

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DE
MAMA: CONCORDÂNCIA DIAGNÓSTICA DO GRAU NUCLEAR DE
BLACK MODIFICADO ENTRE PATOLOGISTAS E PROPOSTA DE UM
QUESTIONÁRIO ELETRÔNICO DISPONÍVEL ON LINE PARA O
DIAGNÓSTICO DE GRADUAÇÃO PATOLÓGICA**

FERNANDO SCHUH

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DE
MAMA: CONCORDÂNCIA DIAGNÓSTICA DO GRAU NUCLEAR DE
BLACK MODIFICADO ENTRE PATOLOGISTAS E PROPOSTA DE UM
QUESTIONÁRIO ELETRÔNICO DISPONÍVEL ON LINE PARA O
DIAGNÓSTICO DE GRADUAÇÃO PATOLÓGICA**

FERNANDO SCHUH

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre
2011

S328s **Schuh, Fernando**

Sistemas de classificação do carcinoma ductal *in situ* de mama: concordância diagnóstica do grau nuclear de black modificado entre patologistas e proposta de um questionário eletrônico disponível on line para o diagnóstico de graduação patológica / Fernando Schuh ; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2011.

120 f. : il. color.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Carcinoma ductal de mama 2. Neoplasias da mama 3. Patologia 4. Questionário 5. Patologia I. Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Título.

NLM: WP 870

*À minha família que sempre me apoiou
na busca de meus ideais.*

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho, pude contar com o apoio, direto e indireto, de muitas pessoas. Meu profundo agradecimento a todas elas e, em especial:

à Prof.^a Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, por seu apoio, bom humor e incentivo; por ter sido mais do que uma orientadora, foi uma amiga e uma mãe em todos os momentos, principalmente, nas horas mais difíceis;

ao Prof. Dr. Jorge Vilanova Biazús e aos colegas do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por acreditarem na realização deste projeto;

à Prof.^a Dra. Erika Resetkova, pela revisão de todas as lâminas de patologia e imagens digitalizadas, pela seleção dos casos, pelo auxílio na correção do texto em inglês e pelas críticas que propiciaram um melhor andamento do estudo;

à Dra. Ana Cristina Bittelbrunn, por seu incentivo à realização deste trabalho, por sua paciência nas incansáveis revisões e correções do texto e por estar sempre presente e disponível para solução de problemas;

aos patologistas que colaboraram com a realização deste estudo, sobretudo à Prof.^a Dra. Márcia Graudenz e ao Dr. Diego Uchoa pela disponibilidade para responder o questionário eletrônico e pelas sugestões para melhor análise dos critérios avaliados;

aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio na busca do material a ser analisado em todo o arquivo do serviço;

aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas pelo apoio, disponibilidade e cordialidade;

a Ceres Oliveira, pelo auxílio na análise estatística dos dados;

à Dra. Márcia Edelweiss, pelo apoio e suporte nos contatos com a Prof.^a Dra. Erika Resetkova e pela obtenção da documentação fotográfica no MD Anderson.

RESUMO

Vários sistemas de classificação de carcinoma ductal in situ de mama (CDIS) têm sido propostos. Decisões terapêuticas são adotadas baseadas na classificação do grau histológico do CDIS associada a outros fatores, como tamanho da lesão, estado das margens, idade da paciente, correlação mamográfica e outros marcadores biológicos de agressividade tumoral avaliados por técnicas moleculares. Poucos estudos avaliaram o grau de concordância de diferentes sistemas de classificação de CDIS. Este estudo tem como objetivo validar um questionário eletrônico associado a um sistema de pontos disponível na Internet (*web-based survey*), pela determinação de grau de concordância entre diagnósticos de CDIS de mama obtidos com e sem o auxílio deste *web-based survey*, através de imagens digitalizadas da microscopia segundo as classificações de Holland, Van Nuys e grau nuclear de Black modificado. Além disso, propôs-se determinar a concordância diagnóstica entre patologistas para os sistemas de graduação histológica de Holland e Black modificado dos mesmos casos de CDIS de mama através deste *web-based survey*. Foram selecionados 43 casos de CDIS de mama para análise inter e intraobservador. Treze patologistas receberam o mesmo conjunto de imagens digitalizadas da microscopia dos casos de CDIS, em formato JPEG, e responderam um questionário contendo os critérios para composição do grau histológico das classificações aqui estudadas. Para tal fim, foi criado um programa informatizado disponível em um website, que organiza as informações coletadas de cada um dos patologistas avaliadores, fornecendo a graduação histológica dos casos para os três sistemas de classificação de forma objetiva, através de um sistema de pontos. Três destes treze patologistas, após um intervalo mínimo de 6 meses, realizaram uma segunda leitura dos mesmos 43 casos, porém desta vez, sem o auxílio do questionário eletrônico e do sistema de pontos. Os resultados foram analisados utilizando a concordância percentual e teste de Kappa. A concordância entre o diagnóstico obtido pelos patologistas a partir do novo método (*web-based survey*) e aquele obtido sem o questionário eletrônico e sistema de pontos foi semelhante para todos os sistemas de classificação estudados, com valores de Kappa de $0,57 + 0,10$, $0,67 + 0,09$ e $0,67 + 0,09$ para as classificações de Holland, de Van Nuys e para o grau nuclear de Black modificado, respectivamente. A concordância diagnóstica interobservador para o grau nuclear de Black modificado aplicado a casos de CDIS de mama foi considerada aceitável, com valor

