosis of papillary lesions.

In most publications¹⁴⁻²⁴ these molecules have been studied in a pool of mammary specimens (including normal parenchyma, benign and malignant lesions). Only two studies have investigated p63 in the differential diagnosis of papillary lesions of the breast and have reached opposite conclusions. Evaluating 48 papillary lesions of the breast, Troxell and coworkers²⁵ favored p63 over smooth muscle actin and calponin because of the greater specificity and lack of background reaction presented by the former. On the other hand, Hill & Yeh²⁶ argued that, being a nuclear marker, p63 creates the impression of a discontinuous layer of MECs. As a membrane marker, CD10 could be more efficient in highlighting continuity of the MEC layer, while featuring a specificity similar to p63. Thus, the value of p63 and CD10 in differential diagnosis of benign and malignant papillary lesions awaits further investigation.

The purpose of the present study is to compare the usefulness of immunostaining with p63, CD10, 1A4 and calponin in delineating the MEC layer in papillary lesions of the breast, and thus to define the most reliable panel for such diagnostic problems.

Material and methods

Case selection/Tissues

Twenty papillary lesions of the breast, some giving rise to diagnostic difficulty, were selected from material examined between January 2000 and December 2004 at our Department of Pathology, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil. Specimens included 11 papillomas (5 typical and 6 atypical; being 10 excisional and 1 core biopsy)

and 9 papillary carcinomas (2 core and 7 excisional biopsies; the latter 3 intracystic and 4 invasive carcinomas). All cases were reviewed by two consultant breast pathologists. Histological parameters assessed were cytological and architectural features, presence or absence of MECs, cellular monotony, necrosis, mitotic count, hyalinization/sclerosis of papillae, and stromal invasion. The lesions were categorized according to published histopathologic criteria¹. A representative paraffin block from each excisional biopsy was selected to contain at least a small amount of benign breast parenchyma to serve as internal positive control for presence of MECs. In two cases, no benign breast parenchyma available.

Morphology and Immunohistochemistry

All specimens had been fixed in formalin and embedded in paraffin. Deparaffinized 4-5µm sections were rehydrated and either H&E stained or subjected to antigen retrieval, optimized for each antibody, as summarized in **Table 1** (along with antibody specifications and staining protocols). Sequential slides from each case were incubated for 2h at room temperature with each primary antibody, thoroughly washed, and then incubated for 30 min with the Envision[®] detection system (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA), using standard manual procedures. The reactions were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA). Negative controls were obtained by omitting the primary antibody, whereas benign breast parenchyma, when available, served as internal positive control. Additional positive controls were also run with each batch of slides.

Qualitative and Semi quantitative analysis

All H&E stained and immunostained slides were reviewed by at least two observers (NGMS, MA or AAS) with the scoring results released by consensus. The following variables were assessed in each lesion and for each marker:

- Intensity of positivity (0= absent to moderate; 1= present and intense);
- Frequency of putative MECs within lesions (i.e., cells situated at the stroma-epithelium interface of the papillary processes) (0= none to most cells; 1= all cells positive);
- Continuity of MEC layer (0= absence or 1= presence of a continuous layer);
- Cross-reaction with other cell types inside and outside lesions (SMF and VSMC): (0= absent; 1= present)

Statistical analysis

The exact Fisher test was used to evaluate the differences among tissue types (normal breast tissue, intraductal papillomas, atypical papillomas and papillary carcinomas) and among MEC markers (1A4, calponin, p63 and CD10).

Results

Normal breast tissue

The expression of traditional and novel MEC markers in normal tissue are summarized in **Table 2**. Benign breast tissue was available for evaluation in 18 cases (n=18). The immunostaining by 1A4, calponin and CD10 in MECs were similar showing a membrane/cytoplasmic pattern, whereas p63 had a selectively nuclear pattern.

1A4 was strongly and diffusely expressed in MECs of normal breast in all cases, but also in VSMC and scattered SMF (100% of the cases). Intense positivity for calponin was detected in 13 of 18 cases (72%). Similar to 1A4, calponin cross-reaction among MECs, VSMC and SMF was seen in all specimens. In all cases, CD10 was intense and diffusely positive within MECs of normal ductular structures. While no VSMC were immunostained for CD10, rare SMF were weakly and focally positive in 3 of 18 cases

(16%). p63, on the other hand, was intensely positive in approximately 61% of normal ductal/lobular MECs, but consistently negative in both VSMC and SMF (See table 2).

The frequency of intense positivity was significantly higher for the traditional marker 1A4 (100%) and the novel marker CD10 (100%), in comparison to calponin (72%) and p63 (61%) ($P= 0.00021$). In addition, p63 staining gave the false impression of a discontinuous MEC layer, as opposed to the other markers which consistently revealed a continuous “sheath” of MECs around ducts and ductules.

Intraductal Papillomas

In spite of the overt morphological differences, no significant change, either in pattern or distribution of positivity (regardless of marker type), was observed among benign papillomas, in comparison to normal surrounding tissue. All markers, except p63, showed membrane/cytoplasmic positivity, disclosing a continuous MEC layer. Also, 1A4 and CD10 exhibited a significantly higher frequency of intense positivity (**Table 2**). MECs in intraductal papillomas are frequently proliferated and sometimes assume an epithelioid phenotype. In such cases, both traditional and novel markers greatly assisted in differentiating proliferated MECs from the adjacent luminal epithelial cells (**Fig. 1**).

Atypical papillomas

Results are presented in **Table 2** and **Figure 2**. A diffuse pattern of staining by traditional and novel MEC markers was observed in approximately 33% and 16% of the cases, respectively. Regardless of the marker and in most cases (67-84%), MECs formed areas of discontinuous layer embracing ducts and ductules. Overall, actin and CD10 were still present with a higher frequency of intense expression, as previously described in normal tissue and benign papillomas.

Papillary carcinomas

Cross-reaction among MECs and stromal elements was noted for 1A4 and calponin in all cases. On the other hand, cross-reaction with CD10 was focal in only 3/9 cases (33%) (See **Table 2**). Differences in the frequency of cross-reaction among traditional markers and CD10 were statistically significant ($p<0,01$). No cross-reaction was observed with p63.

Intense positivity for 1A4 and calponin in cells closely apposed to the epithelium was observed in 2 of 9 cases of papillary carcinoma (22%) (**Table 2**). In the first case (**Fig. 3 – m,n,o,p**), an excisional biopsy, 1A4 and calponin revealed a continuous layer of juxtaposed cells. Such cells could not be unequivocally designated either as MECs or stromal mimickers, because of lack of gold standard, but we considered them as MECs since in this case both p63 and CD10, putatively the more specific markers, were also positive. In addition, p63 was diffuse and moderately positive in the case mentioned above, where the layer of periductal cells was, as usual, discontinuous. Considering the other case (core biopsy), 1A4 and calponin were intensely positive, showing a continuous layer of cells. The novel markers, on the other hand, were completely negative in such lesion, and the positive cells were considered to be cross-reaction with SMF and VSMC (**Fig. 3 – i,j,k,l**).

Luminal epithelial cells from papillary structures in benign, atypical and malignant lesions were consistently negative for all markers (**Figs.1,2 and 3**). All cases of invasive papillary carcinomas (n=4) were uniformly negative for p63. Stromal positivity was also noticed for CD10 in invasive papillary carcinomas, weakly and focally (3 of 4 cases).

Specific diagnostic dilemmas

Intraductal papillomas X Atypical papillomas. Significant differences were observed between these groups concerning the variables “diffuse positivity” ($p=0,015$) and “presence of continuous MEC layer” ($p=0,015$). Benign papillomas were more likely to show diffuse positivity for MECs and a continuous MEC layer than atypical papillomas.

