

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**TEZA DOCTORAT
REZUMAT**

**STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC AL
LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR
INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA

STUDENT-DOCTORAND:

FOTA GEORGIANA LUMINIȚA

CRAIOVA, 2013

CUPRINS

INTRODUCERE	4
STADIUL CUNOAȘTERII	6
CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA ȘI FACTORII DE RISC AI LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	6
I. A. EPIDEMIOLOGIA LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	6
I. B. FACTORII DE RISC AI LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	9
CAPITOLUL II. MODIFICĂRI GENETICE ÎN LEZIUNILE PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	13
CAPITOLUL III. IMUNOPROFILUL LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	17
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	35
CERCETĂRI PERSONALE	36
CAPITOLUL IV. MATERIAL ȘI METODĂ	36
IV. A. SELECȚIA CAZURILOR	36
IV. B. METODA HISTOPATOLOGICĂ	37
IV. C. METODA IMUNOHISTOCHEMICĂ	40
IV. D. METODA STATISTICO-MATEMATICĂ	42
CAPITOLUL V. REZULTATE	47
V. A. STUDIUL CLINICO-PATOLOGIC ȘI STATISTIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	47
<i>V. A. 1. STUDIUL PARAMETRILOR CLINICI AL LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL</i>	47
<i>V. A. 2. STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL</i>	51
<i>V. A. 3. CORELAȚIILE STATISTICE ALE PARAMETRILOR CLINICO-</i>	

<i>PATOLOGICI AL LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL</i>	71
V. B. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC ȘI STATISTIC AL CARCINOAMELOR MAMARE DUCTALE IN SITU	77
<i>V. B. 1. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL CARCINOAMELOR MAMARE DUCTALE IN SITU</i>	77
<i>V. B. 2. CORELAȚIILE STATISTICE ALE PARAMETRILOR IMUNOHISTOCHIMICI ÎN CARCINOAMELE MAMARE DUCTALE IN SITU</i>	103
CAPITOLUL VI. DISCUȚII	106
VI. A. ANALIZA REZULTATELOR CLINICO-PATOLOGICE ALE LEZIUNILOR PRECURSOARE CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL	106
VI. B. ANALIZA REZULTATELOR IMUNOHISTOCHIMICE ALE CARCINOMULUI MAMAR DUCTAL IN SITU	114
CAPITOLUL VII. CONCLUZII	125
BIBLIOGRAFIE	129

CUVINTE CHEIE: LEZIUNI PRECURSOARE, HIPERPLAZIE DUCTALĂ SIMPLĂ, HIPERPLAZIE DUCTALĂ ATIPICĂ, ATIPIE EPITELIALĂ PLATĂ, CARCINOM DUCTAL IN SITU, CARCINOM MAMAR INVAZIV FĂRĂ TIP HISTOLOGIC SPECIAL

INTRODUCERE

Cu toate că leziunile proliferative intraductale au fost analizate complex de-a lungul timpului, epidemiologic, clinic, morfologic, molecular și citogenetic, unele dintre ele pun probleme și în prezent în privința stabilirii diagnosticului și a abordării protocolului terapeutic, a comportamentului și evoluției clinice, precum și în stabilirea prognosticului.

Studii clinice diverse au indicat faptul că leziunile proliferative intraductale asociază riscuri diferite în dezvoltarea ulterioară a leziunii mamare invazive. Urmărirea pacientelor cu hiperplazie ductală simplă (UDH) pe termen lung a evidențiat un risc ușor crescut (de 1,5-2 ori) de apariție a cancerului mamar. În prezent, nu există factori de prognostic care să determine cu certitudine care dintre pacienții cu hiperplazie ductală simplă vor dezvolta ulterior cancer mamar. Studii retrospective au evidențiat un risc scăzut de progresie spre cancer al atipiei epiteliale plate (AEP), mai mic decât cel pentru hiperplazia ductală atipică. Riscul crește de 3-5 ori la populația cu hiperplazie ductală atipică (ADH) și de 8-10 ori la pacientele cu carcinom ductal in situ [3].