de Kappa de $0,23 \pm 0,02$. Realizando a comparação entre as classificações estudadas, houve concordância semelhante para a de Holland, mostrando essa última, um valor de Kappa de $0,27 \pm 0,03$. Analisando os subgrupos de patologistas, foi encontrada uma maior reprodutibilidade no grupo de especialistas em patologia mamária em relação aos patologistas residentes, sendo que no caso da classificação de Black modificado, esta diferença foi estatisticamente significativa ($\kappa = 0,43 \pm 0,07$ vs $\kappa = 0,11 \pm 0,05$; $p = 0,0018$). De forma semelhante, a acurácia acompanhou os resultados das concordâncias interobservador, sendo considerada aceitável. O índice de Kappa, quando comparado o diagnóstico do padrão-ouro com a moda do diagnóstico dos patologistas participantes, foi de $0,32 \pm 0,10$ para ambas classificações. Quando avaliada nos subgrupos por interesse em patologia mamária variou de $0,19 \pm 0,08$ a $0,34 \pm 0,11$ para classificação de Black modificado; $0,19 \pm 0,08$ a $0,33 \pm 0,11$ para a classificação de Holland. Conclusões: A reprodutibilidade do diagnóstico obtido através de um programa de pontos disponível na internet (*web-based survey*) para os sistemas de classificação de CDIS, utilizando imagens digitais, quando comparada ao diagnóstico obtido das mesmas imagens digitais sem o auxílio do novo método, foi regular para as classificações de Holland e boa para as classificações de Van Nuys e para o grau nuclear de Black modificado. Comparando os sistemas de classificação estudados, obteve-se reprodutibilidade e acurácia diagnóstica semelhante para o grau histológico de lesões de CDIS de mama, tanto para a classificação de Holland quanto para o grau nuclear de Black modificado. Tais resultados indicam que a utilização deste sistema de pontos, neste *web-based survey* para graduar lesões de CDIS, objetivamente, é uma ferramenta promissora, útil e confiável.

ABSTRACT

Several relevant classification systems have been proposed to the ductal carcinoma in situ (DCIS) with the purpose of offering information concerning the risk of recurrence and progression to invasive carcinoma. Therapeutic decisions are made based on the histological classification, associated with other factors such as histopathological grading, size of lesion, state of margins, age of patient, mammographic correlation, and other biological markers of tumor aggressiveness assessed by molecular techniques. Few studies have examined the degree of agreement in DCIS classifications. This study intends to validate an electronic questionnaire associated with a scoring point system available on the Internet (web-based survey), aiming to assess the ability of the created web-based survey reproduce the diagnosis of the pathologists in their routine work for the classifications of Holland and Van Nuys and the Black modified nuclear grade system. This study also was performed to assess reproducibility comparing interobserver results, and to determine the accuracy of the histological grade of modified Black nuclear grading system and classification of Holland for DCIS lesions, utilizing the same web-based program. 43 cases of DCIS lesions were selected to provide inter and intraobserver analysis. Thirteen pathologists received the same set of digitized images (JPEG format) from microscopy of the DCIS cases, and answered a questionnaire containing the criteria to compose the studied classifications. For these proposals a web-based survey was created. It organizes the information collected from each pathologist participant providing itself the histological grading of the cases in the classification systems studied. After at least 6 months, three pathologists specialized in breast pathology from the thirteen pathologists read again the same set of digitized images, but without the help of the questionnaire, indicating subjectively the diagnosis, using the grading system of their daily practice. The results were analyzed by concordance rate and Kappa statistical method. Overall, diagnostic reproducibility of this web-based survey compared the subjective reading of the digital images was similar for all systems of histological grading classification, with Kappa values of $0.57 + 0.10$, $0.67 + 0.09$ and $0.67 + 0.09$ for Holland, Van Nuys classification and modified Black nuclear grade system respectively, what makes this method useful for surgical pathologist in daily routines. The reliability for the modified Black nuclear grade applied to cases of DCIS was acceptable, with kappa value of 0.23 ± 0.02 .