Only CD10 allowed demonstration of such differences, whereas p63 permitted distinction only regarding “diffuse positivity” ($p=0,015$). 1A4 and calponin could not demonstrate such differences ($p=0,061$).

Benign papillomas X Papillary carcinomas. Significant differences were observed concerning the variables “diffuse positivity”, “presence of continuous MEC layer” and “frequency of intense positivity”. Benign papillomas were more likely to show intense positivity with 1A4 and CD10 and diffuse positivity within MECs, regardless of immunomarker. In addition, all markers (except p63) were helpful in this differential diagnosis identifying a continuous MEC layer within the benign papilloma group.

Atypical papillomas X Papillary carcinomas. Differences between these groups were observed only when the variable “frequency of intense positivity” (1A4 and CD10 $p=0,07$ - p63 $p=0,044$) was considered, regardless of the marker. Differences identified using the other variables were not statistically significant.

Discussion

In the present study, we investigated the potential role of the novel MEC markers p63 and CD10 in differential diagnosis of the main breast papillary lesions: benign papillomas, atypical papillomas and papillary carcinomas. After a brief qualitative analysis, each diagnostic dilemma (benign *vs* atypical papillomas, atypical papilloma *vs* papillary carcinoma and benign papilloma *vs* papillary carcinoma) was assessed separately using a full panel of MEC immunomarkers (traditional and novel) and different parameters (“intense positivity”, “diffuse positivity” and “continuity of MEC layer”). This is the first study to test these novel markers and compare their usefulness in these specific diagnostic problems.

The ideal marker for MECs should have highest sensitivity, specificity and reproducibility. These parameters, however, can only be assessed directly if an established gold standard or defining characteristic of the cell of interest were available. To the best of our knowledge, such defining features have not as yet been characterized for MECs, at least

on histological/histochemical grounds. Given the lack of such gold standard(s), in the present study sensitivity, specificity and reproducibility were assessed indirectly, through some of the variables that influence them. Sensitivity, for example, was analyzed through “diffuse positivity”, while specificity was determined by cross-reactivity with stromal simulators (MFBs and VSMCs). Cross-reaction is particularly worrisome in papillary lesions, since the rich fibrovascular core of the papillary processes may mimic a preserved MEC layer, leading to an erroneous diagnosis of benignity. Reproducibility was assessed by the ability of the marker to render a uniform positivity (preferably intense) throughout the samples.

In all cases of normal tissue and benign papillomas, where MECs are supposed to be preserved, traditional and novel markers gave diffuse positivity in putative MECs, indicating that all have similar sensitivities. On the other hand, when compared to calponin and p63, 1A4 and CD10 were consistently intense in all normal tissues and benign lesions, which makes the latter more reproducible than the former. The more intense an immunoreaction for a given marker, the easier to characterize a lesion, and the higher the probability of consistent staining in different specimens. Concerning specificity, in spite of similar sensitivity and intensity of positivity, CD10 presented less cross-reaction with stromal mimickers (focal in 0-33% of the cases) than 1A4 (diffuse in all cases), regardless of tissue or lesion. p63 showed the highest specificity, since it did not stain any stromal cell.

When addressing the above specified dilemmas, some parameters and markers were significantly better than others in distinguishing between the entities. When assessing benign vs atypical papillomas, the best parameters were “diffuse positivity” (using either CD10 or p63) and “presence of continuous MEC layer” (using mainly CD10). When confronting benign papillomas with papillary carcinomas, all parameters were equally useful, using 1A4 or CD10. Regardless of the marker, “frequency of intense positivity” was the only parameter able to distinguish atypical papillomas from papillary carcinomas.

p63 staining, which was nuclear and mostly discontinuous, was particularly unhelpful whenever the parameter “presence of continuous MEC layer” was important for diagnosis, which was the case in differentiating benign papillomas from other entities.

CD10 proved versatile as the only reliable marker in all diagnostic dilemmas, regardless of the parameter analyzed. It should be emphasized that all parameters and markers differentiated among groups of lesions, whereas between specific cases considerable overlapping may be found.

In two out of nine (22%) papillary carcinomas (one excisional and one core biopsy) a considerable number of non-epithelial periductal cells were found to express the traditional MEC markers. In the first case (excisional biopsy), these cells could also be disclosed by CD10 and p63. Although in both cases the cells could not be rigorously assigned as MECs (since no gold standard is available), we considered them as such in the first case, based on concordance of all markers. Paradoxically, even considering the identification of a continuous benign-like MEC layer pattern in this case, it was still classified as papillary carcinoma, because it presented an important morphological criterion for malignancy, that is, epithelial atypical proliferation resembling low grade ductal carcinoma *in situ* in more than 90% of the lesion.

Some pitfalls must be anticipated in the histopathological assessment of papillary lesions. First, when using a panel of traditional markers only, more cases may be underdiagnosed as benign or atypical papillomas based on the presence of MECs, especially when epithelial atypia is difficult to categorize. In our study, two of nine papillary carcinomas were diagnosed as having MECs by 1A4 and calponin staining, whereas with a full panel, only one was likely to contain those cells. Second, even with a full panel, one should never underestimate the importance of basic morphological evaluation. Back to our example, at least one case could have been underdiagnosed as atypical papilloma if the immunohistochemical-based identification of MECs were the sole criterion for ruling out carcinoma.

If the diagnosis of atypical papilloma in surgical specimens is difficult, in core biopsies it is even more problematic⁷⁻⁸. Some authors suggest that all papillary lesions seen on core biopsy require surgical excision to exclude atypical papilloma or papillary carcinoma²⁷⁻²⁸. Other studies^{8,29} support that benign papillary lesions can be easily diagnosed by core biopsies especially with help of MEC markers and that only atypical lesions should be excised. Our study did not address this issue, but we did observe considerable morphological heterogeneity in some papillary lesions and a great range of

positivity with different MEC markers. Therefore, we agree with the necessity of excision of every papillary lesion diagnosed by core biopsy for full histological investigation.

In conclusion, although CD10 seems to combine the highest specificity and reproducibility with good sensitivity, our results support that reproducibility of 1A4 staining cannot be neglected. Thus, a minimum panel of MEC markers to assess papillary lesions should include both. Although p63 may be considered the most specific marker, its discontinuous pattern of staining is quite challenging and may lead to erroneous diagnosis especially in differentiating benign papillomas from atypical/malignant lesions. Immunohistochemical detection of MECs should not be the sole criterion to rule out malignancy, but instead must be used in concert with other morphological variables.

List of abbreviations

MEC myoepithelial cell

H&E Hematoxylin and Eosin

1A4 smooth muscle actin

SMF stromal myofibroblast

VSMC vascular smooth muscle cell

CALLA common acute lymphoblastic leukemia antigen

DAB 3-3' diaminobenzidine

Acknowledgements

The Brazilian National Research Council (CNPq) supported the present study and provided a research grant to JV. This study was also supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fapesp, grant no. 2004/09500-7.

