

**PRISCILA SILVA MARSHALL**

---

---

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE  
MAMAS RADIOLOGICAMENTE DENSAS EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE MAMA**

---

---

**Dissertação de Mestrado**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS**

**Unicamp  
2012**



---

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

---

---

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE  
MAMAS RADIOLOGICAMENTE DENSAS EM PACIENTES COM  
CÂNCER DE MAMA**

---

---

**PRISCILA SILVA MARSHALL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Oncologia Ginecológica e Mamária, sob orientação do Prof. Dr. César Cabello dos Santos.

**Campinas, 2012**

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

M357a Marshall, Priscila Silva, 1981 -  
Aspectos histológicos e imuno-histoquímicos  
de mamas radiologicamente densas em pacientes  
com câncer de mama. / Priscila Silva Marshall. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : César Cabello dos Santos  
Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências  
Médicas.

1. Histologia. 2. Mamografia. 3. Câncer de  
mama. I. Santos, César Cabello dos. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Histological and immunohistochemical features of mammographic dense tissue in breast cancer patients

**Palavra-chave em inglês:**

Histology

Mammography

Breast cancer

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

**Titulação:** Mestre em Ciências da Saúde

**Banca examinadora:**

César Cabello dos Santos [Orientador]

Afonso Celso Pinto Nazário

Júlio César Teixeira

**Data da defesa:** 10-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Tocoginecologia

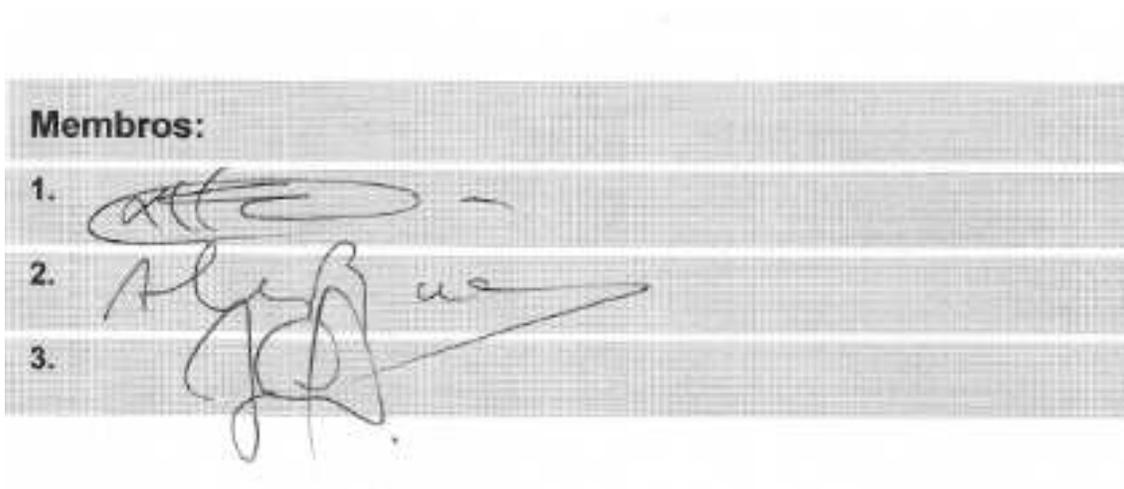
## BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: PRISCILA SILVA MARSHALL

---

Orientador: Prof. Dr. CÉSAR CABELLO DOS SANTOS

---



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

Data: 10/02 /2012

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

*Aos meus pais, Amélia e Paulo  
Ao meu amado Patrick  
Aos meus irmãos e cunhados  
À minha avó Marina  
Aos meus sogros, Carmélia e Zé Pereira*

*Todas são pessoas muito amadas e que já vivenciaram o câncer de mama em suas próprias vidas, como pacientes, pais, filhos ou cônjuges...*

# Agradecimentos

---

*Às mulheres que, mesmo em um momento de dificuldade, foram voluntárias na realização desta pesquisa com o intuito de contribuir para o conhecimento científico.*

*Ao Prof. Dr. César Cabello, que desde o início da minha residência médica orientou meus passos na Mastologia, rumo à busca do conhecimento contínuo para melhor atender os pacientes, os quais muitas vezes confiam-nos suas vidas e todas as suas expectativas, esperando muito mais do que técnica, mas principalmente dedicação e amor; que sempre confiou no meu trabalho e na minha capacidade; que sempre me incentivou, tanto na vida acadêmica quanto na vida profissional.*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga pelo ensino sobre patologia mamária, por toda sua dedicação e todo seu empenho na análise das peças cirúrgicas, lâminas histológicas, imuno-histoquímica e suas fotografias.*

*Ao Prof. Dr. Eduardo Tinois, físico-médico do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Unicamp no início do desenvolvimento de nossa pesquisa – atualmente faz parte do Instituto de Segurança e Tecnologia em Radiação de Campinas –, por toda*

dedicação e empenho no desenvolvimento da técnica de localização não-invasiva das áreas mamárias; pela cumplicidade nas dificuldades encontradas e pela criatividade na elaboração de soluções.

*Ao Prof. Dr. Giuliano Mendes Duarte*, pelas sugestões, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

*Ao Prof. Dr. Renato Zocchio Torresan*, por toda ajuda na elaboração deste projeto, pelas sugestões e todos os ensinamentos.

*À residente de Anatomia Patológica Paola Hesse Poletto*, pela dedicação e empenho na avaliação anatomopatológica das mamas, só interrompida pela chegada da sua querida filha Catarina!

*À equipe de secretaria, residentes, ex-residentes e contratados do Departamento de Anatomia Patológica, em especial aos médicos Ana Gabriela, Larissa, Arthur, João Paulo, JP, Flávia, Aline e à Dra. Renata*, pela ajuda e orientação neste ambiente que era novo para mim.

*À equipe de técnicas e secretárias da Mamografia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM)* pela paciência, dedicação e ajuda sempre que precisei.

*À Sirlei Siani Morais*, estatística que transformou em números nossas ideias e com quem compartilhei angústias e dúvidas.

*A todos os meus professores de residência médica e pós-graduação.*

*À equipe de residentes e ex-residentes de Mastologia do CAISM, em especial Rodrigo, Paulo, Danilo e Cristiane.*

*Aos meus professores de Iniciação Científica, Prof. Dr. José A. R. Gontijo (Clínica Médica) e Profa. Dra. Sophie M. Derchain, com os quais aprendi a dar meus primeiros passos na área de pesquisa.*

*À equipe de secretaria do Departamento de Oncologia do CAISM, pela ajuda e disponibilidade sempre que necessário.*

*A todos os meus amigos pelo incentivo, amizade e apoio sempre.*

*À minha família, pelo amor dedicado, mesmo quando estive ausente e distante, pelo incentivo constante ao meu crescimento profissional e moral e pela orientação quando tive dúvidas e incertezas.*

*A Deus, por todas as oportunidades e todas as pessoas que fazem parte da minha vida.*

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Resumo .....	xi
Summary .....	xiv
1. Introdução .....	17
2. Objetivos .....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. Sujeitos e Métodos .....	32
3.1. Desenho .....	32
3.2. Tamanho Amostral .....	32
3.3. Variáveis.....	32
3.4. Seleção de Sujeitos.....	38
3.5. Técnicas (60, 61, 62, 63).....	39
3.6. Instrumento para Coleta de Dados .....	42
3.7. Coleta de Dados.....	43
3.8. Consentimento Livre e Esclarecido.....	44
3.9. Controle de Qualidade .....	44
3.10. Processamento e Análise dos Dados .....	45
3.11. Aspectos Éticos.....	45
4. Publicação .....	47
4.1. Carta de Encaminhamento.....	47
4.2. Artigo .....	48
5. Conclusões .....	79
6. Referências Bibliográficas .....	80
7. Anexos .....	90
7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados.....	90
7.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94
7.3. Anexo 3 – Carta de aprovação na Comissão de Pesquisa do CAISM .....	95
7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da FCM - UNICAMP .....	96
7.5. Anexo 5 – Apresentação de pôster na VII Jornada Paulista de Mastologia 2011 .....	98

# Símbolos, Siglas e Abreviaturas

---

<b>ADH</b>	– Hiperplasia ductal atípica
<b>ALH</b>	– Hiperplasia lobular atípica
<b>BRCA1</b>	– Gene do câncer de mama 1 ( <i>breast cancer 1</i> )
<b>BRCA2</b>	– Gene do câncer de mama 2 ( <i>breast cancer 2</i> )
<b>CAISM</b>	– Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CD34</b>	– CD34 (glicoproteína transmembrana expressa por células miofibroblásticas – avaliado por imuno-histoquímica)
<b>CEP</b>	– Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CI/IC</b>	– Intervalo de confiança
<b>CYP17</b>	– Enzima do sistema do citocromo P450 envolvida na biossíntese de esteróide
<b>DTG</b>	– Departamento de Tocoginecologia
<b>Ec</b>	– Estádio Clínico
<b>eg.</b>	– por exemplo
<b>et al.</b>	– e colaboradores
<b>ESR-1</b>	– Receptor do estrogênio alfa 1
<b>FEA</b>	– Atipia epitelial plana
<b>FCM</b>	– Faculdade de Ciências Médicas
<b>GH</b>	– Hormônio de crescimento

<b>H.E.</b>	– Hematoxilina e eosina
<b>Ki-67</b>	– Ki-67 (fator de proliferação epitelial expresso em fases G1 e M do ciclo celular, determinado por imuno-histoquímica com o anticorpo Mib-1)
<b>IBIS-1</b>	– <i>International Breast Cancer Intervention Study I</i>
<b>IGF-1</b>	– Fator de crescimento similar à insulina 1
<b>IMC/BMI</b>	– Índice de massa corpórea
<b>OR</b>	– <i>Odds Ratio</i>
<b>PROGINS</b>	– Polimorfismo do gene do receptor de progesterona
<b>RE/ER</b>	– Receptor de estrogênio
<b>RPg/PgR</b>	– Receptor de progesterona
<b>SAS</b>	– <i>Statistical analysis system</i>
<b>SRLP</b>	– Proteoglicanos pequenos ricos em leucina
<b>TIMP-3</b>	– Inibidor tecidual da metaloproteinase 3
<b>UNICAMP</b>	– Universidade Estadual de Campinas
<b>WHO</b>	– <i>World Health Organization</i>

# Resumo

---

**Introdução:** A densidade mamográfica, uma medida da extensão do tecido fibroglandular radiodenso da mama, é um fator de risco independente para o câncer de mama. Fatores de risco já estabelecidos para o câncer de mama como idade ao primeiro parto, paridade e uso hormonal na pós-menopausa, também estão associados com a densidade mamária. Contudo, a base biológica da associação da densidade mamográfica ao risco de câncer de mama ainda não foi determinada. A literatura conhecida sugere que ela esteja associada à presença de proliferação epitelial ou estromal, com uma delas podendo ser a responsável pela associação da densidade com o risco de câncer de mama. **Objetivos:** Avaliar a composição histológica e imuno-histoquímica de áreas densa e não densa de mamas de mulheres submetidas à mastectomia por câncer de mama. **Sujeitos e métodos:** Foi realizado estudo de corte transversal em 18 mulheres com mamas de padrão P1, P2 ou Dy (Wolfe) com carcinoma mamário estágio clínico I ou II ou carcinoma *in situ* com indicação de mastectomia. Suas mamografias foram digitalizadas, sendo localizadas as áreas mais densa, menos densa e tumoral. Cada sujeito também teve sua mama fotografada em 4 posições. Foi utilizada uma técnica

de localização baseada em um método de aproximação linear com interpolação das imagens mamográficas e as fotos da mama. Durante a mastectomia, as áreas selecionadas foram biopsiadas e enviadas para análise anatomopatológica, sendo estudados os seguintes critérios: avaliação macroscópica (tamanho das áreas, proporção de tecido adiposo e pontos pardacentos), avaliação microscópica quanto ao epitélio (unidades ducto-lobulares terminais, presença de lesões proliferativas e não proliferativas), avaliação microscópica do estroma (extensão da fibrose, tipo de fibrose e celularidade estromal), e avaliação imuno-histoquímica, com pesquisa da expressão de CD-34, Ki67 e receptores hormonais (RE e RPg). **Resultados:** As áreas densa e não densa apresentaram o mesmo tamanho. Não houve diferença na proporção de tecido adiposo entre as áreas ( $p = 0,070$ ), porém a proporção de pontos pardacentos foi maior nas áreas densas ( $p = 0,022$ ). O número de unidades ducto-lobulares terminais foi maior para as áreas densas do que para as não-densas ( $p = 0,001$ ). Não foram encontradas lesões proliferativas com atipias no tecido não-denso, porém em 3 das áreas densas avaliadas foi encontrada atipia epitelial plana. Lesões proliferativas sem atipias foram encontradas nas duas áreas, porém foram mais frequentes no tecido denso do que no não denso (23,5% vs 11,8%,  $p = 0,045$ ). Lesões não proliferativas também foram mais frequentes na área densa (17,6% vs 2,9%,  $p = 0,025$ ) em relação a menos densa. Em ambas as áreas a distribuição celular foi mais comumente intra e interlobular. A celularidade estromal foi a mesma nos dois tecidos. A fibrose foi mais comumente extensa ou moderada no tecido mamário denso e leve no não-denso ( $p = 0,030$ ). Quanto à análise imuno-

histoquímica, a expressão de receptores de estrógeno e progesterona, assim como de Ki67 e CD34, foi similar para as duas áreas. **Conclusões:** O estudo demonstrou que tanto a fibrose estromal quanto a proliferação epitelial são responsáveis pela maior densidade mamográfica e que a expressão imunohistoquímica de receptores hormonais, CD-34 e Ki-67 é similar em áreas mais e menos densas.

# Summary

---

**Introduction:** The mammographic density, a measure of the extent of the radio dense fibroglandular tissue of the breast, is an independent risk factor for breast cancer. Established risk factors for breast cancer, including age at first birth, parity and hormone use in pos-menopausal women, are also associated to mammographic density. However, the biological basis of the association of mammographic density and breast cancer risk is still undefined. The known literature suggests that mammographic density is associated to proliferation of epithelium or stroma, and one of these may be responsible for the association of density and breast cancer risk. **Objectives:** To evaluate histological and immunochemical composition of radiologically-dense and -non-dense breast tissues of women undergoing mastectomy for breast cancer. **Subjects and methods:** We realized a transversal study of 18 women undergoing mastectomy with breasts classified as P1, P2 or Dy (Wolfe) and breast cancer of clinical stadium I or II or ductal carcinoma in situ (DCIS). Their mammograms were digitized and, in each mammogram, we localized the dense area, the non-dense area and the tumor area. Pictures of the breast were taken in 4 different positions. We used a novel localization technique based on a linear approximation method with interpolation of the mammogram and breast images.

During mastectomy, the selected areas were biopsied according to the localization method and sent for analyses. The following criterias were analyzed: tissue macroscopy (size of the selected areas, fat proportion and proportion of brownish spots), epithelium microscopy (number of terminal ductal lobular units, presence of proliferative and non-proliferative lesions), microscopy of the stroma (fibrosis extent, kind of fibrosis and cellularity) and immunohistochemical analyses of CD-34, Ki67 and hormone receptors expression (ER and PgR).

**Results:** The dense and non-dense areas had the same weight and volume. We found no difference in percent composition of fat between dense and non-dense tissue ( $p = 0.070$ ). However, the percentage compositions of the brownish spots between dense and non-dense tissues were significantly different ( $p = 0.022$ ). The number of terminal ductal lobular units was higher for dense than non-dense breast tissue ( $p = 0.001$ ). There were no proliferative lesions with atypia in the non-dense tissue, however we found epithelial flat atypia in 3 of the 18 dense areas evaluated. Proliferative lesions without atypia were found in both tissues, but they were more frequent in dense breast tissues than in non-dense breast tissues (23.5% vs 11.8%,  $p = 0.045$ ). Non-proliferative lesions were also more frequent in dense breast tissues (17.6% vs 2.9%,  $p = 0.025$ ). In both areas, the cellular distribution was intra and inter-lobular. The stroma cellularity was the same in both tissues. Fibrosis was more frequently extensive or moderate in dense tissue, while it was predominantly mild in non-dense tissue ( $p = 0.030$ ). With regard to the immunochemical analysis, estrogen and progesterone receptors were equally expressed in both tissues, as were Ki67 and CD34. **Conclusions:** Our study findings lead to the conclusion that

both stromal fibrosis and epithelial proliferation are responsible for higher mammographic density. Immunostaining of ER, PgR, CD-34 and Ki-67 were the same in dense and non-dense breast tissues.

# 1. Introdução

---

A densidade mamográfica, uma medida da extensão do tecido fibroglandular radiodenso da mama, é um fator de risco independente para o câncer de mama (1). A gordura é radiologicamente luzente e aparece escura na mamografia. Em contraste, o epitélio e o estroma são radiograficamente densos e aparecem claros, brancos, uma aparência referida como densidade mamográfica. Portanto, a densidade mamográfica varia entre as mulheres porque reflete sua composição mamária e diferentes proporções de gordura, epitélio e estroma (2).

Wolfe (3) foi o primeiro autor a propor uma classificação que relacionava variações na aparência da mamografia ao risco de câncer de mama. Propôs um sistema de quatro categorias: N1, na qual a mama é principalmente gordurosa e o risco de câncer de mama é o menor, os ductos não são visíveis; DY, na qual a mama é principalmente densa e na qual o risco de câncer de mama é o maior; e P1 e P2, nos quais há densidades lineares de diferentes extensões e nas quais os riscos são intermediários.

Outros métodos de classificação da densidade mamográfica foram elaborados, como o do Colégio Americano de Radiologia (4) e métodos semiquantitativos (5). Contudo, todos eles mostraram ser equivalentes entre si,

com um Kappa de 0,76 a 0,86, têm alta reprodutibilidade e são extremamente consistentes em identificar mulheres com padrões de alta densidade (6).

O risco de câncer de mama está 4 a 6 vezes aumentado em pacientes com densidade mamográfica igual ou superior a 75% do que em mulheres com densidade mamográfica mínima ou ausente (1, 7, 8, 9, 10). Esse risco é maior para mulheres mais jovens do que mais idosas (9). Densidade em mais de 50% da mama pode ser responsável por 1/3 de todos os casos de câncer de mama (9,11).