Comparing the two classifications studied, there was a similar agreement among both schemes, showing Kappa index of 0.27 ± 0.03 for the Holland classification. Analyzing the subgroups of pathologists rated by their interest in breast pathology, a higher diagnostic reproducibility was found for the group of breast pathology experts in relation to the pathology residents, and in the case of the modified Black nuclear grading system, it was statistically significant ($\kappa = 0.43 \pm 0.07$ vs $\kappa = 0.11 \pm 0.05$; $p = 0.002$). The agreement among all pathologists and the gold standard pathologist similarly followed the results of the interobserver concordance, showing to be acceptable, with Kappa for the overall mode value 0.32 ± 0.10 for both classifications. The findings of Kappa index when comparing the gold standard diagnoses and the mode of diagnoses for specialists in breast pathology and pathology residents were, respectively, 0.34 ± 0.11 (acceptable) and 0.19 ± 0.08 (weak) for the modified Black nuclear grade and 0.33 ± 0.11 (acceptable) and 0.19 ± 0.08 (weak) for Holland classification. Breast pathology specialists showed greater reproducibility for both classifications evaluated than the pathologists not devoted to breast pathology. Conclusions: The intraobserver diagnostic reproducibility of DCIS with the use of digital images in a web-based survey comparing subjective analysis with the use of a point scoring system is moderate to good for Holland, Van Nuys and modified Black nuclear grade system. The interobserver reproducibility and the diagnostic accuracy were similar for the modified Black nuclear grading system and for the Holland classification system. These findings indicate that the use of this point scoring system in this web-based survey to objectively grade DCIS lesions is a promising, useful and a reliable diagnostic tool.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl2	– Proteínas de membrana codificadas por genes Bcl2 que atuam como potentes inibidores da morte celular por apoptose.
BRCA1/BRCA2	– Genes de supressão tumoral localizados nos cromossomos humanos 17 no local 17q21 e 13 no local 13q12.3, respectivamente. As mutações destes genes estão associadas com a formação do câncer familiar de mama e de ovário. Codifica uma grande proteína nuclear que é um componente das vias de reparo do DNA.
CDI	– Carcinoma ductal invasor
CDIS/DCIS	– Carcinoma ductal <i>in situ</i>
C-erB2	– Proteína com características estruturais semelhantes às do receptor do fator de crescimento epidérmico que é encontrado superexpresso em vários adenocarcinomas.
CK	– Citoqueratina
CLIS	– Carcinoma lobular <i>in situ</i>
DIN	– Neoplasia intra-epitelial ductal
EP	– Erro-padrão
HCPA	– Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDA	– Hiperplasia ductal atípica
HDU	– Hiperplasia ductal usual
HE	– Hematoxilina-eosina
HFF35	– Anticorpo antiactina de músculo liso
HL	– Holland
HLA	– Hiperplasia lobular atípica
IM	– Índice Mitótico
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
κ	– Índice de Kappa

Ki-67	– Antígeno presente no núcleo celular das células em mitose. Marcador do ciclo celular e proliferação celular que pode ser detectado através de método imunohistoquímico.
LA	– Lagios
NCI	– <i>National Cancer Institute</i>
OMS	– Organização Mundial da Saúde
P53	– Fosfoproteína nuclear codificada pelo gene p53 cuja função normal é controlar a proliferação celular e a apoptose.
RE	– Receptor hormonal de estrogênio
SE	– <i>Standard Error</i>
SEER	– <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
VN	– Van Nuys

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Neoplasias intra-epiteliais ductais	39
Tabela 2: Diferenças histológicas entre HDU/HDA/CDIS	44
Tabela 3: Sistemas de classificação do CDIS	50
Tabela 4: Resumo dos critérios para determinação do grau nuclear de Black modificado	50
Tabela 5: Sumário de estudos de avaliação de reprodutibilidade de sistemas de classificação de CDIS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Incidências de CDIS e carcinoma invasor ajustadas pela idade (1975-2005)	25
Figura 2:	Aspecto normal microscópico do tecido mamário benigno. Há um ducto maior à direita e lóbulos à esquerda. Estroma, contendo colágeno, se estende entre as estruturas. A quantidade variável de tecido adiposo pode estar presente entre estes elementos normais da mama (HE, 3,2x)	34
Figura 3:	Em maior aumento, apresenta-se o aspecto microscópico do ácino normal. Notam-se células epiteliais revestindo a luz internamente, com secreção apócrina no seu ápice. Uma camada de células mioepiteliais, algumas levemente vacuolizadas, são vistas ao redor e delimitando o ácino (seta) (HE, 200x)	34
Figura 4:	Coloração com anticorpo antiactina de músculo liso (HHF35) por imunohistoquímica demonstra a camada de células mioepiteliais ao redor do ácino (HHF35, 200x)	35
Figura 5:	Ductos demonstram hiperplasia epitelial usual. Células epiteliais em multicamadas. Não há atipia. (HE, 100x).....	37
Figura 6a e 6b:	Hiperplasia ductal atípica da mama com atipias celulares e células mioepiteliais remanescentes (HE, 100 e 200 x)	38
Figura 7:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : padrão cribiforme (HE, 200x)	40
Figura 8:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : padrão micropapilar (HE, 100x)	41
Figura 9:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : padrão sólido (HE, 100x)	41
Figura 10:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : padrão comedo (sólido com comedonecrose) (HE, 100x)	42
Figura 11:	Carcinoma ductal invasor (HE, 200x)	45
Figura 12:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : núcleos pleomórficos com variação de forma e tamanho (HE, 400x)	53
Figura 13:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : padrão cribriforme núcleos monomórficos com localização central na célula (HE, 400x)	53