References

1. Tavassoli FA, Devilee P: *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003.
2. Tavassoli FA: *Pathology of the breast*. New York: McGraw-Hill; 1999.
3. Azzopardi JG: **Papilloma and papillary carcinoma**. In: *Problems in Breast Pathology*. Edited by Azzopardi JG. Philadelphia: WB Saunders; 1979:150-166.
4. Putti TC, Pinder SE, Elston CW, Lee AHS, Ellis IO: **Breast pathology practice: most common problems in a consultation service**. *Histopathology* 2005, **47**:445-57.
5. Maluf HM, Koerner FC: **Solid papillary carcinoma of the breast**. *Am J Surg Pathol* 1995, **19**:1237-44.
6. Papotti M, Eusebi V, Gugliotta P, Bussolati G: **Immunohistochemical analysis of benign and malignant papillary lesions of the breast**. *Am J Surg Pathol* 1983, **7**:451-61.
7. 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**:320-7.
8. Ivan D, Selinko V, Sahin AA, Sneige N, Middleton LP: **Accuracy of core needle biopsy in assessing papillary breast lesions: histologic predictors for malignancy**. *Mod Pathol* 2004, **17**:165-71.
9. Egan MJ, Newman J, Crocker J, Collard M: **Immunohistochemical localization of S-100 protein in benign and malignant conditions of the breast**. *Arch Pathol Lab Med* 1987, **111**:28-31.

10. Raju UB, Lee MW, Zarbo RJ, Crissman JD: **Papillary neoplasia of the breast: immunohistochemically defined myoepithelial cells in the diagnosis of benign and malignant papillary breast neoplasms.** *Mod Pathol* 1989, **2**:569-76.
11. Mosunjac MB, Lewis MM, Lawson D, Cohen C: **Use of a novel marker, calponin, for myoepithelial cells in fine-needle aspirates of papillary breast lesions.** *Diagn Cytopathol* 2000, **23**:151-5.
12. Popnikolov NK, Cavone SM, Schultz PM, Garcia FU: **Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) as a marker of breast myoepithelial cells.** *Mod Pathol* 2005, **18**:1535-41.
13. Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G: **Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody.** *J Histochem Cytochem* 1988, **36**:659-63.
14. Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T: **Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections.** *Mod Pathol* 2002, **15**:397-405.
15. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C: **p63, a p53 homologue is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast.** *Am J Surg Pathol* 2001, **25**:1054-60.
16. de Moraes Schenka NG, Schenka AA, de Souza Queiroz L, de Almeida Matura M, Alvarenga M, Vassallo J. **p63 and CD10: reliable markers in discriminating benign sclerosing lesions from tubular carcinoma of breast?** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006, **14**:71-7.
17. Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM: **Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain.** *Am J Surg Pathol* 2003, **27**:82-90.
18. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A: **p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis.** *Nature* 1999, **398**:708-13.

19. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C: **p63 expression profiles in human normal and tumor tissues.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:494-501.
20. Zhang RR, Man YG, Vang R, Saenger JS, Barner R, Wheeler DT, Liang CY, Vinh TN, Bratthauer GL: **A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**:R151-6.
21. Popnikolov NK, Ayala AG, Graves K, Gatalica Z: **Benign myoepithelial tumors of the breast have immunophenotypic characteristics similar to metaplastic matrix-producing and spindle cell carcinomas.** *Am J Clin Pathol* 2003, **120**:161-7.
22. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F, Schmitt FC: **Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray.** *Virchows Arch* 2003, **443**:122-32.
23. Ribeiro-Silva A, Zamzelli Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S: **Is p63 reliable in detecting microinvasion in ductal carcinoma in situ of the breast?** *Pathol Oncol Res* 2003, **9**:20-3.
24. Kalof AN, Tam D, Beatty B, Cooper K: **Immunostaining patterns of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth muscle myosin heavy chain.** *J Clin Pathol* 2004, **57**:625-9
25. Troxell ML, Masek M, Sibley RK. **Immunohistochemical markers in papillary lesions of the breast [abstract].** *Modern Pathol* 2002, **15**:54A(abstract 213).
26. Hill CB, Yeh IT: **Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions: from intraductal papillomas to invasive papillary carcinomas.** *Am J Clin Pathol* 2005, **123**:36-44.
27. Puglisi F, Zuiani C, Bazzocchi M, Valent F, Aprile G, Pertoldi B, Minisini AM, Cedolini C, Londero V, Piga A, Di Loreto C: **Role of mammography, ultrasound and large core biopsy in the diagnostic evaluation of papillary breast lesions.** *Oncology* 2003, **65**:311-5.

28. 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**:1095-110.
29. Agoff SA, Lawson TJ: **Papillary lesions of the breast with and without atypical ductal hyperplasia: can we accurately predict benign behavior from core needle biopsy?** *Am J Clin Pathol* 2004, **122**:440-3.

Table 1- Primary antibodies used in the present study and details of dilution and antigen retrieval methods

Antibody (clone)	Clonality	Supplier/ product no.	Antibody dilution	Antigen retrieval
ASMA ¹ (1A4)	mc ²	DAKO/ M0851	1:50	10mM citrate buffer, pH 6.0, at 100° C, 30'
Calponin (CALP)	mc	DAKO/ M3556	1:50	Proteinase K, 1:500 in 0.05 M Tris-HCl, pH7.6, 30'
p63 (4A4)	mc	DAKO/ M7247	1:50	10mmol/L Tris buffer, 1mmol/L EDTA, pH9.0, 30'
CD10 (56C6)	mc	Serotec/ MCA1806	1:80	10mmol/L Tris buffer, 1mmol/L EDTA, pH9.0, 30'

1: Alpha Smooth Muscle Actin; 2: monoclonal

Table 2- Expression of traditional and novel MEC markers in normal breast tissue (n=18), benign papillomas (n=5), atypical papillomas (n=6) and papillary carcinomas (n=9). N= 38.

Marker	Tissue type	Intense positivity (%)	Diffuse positivity (%)	Continuous MEC layer (%)	Cross-reaction (%)
1A4	Normal	100	100	100	100
	Benign papilloma	100	100	100	100
	Atypical papilloma	100	33	33	100
	Papillary carcinoma	22	22	11	100
calponin	Normal	72	100	100	100
	Benign papilloma	80	100	100	100
	Atypical papilloma	67	33	33	100
	Papillary carcinoma	22	22	11	100
p63	Normal	61	100	0	0
	Benign papilloma	60	100	0	0
	Atypical papilloma	50	16	0	0
	Papillary carcinoma	0	11	0	0
CD10	Normal	100	100	100	16
	Benign papilloma	100	100	100	0
	Atypical papilloma	100	16	16	16
	Papillary carcinoma	11	11	11	33