Associando a densidade mamográfica ao risco de câncer de mama, Boyd et al. (1) revisaram 15 estudos independentes (dez casos-controle e cinco coortes ou casos-controle dentro de coortes), com o total de 6.274 pacientes com câncer de mama e 11.638 controles. Concluíram que o aumento da densidade mamográfica é um fator de risco independente para o câncer de mama e que este risco está 4-6 vezes aumentado em pacientes com densidade mamográfica maior ou igual a 75% do que em mulheres com densidade mamográfica mínima ou ausente (7). Todos os estudos encontraram um odds ratio (OR) significativamente aumentado entre 1,8 a 6,0 e dez dos 15 estudos encontraram um OR de no mínimo 4,0.

McCormack e Silva (8) também estudaram a relação entre padrões de densidade mamográfica e o risco de câncer de mama através de uma revisão sistemática e meta-análise de publicações. Foram incluídos 42 estudos, agregando dados de mais de 14.000 casos e 226.000 controles. Para a porcentagem de densidade medida através de mamografias prévias ao diagnóstico, os riscos relativos combinados de incidência de câncer de mama

na população geral foram de 1,79 (CI 95%, 1,48-2,16), 2,11 (1,70-2,63), 2,92 (2,49-3,42) e 4,64 (3,64-5,91) para as categorias 5% a 24%, 25% a 49%, 50 a 74% e  $\geq$  ou = 75% em relação a  $<$  5%. Essa associação permaneceu forte após excluídos os casos no primeiro ano depois da mamografia inicial.

A densidade mamográfica é, portanto, um fator de risco bem estabelecido para o câncer de mama. Outros fatores de risco também já conhecidos, incluindo idade ao primeiro parto, paridade e uso hormonal na pós-menopausa, também estão associados com a densidade mamária. Titus-Ernstoff et al. (12) estudaram uma grande população de mulheres cadastradas no registro de mamografia do estado de New Hampshire (Estados Unidos) para determinar as características associadas ao câncer de mama e à densidade mamária. Confirmaram que os fatores de risco já estabelecidos para câncer de mama comportam-se de forma similar em relação à densidade mamária, o que vai de acordo com a noção de que a densidade mamária é mediadora do risco de câncer de mama. Foi também mostrado que o índice de massa corpórea (IMC) modifica os fatores de risco: em mulheres de maior IMC, menor é a densidade mamária.

A variação na densidade mamográfica é explicada em parte (20% dos casos) pela idade, paridade e menopausa (13, 14, 15, 16). Após ajuste para estes fatores, aproximadamente 60% da variedade na densidade mamográfica é explicada pela hereditariedade (17), o que foi também confirmado pelo estudo de Stone et al. (18), que demonstrou que tanto as áreas densas quanto as não densas eram hereditárias em aproximadamente 65% dos casos. Os genes responsáveis pela densidade mamográfica ainda não foram identificados, mas

os responsáveis pela atividade proliferativa, manutenção e regulação do epitélio, estroma, matriz extracelular e gordura da mama parecem ser bons candidatos (17).

Pankow et al. (19) já haviam demonstrado que a densidade mamográfica poderia ser determinada geneticamente em um estudo de correlação familiar em uma coorte de mulheres de risco para câncer de mama. Foram avaliadas mamografias de 1370 mulheres de 258 famílias independentes. Correlações de densidade mamográfica irmã-irmã (275 pares de irmãs) foram todas significativas do ponto de vista estatístico (0,22,  $p < 0,05$ ), porém as correlações mãe-filha (65 pares) foram menores em magnitude e não estatisticamente significativas. Análise segregadora indicou que um gene autossômico dominante poderia influenciar a densidade mamográfica e explicar 60% da variabilidade da densidade mamográfica.

Foi proposto que a investigação da base genética da densidade mamográfica poderia ajudar a desvendar os fatores genéticos associados ao câncer de mama (1). Eles reuniram informações de que esta densidade é hereditária, é um forte fator de risco para o câncer de mama, independentemente da idade e outros fatores de risco, e tem as propriedades de uma característica quantitativa. Os genes que determinam esta densidade podem ser em menor número e mais fáceis de identificar do que os genes que determinam a susceptibilidade ao câncer de mama. A identificação de tais genes poderia levar ao maior conhecimento da biologia da mama e identificar possíveis alvos para estratégias preventivas. Contudo, estudos nesta área ainda são iniciais e não chegaram a conclusões objetivas.

Van Duijnhoven et al. (20) concluíram que dois polimorfismos (PvuII e XbaI) no gene responsável pela codificação do receptor de estrogênio alfa (ESR1) poderiam afetar o risco de câncer de mama através de diferenças na densidade mamográfica.

Chambo et al. (21) também associaram variações genéticas no CYP17 (Enzima do sistema do citocromo P450 envolvida na biossíntese de esteróide) e em genes de receptores de progesterona (RPg) à maior densidade mamográfica em mulheres na pós-menopausa, quando ambos estavam presentes. O tipo selvagem PROGINS (polimorfismo do gene do RPg) e a forma polimórfica da CYP17 foram identificados como potenciais marcadores para determinar uma chance 4,87 vezes maior de alta densidade mamográfica ( $p = 0,03$ ).

Já Mitchell et al. (22) compararam a densidade mamográfica de pacientes com câncer de mama, portadoras da mutação BRCA1 ou BRCA2 (casos), com pacientes não portadoras (controles), e de mulheres portadoras e não portadoras da mutação e concluíram não haver diferença na densidade mamográfica média entre portadoras e não portadoras da mutação. Entre as portadoras da mutação, a maior densidade mamográfica foi associada ao maior risco de câncer de mama, com um OR para câncer de mama associado à densidade mamográfica > 50% de 2,29 (1,23-4,26;  $p = 0,009$ ). Estes resultados sugerem que o risco relativo de câncer de mama associado à densidade mamográfica em portadoras da mutação BRCA1 ou BRCA2 é similar ao visto nos estudos na população geral e indicam que os genes responsáveis pela densidade mamográfica não incluem BRCA1 ou BRCA2.

Em 2004, Cuzick et al. (23) já haviam observado que um risco familiar alto de desenvolver câncer de mama nos próximos 10 anos estava associado a uma densidade mamográfica menor em relação a mulheres de risco baixo ou moderado ( $p = 0,02$ ). Apesar de uma densidade mamográfica elevada e uma história familiar de câncer de mama serem fatores de risco estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de mama, é possível que mulheres com história familiar desenvolvam câncer de mama por uma via molecular diferente (como, por exemplo, tumores com receptores hormonais negativos em cânceres associados ao BRCA1) que não seja relacionada à densidade mamográfica ou a níveis estrogênicos (17, 19, 24).

A base biológica da associação da densidade mamográfica ao risco de câncer de mama ainda é desconhecida. A literatura sugere que a densidade mamográfica esteja associada à proliferação epitelial e estromal, podendo uma delas ser a responsável pela associação da densidade com o risco de câncer de mama (25).

Boyd et al. (1) revisaram dez estudos que associaram a histologia mamária à sua aparência radiológica. Nove avaliaram mamas a partir de mastectomias ou de biópsias e a maior parte usou métodos qualitativos de avaliação de densidade da mama da qual veio o tecido. Seis dos nove estudos que descreveram o epitélio encontraram que a proliferação epitelial, com ou sem atipia, estava associada à densidade mamográfica e todos os seis estudos que descreveram o estroma encontraram que a proliferação do estroma estava também associada à densidade. Os estudos foram baseados em tecido mamário obtido de mulheres com doença conhecida ou suspeita, e a relação

entre a histologia e a radiologia destas amostras pode não ser representativa das mulheres em geral.

Um desses estudos (26) usou amostra de mama a partir de autópsia forense e não selecionada pela presença de anormalidades. A densidade mamográfica aumentada foi associada a maior área nuclear total, a maior área nuclear de células epiteliais e não-epiteliais, a maior proporção de colágeno e a maior área de estruturas. Idade, índice de massa corpórea e estado pós-menopausal foram significativamente e inversamente associados à densidade mamográfica e a todas as medidas do tecido mamário. Paridade e número de filhos foram associados inversamente apenas à porcentagem de colágeno. Estes fatores também influenciam o risco de câncer de mama e pode ser que interfiram no número de células e na quantidade de colágeno.

Estes resultados também se assemelham a outro estudo baseado na biópsia cirúrgica de 92 pacientes, nos quais se utilizou microscopia quantitativa e imuno-histoquímica para avaliar a relação entre fatores de crescimento e proteínas reguladoras do estroma com densidades mamográficas (27). Comparado com pacientes com baixa densidade mamária, o tecido mamário de sujeitos com alta densidade mamária apresentou maior área nuclear, uma área corada com colágeno quase 2 vezes maior, uma área corada para IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina 1) aproximadamente 30% maior e uma área corada pelo inibidor tecidual da metaloproteinase 3 (TIMP-3) aproximadamente 2 vezes maior. Apenas as diferenças entre áreas nucleares e áreas coradas por colágeno foram estatisticamente significantes. Todas essas diferenças foram maiores para mulheres com menos de 50 anos do que para as mulheres

mais velhas,. Isso é coerente com a associação entre níveis séricos IGF-1, maior risco de câncer de mama (28, 29) e maior densidade mamográfica (29, 30) encontrada apenas em mulheres na pré-menopausa. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que a proliferação estromal e epitelial, que contribui para a densidade mamária, está associada à presença de fatores de crescimento reguladores. Foi proposto que o IGF-1 e o TIMP-3 possam influenciar tanto a formação dos tecidos responsáveis pelas densidades mamográficas quanto o risco associado de câncer de mama.

Alowami et al. (31) também avaliaram biópsias de mama para uma associação entre a densidade mamográfica e alterações do estroma. A expressão mamográfica densa foi associada ao aumento significativo da proporção dos casos diagnosticados como carcinoma ductal in situ em relação aos casos de doença não proliferativa benigna e doença proliferativa sem atipia ( $p = 0,01$ ). Os casos associados a maior densidade mamária apresentaram fibrose mais extensa, medida pela proporção de colágeno tecidual dentro das seções de tecido, pela densidade do tecido colágeno ou pela extensão da fibrose peri-ductal. A expressão de SRLPs (proteoglicanos pequenos ricos em leucina) estava significativamente aumentada nos casos de maior densidade mamária. Os resultados sugeriram que a densidade mamográfica está mais relacionada à composição estromal do que à epitelial.

O estroma ao redor de tumores invasivos é diferente do estroma da mama normal, com alteração da síntese de proteínas estromais e da expressão de metaloproteinases (32). O CD34 é uma glicoproteína transmembrana expressa por células progenitoras hematopoiéticas, células endoteliais e

mesenquimais. Foi sugerido que há uma relação inversa entre a expressão de CD34 e a diferenciação miofibroblástica. Fibroblastos mamários no estroma normal expressam CD34, mas esta expressão se perderia em fibroblastos ao redor de carcinomas invasivos (32, 33). Contudo, a relevância da expressão alterada de CD34 ainda é incerta (32) e não foram encontrados na literatura estudos que associassem densidade mamográfica e expressão de CD34.

Hawes et al. (34) acessaram o número de células epiteliais na unidade ducto-lobular terminal (TDLU) e nos ductos mamários, além de suas respectivas taxas de proliferação correlacionadas às densidades histológicas mamárias locais em cada mulher. A relação entre a extensão da densidade mamográfica e a quantidade de tecido epitelial foi diretamente associada ao aumento da concentração de colágeno (o principal componente do tecido conjuntivo), uma vez que o epitélio mamário está altamente confinado a áreas de alta densidade de tecido conectivo, o que levou à hipótese de que o aumento do risco de câncer de mama associado a maior densidade mamográfica poderia ser apenas um reflexo de maior quantidade de tecido epitelial. A expressão de Ki-67 (MIB-1), correspondente à taxa de proliferação das células epiteliais, ao contrário do que era esperado, foi menor nas áreas de média e alta densidades, comparadas às áreas de baixa densidade, o que vai contra a possibilidade de que o estroma denso desempenhe o papel de fator de crescimento no aumento do risco de câncer de mama em mulheres com mamas densas. A base da forte relação entre a densidade mamográfica e o câncer de mama pode ser simplesmente a presença de maior quantidade de tecido epitelial nas mamas densas. Mas não se sabe porque o tecido epitelial mamário estaria associado à

densidade do tecido conjuntivo. Não se sabe se o epitélio mamário é capaz de induzir a presença de densidade ou se, alternativamente, áreas de maior densidade favorecem a presença de epitélio. Com este estudo, Hawes et al. (34) propuseram que o entendimento da natureza da relação entre o tecido conjuntivo estromal denso e o tecido epitelial deveria ser um foco maior na pesquisa de câncer de mama.

O antígeno nuclear Ki-67 é um marcador de proliferação celular que está associado ao prognóstico de pacientes com câncer de mama (35, 36, 37). Em 2002, Shaaban et al. (38), em um estudo transversal, observaram que mulheres com aumento de Ki-67 em focos de hiperplasia tinham maior risco de câncer de mama. A redução da proliferação se correlacionou com resposta a agentes anti-hormonais em trials de tratamento de câncer. A expressão de Ki-67 está atualmente sendo usada em trials de quimioprevenção de câncer de mama em fase II. O estudo de Khan et al. (39) avaliou a relação entre a densidade mamográfica e a presença da expressão de Ki-67 e citomorfologia em células mamárias benignas obtidas de aspiração periareolar aleatória por agulha fina em mulheres de alto risco para câncer de mama e não encontrou associação.

Ainda em relação ao epitélio mamário, foi descrita uma possível associação entre sua macroscopia e sua histologia. A presença de pontos pardacentos à macroscopia estaria associada à presença de epitélio (40). Não foi encontrada na literatura esse tipo de análise em relação à densidade mamográfica.

Outro foco de avaliação da densidade mamográfica procura buscar associações entre esta e os níveis de hormônios sexuais. Dois estudos em

mulheres na pós-menopausa, um de Tamimi et al. (41) e outro de Warren et al. (42), demonstraram não haver associação entre a densidade mamográfica e os níveis séricos de hormônios sexuais, indicando que estes fatores de risco têm uma etiologia própria e sugerindo que talvez sejam fatores preditores independentes do risco de câncer de mama. Confirmando esta hipótese, outro estudo concluiu que uma elevada densidade mamográfica foi associada tanto ao câncer de mama com receptores de estrógeno positivos quanto negativos (43). Contrariamente, o estudo de Greendale et al. (44) associou os níveis de estrona, estradiol e estradiol biodisponível a maior densidade mamográfica.

Sabe-se que o uso de tamoxifeno (um modulador seletivo do receptor de estrogênio que atua inibindo estes receptores na mama) está associado à redução da densidade mamográfica (23). Observou-se uma redução de 14% na densidade absoluta ao longo de 54 meses, comparada com uma redução de 8% para mulheres tratadas com placebo no trial IBIS-I (International Breast Cancer Intervention Study I) em coorte de mulheres com mais de 10% de densidade (23). Alterações na densidade mamográfica a favor do tamoxifeno foram significativas apenas em mulheres na pré-menopausa e abaixo de 55 anos de idade, porém outros estudos confirmaram a redução da densidade mamográfica com o uso de tamoxifeno, independente do estado menopausal (38, 39, 40, 41). Mais recentemente, Cuzick et al. (45) demonstraram que apenas pacientes em uso de tamoxifeno que efetivamente tiveram sua densidade mamográfica reduzida apresentaram proteção contra o desenvolvimento de câncer de mama.

Brisson et al. (46) estudaram mulheres de 35 anos ou mais e com risco de desenvolver câncer de mama, avaliado através de um modelo de Gail modificado. Foram analisadas 69 mulheres de forma randomizada (36 no grupo em uso de tamoxifeno 20mg/dia e 33 no grupo em uso de placebo) e foi demonstrado que o tamoxifeno pode reduzir a densidade mamográfica após 1-5 anos de uso, principalmente em mulheres com menos de 50 anos.

Sales et al. (47) estudaram a mama contralateral de pacientes com câncer de mama que fizeram uso de tamoxifeno por no mínimo um ano. Encontraram uma elevada frequência de lesões não-proliferativas e uma baixa expressão de Ki-67 e RE no tecido mamário normal. A redução da densidade mamográfica após a administração de tamoxifeno é consistente com a ideia de que o tamoxifeno reduz a proliferação epitelial (e a fibrose estromal) na mama e que as alterações epiteliais poderiam prevenir o desenvolvimento de novos cânceres invasivos da mama (46).

O tamoxifeno poderia atuar na mama devido à sua ação antiestrogênica e desenvolver um efeito na mama comparável, de certa forma, com a redução de estrógenos circulantes. Paridade e menopausa estão associadas com redução de estrógenos e ambos os fatores acompanham a redução da densidade mamária. Contudo, a influência do tamoxifeno na morfologia mamária poderia ser mediada por outros efeitos biológicos da droga e não apenas o hormonal, como inibição do IGF-1 (48). A redução do risco de câncer de mama nas pacientes de alto risco tratadas com tamoxifeno, em comparação às pacientes tratadas com placebo, não foi associada aos níveis de hormônios sexuais (49). Estes dados sugerem que a dosagem de hormônios sexuais

endógenos não identifica mulheres com maior risco de câncer de mama ou que têm maior benefício devido à quimioprevenção com tamoxifeno.

Boyd et al. em 2006 (50) conduziram uma pesquisa para determinar se o efeito da terapia hormonal no risco de câncer de mama seria mediado pela densidade mamográfica. Contudo, apesar da densidade mamográfica estar associada ao risco de câncer de mama e de ser influenciada pela terapia hormonal, não foi encontrada evidência de que o aumento do risco de câncer de mama, associado à terapia hormonal, fosse consequência do efeito da terapia hormonal na densidade mamográfica. Um estudo recente encontrou que alterações da densidade mamográfica com diferentes exposições hormonais seriam maiores em mulheres que desenvolveriam câncer de mama no futuro do que em controles (51).

Outros fatores modificadores da densidade mamográfica devem ser estudados e avaliados quanto aos seus efeitos no risco de câncer de mama mediados por alteração desta densidade, como o uso de tamoxifeno (52), de agonista da gonadotrofina liberadora de hormônio (53), de dieta de baixa gordura e rica em carboidratos (54, 55), de anticoncepcional oral combinado (56), de atividade física (57, 58) entre outros.