Figuras 14:	Carcinoma ductal <i>in situ</i> : correlação do núcleo com o tamanho da hemácia no campo histológico. (HE, 200x)	54
Figura 15:	Padrões diferentes de cromatina nuclear em CDIS: vesicular, com nucléolos evidentes e irregulares (HE, 400x)	55
Figura 16:	Padrões diferentes da cromatina nuclear em CDIS: padrão mais homogêneo com nucléolos inconspícuos (HE, 200x)	55
Figura 17:	Presença de polarização nuclear em CDIS (HE, 400x)	56
Figura 18:	CDIS com ausência de polarização e desorganização nuclear além de intenso pleomorfismo (HE, 400x)	56
Figura 19	CDIS com evidência de necrose dentro da luz (HE, 100x)	57
Figura 20:	CDIS com campo de grande aumento mostrando numerosas atipias e mitoses (HE, 400x)	58
Figura 21:	Site: página inicial	60
Figura 22:	Site: login	61
Figura 23:	Site: consentimento informado	62
Figura 24:	Site: dados demográficos	63
Figura 25:	Site: questionário eletrônico	63
Figura 26:	Site: magnificação de fotos digitalizadas	64
Figura 27:	Site: resultado das classificações estudadas	64
Figura 28:	Site: releitura subjetiva	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA DUCTAL <i>IN SITU</i> DE MAMA	22
2.2 TELEPATOLOGIA E QUESTIONÁRIO ELETRÔNICO: WEB-BASED SURVEY	27
2.3 TESTE ESTATÍSTICO ÍNDICE DE KAPPA (κ) PARA AVALIAÇÃO DE CONCORDÂNCIA DIAGNÓSTICA	31
2.4 HISTOLOGIA MAMÁRIA	33
2.5 PATOLOGIA MAMÁRIA	35
2.5.1 Hiperplasia ductal usual	36
2.5.2 Hiperplasia ductal atípica	37
2.5.3 Carcinoma ductal <i>in situ</i>	39
2.5.4 Carcinoma ductal invasor	45
2.6 SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CARCINOMA DUCTAL <i>IN SITU</i>	46
2.7 QUESTIONÁRIO INFORMATIZADO PARA DIAGNÓSTICO DE GRADUAÇÃO PATOLÓGICA DE CARCINOMA DUCTAL <i>IN SITU</i> DE MAMA	59
3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	66
4 OBJETIVOS	68
4.1 OBJETIVOS GERAIS	69
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
5 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	70
6 ARTIGO 1 EM INGLÊS	80

7 ARTIGO 2 EM INGLÊS	99
8 CONCLUSÕES	115
ANEXOS	117
ANEXO A: CRITÉRIOS PARA COMPOSIÇÃO DOS TRÊS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CDIS – HOLLAND, VAN NUYS E GRAU NUCLEAR DE BLACK MODIFICADO	118
ANEXO B: EQUAÇÕES PARA GERAÇÃO DO ESCORE FINAL DO GRAU HISTOLÓGICO PARA OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CDIS: HOLLAND, VAN NUYS E GRAU NUCLEAR DE BLACK MODIFICADO.....	119

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) compreende um grupo de lesões com diferentes características citológicas e arquiteturais, que se originam na unidade ducto-lobular terminal e estão associadas a um risco variável de desenvolvimento de carcinoma invasor (BURNSTEIN et al., 2004; HARRIS et al., 2010; ROSEN; OBERMAN, 1993; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). O CDIS caracteriza-se por uma proliferação de células epiteliais malignas dentro dos ductos mamários, confinadas pela membrana basal, sem evidência microscópica de invasão do estroma (ELLIS et al., 1998). Sob o ponto de vista histológico, trata-se de uma entidade clínico-patológica heterogênea, com caráter biológico evolutivo incerto (BURNSTEIN et al., 2004).

A carcinogênese mamária consiste num processo de múltiplas alterações, nas quais as células da unidade ducto-lobular modificam-se de normais a hiperplásicas, do câncer hormônio sensível ao hormônio insensível. O câncer invasor tem sua possível origem em alterações mamárias proliferativas preexistentes. As alterações consideradas pré-malignas são: hiperplasia ductal usual e atípica (HDA), hiperplasia lobular atípica (HLA), carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Embora o CDIS e o CLIS apresentem particularidades malignas - como a perda de controle de proliferação celular - elas não apresentam as propriedades de invasão e metástase, o que permite que sejam consideradas alterações pré-malignas (HARRIS et al., 2010).