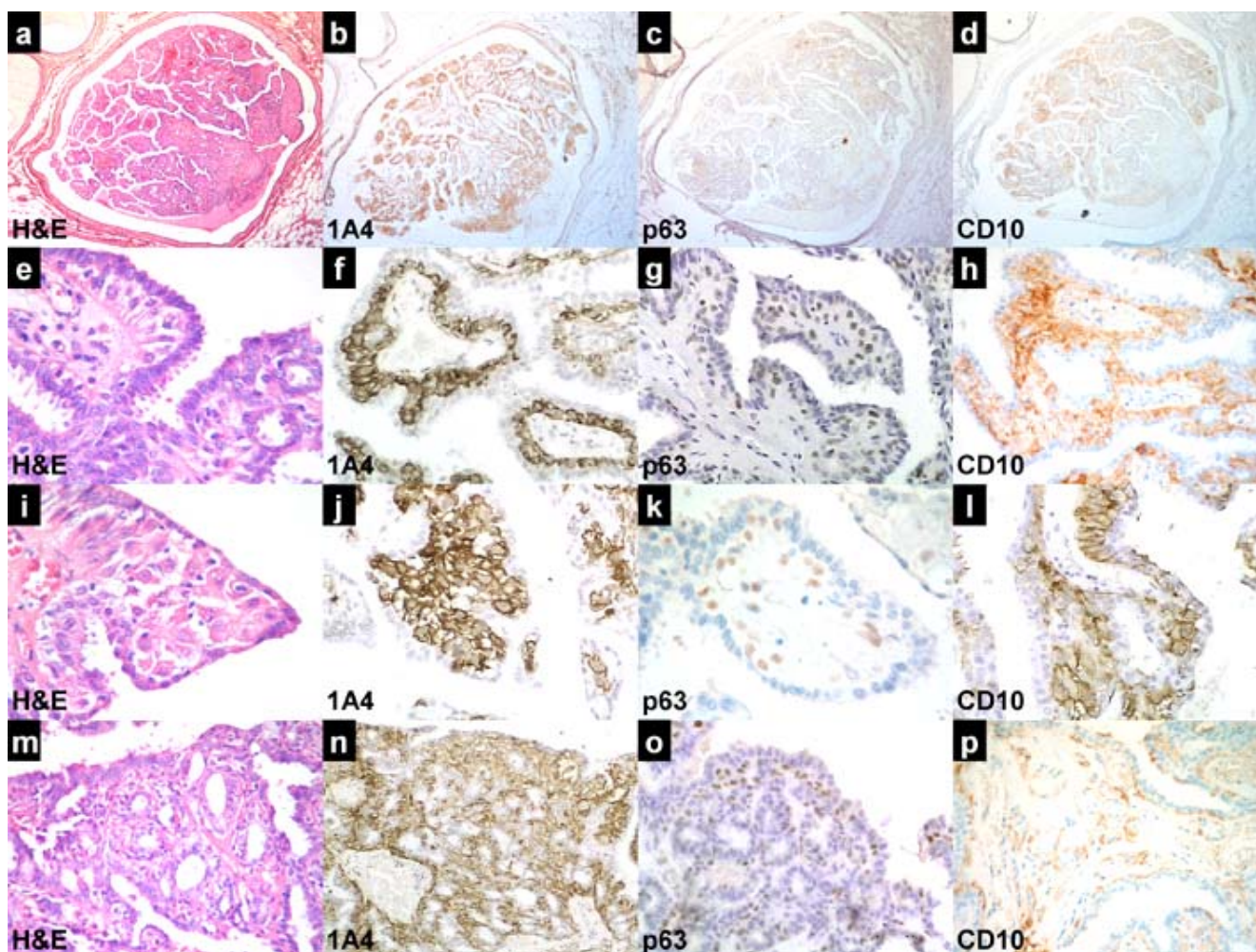


Figure 1 – Serial sections of a benign papilloma stained with H&E (a,e,i,m), 1A4 (b,f,j,n), p63 (c,g,k,o) and CD10 (d,h,l,p). Low power view (a-d, 5X, original magnification). High power fields presenting morphological variability within the same lesion (e-p, 100X, original magnification): typical papillary structures with a single MEC layer (e-h), benign proliferations of myoid MECs (i-l) epithelial ductal structures within a papillae (m-p).

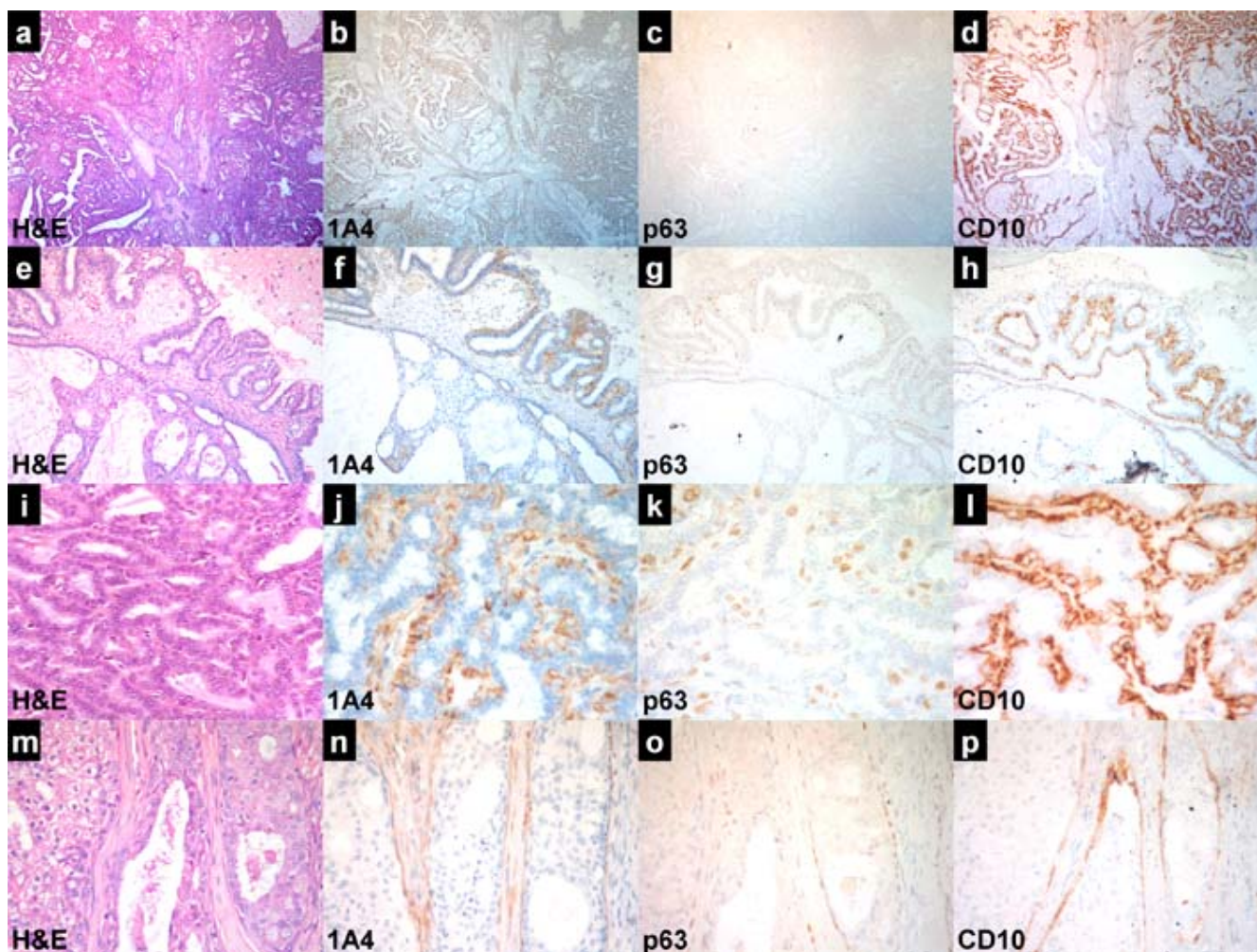


Figure 2 – Serial sections of an atypical papilloma stained with H&E (a,e,i,m), 1A4 (b,f,j,n), p63 (c,g,k,o) and CD10 (d,h,l,p). Low power view (a-d, 5X, original magnification). High power fields (e-p, 100X original magnification) disclosing: typical papillary structures with minimal epithelial proliferation on the tips (e-h), areas of benign ductal proliferation within the lesion (i-l), and a focal area of monotonous epithelial proliferation with nuclear atypia and cribriform architecture resembling low grade ductal carcinoma *in situ* (m-p). Note the characteristic staining of stromal cells with 1A4 (n), but not with p63 (o) and CD10 (p).