Todos os estudos, contudo, que associaram densidade mamográfica a alterações histológicas da mama, avaliaram a densidade da mama de forma global e não áreas específicas da mama, que seriam mais ou menos densas. O conhecimento da composição histológica e imuno-histoquímica das áreas de maior densidade da mama poderia contribuir para o melhor entendimento da carcinogênese mamária.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Estudar a composição histológica e imuno-histoquímica da mama, de apresentação mamográfica densa, em mulheres submetidas à mastectomia por câncer de mama em estádios I e II ou por carcinoma ductal *in situ*.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar e comparar nas porções mais densa e menos densa em peças de mastectomia os seguintes aspectos:

- Dados macroscópicos (medida de cada amostra mamária, avaliação da quantidade de tecido adiposo e pontos pardacentos).
- Dados microscópicos do componente epitelial quanto ao número de ductos e unidades ductais terminais-lobulares, tipo de epitélio e presença de lesões proliferativas, não-proliferativas, carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo.
- Dados microscópicos do estroma conjuntivo-fibroso quanto à quantidade ou extensão da fibrose, distribuição do estroma e avaliação da celularidade estromal.

- Expressão de marcadores imuno-histoquímicos: receptores de estrógeno e progesterona, expressão de Ki-67 (Mib-1) e de CD-34.

# 3. Sujeitos e Métodos

---

## 3.1. Desenho

Foi realizado um estudo de corte transversal.

## 3.2. Tamanho Amostral

O tamanho da amostra foi baseado na diferença de médias entre densidades altas e baixas e da porcentagem de IGF-I, baseado no artigo de Guo et al (27).

Foi considerado como média da porcentagem de IGF-I, em densidades baixas:  $-0,29 \pm 1,82$ , e em altas:  $0,48 \pm 1,37$  (27), o teste *t* de Student pareado, nível de significância de 5%, e 80% de poder do teste, resultando em  $n = 44$ .

Porém, como após a análise parcial de 18 sujeitos foram obtidos resultados significativos, o estudo foi interrompido.

## 3.3. Variáveis

As variáveis estudadas, suas definições e respectivas categorias estão listadas em seguida.

### 3.3.1. Variável independente

- **Áreas mamárias** - medida da extensão do tecido fibroglandular radiodenso da mama, classificada por mamografia digitalizada prévia à mastectomia em 3 categorias:
  - Área mais densa: área de maior densidade da mama, a pelo menos 2cm do tumor.
  - Área menos densa: área de menor densidade da mama, a pelo menos 2cm do tumor.
  - Área tumoral: área onde se visualiza o tumor.

### 3.3.2 Variáveis dependentes

- **Dados macroscópicos** – avaliados por patologista experiente quanto aos seguintes itens:
  - Medida de cada área mamária em três dimensões (em milímetros) e peso (em grama).
  - Avaliação da quantidade de tecido adiposo, classificado como: escasso (< 10%), moderado (entre 10% a 50%) e intenso (acima de 50%).
  - Avaliação quanto à presença de pontos róseos ou pardacentos (correspondentes ao componente epitelial), classificada como: ausente, escasso (raros, não confluentes) e intenso (múltiplos, confluentes).
- **Avaliação microscópica do componente epitelial** – realizada por patologista experiente quanto aos seguintes itens:

- Número de ductos e unidades ductais lobulares terminais (UDLT), contados com objetiva de 10x, em 20 campos microscópicos mais populosos:
  - Tipo de epitélio, classificado como cúbico, colunar e/ou apócrino.
  - Presença de lesões proliferativas e não-proliferativas: cistos, metaplasia apócrina, hiperplasia apócrina, alteração e hiperplasia de células colunares sem atipias, atípial epitelial plana, adenose esclerosante, adenose apócrina, hiperplasia ductal típica (usual), hiperplasia ductal atípica, hiperplasia lobular atípica, papiloma intraductal típico e atípico (critérios da WHO, 2003, referência 56).
  - Presença de carcinomas *in situ* (ductais e lobulares) e carcinomas invasivos (56).
- **Avaliação microscópica do estroma conjuntivo-fibroso** – realizada por patologista experiente quanto aos seguintes itens:
- Quantidade ou extensão da fibrose, avaliada com objetiva de 40 vezes, em 20 campos microscópicos, em leve, moderada e extensa.
  - Distribuição predominante do estroma, classificado como interlobular, intralobular e inter + intralobular.
  - Avaliação da celularidade estromal (miofibroblastos), classificado como leve, moderada ou intensa.
- **Marcadores imuno-histoquímicos** – avaliados por patologista experiente.

- Receptor de estrógeno (clone 6F11 ID5, 1:100, DAKO) e receptor de progesterona (clone PGR-636, 1:800, DAKO) avaliados no componente epitelial e classificados como leve (até 25% das células positivas), moderado (entre 26% e 50%) e intenso (acima de 50%), contados nas áreas de maior positividade, em toda a lâmina. Estrógeno e progesterona são agentes estimuladores da proliferação celular mamária.
- Ki-67 (clone MIB-1, 1:500, DAKO) para avaliar a atividade proliferativa epitelial (fator de proliferação epitelial que é expresso em células em divisão nas fases G1 e M do ciclo celular e pode ser determinado por imuno-histoquímica com o anticorpo MIB-1 em material parafinado). Classificado como leve (positividade menor que 5%), moderado (entre 5 e 10%) e intenso (acima de 10%), contado nas áreas de maior positividade, em toda a lâmina.
- CD-34 (clone QBEend-10, 1:50, DAKO) para avaliar melhor a quantidade de células estromais (miofibroblastos), classificado como de expressão leve, moderada ou intensa.
- Cerb-B2 (clone da oncoproteína cerb-B2, 1:800, DAKO) avaliado apenas na área tumoral, classificado como negativo (coloração irregular ou fraca em 0-10% das células tumorais), positivo (coloração completa e forte em 30% ou mais das células tumorais) e indeterminado (coloração completa, mas fraca ou pouco homogênea em pelo menos 10% das células tumorais ou intensa e completa em menos de 30% das células tumorais).

### 3.3.3 Variáveis de controle

- **Idade** – tempo decorrido entre o ano de nascimento do sujeito até a data da cirurgia, em anos completos, referido pelo sujeito.
- **Paridade** – número de filhos referidos pelo sujeito no momento da cirurgia.
- **Índice de massa corpórea (IMC)** – a relação entre peso (em quilogramas) e altura multiplicada ao quadrado (em centímetros), no momento da cirurgia, sendo: < 25, normal; 25-29, sobrepeso; > ou = 30, obesidade (57).
- **Estado menopausal** – estado menopausal no momento da cirurgia, classificado em pré-menopausa (mulheres com períodos menstruais) ou pós-menopausa (mulheres em amenorreia há pelo menos 1 ano), de acordo com a Organização Mundial da Saúde (58).
- **História familiar de câncer** – presença de casos de câncer de mama na família até a realização da cirurgia do sujeito e, se presentes, avaliar presença de bilateralidade, grau de parentesco e idade do parente afetado. Identificar também outros tipos de câncer na família.
- **História pessoal de câncer** – antecedente pessoal de qualquer tipo de câncer no sujeito entre seu nascimento e a realização da cirurgia.
- **Uso de terapia de reposição hormonal** – antecedente pessoal de uso de hormônio exógeno (estrógeno ou estrógeno associado à progesterona) e, caso tenha sido feito, questionar sua duração e tempo desde o término do uso.

- **Menarca** – idade, em anos completos, em que o sujeito teve sua primeira menstruação.

### 3.3.4 Variáveis descritivas

- **Estádio** – estágio dos tumores das pacientes no estudo.
- **Densidade mamográfica** – medida da extensão do tecido fibroglandular radiodensito da mama por profissional qualificado, classificada pela mamografia prévia à mastectomia através da análise da mama nas categorias de Wolfe (3) em N1, P1, P2 e DY:
  - N1: parênquima composto predominantemente por tecido gorduroso, com no máximo pequenas ilhas de "displasia". Ductos não visíveis.
  - P1: parênquima composto na sua maioria por gordura, com ductos proeminentes na porção anterior até 1/4 da mama. Também pode ser uma fina faixa de ductos estendendo-se dentro de um quadrante.
  - P2: Severo envolvimento com padrão ductal, ocupando mais de 1/4 do volume da mama.
  - Dy: Severo envolvimento com "displasia". Com frequência confunde-se com padrão ductal proeminente.

### **3.4. Seleção de Sujeitos**

Os sujeitos foram mulheres acompanhadas no Ambulatório de Mastologia do Serviço de Oncologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Unicamp. Foram selecionadas mulheres com diagnóstico de câncer de mama em estágio inicial (I ou II), que tinham indicação de mastectomia, no período de junho/2010 a maio/2011.

#### **3.4.1 Critérios de Inclusão**

- Mulheres com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama em estágio inicial (I ou II) ou com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* de mama segundo Sistema TNM, adotado pela União Internacional Contra o Câncer (59).
- Mulheres com mamografias de densidades P1, P2 e Dy (3).

#### **3.4.2 Critérios de Exclusão**

- Carcinoma ductal invasivo localmente avançado (estádios clínicos III e IV).
- Carcinoma lobular invasivo.
- Doença multicêntrica.
- Carcinoma ductal *in situ* extenso.
- Mulheres com mamografias de densidade N1 (3).

### **3.5. Técnicas (60, 61, 62, 63)**

Todos os sujeitos incluídos no estudo foram submetidos a mamografias nas incidências crânio-caudal e perfil absoluto. As mamografias foram então digitalizadas e avaliadas quanto às suas diferentes áreas de densidade. Foram localizadas a área mais densa da mama a pelo menos 2cm do tumor, a área de menor densidade da mama a pelo menos 2cm do tumor e a área tumoral.

Durante a realização da mastectomia, as áreas selecionadas pela mamografia foram localizadas e biopsiadas (2cm<sup>3</sup>) para análise anatomopatológica quanto aos critérios já descritos (variáveis dependentes).

A avaliação anatomopatológica foi realizada por patologista experiente que recebeu a mama e as áreas mamárias selecionadas após sua biópsia. Foram realizadas as análises macroscópica e microscópica, além da avaliação imuno-histoquímica de todas as áreas, conforme descrito nas variáveis dependentes (item 3.3.2).

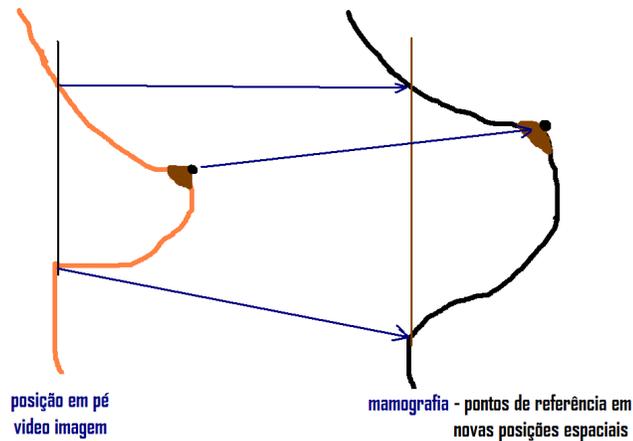
O posicionamento e a delimitação não invasiva de áreas de ressecção é um dos problemas mais importantes para o planejamento cirúrgico na Mastologia. Há diversos trabalhos de pesquisa procurando por uma solução eficiente. O grande desafio dos métodos por imagem é que as condições em que são feitas as imagens diferem das condições em que são realizadas as cirurgias. Na Imagem por Medicina Nuclear e na Imagem por Ressonância Magnética a mama fica normalmente em posição pendular. Na Mamografia é realizada compressão da mesma. A cirurgia ocorre com a paciente em posição

supina, formando um ângulo aproximado de 30 graus com a linha horizontal do solo.

As imagens de mamografia fornecem a distribuição interna da densidade do tecido mamário em dois planos, na condição de compressão da mama. Esta condição é diferente da condição na posição cirúrgica.

Foram utilizadas as imagens de mamografia e da mama obtidas por câmera fotográfica com a paciente na posição vertical, em pé ou sentada, formando um ângulo de 90 graus com a horizontal (dois planos: lateral e frontal) e na posição cirúrgica (dois planos: crânio-caudal e frontal) para inferir a redistribuição interna do tecido mamário a partir da redistribuição de sua superfície.

A redistribuição da superfície foi feita por pontos de referência de fácil marcação: o mamilo e a linha que une a clavícula e o sulco inframamário, para a imagem lateral. Para a imagem crânio-caudal foram utilizados o mamilo e a linha tangente ao mediastino. Estes pontos serviram de referência para o algoritmo de interpolação que calculou a densidade em cada ponto interior à mama quando a paciente esteve nas posições distintas da mamografia.



**Figura 1.** Exemplo da visão lateral da mama em videoimagem e mamografia apontando as mudanças da geometria e as novas posições dos pontos de referência. Situação semelhante ocorre na vista crânio-caudal.

A mamografia forneceu os dados de densidade para a redistribuição da densidade mamográfica na nova posição através de algoritmos de interpolação e de reconstrução, aplicáveis às imagens digitais. Estes algoritmos, juntamente com os pontos de referência, foram desenvolvidos para embutir as correções devido às alterações provenientes de torção e tração que ocorrem na mama nas diferentes posições, em decorrência das diferentes forças aplicadas. Igual processo foi aplicado para a paciente na posição cirúrgica.

A utilização de padrões com dimensões conhecidas nas diferentes imagens permitiu a determinação do tamanho do *pixel*, possibilitando o escalonamento das imagens para que estejam em mesma escala de dimensão.

A partir da redistribuição da densidade mamária nas novas posições da paciente, distintas daquela da mamografia, e cálculo do tamanho do *pixel* foram determinados:

- pontos com maior densidade a distância mínima de 2cm;
- pontos com menor densidade a distância mínima de 2cm;
- área do tumor;
- as posições em relação a pontos de referência de fácil medição em que se encontram estas áreas para guiar a cirurgia.

A implementação deste método foi feita através de *software* desenvolvido em ambiente MATLAB 6.5 com interface visual de janelas. Teve como argumentos as imagens de mamografia e videoimagem e a definição dos pontos de referência para interpolação feita pelo usuário.

### **3.6. Instrumento para Coleta de Dados**

- Ficha de avaliação: foi preenchida pelo pesquisador, composta de dados pessoais e avaliação da doença, sendo feita a coleta de dados por entrevista com o sujeito e outra parte de avaliação pelo patologista, que foi preenchida com dados extraídos do laudo da biópsia realizada (Anexo 1).
- Biópsia das áreas mamárias: foi realizada pelos pesquisadores nos sujeitos que preencherem os critérios de inclusão e exclusão, e após o consentimento informado. Esta biópsia ocorreu a partir de peças de mastectomia realizada no Centro Cirúrgico do CAISM – Unicamp.

### 3.7. Coleta de Dados

Os sujeitos foram recrutados do ambulatório de mastologia, após prévia seleção e consentimento informado (Anexo 2) e realizada uma entrevista, com preenchimento da ficha de avaliação (Anexo 1).

Em seguida, o sujeito foi submetido à realização de fotos da sua mama em 4 posições e nova mamografia em duas incidências (crânio-caudal e perfil absoluto). Após digitalização desta, foram localizadas na mama a área mais densa, a pelo menos 2cm do tumor, a área menos densa também a pelo menos 2cm do tumor e a área tumoral. Durante a realização da mastectomia foi realizada a localização das respectivas áreas e biópsia das mesmas, de acordo com a indicação pelo cálculo matemático, e as áreas foram enviadas para a avaliação histológica.

Aproximadamente 30 dias após, o resultado da biópsia estava disponível e constava de uma avaliação histológica e de uma avaliação imuno-histoquímica dos receptores de estrógeno e dos marcadores CD-34, KI-67 e cerb-B2 (apenas na área tumoral), estando estes dados em um laudo emitido pelo médico patologista.

Ao término do preenchimento das fichas, onde cada sujeito adquiriu um número atribuído pelo pesquisador, qualquer dado que pudesse identificá-lo, como o nome ou o HC, foi desprezado, restando apenas o número do caso no estudo. Ao final, as fichas foram agrupadas por numeração e os dados analisados.

### 3.8. Consentimento Livre e Esclarecido

O consentimento livre e esclarecido foi obtido pessoalmente pelo pesquisador no momento da entrevista no ambulatório e, consistiu de duas etapas:

- **Esclarecimento verbal:** explanação verbal dada pelo pesquisador para a mulher, abrangendo itens como:
  - objetivo da pesquisa;
  - forma de acompanhamento e assistência;
  - garantia do sigilo aos dados envolvidos na pesquisa;
  - liberdade de se recusar a participar ou de se retirar em qualquer momento da pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo.
- **Preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) foi passado ao sujeito pelo pesquisador no momento da entrevista e, quando havia anuência desta, era preenchido e assinado por ambas as partes e arquivado pelo pesquisador.

### 3.9. Controle de Qualidade

A coleta de dados de todos os sujeitos do estudo foi realizada pelo pesquisador principal. As áreas a serem biopsiadas foram localizadas na mamografia digitalizada por médico-físico experiente e por médico qualificado, o qual também realizou a classificação da densidade da mama de acordo com os

critérios de Wolfe (3). A avaliação anatomopatológica foi realizada por patologista experiente.

### **3.10. Processamento e Análise dos Dados**

A descrição da amostra foi realizada através de média, desvio-padrão e distribuição de frequências. As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à distribuição normal utilizando o teste de Kolmogorv-Smirnov (dados não mostrados).

A comparação entre as áreas densa e não-densa foi realizada através do teste *t* de Student pareado (para variáveis de distribuição normal) ou pelo testes de Wilcoxon (para variáveis sem distribuição normal) e pelo teste de McNemar (para variáveis categóricas). Foi assumido o nível de significância de 5% e o *software* utilizado para análise foi o SAS versão 9.2.

### **3.11. Aspectos Éticos**

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos enunciados na Declaração de Helsinki III (64) e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (65). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas- FCM/Unicamp (Anexo 3) e Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/Unicamp (Anexo 4).

As informações colhidas foram mantidas em sigilo. A obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada pelo pesquisador principal, durante a entrevista de avaliação da paciente em um dos ambulatórios do DTG/Caism/Unicamp.

# 4. Publicação

---

## 4.1. Carta de Encaminhamento

from: **Breast Cancer Research and Treatment (BREA)** priya.sambandam@springer.com via editorialmanager.com

to: Priscila Silva Marshall <priscila.marshall@gmail.com>

date: Sun, Dec 18, 2011 at 9:19 PM

subject: BREA - Acknowledgement of Receipt

mailed-by: editorialmanager.com

: Important mainly because it was sent directly to you.

Dear Ms. Priscila Silva Marshall,

Thank you for submitting your manuscript, **Stroma and Epithelium Features of Mammographic Dense Tissue in Breast Cancer Patients**, to Breast Cancer Research and Treatment.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://brea.edmgr.com/>

Should you require any further assistance please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us.