Pe plan internațional, datorită implementării programelor de screening mamar, identificarea carcinomului ductal in situ (CDIS) se apropie de 30% din totalul cazurilor de carcinoame mamare diagnosticate. Depistarea leziunii mamare în faza in situ și stabilirea tratamentului corespunzător duc la vindecare, rata de recurență a carcinomului ductal in situ fiind infimă; doar 1-2,6% din pacienții diagnosticați cu leziune ductală in situ au decedat de cancer mamar invaziv, la 10 ani de la diagnostic inițial [2].

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Prezentul studiu și-a propus o evaluare completă și amănunțită a factorilor implicați în etapele timpurii ale carcinogenezei mamare, cu scopul de a identifica posibile ținte prognostice și terapeutice. Studiul a analizat leziunile proliferative intraductale, considerate precursori ai carcinomului mamar invaziv fără tip histologic special (CMI NST), cu ajutorul metodelor histopatologice clasice de investigare, precum și al tehnicilor moderne imunohistochimice. Identificarea mecanismelor complexe care se desfășoară la nivel molecular și a interacțiunilor dintre acestea furnizează informații valoroase și utile în ceea ce privește inițierea, progresia tumorală și prognosticul pacienților cu astfel de leziuni. Principalele obiective specifice ale proiectului au inclus: extinderea cunoștințelor legate de factorii clinici, histopatologici, imunohistochimici care contribuie la apariția leziunilor precursori ai carcinomului invaziv NST, în vederea aprofundării mecanismelor carcinogenice; identificarea și definirea parametrilor morfologici ce caracterizează leziunile proliferative intraductale, în scopul diagnosticării și încadrării cât mai

corecte, în vederea selectării celor mai fiabili markeri ai prognosticului; identificarea imunoprofilului și orientarea prognosticului carcinomului ductal in situ; identificarea corelațiilor semnificative statistic între parametrii clinici, histopatologici și imunohistochimici pentru leziunile precursoare CMI NST.

MATERIAL ȘI METODĂ

Prima etapă de desfășurare a acestui studiu a început cu documentarea științifică privind leziunile precursoare carcinomului mamar invaziv fără tip histologic special. S-au căutat cele mai recente informații despre leziunile precursoare carcinomului mamar invaziv NST, urmărindu-se studiile epidemiologice și factorii de risc pentru apariția leziunilor și progresia lor către boala invazivă, caracteristicile citogenetice și moleculare, încadrarea și clasificarea histopatologică, precum și imunoprofilul lor.

A fost realizată o selecție a cazurilor cu leziuni proliferative intraductale, apoi înregistrarea lor într-o bază de date, pe o perioadă de șapte ani, 2005-2011, utilizând programul Microsoft Excel 2002. Ulterior, s-au stabilit și evaluat unii parametri clinici pentru cazurile selectate, cum sunt sexul și vârsta pacienților. În acest scop au fost efectuate studii retrospective pe cazuistica Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, precum și studii prospective în colaborare cu Clinicile de Oncologie și Chirurgie ale aceluiași spital.

Studiile retrospective au vizat selectarea cazurilor de leziuni precursoare carcinomului mamar invaziv NST, diagnosticate în ultimii patru ani (2005-2008), cu strângerea datelor clinice, morfologice și introducerea lor în baza de date. De asemenea, s-au triat blocurile de parafină corespondente cazurilor clinice selectate pentru a fi supuse prelucrărilor histopatologice și imunohistochimice.

Studiul prospectiv a urmărit selectarea de cazuri noi de leziuni precursoare carcinomului mamar invaziv NST, pe parcursul a trei ani din durata studiului (2009-2011). Piesele de mastectomie au fost supuse examinărilor histopatologice și imunohistochimice. Primele secțiuni tisulare au fost colorate hematoxină-eozină, pe ele stabilindu-se diagnosticul histopatologic.

Analiza histopatologică s-a realizat pe 478 de cazuri de leziuni proliferative intraductale, din care 222 de cazuri de hiperplazie ductală simplă, 44 de cazuri de hiperplazie ductală atipică, 3 cazuri de atipie epitelială plată și 209 cazuri de carcinom ductal in situ. Parametrii histopatologici au fost stocați într-o bază de date computerizată, cu ajutorul programului Microsoft Excel, apoi au fost stabilite grupurile de studiu histopatologic.