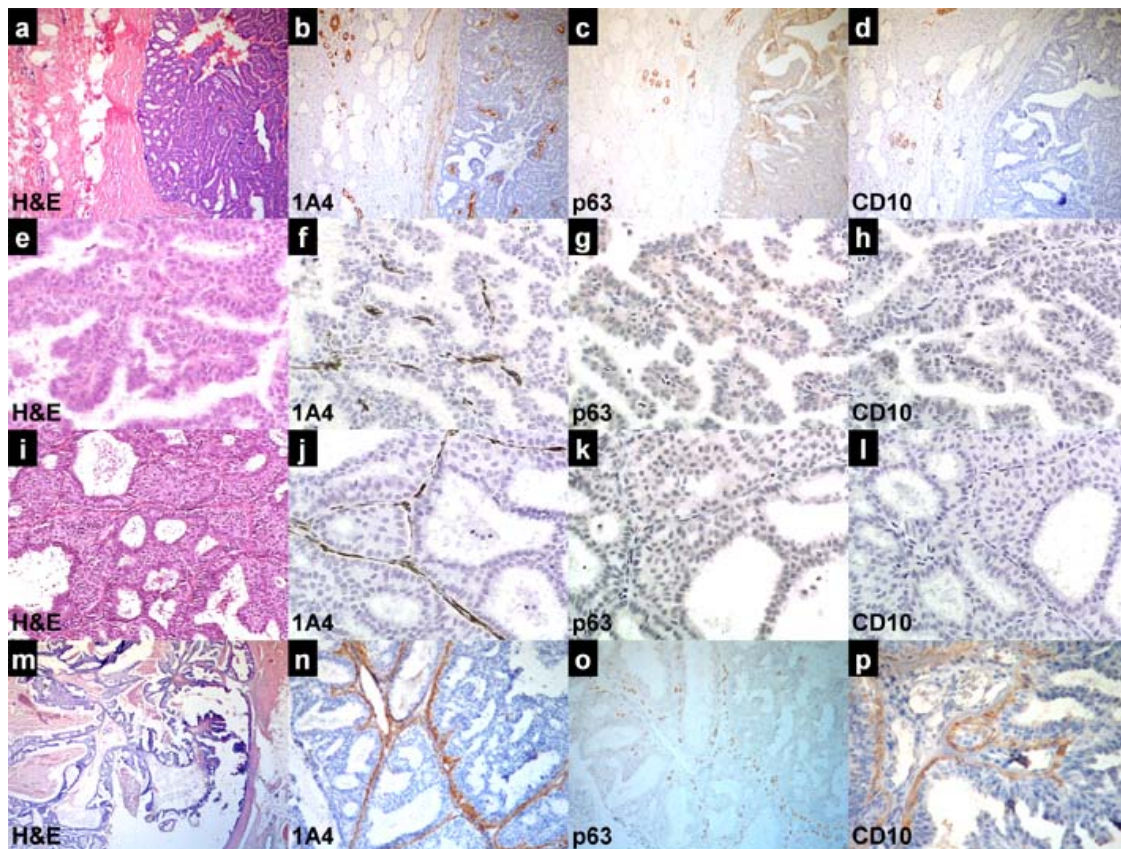


Figure 3 – Serial sections illustrating different cases of papillary carcinoma. Low (**a-d**, 5X) and high (**e-h**) power fields displaying the usual staining pattern of 1A4 (**b,f**), p63 (**c,g**) and CD10 (**d,h**) in normal (**a-d**) and neoplastic tissue (**a-h**). Note that 1A4 (but not p63 or CD10) clearly highlights the vascular structures within papillary cores. Since the vascular structures are not juxtaposed to the epithelial lining, such cross-reaction with 1A4 is not expected to cause any diagnostic problems. In the second case (**i-l**), however, the proximity of 1A4-positive vessels with the epithelial layer could be misleading if the marker had been interpreted alone. Finally, in the last example (**m-p**), all markers disclosed the presence of MECs layer beneath the atypical epithelial proliferation of every papillary structure (a true case of papillary carcinoma with MECs).



DISCUSSÃO GERAL

As células mioepiteliais ocupam uma posição estratégica no tecido mamário normal, entre o estroma e o lúmen, numa situação ideal para participar e controlar muitas das ações engendradas por células luminais (**Lakhani & O'Hare, 2001; Deugnier *et al.*, 2002**). Em situações fisiológicas, a célula mioepitelial atua na contração de estruturas acinares e ductais, levando assim a ejeção da secreção láctea (**Lakhani & O'Hare, 2001**).

Mesmo em situações patológicas, a interação entre os dois tipos celulares não parece se desintegrar por completo: freqüentemente observamos que a anomalia em um subtipo se faz acompanhar de uma alteração (semelhante ou diversa) no outro subtipo, indicando a existência de um provável equilíbrio dinâmico entre células luminais e mioepiteliais. A hiperplasia glandular (adenose esclerosante, papilomatose), por exemplo, geralmente é acompanhada pela hiperplasia de células mioepiteliais (**Popnikolov *et al.*, 2003**).

A identificação das células mioepiteliais da mama é de grande importância em patologia cirúrgica, já que esta camada está sempre presente e contínua em lesões benignas (cicatriz radiada, lesões esclerosantes complexas, adenose esclerosante, papilomas), descontínua em carcinoma ductal *in situ* e geralmente ausente em lesões malignas como o carcinoma tubular e o papilífero. Infelizmente, a identificação destas células pela morfologia (i.e. H&E) pode ser muito difícil, sendo necessário o uso dos marcadores imunoistoquímicos mioepiteliais (**Wang *et al.*, 1997; Tavassoli, 1999; Lele *et al.*, 2000; Rosen, 2001; Werling *et al.*, 2003**). Até o momento, contudo, nenhum marcador mostrou-se, isoladamente, sensível e específico o bastante para auxiliar de maneira fidedigna no diagnóstico diferencial acima exposto. No presente trabalho, dois novos marcadores (p63 e CD10) foram testados e comparados aos marcadores tradicionalmente empregados em patologia cirúrgica, em dilemas diagnósticos específicos: (1) lesões esclerosantes benignas vs. carcinoma tubular e (2) neoplasias papilíferas.

No contexto das lesões esclerosantes benignas vs. carcinoma tubular, nossos dados revelaram que os novos marcadores se diferenciam dos tradicionais principalmente em relação à especificidade, sendo mais específicos do que estes, a despeito da sensibilidade semelhante. A propósito, cumpre destacar que, na ausência de um padrão ouro de diagnóstico de célula mioepitelial, não foi possível a utilização das definições “estatísticas”

de sensibilidade e especificidade. Neste trabalho, assim como por outros autores (**Werling *et al.*, 2003**), sensibilidade foi definida como a habilidade do marcador de identificar as células mioepiteliais no tecido mamário fixado em formalina. A especificidade foi definida como o grau em que o marcador consegue distinguir células mioepiteliais de outras células estromais que podem estar justapostas às estruturas ductais/lobulares. Neste sentido, além de ser mais específico que os marcadores tradicionais, o p63 também parece ser mais específico que o CD10. Contudo esta discreta diferença não parece acarretar problemas de interpretação diagnóstica, uma vez que a reação cruzada observada com o CD10 foi um evento raro e focal neste estudo. Apesar de mais específicos, os novos marcadores foram tecnicamente menos reprodutíveis que os tradicionais, mostrando significativa variabilidade na intensidade de positividade da reação. Portanto, até o momento, advogamos o uso combinado dos marcadores tradicionais e novos diante deste diagnóstico diferencial.

As neoplasias papilíferas da mama representam um dilema diagnóstico mais complexo que o exposto acima. Isto ocorre na medida em que não é a mera presença de células mioepiteliais que definem o comportamento da lesão, mas sua frequência e capacidade de formar camada contínua, em conjunto com outros critérios morfológicos (atipia citológica e arquitetural). Em função desta complexidade no processo de classificação destas lesões, obtivemos conclusões diferentes do que no trabalho anterior.