Alternatively, please call us at [+91 44 42197752](tel:+914442197752) anytime between 9.00 - 17.00 hrs IST/5.00 -

13.00 hrs CET.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office

#### 4.2. Artigo

### STROMA AND EPITHELIUM FEATURES OF MAMMOGRAPHIC DENSE TISSUE IN BREAST CANCER PATIENTS

Authors:

Priscila Silva Marshall, M.D.<sup>1</sup>  
Marcelo Alvarenga, PhD<sup>2</sup>  
Renato Zocchio Torresan, PhD<sup>1</sup>  
Giuliano Mendes Duarte, PhD<sup>1</sup>  
Paola Hesse Polleto, M.D.<sup>3</sup>  
Sirlei Siani Moraes<sup>1</sup>  
Eduardo Tinois, PhD<sup>4</sup>  
Cesar Cabello, PhD<sup>1</sup>

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil
2. Pathology Institute of Campinas (IPC), Campinas, São Paulo, Brazil
3. Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil
4. Institute of Radiation Safety and Technology (ISTR), Campinas, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Priscila Silva Marshall  
University of Campinas, Sao Paulo, Brazil  
Av. Alexander Flemming, 101, Cidade Universitária, Campinas, SP, Brazil  
ZIP CODE 13083-881  
email: [priscila.marshall@gmail.com](mailto:priscila.marshall@gmail.com)  
telephone: +55-19-32875981 or +55-19-97732884  
fax number: +55-19-32528011

Abstract: Radiologically-dense breast tissue is a strong risk factor for breast cancer. In this study, we investigated the histological and immunochemical composition of dense and non-dense breast tissue of 18 women undergoing mastectomy as the initial treatment for breast cancer (stages I or II). In each mammogram, we localized the dense area, the non-dense area and the tumor area. Pictures of the breasts of the subjects were taken in 4 different positions. We used a novel localization technique based on a linear approximation method with interpolation of the mammograms images and the breasts pictures. During mastectomy, the selected areas were retrieved and submitted to pathological and immunochemical analyses. Dense and non-dense areas had the same weight and volume. There was no difference in the percentage composition of fat between dense and non-dense tissue ( $p = 0.0700$ ). However, the percentages of the composition of brownish spots among dense and non-dense tissue were significantly different ( $p = 0.0226$ ). The number of terminal ductal lobular units was higher for dense than non-dense breast tissues ( $p = 0.0019$ ). In the non-dense breast tissue, there were no proliferative lesions with atypia, while we found flat epithelial atypia in 3 of the 18 dense areas evaluated. Proliferative lesions without atypia and non-proliferative lesions were found in both tissues, but they were more frequent in dense than in non-dense breast tissues (23.5% vs 11.8%,  $p = 0.0455$ , and 17.6% vs 2.9%,  $p = 0.0253$ , respectively). Fibrosis was more frequently extensive or moderate in dense tissue, while it was predominantly mild in non-dense tissue ( $p = 0.0300$ ). With regard to immunochemical analysis, estrogen and progesterone receptors were equally expressed in both tissues, as were Ki-67 and CD-34. Our study findings lead to the conclusion that both stroma fibrosis and epithelial proliferation are responsible for higher mammographic density.

Keywords:

Stroma, epithelium, mammographic density, breast cancer

## **INTRODUCTION**

The mammographic density, a measure of the extent of the radio dense fibro glandular breast, is an independent risk factor for breast cancer [1]. Fat has a non-dense radiological appearance and appears *dark* on a mammogram, whereas connective and epithelial tissues are radiologically dense and appear clear, light or white, an appearance referred to as mammographic density. Therefore, mammographic density differs among women because it reflects their breast composition and different proportions of fat, epithelium and stroma tissues [2].

The risk of breast cancer is 4 to 6 times increased in patients with mammographic density equal to or greater than 75% than in women with absent or minimal mammographic density [1, 3, 4, 5, 6, 7]. This risk is constant, although it is higher in younger than in older patients [6]. Densities in more than 50% of the breast may be responsible for about a third of all breast cancers [6, 8].

The variation in mammographic density is explained in part (20% of cases) by age, parity and menopause [9, 10, 11, 12]. After adjusting for these factors, approximately 60% of the variability in mammographic density is explained by genetics [13, 14]. Genes responsible for mammographic density have not been identified. However, those responsible for proliferative activity, epithelium maintenance and regulation, stroma, extracellular matrix and fat seem to be good candidates [13].

The investigation of the genetic basis of mammographic density could help to unravel the genetic factors associated with breast cancer since breast density is hereditary, it is a strong risk factor for breast cancer, regardless of age or other risk factors and it has the properties of a quantitative trait. However, studies in this area are still preliminary and have not come to objective conclusions [1, 15]. In 2004, Cuzick et al. [16] noted that a high familial risk for developing breast cancer over the next 10 years was associated with low mammographic density ( $p = 0,02$ ). While both high mammographic density and familial history of breast cancer are established risk factors for developing breast cancer, it is possible that they might have different molecular pathways (as, for an example, receptor-negative tumors in cancers associated with BRCA1) that are not associated with mammographic density or estrogen levels [13, 15, 17, 18].

The biological basis of the association of mammographic density with the risk of breast cancer is still, however, unknown. The literature suggests that mammographic density is associated with epithelial and stromal proliferation and that one of these factors may be responsible for the association of density with breast cancer [19].

Some studies have associated epithelial cell proliferation, with or without atypia, with mammographic density, while others have found that the proliferation of the stroma is associated with that density [1, 20, 21, 22, 23, 24].

In this article, we investigated the histological and immunohistochemical composition of the dense breast in women with breast cancer undergoing mastectomy. This knowledge might contribute to a better understanding of breast carcinogenesis in this group of women at risk for breast cancer. Since mammographic density is a modifiable risk factor (e.g., through the use of tamoxifen), the identification of factors

determining such density may contribute to the development of new techniques for the prevention or treatment of breast cancer.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was conducted at the Oncology Service of the Department of Obstetric and Gynecology of University of Campinas (UNICAMP) for one year from June of 2010 until May of 2011. The study was approved by The Research Commission and The Ethics Committee of the College of Medical Sciences of UNICAMP. All women included in the study signed an informed consent form before being enrolled in the research.

### **Subjects**

One hundred and fifty women with invasive breast carcinoma at stages I or II or with carcinoma *in situ* according to TNM [25], with an indication for mastectomy as initial treatment were included in the study. However, of these, 56 women were excluded due to non-dense breasts (N1) [3]. Of the remaining 94 subjects, 32 subjects refused to participate, 14 subjects participated during the improvement of the mammographic localization technique, 6 subjects were excluded due to changes in medical management, 16 were excluded because the mammographic unit was out of service and 8 subjects were excluded due to tumor multicentricity. The 18 subjects left were included in the study (Figure 1).

Before surgery, two mammograms (craniocaudal and true medio-lateral views) were taken of each woman selected after her enrollment in the study. Four pictures were

taken of the breast of each patient, in the following positions: orthostatic position (lateral and frontal views) and dorsal position (frontal and craniocaudal views).

**Technique for identification of dense and non-dense breast tissue** [26, 27, 28, 29]

This study used images of mammography and breast images obtained using a camera to infer the internal redistribution of breast tissue from the redistribution of its surface. The redistribution of the surface was made through reference points: the nipple and the line joining the clavicle and the infra-mammary fold to the lateral image. For the craniocaudal image we used the nipple and the line tangent to the mediastinum; these served as reference points for the interpolation algorithm that calculates the density at each point within the breast when the patient assumes different positions other than at mammography.

Mammography provided density data for redistribution of mammographic density in the new position by interpolation algorithms and reconstruction, applicable to digital images. These algorithms, together with the reference points, were developed to embed the corrections due to changes from twist and pull that occur in the breast in different positions due to different applied forces. The same process was applied to the patient in the surgical position.

Standards with known dimensions in the different images were used to determine the pixel size and enable the scaling of the images to the same scale of size (Figure 2).

From the redistribution of the breast density in the new position of the patient, distinct from that of the mammography, and after calculating the pixel size, we determined:

- points with higher density at a minimum 2cm distance from the tumor
- points with lower density with at a minimum distance of 2cm from the tumor
- tumor with a margin of 2 cm
- the position relative to landmarks that are easy to measure in these areas to guide the surgery

High density areas were considered to be those presenting high regular mammographic radiopacity, not related to the tumor. Low density areas were those with regular radiotransparency (fatted related N1 Wolfe pattern [3]).

Method implementation was performed using software developed in MATLAB 6.5 with the visual interface of windows. As arguments we used mammographic and video images and the definition of reference points for interpolation made by the user (Figure 3).

### **Histological analysis**

After mastectomy, the selected areas were retrieved, each of them measuring about 13cm<sup>3</sup>. Samples were submitted to conventional pathological analysis and immunochemical analysis. The dense tissue, the non-dense tissue and the tumor were all analyzed.

The macroscopic features analyzed were: measurement of each breast tissue area in three dimensions (millimeters) and weight (grams); evaluation of fat tissue in each

area classified as scarce (< 10%), moderate (10 to 50%) and intense (above 50%); evaluation of brownish dots (epithelial component) classified as absent, scarce (rare, non confluent) or intense (multiples, confluent) [30].

Microscopic features of the epithelial tissue were also evaluated: number of ducts and terminal ductal lobular units (TDLU), counted with a 10x objective in 20 more populous microscopic fields; type of epithelium, classified as cubic, columnar and/or apocrin; presence of proliferative or non-proliferative lesions (cysts, apocrin metaplasia, apocrin hyperplasia, column cell change, column cell hyperplasia without atypia, flat epithelial atypia, sclerosing adenosis, apocrin adenosis, typical ductal hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, atypical lobular hyperplasia, typical and atypical intraductal papiloma; presence of carcinoma *in situ* and invasive carcinoma [31].

The microscopic features of stroma evaluated were: amount or extent of fibrosis, measured by a 40x objective in 20 microscopic fields and classified as mild, moderate or extensive; stromal distribution, classified as inter-lobular, intra-lobular or inter and intra-lobular; cellularity of the stroma (myofibroblasts), classified as mild, moderate or intense.

Two researchers were involved in performing histological analyses on all areas for macroscopy and all slides for microscopy.

### **Immunohistochemical analysis**

The immunohistochemical markers analyzed were: the estrogen receptor (6F11 ID5 clone, 1:1000, DAKO) and progesterone receptor (PGR-636 clone, 1:800, DAKO) were evaluated in the epithelial component and classified as negative or positive; when

the epithelium was positive, it was classified as mild (less than 25% of positive cells), moderate (26-50% of positive cells) or intense (more than 50%), counted in areas of greater positivity across the slide; Ki-67 (MIB-1 clone, 1:500, DAKO), to assess the epithelial proliferative activity, classified as mild (less than 5% of positivity), moderate (5-10%) and intense (above 10% of positivity), counted in areas of greater positivity in the whole slide; CD-34 (QBEend-10 clone, 1:50, DAKO) was determined to assess the amount of stromal cells (myofibroblasts) with expression classified as mild, moderate or intense; cerb-B2 (cerb-B2 oncoprotein clone, 1:800, DAKO), to assess only the tumoral cells, classified as negative (0 to 10% of irregular or weak staining of tumoral cells), positive (strong and complete staining of 30% or more of tumoral cells) and indetermined (complete but weak or not uniform staining of at least 10% of tumoral cells, or intense and complete staining in less than 30% of tumoral cells).

### **Statistical analysis**

The data report the means with standard deviations or frequency distributions. The continuous variables were evaluated to the normal distribution using the Kolmogorv-Smirnov test (data not shown). The comparisons between dense tissue and non-dense tissue were made using the Student paired T test (for variables with normal distribution) or Wilcoxon signed rank test (for variables without normal distribution), and the McNemar chi-squared (for categorical data). The significance level was 5% and the software used in the analyses was SAS version 9.2.

## RESULTS

### Demographic characteristics of the study cohort and tumor characteristics (Figure 1 and Table 1)

Subjects were aged between 29 and 59 years, with a median age of 44.4 years ( $\pm$  8.4). The median BMI of the subjects was 24.9 ( $\pm$  3.69), and among these, 14 were premenopausal and 4 were post-menopausal at the time of surgery (Table 1). The median age at menarche was 13.67 ( $\pm$  1.53). None of the patients had taken hormone replacement therapy. Only one subject had 1<sup>st</sup> degree parents with breast cancer (mother and sister). In addition, only one subject had a personal history of previous carcinoma *in situ* of the breast.

All mammograms were classified by Wolfe [3] as P1 (7), P2 (6) or Dy (5) and the breast carcinoma was clinically staged as 0 (6), I (1), IIa (6) and IIb (5).

The median tumor size was 3.26cm. Half of the tumors were positive for estrogen (9) and progesterone (9) receptors. Half of the tumors also expressed cerbB-2 (8 were 3+), while 7 were negative for cerbB-2 expression (0 or 1+).

After surgery, the subjects were pathologically staged as 0 (2), I (2), IIA (5), IIB (3), IIIA (1) or IIIB (5). There were no axillary metastases in 9 patients, one to three lymph nodes were involved in 7 and four or more lymph node metastasis were found in 2 subjects.

### **Histological and Immunohistochemical analyses of dense and non-dense breast tissues (Tables 2 and 3)**

The tissues obtained from dense and non-dense breast tissues had the same weight and volume. The number of terminal ductal lobular units was higher for dense than non-dense breast tissue (8.31 vs 5.69,  $p = 0.0019$ ).

We found no difference in percent composition of fat between dense and non-dense tissue ( $p = 0.0700$ ), although there was a trend towards more intense fat tissue in non-dense breast tissue. However, the percentages of the composition of brownish spots among dense (72% intense) and non-dense tissue (83% absent or scarce) were significantly different ( $p = 0.0226$ ).

In the non-dense breast tissue, there were no proliferative lesions with atypia, while we found epithelial flat atypia in 3 dense breast tissues (Figure 4). Proliferative lesions without atypia were found in both tissues, but they were more frequent in dense breast tissues than in non-dense breast tissues (23.5% vs 11.8%,  $p = 0.0455$ ) (Figure 5). Non-proliferative lesions were also more frequent in dense breast tissues (17.6% vs 2.9%,  $p = 0.0253$ ).

In both areas the cell distribution was usually intra and inter-lobular. The cellularity of both tissues was the same.

Fibrosis was more frequently extensive or moderate in breast dense tissue while it was predominantly mild in non-dense breast tissue ( $p = 0.0300$ ) (Figure 6).

With regard to immunochemical analysis, estrogen and progesterone receptors were equally expressed in both tissues (Table 3). The expression of Ki67, as well as CD34 expression was the same for the different tissues (Figure 7).

## DISCUSSION

This study assessed the histological and immunochemical features of dense and non-dense breast areas in women with initial breast cancer undergoing mastectomy. We conducted image-guided sampling of dense and non-dense breast tissue areas within the same breast using a novel non-invasive methodology.

In contrast to other studies that used mastectomy specimens, since every breast has different areas of density within itself, we did not evaluate the breast and consider its general density as a whole, rather we evaluated each dense and non-dense selected areas within each breast (similarly to the study by Lin et al. [32]). In addition to the studies of breast area specimens, we assessed the mammographic density of each area of interest before proceeding to biopsy.

The dense breast areas evaluated were significantly associated to with fibrosis (Table 2), and numerous previous articles have associated fibrosis with mammographic density [21, 22, 23, 24, 32, 33, 34, 35, 36].

Alowami et al. [22] evaluated breast samples from breast biopsies for benign or pre-invasive disease. Greater mammographic density was associated with a larger incidence of carcinoma ductal *in situ* in comparison to benign non-proliferative lesion and proliferative lesion without atypia ( $p = 0.01$ ). Greater mammographic density was also associated with more extensive fibrosis, as shown by the proportion of collagen in the tissue, density of collagen tissue or extent of peri-ductal fibrosis. These results suggest the association between mammographic density and stroma.

Epithelial features evaluated in our study were also significantly different between the dense and non-dense areas. We found a greater number of terminal ductal lobular units in the dense tissue compared to the non-dense tissue ( $p = 0.001$ ). Proliferative lesions with atypia were only found in the dense tissue and proliferative lesions without atypia were more frequent in the dense areas, compared to the non-dense areas.

Previous articles have associated mammographic density and epithelial proliferation, with or without atypia and with or without stroma proliferation [24, 36, 37, 38, 39]. The higher incidence of proliferative lesions in the dense breast could explain its higher risk for breast cancer.

A review of ten studies, carried out by Boyd et al. [1], showed that nine studies evaluated breast from mastectomies or biopsies and that most of them qualitatively analyzed the density of the breast where the samples came from. Six of the nine studies that described epithelium found that epithelial proliferation, with or without atypia, was associated to mammographic density. All of the six studies that described stroma found that stroma proliferation was also associated to density. All studies were based on the breast tissue of women with suspicious or known disease and the relationship between histology and radiology of these samples may not be representative for women in general.

Li et al. [23], analyzed mastectomy specimens from forensic autopsies and associated higher mammographic density to greater total nuclear area ( $p < 0.001$ ), greater nuclear area of epithelial and non-epithelial cells, greater area of glandular structures and a greater proportion of collagen ( $p < 0.001$ ). Collagen was present in the greatest quantity and was most strongly associated with percent mammographic density.

Age, BMI and postmenopausal status were significantly and inversely associated to mammographic density and all of the measurements of the breast tissue. Parity and greater number of births were inversely associated with collagen percentage.

Li et al. [23] also found that columnar cell lesions were more frequent in biopsy samples from higher density breasts and were positively associated with the percentage of the biopsy sample occupied by collagen ( $p < 0.001$ ) and the percentage that was glandular area ( $p < 0.001$ ). Interestingly, in our study, the most frequent proliferative lesion with atypia in dense breast area was a columnar cell lesion (data not shown) – in all of the three subjects – in two of these subjects the lesion was associated with atypical ductal hyperplasia and atypical lobular hyperplasia, respectively.

Although, in our study, there was a trend towards more proliferative lesions in the dense tissue, proliferative activity was the same for both tissues, as demonstrated by the same Ki67 staining in the different areas.

Previous studies that have assessed proliferative markers (Ki67) in high density tissue also did not find significant results [24, 32, 40, 41]. There is empiric evidence that suggests that mammary progenitors enter a state of cellular quiescence between cycles of regenerative activity to maintain their self-renewing capacity [42, 43, 44] and that a high breast density environment could contribute to this state [32].