Piesele de mastectomie au fost fixate în formaldehidă 10% tamponată, apoi prelucrate prin tehnica uzuală de includere la parafină, în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova. S-au făcut secțiuni seriate care au fost colorate în hematoxilină-eozină (kit BioOptica) și unele în colorația histochimică specială PAS. Similar, au fost prelucrate și blocurile histopatologice selectate prin studiul retrospectiv.

Analiza histopatologică a urmărit cazurile de leziuni proliferative intraductale pe baza tipului histologic (caracteristici arhitecturale și citologice), paternului de creștere, gradului leziunilor in situ, asocierea leziunilor între ele, asocierea lor cu carcinomul mamar invaziv NST, precum și asocierea cu alte leziuni maligne.

Prin analiza histopatologică s-au evaluat, definit și încadrat cazurile cu leziuni proliferative intraductale, conform celor mai recente date ale Organizației Mondiale a Sănătății [2].

Preparatele histologice seriate succesiv secțiunilor prelucrate histochimic (hematoxilină-eozină, PAS) au fost prelucrate imunohistochimic, în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova și Laboratorul Disciplinei de Morfopatologie.

S-a utilizat metoda de lucru indirectă în doi timpi, folosind tehnica Dako En Vision™ Dual Link System-HRP de amplificare polimerică. Metoda se bazează pe utilizarea unui anticorp secundar marcat, acesta având specificitate împotriva anticorpului primar nemarcat. În primul timp, anticorpul primar se leagă la antigenul tisular, excesul fiind îndepărtat prin spălare, după care se aplică al doilea anticorp marcat enzimatic, acesta recunoscând determinanții antigenici de pe primul anticorp (devenit antigen). Complexul format este apoi vizualizat cu ajutorul unui cromogen (diaminobenzidina, DAB). Analiza imunohistochimică s-a făcut pe 70 de cazuri de CDIS care au asociat componenta invazivă NST, studiindu-se markerii implicați în evaluarea profilului imunohistochimic și orientarea

prognosticului leziunii in situ. S-au selectat cazurile cu CDIS reprezentative pentru cele trei grade histologice și pentru tipurile histologice identificate în analiza histopatologică.

S-a utilizat următorul panel de anticorpi implicați în orientarea prognosticului CDIS: oncoproteina c-ErB2 (Her2/neu), receptorii hormonali (estrogen și progesteron), p53, Ki67, ciclina D1(bcl 1) și beta-catenina.

Pentru procesarea datelor numerice obținute în cadrul analizei histopatologice s-au folosit indicatori statistici ca: media aritmetică, deviația standard, coeficientul de variație, mediana și quartilele. Analiza statistică a leziunilor proliferative intraductale a utilizat și teste care analizează tabelele de incidență (contingență) generate prin aplicarea încrucișată („cross tabulation”) a unor perechi de factori, pentru a identifica legăturile dintre diferitele leziuni proliferative intraductale, precum și dintre acestea și leziunile maligne.

Analiza statistică a rezultatelor imunohistochemice obținute s-a făcut prin utilizarea testelor D al lui Somers și *tau* al lui Kendall. Aceste teste arată puterea legăturii dintre ordinea categoriilor a doi factori analizați și intensitatea exprimării markerilor utilizați pe cei doi factori studiați [1].

CONCLUZII

Studiul efectuat asupra unui număr de 478 de cazuri de leziuni proliferative intraductale ale glandei mamare precursore CMI NST, selectate în intervalul 2005-2011, a permis următoarele concluzii:

- Cele mai multe cazuri cu hiperplazie ductală simplă au fost diagnosticate în anii 2008 și 2009, cu hiperplazie ductală atipică în 2008, iar cu carcinom ductal in situ în 2011.

Majoritatea leziunilor proliferative intraductale au fost diagnosticate la femei, carcinomul ductal in situ și atipia epitelială plată fiind întâlnite exclusiv la femei.

- Leziunile proliferative intraductale au avut incidența maximă în intervalul de vârstă 50-59 de ani pentru pacientele cu UDH, AEP și ADH, respectiv 70-79 de ani pentru cele cu CDIS. Pentru pacienții investigați mamar, vârsta bărbaților a fost net mai mare decât cea a femeilor.