Neste estudo, o CD10 mostrou uma combinação de uma maior especificidade e reprodutibilidade com uma boa sensibilidade. Apesar de ser o mais específico de todos os marcadores, o p63 apresentou a menor sensibilidade. Conforme previamente relatado (**Hill & Yeh, 2005**), seu padrão nuclear de positividade cria uma impressão de uma camada de células mioepiteliais variavelmente interrompida mesmo em tecido normal e lesões benignas, prejudicando, a avaliação do parâmetro continuidade da camada mioepitelial, que é um dos principais critérios diagnósticos. Da mesma forma que no contexto lesões esclerosantes/carcinoma tubular, o marcador 1A4 segue como o mais reprodutível tecnicamente com a vantagem de ser mais comumente disponível nos laboratórios de imunoistoquímica. Assim sendo, no caso das neoplasias papilíferas, defendemos o uso combinado do CD10 com o 1A4.

A considerável variação na frequência e intensidade de positividade para os diferentes marcadores de células mioepiteliais observada nas diferentes entidades morfológicas avaliadas em ambos os estudos, sugere que a co-expressão de diferentes marcadores talvez não ocorra em todas as células mioepiteliais. Assim, estas poderiam ser divididas em subgrupos não apenas morfológica, mas imunofenotipicamente distintos. Permanecem, contudo, dúvidas: seria esta ausência de co-expressão um achado real? Seria um artefato causado pelo fato de que os marcadores foram avaliados em níveis de corte diferentes? Outros autores como **Zhang *et al.* (2003)** sugerem que estes subtipos de células mioepiteliais podem ser funcionalmente distintos e contribuir de maneira diferente nos diversos contextos fisiológicos e patológicos da mama.

Em resumo, as conclusões divergentes dos estudos que compõem o corpo desta tese ilustram a importância de se testar novos marcadores em dilemas diagnósticos específicos e não em um conjunto de amostras pouco expressivas de lesões mamárias variadas. Ressalta-se ainda que, além de contribuir para a busca crítica de um marcador mioepitelial ideal, o presente trabalho também contribui para a discussão acerca das variações imunomorfológicas das células mioepiteliais e seu possível significado funcional. Dentro desta perspectiva, dado que os marcadores existentes não podem ser considerados ideais, segundo estudos atuais, deve-se continuar a busca para validar a aplicação dos novos marcadores no diagnóstico diferencial de outras lesões mamárias difíceis, orientar o seu uso sob uma ótica racional e econômica, e, finalmente, esclarecer o papel das células mioepiteliais na fisiopatogênese de inúmeras lesões da mama.



CONCLUSÕES

Resumidamente, o primeiro artigo demonstra que:

- ❖ No problema diagnóstico lesões esclerosantes benignas vs. carcinoma tubular, bem como em tecido mamário normal, os novos marcadores p63 e CD10 mostraram-se mais específicos na identificação de células mioepiteliais que os marcadores tradicionais 1A4 e calponina.
- ❖ Quando comparado ao p63, o marcador CD10 mostrou-se discretamente menos específico, ao ser expresso em miofibroblastos estromais, em raros casos. Contudo, sendo fraca e focal, esta reação não ocasionou problemas de interpretação.
- ❖ O marcador 1A4 mostrou baixa especificidade na identificação de células mioepiteliais (o que, em quatro casos, culminaria em uma interpretação diagnóstica inadequada), apresentando, porém, uma positividade mais intensa e tecnicamente mais reprodutível que os demais marcadores.

Assim,

- ❖ Na avaliação de casos difíceis de lesões esclerosantes benignas vs. carcinoma tubular, em rotina de patologia cirúrgica, recomenda-se a utilização de um painel de anticorpos que combine a reprodutibilidade do anti-1A4 com a especificidade do anti-p63 e do anti-CD-10.

Com relação ao segundo artigo, pode-se concluir que:

- ❖ No contexto diagnóstico das neoplasias papilíferas, o marcador CD10 mostrou a melhor relação especificidade e reprodutibilidade, preservando uma boa sensibilidade.
- ❖ Apesar da alta especificidade, o marcador p63 mostrou a menor sensibilidade na identificação de células mioepiteliais. Além disso, seu padrão nuclear de imunoexpressão resulta na impressão de camada mioepitelial descontínua, prejudicando o diagnóstico diferencial entre lesões benignas e atípicas/malignas.

- ❖ Assim como no trabalho anterior, o marcador 1A4 apresentou a positividade mais intensa e tecnicamente reprodutível.

Assim,

- ❖ Na avaliação de neoplasias papilíferas, especialmente em biópsias de pequena amostragem como biópsias de fragmento (“core biopsies”), o painel imunoistoquímico deve incluir o marcador CD10 em conjunto com o 1A4. Este painel combinado torna-se mais seguro na medida em que pode contribuir na re-classificação das entidades.
- ❖ Além disso, o painel imunoistoquímico não deve ser utilizado isoladamente na avaliação de uma lesão papilífera, mas de forma complementar à impressão morfológica inicial, já que critérios importantes como atipia citológica e arquitetural não podem ser negligenciados, sendo fundamentais para a classificação precisa das neoplasias papilíferas.
- ❖ Os novos marcadores podem fornecer uma boa contribuição na re-classificação de lesões papilíferas estudadas inicialmente apenas com os marcadores tradicionais.

Finalmente,

- ❖ Notou-se, em ambos os trabalhos, uma variação considerável para todos os marcadores na frequência e intensidade de positividade de expressão nas células mioepiteliais. Este dado sugere a existência de subgrupos não apenas morfológica, mas também imunofenotipicamente distintos de células mioepiteliais.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Adler DD, Helvie MA, Oberman HA, Ikeda DM, Bhan AO. Radial sclerosing lesions of the breast: mammographic features. *Radiology* 1999; 176(3):737-40.

Andersen JA, Carter D, Linell F. A symposium on sclerosing duct lesions of the breast. *Pathol Annu* 1986;21 Pt 2:145-79.

Anderson TJ, Battersby S. Radial scars of benign and malignant breasts: comparative features and significance. *J Pathol* 1985;147(1): 23-32.

Azzopardi JG. *Problems in Breast Pathology*. Philadelphia: WB Saunders; 1979.

Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C. p63, a p53 homologue is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 2001;25(8):1054-60.

Bocker W, Bier B, Freytag G, Brommelkamp B, Jarasch ED, Edel G, et al. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part I: Normal breast and benign proliferative lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421(4):315-22.

Bonser GM, Dossett JA, Jull JW. *Human and Experimental Breast Cancer*. London: Pittman Medical; 1961.p.269-83.

Chan JK, Ng WF. Sclerosing adenosis cancerized by intraductal carcinoma. *Pathology* 1987;19(4):425-8.

Ciatto S, Morrone D, Catarzi S, Del Turco MR, Bianchi S, Ambrogetti D, et al. Radial scars of the breast: review of 38 consecutive mammographic diagnosis. *Radiology* 1993;187(3):757-60.

Dawson EK. Fibrosing adenosis; a little recognised mammary picture. *Edinburgh Med J* 1954;61(12):391-401.

de la Torre M, Lindholm K, Lindgren A. Fine needle aspiration cytology of tubular breast carcinoma and radial scar. *Acta Cytol* 1994;38(6):884-90.

Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* 2002;4(6):224-30.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):494-501.

Douglas-Jones AG, Pace DP. Pathology of R4 spiculated lesions in the breast screening programme. *Histopathology* 1997;30(3):214-20.