Hawes et al. [24] assessed the number of epithelial cells in terminal ductal lobular units and mammary ducts and their respective proliferative rates, in correlation with the histologic densities in each woman. The relationship between mammographic density extent and the amount of epithelial tissue was associated with a higher collagen amount, leading to the hypothesis that the higher risk of breast cancer that is associated with higher density could accrue from a higher epithelial quantity. However, Ki67

expression was not higher in the dense breast. The basis of the strong association between mammographic density and breast cancer may only be due to a greater amount of epithelial tissue in dense breast. However, it is not clear why epithelial tissue is associated with a higher connective tissue density. Whether the breast epithelium is capable of inducing the presence of density, or whether the breast epithelium can only survive in higher density areas, is not known.

A recent and similar study by Lin et al [32] associated higher density tissues to higher stromal and lower fat compositions, with no evidence of difference in glandular areas compared to lower density regions. However, high density regions had higher relative gland counts. Lin et al. also assessed lobular involution and found that smaller and lower complexity glands were more incident in high density areas.

In our study, both dense and non-dense areas had similar expressions of hormone receptors. The relationship between breast cancer and mammographic density may be due to factors other than estrogen exposure. A recent study by Vachon et al [45] investigated dense and non-dense tissue in healthy voluntary women to assess aromatase immunoreactivity. The aromatase immunoreactivity was greater for dense tissue than non-dense tissue. However, studies of aromatase inhibitors and changes in mammographic density are inconsistent. Vachon et al. [45] also found that the proportions of stroma and epithelium were greater in dense areas than in non-dense areas and that adipocytes were more prevalent in non-dense tissue.

Although we had a small number of subjects, our study design allowed intra-subject analysis, enabling a greater power for statistical analysis, since all areas of high and low density were completely controlled for all possible confounding factors (such as age, menopausal status, BMI). All samples had a good reasonable size, different from

samples of core biopsy or vacuum-assisted biopsy. Moreover, all samples came from breast cancer patients, namely high risk breasts. However, one of our study limitations is that we have developed a novel localization technique of breast areas that may not be reproducible. It would be appropriate to design a study to confirm its feasibility. Also, we could have assembled a control group of woman with non-dense breast (N1) [3] and compared to our cohort.

Our study suggests the association of stroma and epithelium with mammographic density. However, it is unclear why we find a higher incidence of proliferative lesions and cancer in dense breast.

Epithelial and stromal cells, collagen (product of stromal fibroblasts) and fat are all components that contribute to variations in mammographic density and are related to each other in several ways. Factors that affect one of these components may affect the others, either directly or indirectly, and each component has properties that may influence the risk and progression of breast cancer [46].

Our study findings and the literature review lead to the conclusion that both stroma fibrosis and epithelial proliferation are responsible for high mammographic density. However, the biological mechanisms involved are unclear. Paracrine growth factors that allow communication among epithelial and stromal cells, as well as factors that may affect each component should be the aim of future research.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## SPONSORSHIP

The authors declare no financial support.

## REFERENCES

1. Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, Lee V, Hopper JL, Yaffe MJ, Paterson AD. Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6(10):798-808.
2. Johns PC, Yaffe MJ. X-ray characterisation of normal and neoplastic breast tissues. *Phys Med Biol.* 1987;32(6):675-95.
3. Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer. *AJR Am J Roentgenol.* 1976;126(6):1130-7.
4. Byng JW, Boyd NF, Fishell E, Jong RA, Yaffe MJ. The quantitative analysis of mammographic densities. *Phys Med Biol.* 1994;39(10):1629-38.
5. McCormack VA and dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1159-69.
6. Boyd NF, Guo H, Martin LJ et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227-36.
7. Vachon CM, Brandt KR, Ghosh K et al. Mammographic Breast Density as a General marker of breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:43-9.

8. Byrne C, Schairer C, Wolfe J et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(21):1622-9.
9. Vachon CM, Kuni CC, Anderson K, Anderson VE, Sellers TA. Association of mammographically defined percent breast density with epidemiologic risk factors for breast cancer. *Cancer Causes Control.* 2000;11(7):653-62.
10. Maskarinec G, Pagano I, Lurie G, Kolonel LN. A longitudinal investigation of mammographic density: the multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):732-9.
11. Martin LJ, Boyd NF. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* 2008;10(1):201.
12. Sung J, Song YM, Stone J, Lee K, Lee D. Reproductive factors associated with mammographic density: a Korean co-twin control study. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):567-72.
13. Boyd NF, Dite GS, Stone J et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(12):886-94.
14. Stone J, Dite GS, Gunasekara A et al. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):612-7.
15. Pankow JS, Vachon CM, Kuni CC et al. Genetic analysis of mammographic breast density in adult women: evidence of a gene effect. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(8):549-56.

16. Cuzick J, Warwick J, Pinney E, Warren RM, Duffy SW. Tamoxifen and breast density in women at increased risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(8):621-8.
17. Mitchell G, Antoniou AC, Warren R et al. Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Res.* 2006;66(3):1866-72.
18. Passaperuma K, Warner E, Hill KA, Gunasekara A, Yaffe MJ. Is mammographic breast density a breast cancer risk factor in women with BRCA mutations? *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3779-83.
19. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Trichler DL, Yaffe MJ. Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(12):1133-44.
20. Boyd NF, Jensen HM, Cooke G, Han HL. Relationship between mammographic and histological risk factors for breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(15):1170-9.
21. Guo YP, Martin LJ, Hanna W et al. Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):243-8.
22. Alowami S, Troup S, Al-Haddad S, Kirkpatrick I, Watson PH. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):R129-35.
23. Li T, Sun L, Miller N, Nicklee T et al. The association of measured breast tissue characteristics with mammographic density and other risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):343-9.

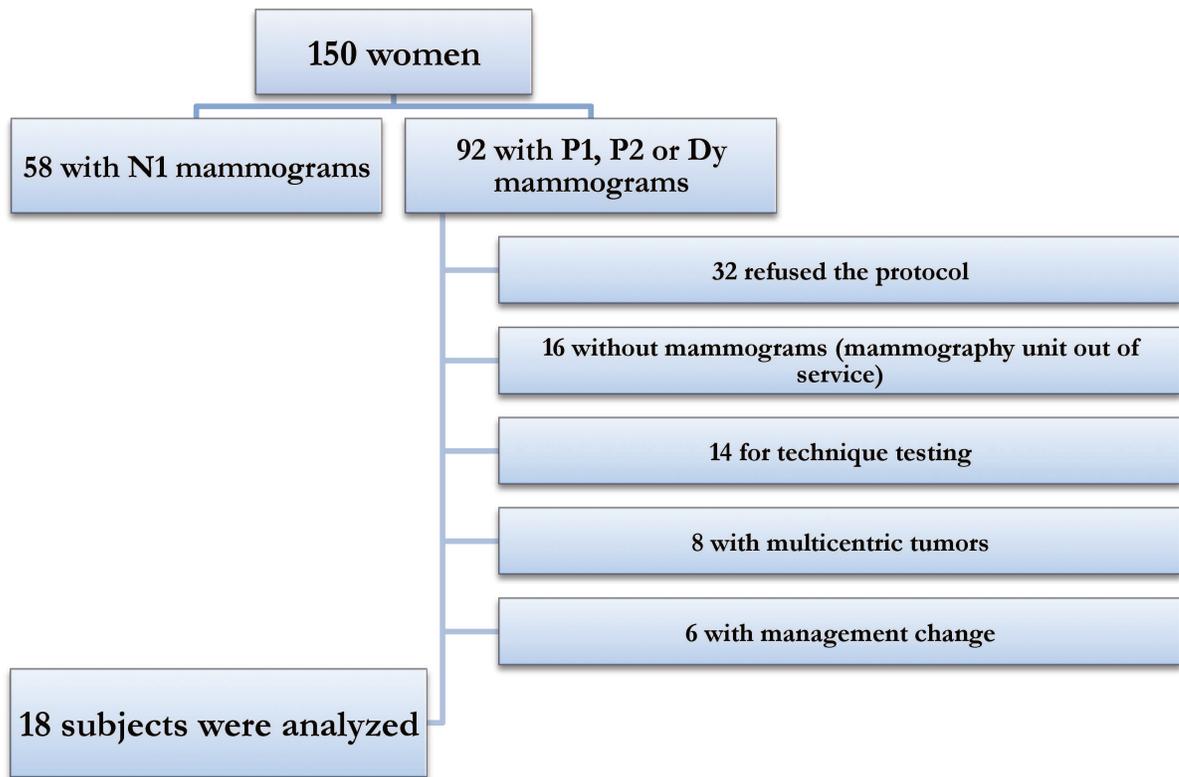
24. Hawes D, Downey S, Pearce CL, Bartow S, Wan P, Pike MC, Wu AH. Dense breast stromal tissue shows greatly increased concentration of breast epithelium but no increase in its proliferative activity. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):R24.
25. International Union Against Cancer (UICC) – TNM Classification of Malignant Tumours 2009.
26. Cochrane RA, Valasiadou P, Wilson AR, Al-Ghazal SK, Macmillan RD. Cosmesis and satisfaction after breast-conserving surgery correlates with the percentage of breast volume excised. *Br J Surg.* 2003;90(12):1505-9.
27. Losken A, Fishman I, Denson DD, Moyer HR, Carlson GW. An objective evaluation of breast symmetry and shape differences using 3-dimensional images. *Ann Plast Surg.* 2005;55(6):571-5.
28. Kovacs L, Eder M, Hollweck R, Zimmermann A et al. New aspects of breast volume measurement using 3-dimensional surface imaging. *Ann Plast Surg.* 2006;57(6):602-10.
29. Zyganitidis C, Bliznakova K, Pallikarakis N. A novell simulation algorithm for soft tissue compression. *Med Biol Eng Comput.* 2007;45:661-669.
30. Alvarenga M. Breast Tumours. In: Billis A, Altemani AMAM, Andrade LALA. *Patologia Diagnóstica de Tumores.* 2<sup>nd</sup> Edition. Campinas: Impressão Digital Gráfica e Editora; 2010, pages 295-340.
31. World Health Organization – Tumours of the breast and female genital organs (WHO/IARC Classification of Tumours). IARCPress-WHO; 1<sup>st</sup> Edition (Oct 1<sup>st</sup>, 2003). The International Agency for Research on Cancer (Author). Tavassoli FA (Editor). Devilee P (Editor).

32. Lin SJ, Cawson J, Hill P, Haviv I, Jenkins M, Hopper JL, Southey MC, Campbell IG, Thompson EW. Image-guided sampling reveals increased stroma and lower glandular complexity in mammographically dense breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):505-16.
33. Fisher ER, Palekar A, Kim WS, Redmond C. The histopathology of mammographic patterns. *Am J Clin Pathol.* 1978;69(4):421-6.
34. Bright RA, Morrison AS, Brisson J, Burstein NA, Sadowsky NS, Kopans DB, Meyer JE. Relationship between mammographic and histologic features of breast tissue in women with benign biopsies. *Cancer.* 1988;61(2):266-71.
35. Arthur JE, Ellis IO, Flowers C, Roebuck E, Elston CW, Blamey RW. The relationship of "high risk" mammographic patterns to histological risk factors for development of cancer in the human breast. *Br J Radiol.* 1990;63(755):845-9.
36. Bartow SA, Mettler FA, Black WC. Correlations between radiographic patterns and morphology of the female breast. *Rad Patterns Morph.* 1997;13:263-75.
37. Boyd NF, Jensen HM, Cooke G, Han HL, Lockwood GA, Miller AB. Mammographic densities and the prevalence and incidence of histological types of benign breast disease. Reference Pathologists of the Canadian National Breast Screening Study. *Eur J Cancer Prev.* 2000;9(1):15-24.
38. Bland KI, Kuhns JG, Buchanan JB et al. A clinicopathologic correlation of mammographic parenchymal patterns and associated risk factors for human mammary carcinoma. *Ann Surg.* 1982;195(5):582-94.
39. Urbanski S, Jensen HM, Cooke G, McFarlane D, Shannon P, Kruiikov V, Boyd NF. The association of histological and radiological indicators of breast cancer risk. *Br J Cancer.* 1988;58:474-9.

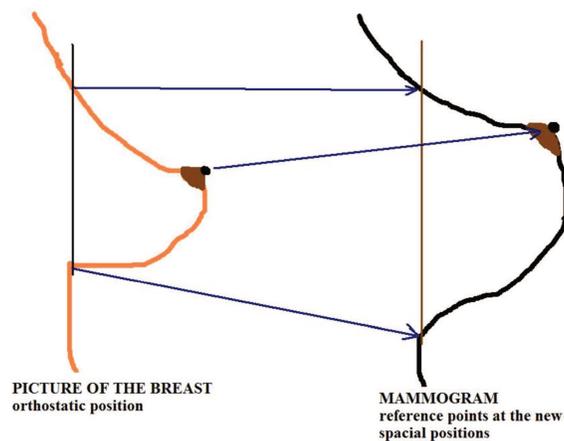
40. Khan QJ, Kimler BF, O'Dea AP, Zalles CM, Sharma P, Fabian CJ. Mammographic density does not correlate with Ki-67 expression or cytomorphology in benign breast cells obtained by random periareolar fine needle aspiration from women at high risk for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R35.
41. Verheus M, Maskarinec G, Erber E, Steude JS, Killeen J, Hernandez BY, Cline M. Mammographic density and epithelial histopathologic markers. *BMC Cancer.* 2009;9:182.
42. Smalley M and Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):832-44.
43. Harmes DC and DiRenzo J. Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypothesis? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009;14(1):19-27.
44. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *J Cell Science.* 2005;118:2585-94.
45. Vachon CM, Sasano H, Ghosh K et al. Aromatase immunoreactivity is increased in mammographically dense regions of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:243-52.
46. Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, Minkin S. Breast Tissue Composition and Susceptibility to Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1124-37.

## TABLES AND FIGURES

**Figure 1.** Subjects Selection



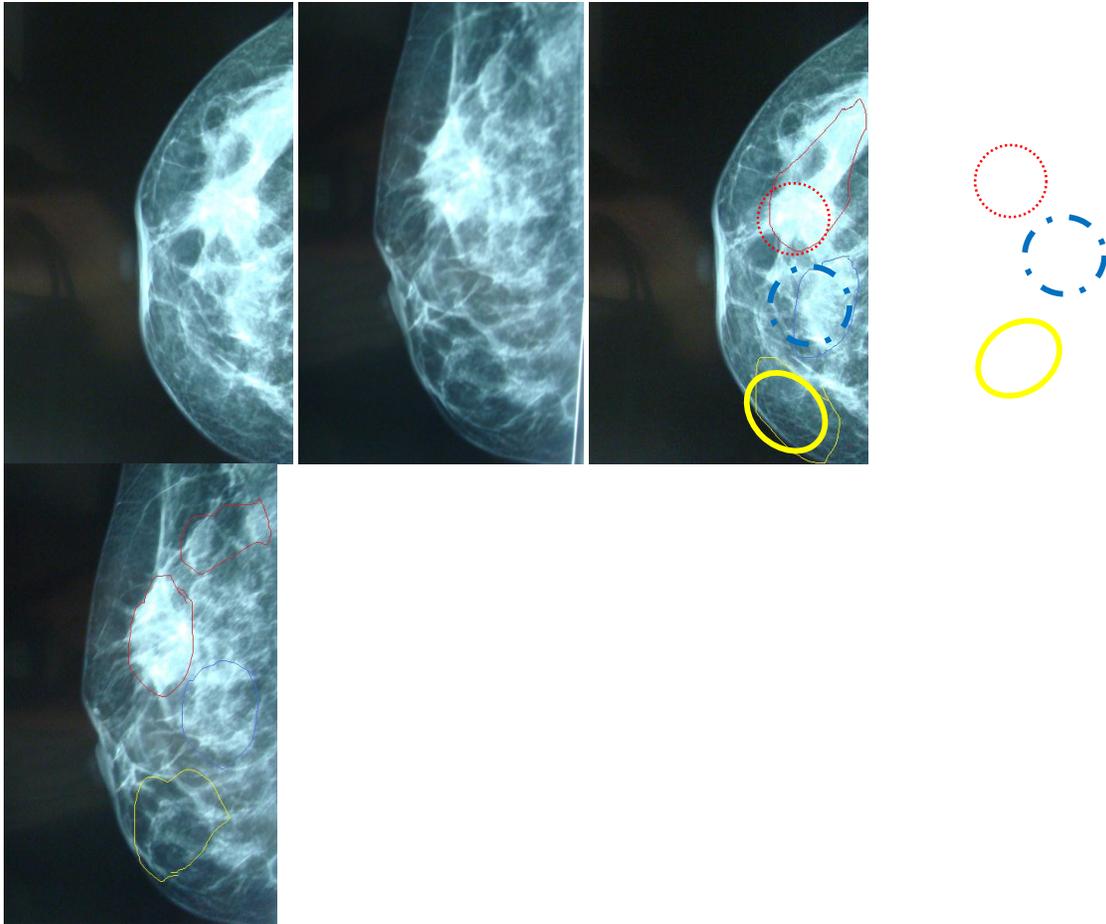
**Figure 2.** Example of the lateral vision of the breast – picture and mammogram – with the changes of geometry and the new positions of the reference points. A similar situation occurs with the cranio-caudal view. The posterior portion of the breast (chest wall) does not change.



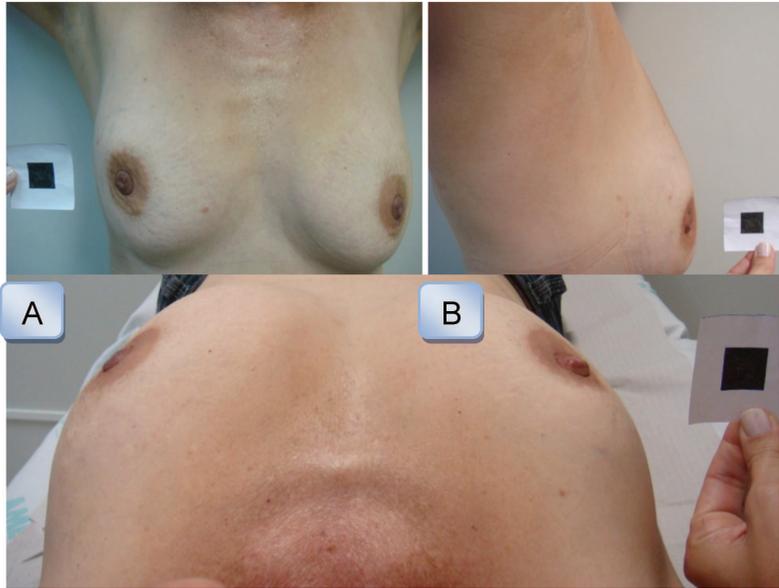
**Figure 3.** Steps for the localization technique (Examples A and B).

**EXAMPLE A**

**Step 1.** Mammogram and selection of dense area (circled in blue - ) , non-dense area (circled in yellow - ) and tumor area (circled in red - ) .