Conforme as várias propostas conhecidas, o início da carcinogênese e a progressão do tecido mamário ao câncer dependem do estímulo proliferativo, por meio do estrógeno, dos fatores de crescimento e do dano genético (HARRIS et al., 2010). A progressão do tumor hormônio dependente em hormônio independente, provavelmente, envolve ativação de oncogenes, perda dos receptores de estrogênio e perda da resposta aos hormônios, por meio de outros produtos gênicos (MIETTINEN et al., 2000).

A definição do prognóstico dos tumores de mama, pela simples classificação desses quanto ao tamanho e a presença de metástases que comprometam os linfonodos axilares, não explica, adequadamente, as diferenças clínicas observadas entre as pacientes com o mesmo estadiamento (LAGIOS et al., 1996).

Os fatores prognósticos na doença invasiva são indicadores que auxiliam a determinar a história natural da doença, na ausência de tratamento complementar, assim como a decidir o

tipo de intervenção necessária para o melhor tratamento da neoplasia. Dentre os fatores prognósticos mais importantes para o tratamento, estão: avaliação dos linfonodos axilares, tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico e marcadores biomoleculares envolvidos no processo carcinogênico. Os fatores preditivos, por sua vez, são indicadores que orientam a probabilidade de resposta a determinadas terapias, considerando-se os receptores hormonais de estrógeno como um dos mais importantes elementos para o tratamento do câncer de mama. Esses fatores não se excluem mutuamente, assim sendo, alguns indicadores podem assumir ambas as funções, como é o caso dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona, assim como o HER2 (HARRIS et al., 2010).

Decisões terapêuticas são adotadas baseadas na classificação histológica do CDIS associada a outros fatores como: tamanho da lesão, estado das margens, idade da paciente, correlação mamográfica e outros marcadores biológicos de agressividade tumoral, avaliados por técnicas moleculares (LAGIOS et al., 1996; SILVERSTEIN et al., 1996). O tratamento do CDIS pode variar segundo o potencial evolutivo da lesão e potencial de recorrência; portanto, é de fundamental importância que existam critérios muito bem definidos para a classificação dessas lesões (BADVE et al., 1998). Considerando o tratamento cirúrgico – que pode variar desde uma ressecção segmentar isolada ou associada à radioterapia até uma mastectomia – e, dada à irreversibilidade dessa ação terapêutica, é de fundamental importância que as bases diagnósticas tenham critérios objetivos, facilmente reproduzíveis na prática diária, e assim, possam auxiliar na escolha do melhor tratamento para cada paciente. (DOUGLAS-JONES et al., 1996).

Para o controle local do CDIS, os fatores anatomopatológicos e indicadores de prognósticos mais importantes são: extensão da lesão, margens cirúrgicas livres e grau histológico (GOLDHIRSCH et al., 2005). Vários estudos favorecem a ideia de que, dos parâmetros semiquantitativos (diferenciação tubular, alteração nuclear e número de mitoses), o grau nuclear é o indicador prognóstico mais importante (FISCHER et al., 1980), embora separá-lo da dimensão da lesão e das margens cirúrgicas seja difícil (CONSENSUS..., 1997). O grau nuclear e a necrose, juntos, definem subgrupos de CDIS com maior ou menor risco de recorrência local e transformação invasiva (LAGIOS et al., 1996; SALLES et al., 2007; SCOTT et al., 1997). O grau nuclear é independente do padrão arquitetural. Observa-se que lesões de alto grau podem se apresentar com qualquer padrão histo-arquitetural. Lesões com padrões histológicos uniformes, por sua vez, são associadas às de baixo grau nuclear (PAGE; ANDERSON, 1987). Classificações baseadas no grau nuclear e necrose podem identificar a

maioria das pacientes (85% dos casos) de CDIS com risco de recorrência local e transformação invasiva após excisão (SCOTT et al., 1997).

Black *et al.* avaliaram o significado prognóstico da formação tubular e das características nucleares do carcinoma mamário separadamente e concluíram que a morfologia nuclear isolada é um fator prognóstico significativo (BLACK et al., 1975). No MD Anderson Cancer Center – Universidade do Texas, leva-se em consideração apenas o grau nuclear de Black com a argumentação de ser possível assim verificar de forma mais adequada a correlação da histologia com a citologia da mama, visto que a arquitetura do tecido se perde na avaliação citológica.

Vários estudos têm examinado a questão da confiabilidade e reprodutibilidade dos diagnósticos, segundo os critérios das classificações propostas e as variações de concordância interobservadores (BADVE et al., 1998; BETHWAITE et al., 1998; DOUGLAS-JONES et al., 1996; SALLES et al., 2005; SLOANE et al., 1998; SNEIGE et al., 1999; WELLS et al., 2000, SCHUH et al., 2010). Esses estudos diferem quanto à forma de apresentação dos casos selecionados de CDIS. Frequentemente, há variação quanto à origem e às características dos espécimes cirúrgicos de *core biopsy* ou de biópsias excisionais associados a carcinoma invasor, e, por vezes, tais estudos apresentam uma amostragem coletada por conveniência ou aleatoriamente. Outros focalizam dificuldades diagnósticas ou casos representativos e exemplares para determinado grau histológico. Igualmente, há uma grande variação em relação aos profissionais incluídos na elaboração de diagnósticos: há profissionais especialistas em patologia mamária, bem como patologistas cirúrgicos envolvidos diretamente com a rotina diagnóstica, não exclusivamente na interpretação de tumores de mama.