Douglas-Jones A, Shah V, Morgan J, Dallimore N, Rashid M. Observer variability in the histopathological reporting of core biopsies of papillary breast lesions is reduced by the use of immunohistochemistry for CK5/6, calponin and p63. *Histopathology* 2005;47(2):202-8.

Elson BC, Helvie MA, Frank TS, Wilson TE, Adler DD. Tubular carcinoma of the breast: mode of presentation, mammographic appearance, and frequency of nodal metastases. *AJR Am J Roentgenol* 1993;161(6):1173-6.

Fechner RE. Lobular carcinoma in situ in sclerosing adenosis. A potential source of confusion with invasive carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1981;5(3):233-9.

Fenoglio C, Lattes R. Sclerosing papillary proliferations in the female breast. A benign lesion often mistaken for carcinoma. *Cancer* 1974;33(3):691-700.

Fisher ER, Palekar AS, Kotwal N, Lipana N. A nonencapsulated sclerosing lesion of the breast. *Am J Clin Pathol* 1979;71(3):240-6.

Fisher ER, Palekar AS, Sass R, Fisher B. Scar cancers: pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4) – IX. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3(1):39-59.

Foote FW Jr, Stewart FW. Comparative studies of cancerous versus noncancerous breast. *Ann Surg* 1945;121:197-222.

Frouge C, Tristant H, Guinebretiere JM, Meunier M, Contesso G, Di Paola R, et al.

Mammographic lesions suggestive of radial scars: microscopic findings in 40 cases. *Radiology* 1995;195(3):623-5.

Gottlieb C, Raju U, Greenwald KA. Myoepithelial cells in the differential diagnosis of complex benign and malignant breast lesions: an immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1990;3(2):135-40.

Greaves MF, Hariri G, Newman RA, Sutherland DR, Ritter MA, Ritz J. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* 1983 61(4):628-39.

Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G. Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. *J Histochem Cytochem* 1988;36(6):659-63.

Hamperl H. Radial scars (scarring) and obliterating mastopathy (author's transl) *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1975;369(1):55-68.

Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. *J Clin Pathol* 1995;48(1):26-32.

Hill CB, Yeh IT: Myoepithelial cell staining patterns of papillary breast lesions: from intraductal papillomas to invasive papillary carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005;123(1):36-44.

Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch* 2002;440(6):589-93.

^aJacobs TW, Byrne C, Colditz G, Connolly JL, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1999;340(6):430-6.

^bJacobs TW, Schnitt SJ, Raza S, Connolly JL. Radial scars in breast biopsies: pathologic features and clinical importance. *Pathol Case Rev* 1999;4(5):194-8.

Jacobs TW, Schnitt SJ, Tan X, Brown LF. Radial scars of the breast and breast carcinomas have similar alterations in expression of factors involved in vascular stroma formation. *Hum Pathol* 2002;33(1):29-38.

Jensen RA, Page DL, Dupont WD, Rogers LW. Invasive breast cancer risk in women with sclerosing adenosis. *Cancer* 1989;64(10):1977-83.

Kalof AN, Tam D, Beatty B, Cooper K. Immunostaining patterns of myoepithelial cells in breast lesions: a comparison of CD10 and smooth myosin heavy chain. *J Clin Pathol* 2004;57(6):625-9.

Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell – Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res* 2001;3(1):1-4.

Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Kotliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(3):999-1003.

Lefkowitz M, Lefkowitz W, Wargotz ES. Intraductal (intracystic) papillary carcinoma of the breast and its variants: a clinicopathological study of 77 cases. *Hum Pathol* 1994;25(8):802-9.

Lele SM, Graves K, Gatalica Z. Immunohistochemical detection of maspin is a useful adjunct in distinguishing radial sclerosing lesion from tubular carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(1):32-6.

Linell F, Ljungberg O, Andersson I. Breast carcinoma. Aspects of early stages, progression and related problems. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1980;(272):1-233.

MacErlean DP, Nathan BE. Calcification in sclerosing adenosis simulating malignant breast calcification. *Br J Radiol* 1972;45(540):944-5.

Maluf HM, Koerner FC. Solid papillary carcinoma of the breast. A form of intraductal carcinoma with endocrine differentiation frequently associated with mucinous carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19(11):1237-44.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398(6729):708-13.

Moinfar F, Man YG, Lininger AR, Bodian C, Tavassoli FA. Use of keratin 34 β E12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type-benign and malignant intraductal proliferations. *Am J Surg Pathol* 1999; 23(9):1048-58.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31(1):11-24.

Moll R. Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. *Acta Histochem Suppl* 1991;41:117-27.

Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. *Mod Pathol* 2002;15(4):397-405.

Mosunjac MB, Lewis MM, Lawson D, Cohen C. Use of a novel marker, calponin, for myoepithelial cells in fine-needle aspirates of papillary breast lesions. *Diagn Cytopathol* 2000;23(3):151-5.

Nagle RB, Bocker W, Davis JR, Heid HW, Kaufmann M, Lucas DO, et al. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1986;34(7):869-81.

Nielsen BB. Adenosis tumor of the breast-- a clinicopathological investigation of 27 cases. *Histopathology* 1987;11(12):1259-75.

Nielsen M, Jensen J, Andersen JA. An autopsy study of radial scar in the female breast. *Histopathology* 1985;9(3):287-95.

Pavlakakis K, Zoubouli C, Liakakos T, Messini I, Keramopoulos A, Athanassiadou S, et al. Myoepithelial cell cocktail (p63+SMA) for the evaluation of sclerosing breast lesions. *Breast* [on-line] 2005 Dec 26 [acesso em 4 de março de 2006]. Disponível em: URL:<http://www.sciencedirect.com>

Popnikolov NK, Ayala AG, Graves K, Gatalica Z. Benign myoepithelial tumors of the breast have immunophenotypic characteristics similar to metaplastic matrix-producing and spindle cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2003;120(2):161-7.

Popnikolov NK, Cavone SM, Schultz PM, Garcia FU. Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod Pathol* 2005;18(12):1535-41.

Rosai J. Breast. In: Rosai J (Ed). *Ackerman's Surgical Pathology*. 6th ed. St. Louis: Mosby; 1981.p.1087-1149.V.2.

Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ* [on-line] 2006 Mar 24 [acesso em 5 de março de 2006]. Disponível em: URL:<http://www.nature.com>

Ruiz-Sauri A, Almenar-Medina S, Callaghan RC, Calderon J, Llombart-Bosch A. Radial scar versus tubular carcinoma of the breast. A comparative study with quantitative techniques (morphometry, image- and flow cytometry). *Path Res Pract* 1995;191(6):547-54.

Semb C. Pathologico-anatomical and clinical investigations of fibro-adenomatosis cystica mammae and its relation to other pathological conditions in the mamma, especially cancer. *Acta Chir Scand (Suppl)* 1928;64:1-484.

Shipp MA, Vijayaraghavan J, Schmidt EV, Masteller EL, D'Adamio L, Hersh LB, et al. Common acute Lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 (“enkephalinase”): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(1):297-301.

Sloane JP, Mayers MM. Carcinoma and atypical hyperplasia in radial scars and complex sclerosing lesions: importance of lesion size and patient age. Histopathology 1993;23(3):225-31.

Smith CA, Monaghan P, Neville AM. Basal clear cells of the normal human breast. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1984;402(3):319-29.

Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Ann Rev Biochem 1988;57:593-625.

Symmers WSC. The breasts. In: Symmers WSC (Ed) Systemic Pathology, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1978.p.1791-6.V.4.

Tanaka Y, Oota K. A stereomicroscopic study of the mastopathic human breast. I. Three-dimensional structures of abnormal duct evolution and their histologic entity.