- UDH a fost prezentă în 13% din cazurile de leziuni proliferative intraductale investigate. AEP a fost leziunea proliferativă intraductală identificată în 0,18% din cazuri, prezentă numai la pacienții de sex feminin. ADH a fost observată în aproape 3% din patologia mamară studiată, reprezentând aproximativ 9% din totalul leziunilor proliferative intraductale. CDIS a fost diagnosticat în aproximativ 13% din patologia mamară analizată.

- Cazurile diagnosticate cu ADH au prezentat asociere cu CMI NST în 57% din cazuri, din care 41% au asociat și CDIS. Asocierea cu leziunile mamare benigne a fost găsită în 14% din cazuri și în 11% din cazuri cu CDIS.

- Aproximativ 80% din cazurile diagnosticate cu CDIS au prezentat asociere cu CMI NST și în 11% din cazuri cu alte leziuni maligne. CDIS a prezentat asociere cu alte leziuni proliferative intraductale în aproape 30% din cazuri, cele mai multe cazuri asociind și CMI NST (24%). CDIS a fost observat în formă pură, neasociat cu leziuni mamare maligne în aproape 9% din cazuri.

- A fost observată o legătură puternică între apariția CMI NST și prezența CDIS (OR:15,046). A existat o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește asocierea tipurilor histologice unice, respectiv mixte de CDIS cu CMI NST (p Chi pătrat - 0,039), obiectivându-se ipoteza că formele mixte de CDIS au o pondere mai mare de transformare în CMI NST. În plus, s-a putut afirma statistic că existența unui singur tip histologic de CDIS indică o probabilitate mai mică de transformare în CMI NST.

- Cazurile analizate imunohistochimic au prezentat o legătură înalt semnificativă statistic ($p < 0,001$) între gradul CDIS și cel al CMI NST. Analiza relației dintre expresia markerilor imunohistochimici în CDIS și expresia lor în CMI NST a evidențiat în majoritatea cazurilor legături directe foarte puternice din punct de vedere statistic.

- Expresia receptorilor hormonal, ER și PR, a fost prezentă în peste 50% din CDIS și CMI NST analizate imunohistochimic. Imunoreactivitatea receptorilor hormonal s-a corelat indirect cu gradul leziunilor, pozitivitatea lor fiind maximă în cele de grad scăzut, respectiv în formele bine diferențiate.

- Majoritatea tipurilor histologice CDIS de grad scăzut și intermediar au prezentat imunoreacție Her2/neu negativă. Supraexpresia oncoproteinei Her2/neu a fost prezentă exclusiv în CDIS de grad înalt și în cele invazive slab diferențiate.

- Rata de proliferare celulară înaltă (Ki67) a fost identificată predominant în CDIS de grad înalt, fiind prezentă în peste 70% din CDIS de grad înalt și în aproape 90% din cele invazive asociate.

- Imunoexpresia pozitivă a proteinei p53 și negativă a receptorilor hormonală a fost observată în aproximativ 31% din cazuri, majoritatea leziunilor fiind de grad înalt (84%).

- Imunoexpresia beta-cateninei a fost normală în majoritatea cazurilor analizate, în ambele componente prezente (CDIS și CMI NST - 97%). Absența imunoexpresiei beta-cateninei a fost observată în CDIS G3 de tip comedo.

- Imunoreacția ciclonei D1 s-a corelat direct cu gradul leziunilor investigate, cele mai puține cazuri fiind de grad scăzut, urmând apoi cele de grad intermediar și de grad înalt, respectiv bine, moderat și slab diferențiate.

- Analiza relației dintre expresia markerilor imunohistochimici în CDIS și expresia lor în CMI NST a utilizat testele D al lui Somers și *tau* al lui Kendall. În majoritatea cazurilor am întâlnit legături directe foarte puternice (Somers's D >0,80, Kendall's *tau* p value < 0,001). Doar în cazul expresiei Ki67 legătura a fost puternică – Somers's D=0,638.

BIBLIOGRAFIE

1. Hill T, Lewicki P. Statistics: Methods and applications, StatSoft Inc. 2006;1:3-65;
2. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC Press 2012, Lyon;
3. Schnitt SJ, Ellis IO, van de Vijer MJ, et al. Intraductal proliferative lesions: Introduction and overview. WHO Classification of Tumors of the Breast. IARC Press 2012;5:81-90.