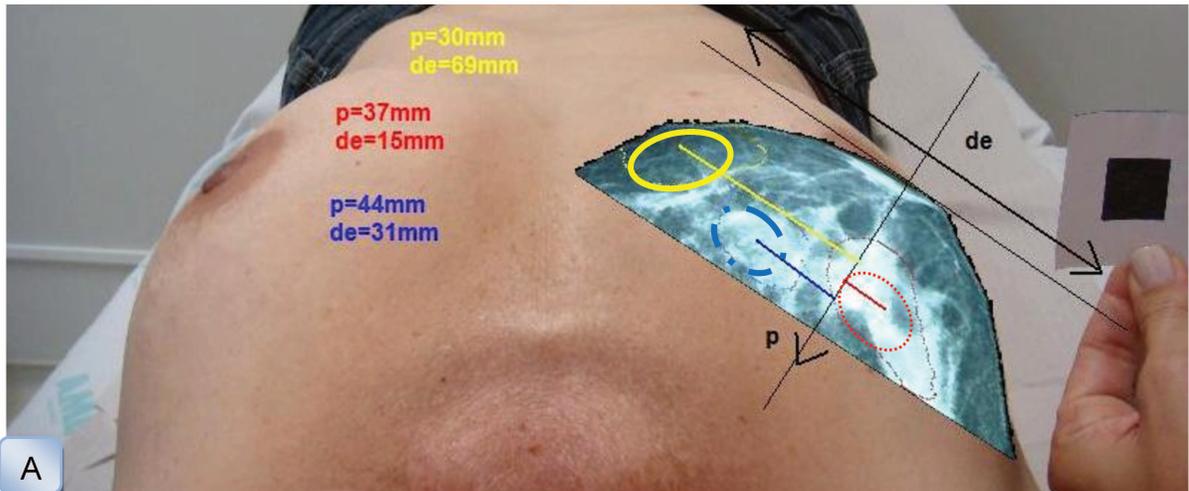


**Step 2.** Pictures of the subject with squares of known dimensions (pixel): a) frontal view, b) lateral view and c) craniocaudal view.

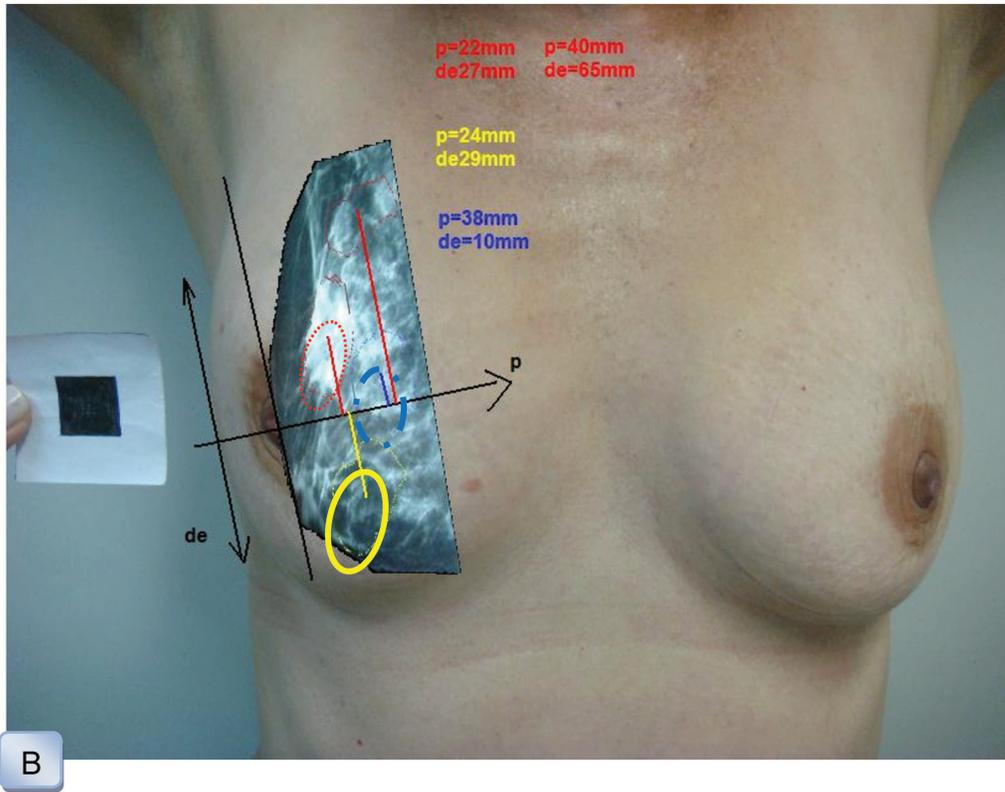


C

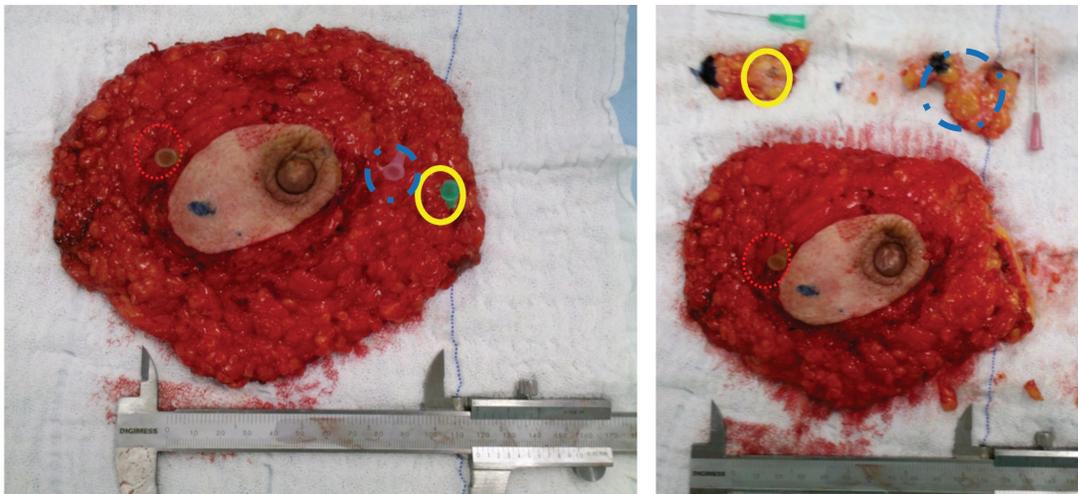
**Step 3.** Breast deformation from the mammogram position to the surgery position and localization of the mammogram selected areas from the reference points. a) Blue – dense area; Yellow – non-dense area; Red – tumor area; de – sidelong distance ; p – depth; b) Blue – dense area; Yellow – non-dense area; Red – tumor area; de – vertical distance; p – depth



A

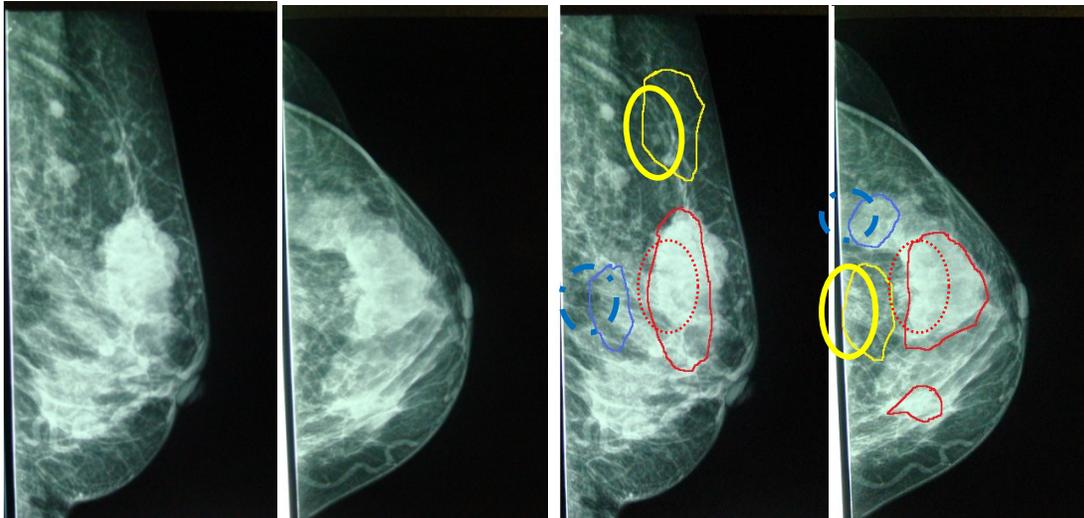


**Step 4.** Removed breast and localized interest areas: Blue – dense area; Yellow – non dense area; Red – tumor area

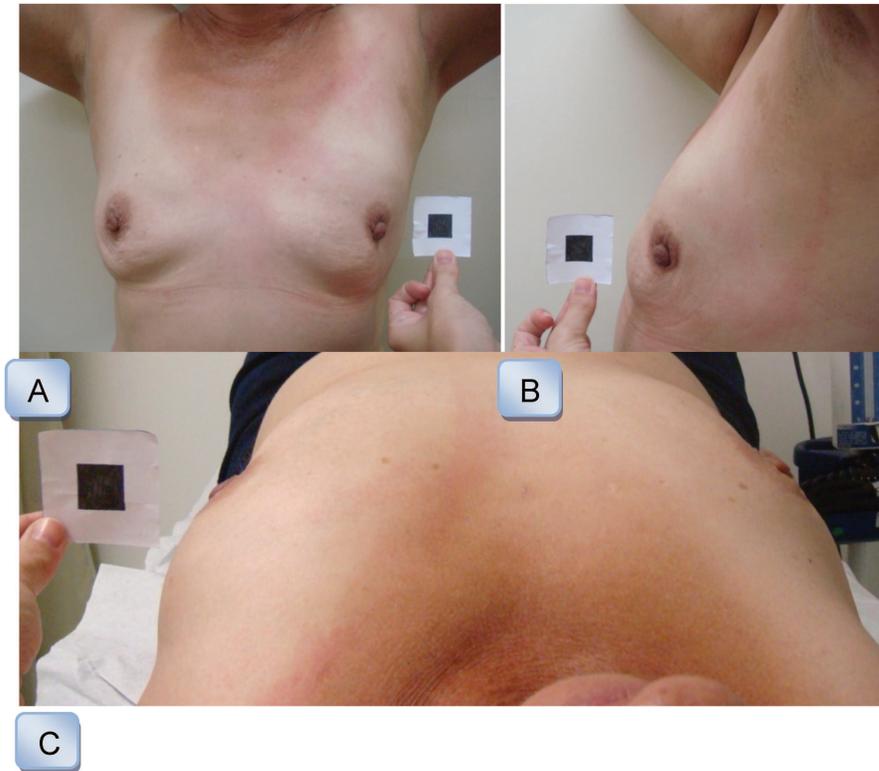


**EXAMPLE B**

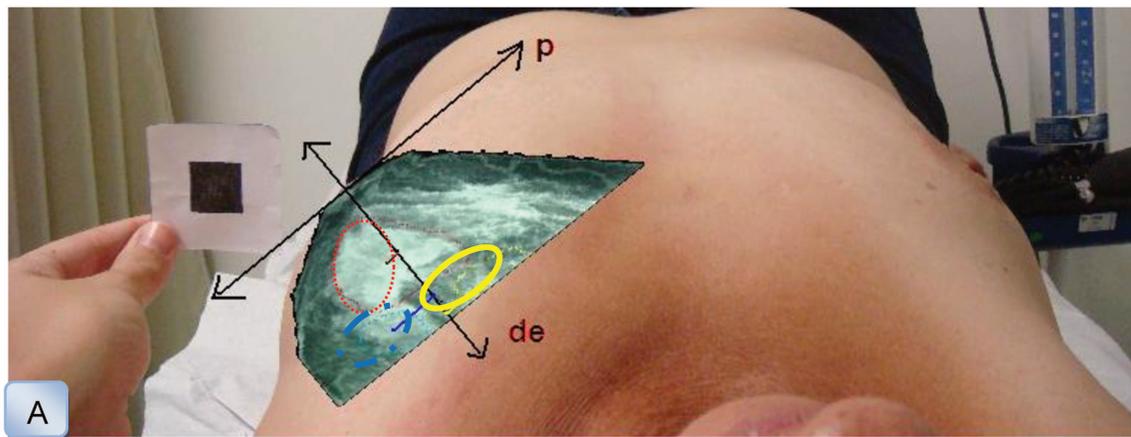
**Step 1.** Mammogram and selection of dense area (circled in blue - ) , non-dense area (circled in yellow - ) and tumor area (circled in red - ) .

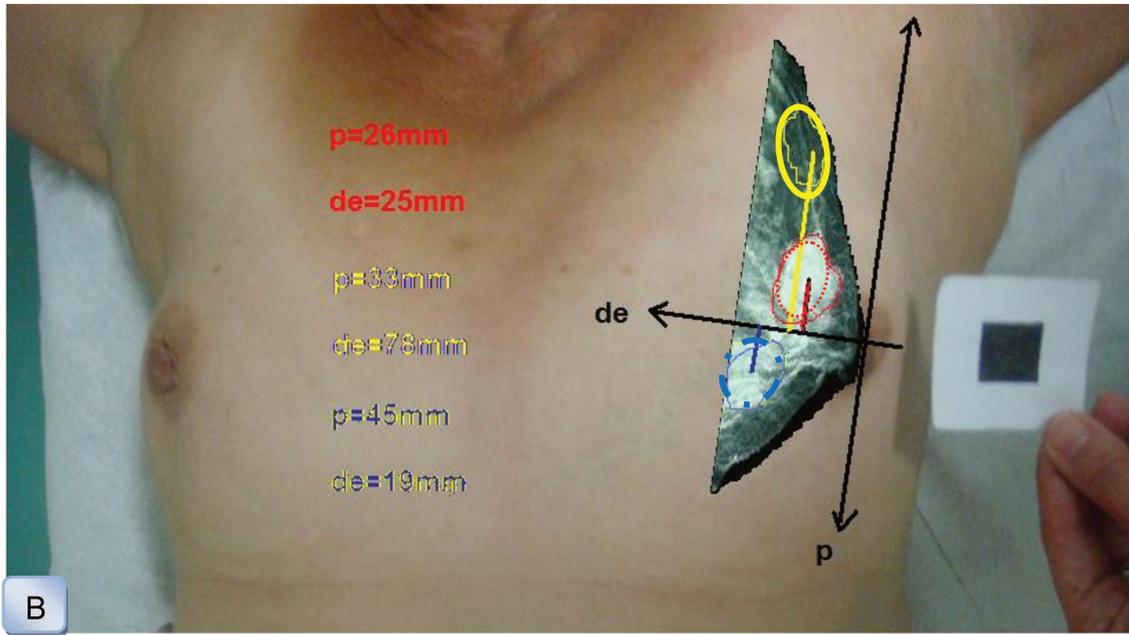


**Step 2.** Pictures of the subject with squares of known dimensions (pixel): a) frontal view, b) lateral view and c) craniocaudal view.

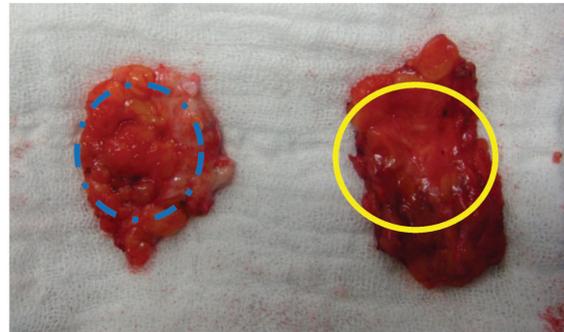
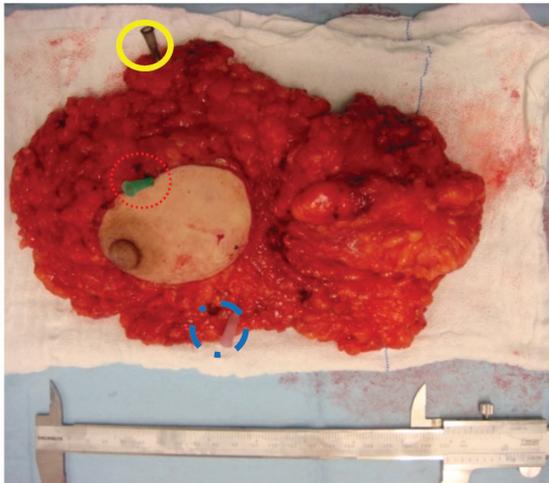


**Step 3.** Breast deformation from the mammogram position to the surgery position and localization of the mammogram selected areas from the reference points. a) Blue – dense area;  $p = 55\text{mm}/de = 21\text{mm}$ ; Yellow – non-dense area;  $p = 63\text{mm}/de = 23\text{mm}$ ; Red – tumor area;  $p = 33\text{mm}/de = 5\text{mm}$ ; de – sidelong distance; p – depth; b) Blue – dense area;  $p = 45\text{mm}/de = 19\text{mm}$ ; Yellow – non-dense area;  $p = 33\text{mm}/de = 78\text{mm}$ ; Red – tumor area;  $p = 26\text{mm}/de = 25\text{mm}$ ; de – sidelong distance; p – depth.