Para o presente estudo, foi criado um questionário acessível pela internet, inserido no formato de *website*, que oferece uma tabela (Anexo A), contendo as características utilizadas para composição de três sistemas de classificação dentre os vários existentes, assim como imagens digitalizadas da microscopia de casos de CDIS. Uma vez respondido o questionário, o programa compõe a graduação final do caso de CDIS (Anexo B) para três sistemas de classificação: Holland, Van Nuys e grau nuclear de Black modificado.

Para este estudo, foram selecionados casos de CDIS, a partir de uma revisão dos arquivos do serviço de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da unidade de patologia do MD Anderson Cancer Center, em Houston, Texas. Os casos foram escolhidos por serem representativos e ilustrativos dos três graus histológicos possíveis: alto, intermediário e baixo.

Com o objetivo de direcionar a leitura, os respectivos casos foram apresentados em imagens digitalizadas de microscopias de áreas selecionadas dos cortes histológicos, em campos de pequeno, médio e grande aumento, evitando, assim, a possibilidade de os observadores emitirem seu diagnóstico a partir de diferentes áreas do mesmo corte histológico. Para interpretação dos casos, foram convidados médicos patologistas que exercem suas atividades em serviços de atenção a pacientes com câncer de mama. Esses profissionais, em sua maioria, atuantes em um hospital universitário, foram escolhidos tanto para oportunizar o treinamento na graduação de CDIS, como para fins educativos, possibilitando a uniformização e padronização da descrição de laudos diagnósticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia que mais causa mortes em mulheres no Brasil. A incidência estimada para 2010, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), é de 49.240 novos casos, correspondendo aproximadamente a 49,27 novos casos por 100.000 mulheres. Para o Estado do Rio Grande do Sul, estima-se, para o mesmo ano, uma taxa bruta de incidência de 81,57 para 100.000 mulheres (INCA, 2010).

Em 2010, nos Estados Unidos estimou-se que 207.090 mulheres e 1970 homens seriam diagnosticados com câncer de mama, e que 39.840 mulheres e 390 homens poderiam morrer da doença (NCI - *National Cancer Institute*, 2010). De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, desde 1980 vem ocorrendo, a cada ano, um sucessivo aumento de casos diagnosticados, devido, primeiramente, ao aumento do *screening* mamográfico. Entretanto, a melhoria dos métodos que propiciam diagnósticos mais precoces, combinada com melhores tratamentos, resultou em um decréscimo na mortalidade por câncer de mama durante as duas últimas décadas (GUPTA; KUPERWASSER, 2004).

Segundo os dados do programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, durante os anos de 1990 a 2000, a taxa de incidência de câncer de mama vinha aumentando cerca de 3% ao ano. O aumento da incidência nesse período foi atribuído, em parte, à melhoria e divulgação dos programas de rastreamento do câncer de mama (JEMAL et al., 2008). Porém, a partir de 2003, a incidência da doença vem sofrendo um leve declínio. Dois fatores são descritos como responsáveis por essa observação. Primeiramente, a redução da incidência em todos os grupos de mulheres com mais de 45 anos sugere que tal fenômeno esteja relacionado à saturação do sistema de rastreamento da doença. Junto a isso, a redução súbita da incidência entre os anos de 2002 e 2003, que ocorreu predominantemente no grupo de mulheres entre 50 e 69 anos de idade, pode ser lida como reflexo da redução do uso indiscriminado da terapia de reposição hormonal (TIEZZI, 2009).

Desde 1990, nos Estados Unidos, tem ocorrido uma redução da mortalidade por câncer de mama, ajustada por idade, de aproximadamente 2% ao ano. De acordo com sete grupos formados pelo *National Cancer Institute*, todos registraram benefícios do *screening* e do

tratamento adjuvante na redução da mortalidade. Porém, estima-se que o rastreamento mamográfico tenha contribuído de 28 a 65% nessa redução, enquanto a terapia adjuvante foi responsável pela proporção restante (BERRY et al, 2005).

Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente pelo fato de a doença ainda ser diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos após o diagnóstico é de 61%, sendo que em países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, ao passo que em países em desenvolvimento a média cai para 57% (INCA, 2010).