Virchows Arch A Pathol Pathol Anat 1970;349(3):195-214.

Tavassoli FA, Devilee P. (Eds). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003.

Tavassoli FA. Pathology of the breast 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1999.

Taylor HB, Norris HJ. Epithelial invasion of nerves in benign diseases of the breast. Cancer 1967;20(12):2245-9.

Troxell ML, Masek M, Sibley RK. Immunohistochemical markers in papillary lesions of the breast [abstract]. Modern Pathol 2002; 15: 54A [United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting (USCAP), 2002; Chicago].

Tukel S, Kocak S, Aydintug S, Ereku S, Akyar G. Radial Scar and tubular carcinoma of the breast. *Australas Radiol* 1997;41(2):190-2.

Urban JA, Adair FE. Sclerosing adenosis. *Cancer* 1949;2:625-634.

Vazquez MF, Mitnick JS, Pressman P. Radial scar: Cytologic evaluation by stereotactic evaluation. *Breast disease* 1994;7:299-306.

Vega A, Garijo F. Radial scar and tubular carcinoma. Mammographic and sonographic findings. *Acta Radiol* 1993;34(1):43-7.

Wang NP, Wan BC, Skelly M, Frid MG, Glukhova MA, Koteliansky VE, et al. Antibodies to novel myoepithelium-associated proteins distinguish benign lesions and carcinoma in situ from invasive carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem* 1997;5(3):141-51.

Wellings SR, Alpers CE. Subgross pathologic features and incidence of radial scars in the breast. *Hum Pathol* 1984;15(5):475-9.

Werling RW, Yaziji H, Hwang H, Gown AM. Immunohistochemical distinction of invasive from non-invasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 2003;27(1):82-90.

Zhang RR, Man YG, Vang R, Saenger JS, Barner R, Wheeler DT, et al. A subset of morphologically distinct mammary myoepithelial cells lacks corresponding immunophenotypic markers. *Breast Cancer Res* 2003, 5(5):R151-6.



APÊNDICES

APÊNDICE 1

Técnica imunoistoquímica

Marcadores de células mioepiteliais e respectivos controles positivos

- **Anti-1A4/ anti-actina de músculo liso humana** (anticorpo monoclonal murino anti- actina de músculo liso humana). Imunógeno: decapeptídeo sintético N-terminal da actina α de músculo liso. Clone: 1A4. Apresentação: 90g/L de IgG murina. Especificidade: este clone reconhece a actina de músculo liso humana. Padrão de positividade: membrana. Fornecedor: DAKO (código: M0851). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50). Controle positivo: intestino grosso (vasos).
- **Anti-calponina** (anticorpo monoclonal murino anti-calponina). Imunógeno: extrato de útero humano. Clone: CALP. Apresentação: 86ug/ml de IgG1 murina. Especificidade: este clone reconhece uma forma de calponina de 34 kDa presente em extratos de camada média muscular de aorta humana. Padrão de positividade: membrana. Fornecedor: DAKO (código: M3556). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50). Controle positivo: intestino grosso (vasos).
- **Anti-p63:** (anticorpo monoclonal murino anti-p63). Imunógeno: proteína recombinante glutathiona-S-transferase (GST)-p63. Clone: 4A4. Apresentação: 90g/L de IgG murina. Especificidade: identificação de diferentes isoformas de p63, um análogo do gene supressor tumoral p53, presente na camada de células basais da próstata e mioepiteliais da mama, entre outros epitélios. Padrão de positividade: nuclear. Fornecedor: DAKO (código: M7247). Diluição preconizada: 1:50-1:100 (utilizada: 1:50). Controle positivo: epitélio escamoso normal (ectocérvice de colo uterino).

- **Anti-CD10** (anticorpo monoclonal murino anti-CD10). Imunógeno: CD10 humana recombinante. Clone: 56C6. Apresentação: 90g/L de IgG murina. Especificidade: anticorpo monoclonal utilizado na identificação de células B imaturas e de centros germinativos, leucemia linfoblástica e células mioepiteliais da mama. Padrão de positividade: membrana. Fornecedor: Serotec (código: MCA1806). Diluição preconizada: 1:80 (utilizada: 1:80). Controle positivo: amígdala.

Preparo do material histológico

Foram realizadas secções de 4µm a partir dos blocos selecionados para cada caso. Os cortes foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas com solução de organosilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América; cod. A3648). As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imunoistoquímica.

Foram realizadas para cada caso, seis lâminas histológicas. Um estoque de lâminas suplementares foi reservado para o propósito de controle negativo (duas lâminas por bateria de colorações). Além disso, do total de lâminas realizadas, uma lâmina de cada caso foi corada em hematoxilina-eosina (HE), para revisão diagnóstica dos casos estudados.

Reação de imunoperoxidase em material histológico (imunoistoquímica)

As secções foram desparafinizadas em banho de xilol previamente aquecido em estufa a 110° C e, a seguir, em banhos subsequentes de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H₂O₂ a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS.

Todos os cortes histológicos foram submetidos a recuperação antigênica. Os protocolos de recuperação variaram segundo o antígeno em estudo. No caso do marcador 1A4, os cortes foram imersos numa solução de tampão citrato 10mM, pH 6.0, a 100° C (panela vapor T-Fall), por 30 minutos. Para desmascarar a calponina, os cortes foram submetidos a digestão pela Proteinase K em Tris-HCL 0.05M, pH7.6, por 30 minutos. Finalmente, para recuperação antigênica de p63 e CD10, utilizamos uma solução de tampão Tris EDTA (1mmol/L), pH9.0, por 30 minutos.

O anticorpo primário foi gotejado sobre o corte histológico na diluição adequada e incubado durante o dia (*overday*), por 2 horas a temperatura ambiente.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com *EnVision Labeled Polymer Component* (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, Califórnia, Estados Unidos da América) por uma hora a 37° C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação.

Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidrocloro de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500µl de H₂O₂ a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37° C.

O material foi lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, e submetidas a três banhos de xilol, para em seguida serem montadas em lamínulas e resina Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

APÊNDICE 2

Planilha de coleta de dados

Posit.: 0 = 0%, 1 = $\leq$ 25%, 2 = 26-75%, 3 = 76-100%.

Ints.: 0, +, ++, +++.

Biópsia: _____; **procedência:** _____.

Dx: _____.

	ME na lesão		ME fora da lesão		MF Estroma		ML vasos		Epit. luminal	
	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int
1A4										
Calp										
p63										
CD10										

OBS.:

Biópsia: _____; **procedência:** _____.

Dx: _____.

	ME na lesão		ME fora da lesão		MF Estroma		ML vasos		Epit. luminal	
	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int
1A4										
Calp										
p63										
CD10										

OBS.:

Biópsia: _____; **procedência:** _____.

Dx: _____.

	ME na lesão		ME fora da lesão		MF Estroma		ML vasos		Epit. luminal	
	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int	Pos	Int
1A4										
Calp										
p63										
CD10										

OBS.:

APÊNDICE 3

Planilha de coleta de dados – Lesões papilíferas

Biópsia: _____.

Diagnóstico Inicial: _____.

MORFOLOGIA (H&E)	Lesão papilífera
Arquitetura (papilífero, sólido, cribriforme)	
Monotonia celular	
Atipia citológica	
Grau nuclear	
Necrose (10cga)	
Mitoses	
Presença de CMEs	
Hialinização/esclerose da papila	
Invasão estromal	

IHQ	Intensidade de positividade (0/1)	Frequência de supostas CMEs	Camada contínua (0/1)	Reação cruzada (0/1)
1A4				
Calp				
p63				
CD10				

Mudança de diagnóstico?: _____.