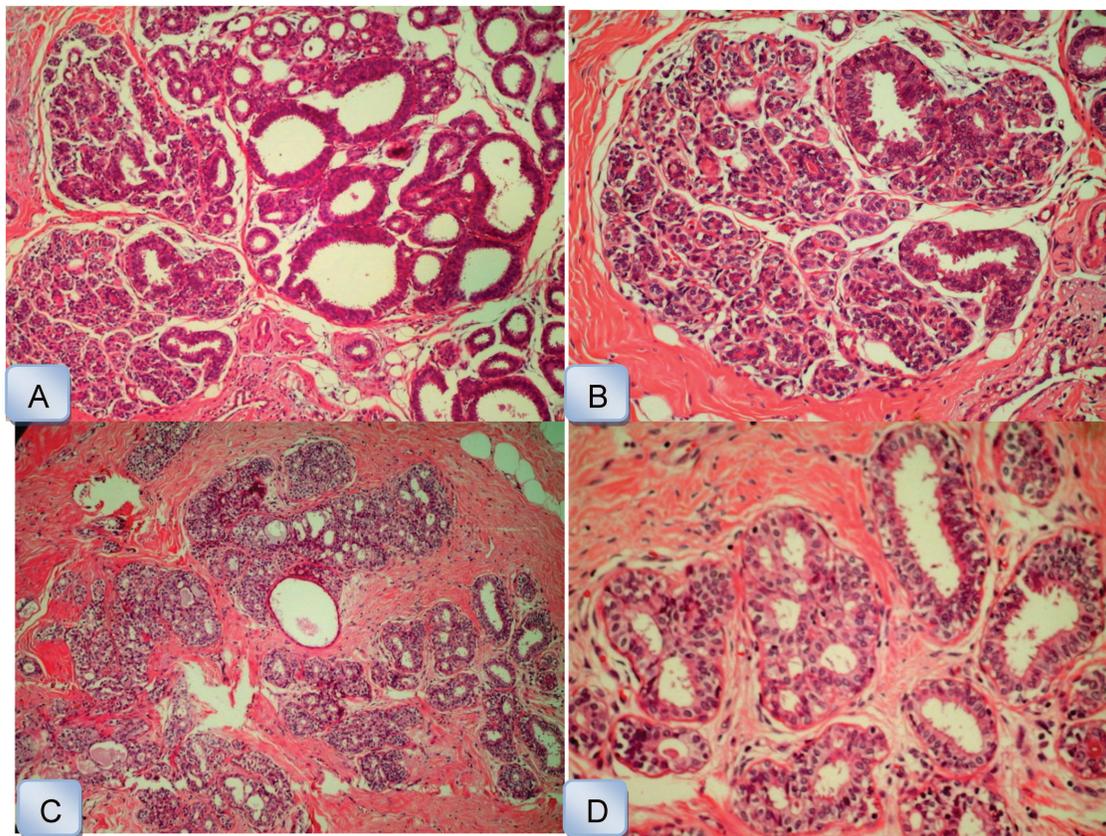




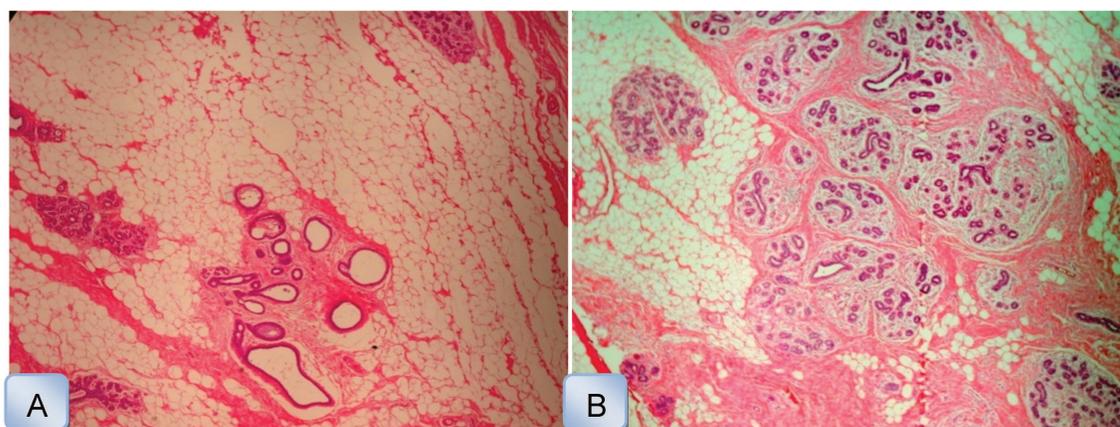
**Step 4.** Removed breast and localized interest areas: Blue – dense area; Yellow – non dense area; Red – tumor area.



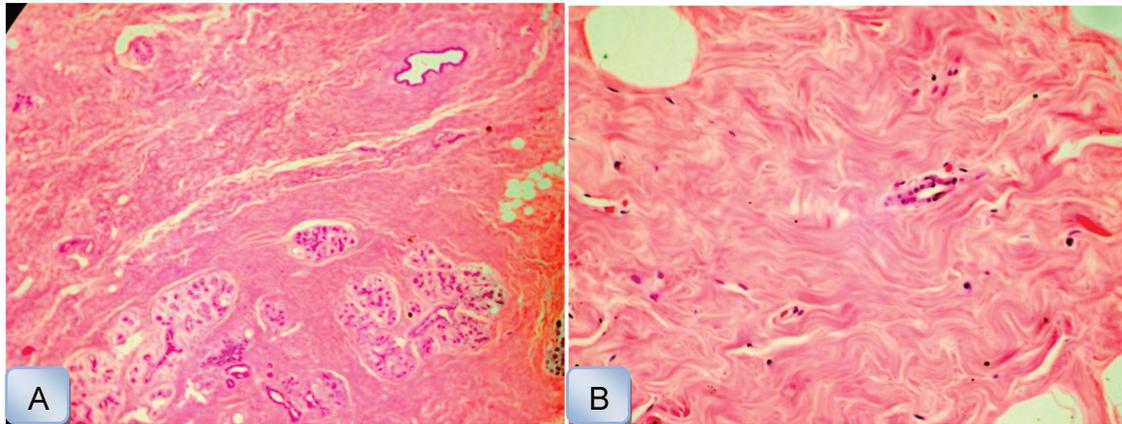
**Figure 4. Dense Area:** A) Columnar cell change with atypia or flat epithelial atypia (FEA) and atypical lobular hyperplasia (ALH). H.E.,10x; B) FEA + ALH. H.E., 20x; C) Atypical ductal hyperplasia (ADH) and FEA. H.E.,10x. D) ADH and FEA. H.E.,20x. Nikon Eclipse E200 Mycroscope.



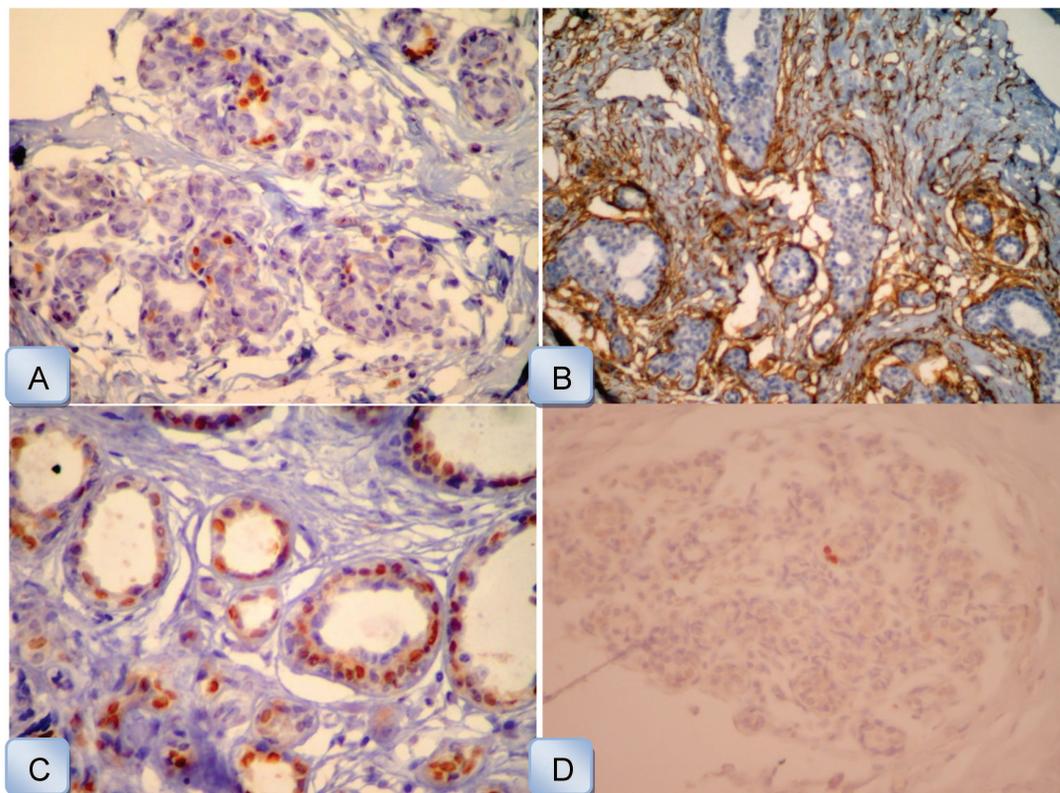
**Figure 5. Non-dense area:** A) Columnar cell change without atypia and fat tissue in stroma. H.E., 4x. B) Well developed lobules and fat tissue in stroma. H.E., 4x. Nikon Eclipse E200 Mycroscope.



**Figure 6.** A) Intense fibrosis in stroma with rare lobules in Dense Area. H.E., 4x. B) Stroma fibrosis with rare fibroblasts in Non-dense Area. H.E., 20x. Nikon Eclipse E200 Mycroscope.



**Figure 7. Immunochemical analysis:** A) ER, ID5 clone, with intense nuclear positivity in an area with columnar cellular change without atypia. 40x. Dense area; B) ER, ID5 clone, with mild nuclear positivity in lobular epithelial cells. 40x. Non-dense area; C) CD-34, QBEend 10 clone, with intense positivity in myofibroblasts of stroma and around the ducts. 20x. Dense area; D) Ki-67, MIB-1 clone, low, with rare nuclear positive cells. 40x. Nikon Eclipse E200 Mycroscope.



## 5. Conclusões

---

- A área densa teve maior quantidade de pontos róseos ou pardacentos que a área não densa, e ambas as áreas tiveram a mesma quantidade de tecido adiposo.
- A área densa apresentou maior número de ductos e unidades ductais terminais-lobulares, além maior número de lesões proliferativas com e sem atipias e maior número de lesões não-proliferativas do que a área não densa.
- A área densa apresentou fibrose mais extensa do que a área não densa, porém as duas áreas tiveram a mesma distribuição e celularidade estromais.
- As áreas densa e não densa tiveram a mesma expressão de marcadores imuno-histoquímicos: receptores de estrógeno e progesterona, Ki-67 (Mib-1) e CD-34.

## 6. Referências Bibliográficas

---

1. Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, Lee V, Hopper JL, Yaffe MJ et al.  
Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6(10):798-808.
2. Johns PC, Yaffe MJ. X-ray characterisation of normal and neoplastic breast tissues. *Phys Med Biol.* 1987;32(6):675-95.
3. Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer. *AJR Am J Roentgenol.* 1976;126(6):1130-7.
4. Reston VA. ACR breast imaging reporting and data system atlas. American College of Radiology. 2003.
5. Boyd NF, Byng JW, Jong RA, Fishell EK, Little LE, Miller AB et al.  
Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study. *J Natl Cancer Inst.* 1995, 87:670-5.
6. Garrido-Esteba M, Ruiz-Perales F, Miranda J, Ascunce N, González-Román I, Sánchez-Contador C et al. Evaluation of mammographic density patterns: reproducibility and concordance among scales. *BMC Cancer.* 2010; 10:485.
7. Byng JW, Boyd NF, Fishell E, Jong RA, Yaffe MJ. The quantitative analysis of mammographic densities. *Phys Med Biol.* 1994;39(10):1629-38.

8. McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1159-69.
9. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227-36.
10. Vachon CM, Brandt KR, Ghosh K, Scott CG, Maloney SD, Carston MJ et al. Mammographic breast density as a general marker of breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:43-9.
11. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA, et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(21):1622-9.
12. Titus-Ernstoff L, Tosteson AN, Kasales C, Weiss J, Goodrich M, Hatch EE et al. Breast cancer risk factors in relation to breast density (United States). *Cancer Causes Control.* 2006;17(10):1281-90.
13. Vachon CM, Kuni CC, Anderson K, Anderson VE, Sellers TA. Association of mammographically defined percent breast density with epidemiologic risk factors for breast cancer. *Cancer Causes Control.* 2000;11(7):653-62.
14. Maskarinec G, Pagano I, Lurie G, Kolonel LN. A longitudinal investigation of mammographic density: the multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):732-9.
15. Martin LJ, Boyd NF. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* 2008;10(1):201.

16. Sung J, Song YM, Stone J, Lee K, Lee D. Reproductive factors associated with mammographic density: a Korean co-twin control study. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):567-72.
17. Boyd NF, Dite GS, Stone J, Gunasekara A, English DR, McCredie MR et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(12):886-94.
18. Stone J, Dite GS, Gunasekara A, English DR, McCredie MRE, Giles GG et al. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):612-7.
19. Pankow JS, Vachon CM, Kuni CC, King RA, Arnett DK, Grabrick DM et al. Genetic analysis of mammographic breast density in adult women: evidence of a gene effect. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(8):549-56.
20. van Duijnhoven FJB, Bezemer ID, Peeters PHM, Roest M, Uitterlinden AG, Grobbee DE et al. Polymorphisms in the estrogen receptor  $\alpha$  gene and mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11):2655-60.
21. Chambo D, Kemp C, Costa AMM, Souza NCN, Guerreiro da Silva IDC. Polymorphism in CYP17, GSTM1 and the progesterone receptor genes and its relationship with mammographic density. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:323-9.
22. Mitchell G, Antoniou AC, Warren R, Peock S, Brown J, Davies R et al. Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Res.* 2006;66(3):1866-72.

23. Cuzick J, Warwick J, Pinney E, Warren RM, Duffy SW. Tamoxifen and breast density in women at increased risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(8):621-8.
24. Passaperuma K, Warner E, Hill KA, Gunasekara A, Yaffe MJ. Is mammographic breast density a breast cancer risk factor in women with BRCA mutations? *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3779-83.
25. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Trichler DL, Yaffe MJ. Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(12):1133-44.
26. Li T, Sun L, Miller N, Nicklee T, Woo J, Hulse-Smith L et al. The association of measured breast tissue characteristics with mammographic density and other risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):343-9.
27. Guo YP, Martin LJ, Hanna W, Banerjee D, Miller N, Fishell E et al. Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):243-8.
28. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.* 1998;351(9113):1393-6.
29. Boyd NF, Stone J, Martin LJ, Jong R, Fishell E, Yaffe M et al. The association of breast mitogens with mammographic densities. *Br J Cancer.* 2002;87(8):876-82.

30. Byrne C, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Pollak M, Hankinson SE. Plasma insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein 3, and mammographic density. *Cancer Res.* 2000;60(14):3744-8.
31. Alowami S, Troup S, Al-Haddad S, Kirkpatrick I, Watson PH. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):R129-35.
32. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ and invasive breast lesions. *J Clin Pathol.* 2003;56:271-6.
33. Cîmpean AM, Raica M, Narița D. Diagnostic significance of the immunoexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. *Rom J Morphol Embryol.* 2005;46:123-9.
34. Hawes D, Downey S, Pearce CL, Bartow S, An P, Pike MC et al. Dense breast stromal tissue shows greatly increased concentration of breast epithelium but no increase in its proliferative activity. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):R24.
35. Weidner N, Moore DH 2nd, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody. *Hum Pathol.* 1994;25(4):337-42.
36. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, Li M, Hwang H, Krummenauer F et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Hum Pathol.* 1999;30(11):1314-20.

37. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
38. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol*. 2002;160(2):597-604.
39. Khan QJ, Kimler BF, O'Dea AP, Zalles CM, Sharma P, Fabian CJ. Mammographic density does not correlate with Ki-67 expression or cytomorphology in benign breast cells obtained by random periareolar fine needle aspiration from women at high risk for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):R35.
40. Alvarenga M. Tumores da mama. In: Billis A, Altemani AMAM, Andrade LALA (org.) *Patologia Diagnóstica de Tumores*. 2a ed. Campinas: Imprensa Digital Gráfica e Editora; 2010. p. 295-340.
41. Tamimi RM, Hankinson SE, Colditz GA, Byrne C. Endogenous sex hormone levels and mammographic density among postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(11): 2641-7.
42. Warren R, Skinner J, Sala E, Denton E, Dowsett M, Folkard E et al. Associations among mammographic density, circulating sex hormones, and polymorphisms in sex hormone metabolism genes in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(8):1502-8.

43. Ziv E, Tice J, Smith-Bindman R, Shepherd J, Cummings S, Kerlikowske K.  
Mammographic density and estrogen receptor status of breast cancer.  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13(12): 2090-5.
44. Greendale GA, Palla SL, Ursin G, Laughlin GA, Crandall C, Pike MC et al.  
The Association of endogenous sex steroids and sex steroid binding proteins  
with mammographic density: Results from the postmenopausal  
estrogen/progestin interventions mammographic density study. Am J  
Epidemiol. 2005;162(9):826-34.
45. Cuzick J, Warwick J, Pinney E, Duffy SW, Cawthorn S, Howel A et al.  
Tamoxifen-induced reduction in mammographic density and breast cancer  
risk reduction: a nested case-control study. J Natl Cancer Inst.  
2011;103(9):1-9.
46. Brisson J, Brisson B, Côté G, Maunsell E, Bérubé S, Robert J. Tamoxifen  
and mammographic breast densities. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.  
2000;9(9):911-5.
47. Sales Jr JFS, Cabello C, Alvarenga M, Torresan RZ, Duarte GM.  
Nonproliferative epithelial alteration and expression of estrogen receptor and  
Ki67 in the contralateral breast of women treated with tamoxifen for breast  
cancer. Breast. 2007;16(2):197-203.
48. Pollak M, Constantino J, Polychronakos C, Blauer SA, Guyda H, Redmond  
C, et al. Effect of tamoxifen on serum insulin-like growth factor I levels in  
stage I breast cancer patients. J Natl Cancer Inst. 1990; 84:1418-23.
49. Beattie MS, Costantino JP, Cummings SR, Wickerham DL, Vogel VG,  
Dowsett M et al. Endogenous sex hormones, breast cancer risk, and

- tamoxifen response: an ancillary study in the NSABP. Breast Cancer Prevention Trial (P-1). J Natl Cancer Inst. 2006;98(2):110-5.
50. Boyd NF, Martin LJ, Li Q, Sun L, Chiarelli AM, Hislop G et al. Mammographic density as a surrogate marker for the effects of hormone therapy on risk of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(5):961-6.
51. Boyd NF, Melnichouk O, Martin LJ, Hislop G, Chiarelli AM, Yaffe MJ et al. Mammographic density, response to hormones and breast cancer risk. J Clin Oncol. 2011;29(22):2985-92.
52. Ursin G, Pike MC, Spicer DV, Porrath SA, Reitherman RW. Can mammographic densities predict effects of tamoxifen on the breast? J Natl Cancer Inst. 1996;88:128-9.
53. Weitzel JN, Buys SS, Sherman WH, Daniels A, Ursin G, Daniels JR et al. Reduced mammographic density with use of a gonadotropin-releasing hormone agonist – based chemoprevention regimen in *BRCA1* carriers. Clin Cancer Res. 2007;13(2):654-8.
54. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, Little L, Martin L, Byng J et al. Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial. Canadian Diet and Breast Cancer Prevention Study Group. J Natl Cancer Inst. 1997;89(7):488-96.
55. Martin LJ, Greenberg CV, Kriukov V, Minkin S, Jenkins DJ, Yaffe M et al. Effect of a low-fat, high-carbohydrate dietary intervention on change in mammographic density over menopause. Breast Cancer Res Treat. 2009;113(1):163-72.