O prognóstico pode variar muito e é influenciado por diversos fatores. A sobrevida está diretamente relacionada ao desenvolvimento de metástases a distância e a sua resposta a tratamentos sistêmicos disponíveis. O câncer de mama é uma doença que pode se apresentar sob diversas formas clínicas, sendo essa diversidade relacionada às múltiplas alterações genéticas e moleculares. Devido aos diferentes tipos de câncer de mama, algumas mulheres têm bom prognóstico, com baixo risco de metástases à distância; outras, ao contrário, apresentam alto risco e baixa sobrevida (INCA, 2010).

No Brasil, o rastreamento mamográfico para mulheres de 50 a 69 anos é a estratégia recomendada para controle do câncer de mama. As recomendações do Ministério da Saúde para detecção e diagnóstico precoce desse câncer são baseadas no Documento de Consenso para Controle do Câncer de Mama de 2004, que considera como principais estratégias de rastreamento um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. O exame clínico da mama deve ser realizado em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independente da faixa etária, como parte do atendimento à saúde da mulher. Para as mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau), recomendam-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos (INCA, 2010).

Fatores de risco, associados ao desenvolvimento do câncer de mama, incluem histórico familiar, idade da menarca, idade da menopausa, nuliparidade ou paridade após os 30 anos e terapia de reposição hormonal. Mutações hereditárias nos genes supressores de tumores BRCA1 e BRCA2, embora ocorrendo apenas em 5 a 10% de todos os tumores da mama, têm o risco de até 85% de desenvolver a doença. A complexidade dos fatores que

governam a incidência do câncer de mama e sua progressão tem levado a múltiplas teorias para a compreensão de sua patogênese (GUPTA; KUPERWASSER, 2004).

Um modelo hipotético de carcinogênese indica que o câncer da mama se desenvolve desde uma série de lesões hiperplásicas intermediárias até um carcinoma *in situ* e invasor, com o risco de desenvolvimento de carcinoma aumentando em cada estágio. Além disso, estudos epidemiológicos demonstram um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama associado a lesões proliferativas nos ductos e ácinos mamários (TAFURI et al., 2006).

A progressão do CDIS para carcinoma invasivo ainda é pouco compreendida. Alterações genéticas semelhantes às observadas nos carcinomas invasivos já ocorrem nas lesões pré-invasivas. Embora os passos iniciais e as rotas da gênese tumoral, na mama, permaneçam ainda pouco definidos, é bastante provável que a maioria dos carcinomas invasivos surja a partir de carcinomas *in situ*. A presença compartilhada de alterações cromossômicas em CDIS e em carcinoma invasor sincrônico e adjacente demonstram a relação clonal entre ambas as lesões (RADFORD et al., 1995 [erratum, 1996]; STRATTON et al., 1995).

Múltiplos achados biológicos e clínico-patológicos distinguem o CDIS de lesões proliferativas e do tecido mamário normal. À medida que lesões hiperplásicas progridem para CDIS e carcinoma invasor, ocorrem desbalanços cromossômicos, com ganho e perda de múltiplos *loci*. A perda de heterozigosidade é percebida em mais de 70% dos CDIS de alto grau, em comparação com 35 a 40% dos casos de HDA, e 0% em tecido mamário normal (AUBELE et al., 2000; FARABEGOLI et al., 2002; O'CONNELL et al., 1998).

Ultimamente, têm sido identificados marcadores moleculares associados com a gênese tumoral. O receptor estrogênico, normalmente expresso pelas células mamárias luminais, é verificado em até 70% dos CDIS (ALLRED et al., 1992). O gene supressor tumoral p53 apresenta-se mutante em, aproximadamente, 25% de todas as lesões de CDIS e, raramente, no tecido normal e nas lesões proliferativas benignas (RUDAS et al., 1997). O proto-oncogene *c-erbB2* é hiperexpresso em, aproximadamente, 50% dos CDIS, todavia ausente na HDA (ALLRED et al., 1992). A expressão e a amplificação do *c-erbB2* ocorrem de forma mais expressiva no CDIS de alto grau tipo comedo. Assim como há heterogeneidade de padrões morfológicos, também há diferente expressão de marcadores moleculares no CDIS (ELLIS et al., 1998).

O CDIS é considerado uma lesão precursora do carcinoma invasivo de mama. No período de 10 a 20 anos após o diagnóstico inicial, existe um risco de 30% a 50% de o CDIS não tratado progredir para o carcinoma invasor na mama ipsilateral. O risco cumulativo do desenvolvimento de câncer na mama contralateral é baixo, menos de 1% ao ano (CORNFELD et al., 2004; HARRIS et al., 2010; ROSEN et al., 2009; PAGE et al., 1995).

O diagnóstico de CDIS era responsável por 2% dos casos de câncer tratados em 1980 (ROSNER et al., 1980). De 1973 a 1992, sua frequência aumentou em 587%, enquanto a incidência de carcinoma invasivo, com o emprego de programas de rastreamento mamográfico, aumentou em 34,3% entre mulheres acima de 40 anos de idade (Figura 1). Atualmente, lesões de CDIS compreendem 15 a 25% de todos os casos de câncer de mama. É descrito na literatura que programas de rastreamento por mamografia, se adotados de forma mais abrangente, poderiam detectar uma taxa de lesões não palpáveis de CDIS na ordem de até 45% (ERNSTER, et al., 1996).