56. World Health Organization. Tumours of the breast and female genital organs (WHO/IARC Classification of Tumours). IARC Press-WHO; 1ª edição (1 Outubro, 2003). The International Agency for Research on Cancer (Author). Tavassoli FA (Editor). Devilee P (Editor).
57. Keys SA, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chron Dis*. 1972;25:329-43.
58. World Health Organization. Research on the menopause. Report of a WHO scientific group. Technical Report Series 670. Geneva: WHO. 1981.
59. International Union Against Cancer (UICC) – TNM Classification of Malignant Tumours 2009.
60. Cochrane RA, Valasiadou P, Wilson AR, Al-Ghazal SK, Macmillan RD. Cosmesis and satisfaction after breast-conserving surgery correlates with the percentage of breast volume excised. *Br J Surg*. 2003;90(12):1505-9.
61. Losken A, Fishman I, Denson DD, Moyer HR, Carlson GW. An objective evaluation of breast symmetry and shape differences using 3-dimensional images. *Ann Plast Surg*. 2005;55(6):571-5.
62. Kovacs L, Eder M, Hollweck R, Zimmermann A, Settles M, Schneider A et al. New aspects of breast volume measurement using 3-dimensional surface imaging. *Ann Plast Surg*. 2006;57(6):602-10.
63. Zyganitidis C, Bliznakova K, Pallikarakis N. A novel simulation algorithm for soft tissue compression. *Med Biol Eng Comput*. 2007;45:661-669.
64. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Scotland; 2000

65. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução n. 196/96 Conselho Nacional da Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética*. 1996;4(2):15-25. Suplemento.

# 7. Anexos

---

## 7.1. Anexo 1 – Ficha para coleta de dados

1/4

**Avaliação dos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos de mamas densas em pacientes submetidas a mastectomia em hospital de referência**

**Número da Ficha:**

1. Idade: \_\_\_ anos

2. Paridade: G \_\_\_ P \_\_\_ A \_\_\_

3. Peso: \_\_\_ kg Altura: \_\_\_ cm IMC: \_\_\_ kg/cm<sup>2</sup>

4. Estado Menopausal: A. Pré \_\_\_ B. Pós \_\_\_

5. Uso de TRH: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_

6. História familiar:

Mãe \_\_\_ Pré-menopausa \_\_\_ Pós-menopausa \_\_\_ Unilateral \_\_\_ Bilateral \_\_\_

Irmã \_\_\_ Pré-menopausa \_\_\_ Pós-menopausa \_\_\_ Unilateral \_\_\_ Bilateral \_\_\_

Avó \_\_\_ Pré-menopausa \_\_\_ Pós-menopausa \_\_\_ Unilateral \_\_\_ Bilateral \_\_\_

Outro familiar \_\_\_\_\_

7. História pessoal de câncer: A. Positiva \_\_\_ B. Negativa \_\_\_

Se positiva, especificar: \_\_\_\_\_

8. Idade à menarca: \_\_\_ anos

9. Densidade mamográfica:

A. N1 \_\_\_ B. P1 \_\_\_ C. P2 \_\_\_ C. DY \_\_\_

10. Estádio clínico:

▪ cT: A. T1 \_\_\_ B. T2 \_\_\_ C. T3 \_\_\_ D. T4a \_\_\_ E. T4b \_\_\_ F. T4c \_\_\_

▪ cN: A. N0 \_\_\_ B. N1 \_\_\_ C. N2 \_\_\_ D. N3 \_\_\_

▪ Estádio Clínico: A. I \_\_\_ B. IIA \_\_\_ C. IIB \_\_\_ D. Carcinoma in situ \_\_\_

**Avaliação dos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos de mamas densas em pacientes submetidas à mastectomia em hospital de referência**

**Número da Ficha:**

**Anatomopatológico da mama**

Número do exame: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

**Dados macroscópicos**

1. Cirurgia: \_\_\_\_\_
2. Medida da mama: \_\_\_ x \_\_\_ x \_\_\_ mm
3. Peso: \_\_\_ g
4. Medida do fuso de pele: \_\_\_\_\_ mm
5. Medida do tumor/nódulo: \_\_\_\_\_ mm
6. Distância do tumor/ nódulo da margem superficial: \_\_\_\_\_ mm
7. Margem mais próxima \_\_\_\_\_ distando do tumor: \_\_\_\_\_ mm
8. Tecido adiposo: A. Escasso \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_
9. Pontos róseos/pardacentos: A. Ausente \_\_\_ B. Escasso \_\_\_ C. Intenso \_\_\_
10. Medida da axila: \_\_\_ x \_\_\_ x \_\_\_ mm

**Dados microscópicos - Epitélio**

11. Número de ductos e UDTL: \_\_\_\_\_
12. Tipo de epitélio: A. Cúbico \_\_\_ B. Colunar \_\_\_ C. Apócrino
13. Lesões proliferativas e não proliferativas: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
14. Carcinoma *in situ*: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_
15. Carcinoma invasivo: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_

**Dados microscópicos – Estroma**

16. Fibrose: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_
17. Distribuição: A. Interlobular \_\_\_ B. Intralobular \_\_\_ C. Ambas \_\_\_
18. Celularidade: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_

**Marcadores imuno-histoquímicos**

19. Receptor de estrógeno: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_
20. Receptor de progesterona: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_
21. *cerbB-2*: A. Negativo (0 ou 1+) \_\_\_ B. Duvidoso (2+) \_\_\_ C. Positivo (3+) \_\_\_

**Avaliação dos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos de mamas densas em pacientes submetidas à mastectomia em hospital de referência**

**Número da Ficha:**

**Anatomopatológico da área mais densa não tumoral**

Número do exame: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

**Dados macroscópicos**

22. Medida: \_\_\_ x \_\_\_ x \_\_\_ mm

23. Peso: \_\_\_ g

24. Tecido adiposo: A. Escasso \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

25. Pontos róseos/pardacentos: A. Ausente \_\_\_ B. Escasso \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

**Dados microscópicos - Epitélio**

26. Número de ductos e UDTL: \_\_\_

27. Tipo de epitélio: A. Cúbico \_\_\_ B. Colunar \_\_\_ C. Apócrino

28. Lesões proliferativas e não proliferativas: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

29. Carcinoma *in situ*: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_

30. Carcinoma invasivo: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_

**Dados microscópicos – Estroma**

31. Fibrose: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_

32. Distribuição: A. Interlobular \_\_\_ B. Intralobular \_\_\_ C. Ambas \_\_\_

33. Celularidade: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_

**Marcadores imuno-histoquímicos**

34. Receptor de estrógeno: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

35. Receptor de progesterona: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

36. Ki-67: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

37. CD34: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

**Avaliação dos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos de mamas densas em pacientes submetidas à mastectomia em hospital de referência**

**Número da Ficha:**

**Anatomopatológico da área menos densa não tumoral**

Número do exame: \_\_\_\_\_ data: \_\_/\_\_/\_\_

**Dados macroscópicos**

38. Medida: \_\_\_ x \_\_\_ x \_\_\_ mm

39. Peso: \_\_\_ g

40. Tecido adiposo: A. Escasso \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

41. Pontos róseos/pardacentos: A. Ausente \_\_\_ B. Escasso \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

**Dados microscópicos - Epitélio**

42. Número de ductos e UDTL: \_\_\_

43. Tipo de epitélio: A. Cúbico \_\_\_ B. Colunar \_\_\_ C. Apócrino \_\_\_

44. Lesões proliferativas e não proliferativas: \_\_\_\_\_

---

45. Carcinoma *in situ*: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_

46. Carcinoma invasivo: A. Sim \_\_\_ B. Não \_\_\_ Se sim, tipo: \_\_\_\_\_

**Dados microscópicos – Estroma**

47. Fibrose: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_

48. Distribuição: A. Interlobular \_\_\_ B. Intralobular \_\_\_ C. Ambas \_\_\_

49. Celularidade: A. Leve \_\_\_ B. Moderada \_\_\_ C. Intensa \_\_\_

**Marcadores imuno-histoquímicos**

50. Receptor de estrógeno: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

51. Receptor de progesterona: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

52. Ki-67: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

53. CD34: A. Leve \_\_\_ B. Moderado \_\_\_ C. Intenso \_\_\_

## 7.2. Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

### **Avaliação dos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos de mamas densas em pacientes submetidas à mastectomia em hospital de referência**

Eu, \_\_\_\_\_, com \_\_\_\_ anos de idade, portadora do R.G.: \_\_\_\_\_, através deste documento, declaro que estou de acordo em participar do projeto de pesquisa sobre “aspectos histológicos da densidade mamográfica”, que serve para estudar melhor mamas de risco para câncer de mama e que talvez nos ajude a sabermos como tratarmos melhor e prevenir novos tumores.

Fui então informada de que serão realizadas fotografias (6) da minha mama em posição em pé, deitada e durante a realização da minha mamografia. Como tratamento para o meu câncer de mama, será realizada a mastectomia, pois este é o tratamento padrão para casos como o meu. Após retirada a minha mama, serão retirados dois pequenos pedaços dela, não levando a nenhuma consequência a mais para o meu tratamento e não influenciando o mesmo.

Talvez a retirada desses pedaços da minha mama normal (partes sem tumor) traga alguma informação que possa ser útil, visto que eu tenho câncer de mama.

Este procedimento será realizado pela Dra. Priscila Marshall e pelo Dr. César Cabello e qualquer dúvida, posso tirá-la diretamente com o pesquisador responsável através de seu telefone: (0-xx-19-97912761) e que reclamações que possam surgir poderei contatar o comitê de ética através do telefone: 0-xx-19-37888936.

Durante toda a pesquisa posso ser esclarecida de qualquer coisa que eu quiser a respeito, como por exemplo, o resultado do exame dos pedaços analisados.

Se eu não quiser participar, ou quiser me retirar desta pesquisa a qualquer momento, não vou ter qualquer prejuízo no meu tratamento ou no meu relacionamento com a equipe que me trata.

Sei que não ganharei dinheiro participando desta pesquisa, sendo a participação totalmente voluntária.

Também fui informada que o pesquisador ao apresentar os resultados desta pesquisa em congressos, publicações ou quaisquer outras atividades, manterá completo sigilo sobre a minha identidade, e que posso abandonar este estudo sem nenhum prejuízo ao meu tratamento, a qualquer momento.

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Voluntária

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

### 7.3. Anexo 3 – Carta de aprovação na Comissão de Pesquisa do CAISM



Comissão de Pesquisa do DTG / CAISM

Campinas, 26 de setembro de 2008

Protocolo nº: 053/2008

O protocolo de pesquisa "*Avaliação dos aspectos histológicos e imunohistoquímicos de mamas em pacientes submetidas a mastectomia em hospital de referência*" dos pesquisadores Prof. Dr. César Cabello dos Santos, Priscila Silva Marshall, Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, Dr. Eduardo Tinois, Dr. Giuliano Mendes Duarte, Dr. Renato Zocchio Torresan, Patrícia Andrade Brandalise, Sirlei Siani Morais foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM em 25/09/2008.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Ellen Hardy  
Presidenta

Rua Alexander Flemming, n.º101 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas-SP  
Fone: (19) 3521-9402  
comissaoPesquisa@caism.unicamp.br



## 7.4. Anexo 4 – Carta de aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da FCM

### - UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 16/12/08.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 1076/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0849.0.146.000-08

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS DE MAMAS EM PACIENTES SUBMETIDAS A MASTECTOMIA EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA”.  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** César Cabello do Santos  
**INSTITUIÇÃO:** CAISM/UNICAMP  
**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/12/2008  
**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 16/12/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

**II - OBJETIVOS**

Estudar a composição histológica e biomolecular da mama de apresentação mamográfica densa em mulheres submetidas a mastectomia por câncer de mama em estágio inicial (I e II) ou por carcinoma ductal in situ.

**III - SUMÁRIO**

Neste estudo, pretendemos avaliar a composição histológica e biomolecular da mama de apresentação mamográfica densa em relação a mama de apresentação mamográfica não densa em mulheres submetidas a mastectomia. As mamografias dos sujeitos selecionados serão digitalizadas após sua entrada no estudo e avaliadas quanto à sua densidade. Será localizada a área mais densa da mama em outro quadrante diferente do tumoral, a área de menor densidade também em quadrante diferente da área do tumor e uma área a 2 cm de distância da área tumoral. Após a realização da mastectomia, as áreas selecionadas de acordo com a mamografia serão biopsiadas para análise anátomo-patológica quanto aos seguintes critérios: avaliação histológica quanto ao epitélio, quanto ao estroma, proporção estroma-epitelial, proporção de tecido adiposo e pesquisa da expressão de CD-34, Ki67, receptores hormonais e IGF-1. Trata-se de um estudo de corte transversal onde será avaliada uma população de 44 pacientes (N). As variáveis serão avaliadas através do teste T de Student.

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão, exclusão dos sujeitos estão definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística adequada. Os aspectos éticos estão discutidos no corpo do projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado às recomendações. O orçamento é detalhado e o controle de qualidade, bem como, a ficha de coleta de dados estão adequados. Consideramos o projeto adequado a esse tipo de estudo.

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2008.

  
**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## 7.5. Anexo 5 – Apresentação de pôster na VII Jornada Paulista de Mastologia 2011



### Aspectos Histológicos e Imunohistoquímicos de Mamas Radiologicamente Densas em Pacientes com Câncer de Mama

Marshall PS, Duarte GM, Torresan RZ, Tinois E, Alvarenga M, Cabello C

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Faculdade de Ciências Médicas

#### Introdução

A densidade mamográfica, uma medida da extensão do tecido fibroglandular radiodensos da mama, é um fator de risco independente para o câncer de mama. Fatores de risco já estabelecidos para o câncer de mama como idade ao primeiro parto, paridade e uso hormonal na pós-menopausa, também estão associados com a densidade mamográfica. Contudo, a base biológica da associação da densidade mamográfica ao risco de câncer de mama ainda não foi determinada. A literatura conhecida sugere que ela esteja associada com a presença de proliferação epitelial ou estromal, com uma delas podendo ser a responsável pela associação da densidade com o risco de câncer de mama. Porém, a maior parte dos estudos realizados até hoje avaliaram a densidade global da mama para associação com a histologia.



#### Objetivos

Avaliar a composição histológica e imunohistoquímica de áreas radiologicamente densas e não densas de mamas de mulheres submetidas a mastectomia por câncer de mama.

Dados Macroscópicos	Microscopia do Epitélio	Microscopia do Estroma	Marcadores Imuno-histoquímicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>Medida amostra</li> <li>Tecido adiposo</li> <li>Pontos pardacentos (epitélio)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UDLT</li> <li>Lesões proliferativas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fibrose</li> <li>Distribuição do estroma</li> <li>Celularidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RE</li> <li>RPg</li> <li>Ki-67</li> <li>CD-34</li> </ul>

#### Sujeitos e Métodos

Foi realizado estudo de corte transversal em 18 mulheres com mamas de padrão P1, P2 ou Dy (Wolfe) com carcinoma mamário com estágio clínico I ou II ou carcinoma *in situ* e com indicação de mastectomia. Suas mamografias foram digitalizadas e localizadas suas áreas mais densa, menos densa longe e a área tumoral. Cada sujeito também teve sua mama fotografada em 2 posições. Foi utilizada uma técnica de localização baseada em um método de aproximação linear com interpolação das imagens mamográficas e as fotos da mama (Figura 1). Durante a mastectomia, as áreas selecionadas foram localizadas e enviadas para análise anátomo-patológica.

#### Resultados (Figuras 2 e 3)

Não houve diferença na proporção de tecido adiposo entre as áreas ( $p = 0,070$ ), porém a proporção de pontos pardacentos foi maior nas áreas densas ( $p = 0,022$ ). O número de unidades ducto-lobulares terminais foi maior para as áreas densas do que para as não-densas ( $p = 0,001$ ). Não foram encontradas lesões proliferativas com atipias no tecido não-denso, porém em três das áreas densas avaliadas foram encontradas células colunares com atipias (atipia epitelial plana). Lesões proliferativas sem atipia foram encontradas nas duas áreas, porém foram mais frequentes no tecido denso do que no não denso (23,5% vs 11,8%,  $p = 0,045$ ). Lesões não proliferativas também foram mais frequentes na área densa (17,6% vs 2,9%,  $p = 0,025$ ). Em ambas as áreas a distribuição celular foi mais comumente intra e inter-lobular. A celularidade estromal foi a mesma nos dois tecidos. A fibrose foi mais comumente extensa ou moderada no tecido mamário denso e leve no tecido não-denso ( $p = 0,030$ ). Quanto à análise imunohistoquímica, a expressão de receptores de estrogênio e progesterona, assim como de Ki67 e CD34 foi a mesma para as duas áreas.

#### Conclusões

O estudo demonstrou que tanto a fibrose estromal quanto a proliferação epitelial são responsáveis pela maior densidade mamográfica e que a expressão imunohistoquímica de receptores hormonais, CD-34 e Ki-67 é similar em áreas mais e menos densas.

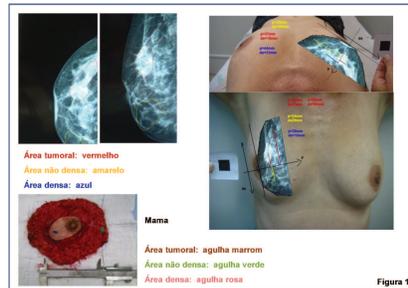


Figura 1

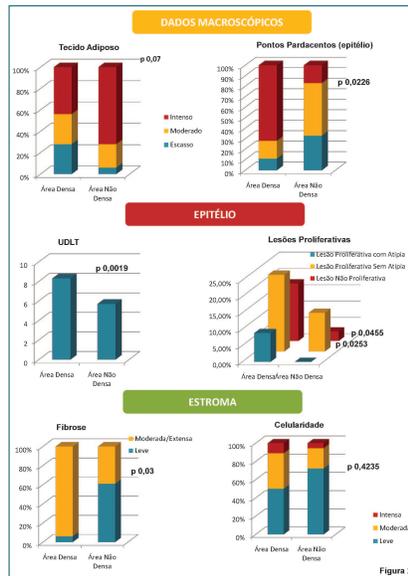


Figura 2



Figura 3