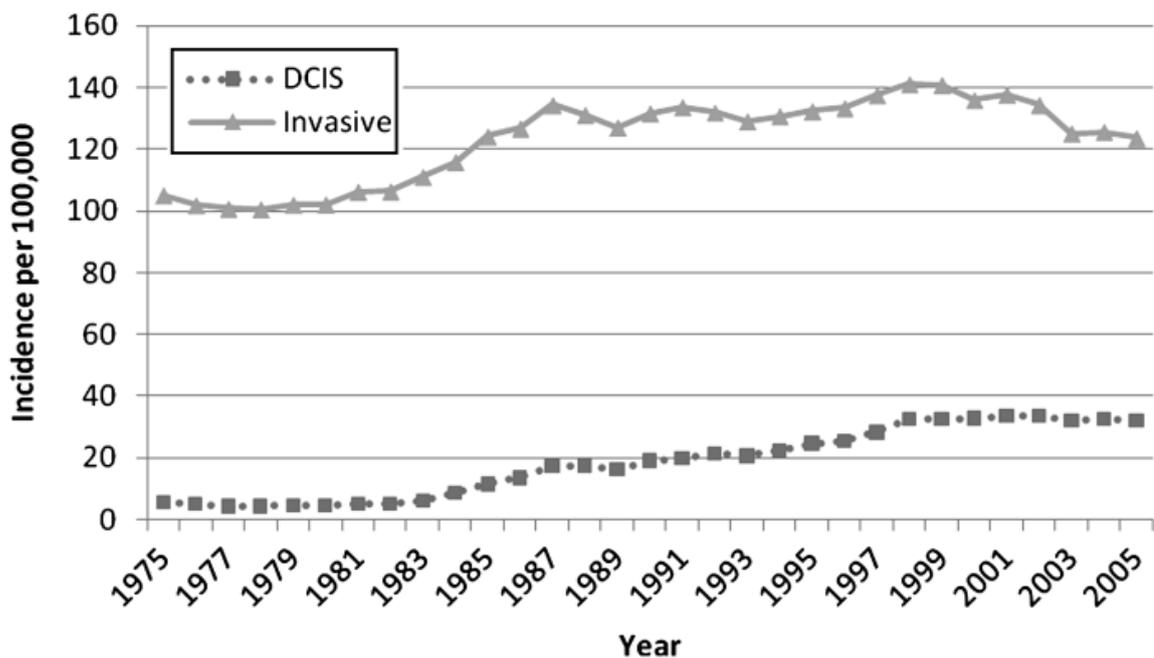


Figura 1: Incidências de CDIS e carcinoma invasor ajustadas pela idade (1975-2005)

Fonte: adaptado de Virnig BA; Tuttle TM; Shamliyan T; Kane RL. **Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes.** J Natl Cancer Inst. 2010 Feb 3;102(3):170-8.

O desenvolvimento de câncer de mama pós-tratamento de lesões de CDIS depende do tipo de tratamento realizado. Um ensaio clínico randomizado encontrou a taxa de 13,4% de

recidiva ipsilateral na forma de carcinoma invasor após setorectomia isolada para lesões de CDIS, num período de seguimento de 90 meses. Esse dado pode ser comparado com a taxa de 3,9%, relativa à associação de radioterapia adjuvante à mama operada por setorectomia (FISHER et al., 1998).

Outra série de 706 pacientes com DCIS tiveram seu tratamento definido a partir do Índice Prognóstico de Van Nuys, que estima o risco de recorrência considerando fatores como idade, margens cirúrgicas, tamanho tumoral e grau histológico. O grupo de baixo risco compreendeu um terço dos casos e apresentou baixa recorrência na forma de CDIS (1%) e nenhuma como carcinoma invasor. Os grupos de moderado e alto risco, por sua vez, apresentaram maior taxa de recorrência, com benefício adicional quando realizado radioterapia adjuvante (SILVERSTEIN et al., 2003). Ambos os estudos avaliaram casos de CDIS detectados através de *screening* mamográfico.

De acordo com os dados do programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, 1,9% das mulheres que tiveram o diagnóstico de CDIS durante os anos de 1984 a 1989 morreram de câncer de mama nos 10 anos seguintes ao diagnóstico (ERNSTER et al., 2000).

Em razão de, atualmente, o CDIS ser uma doença frequente, principalmente nos locais onde programas de rastreamento para câncer de mama são uma realidade, e pelo potencial evolutivo e de recorrência como carcinoma invasor, o diagnóstico adequado e preciso torna-se de fundamental importância. Consequentemente, a classificação de tais lesões, através das características histopatológicas com critérios bem definidos, propicia um diagnóstico mais confiável do CDIS. Tal procedimento possibilita estabelecer um tratamento mais adequado, reduzindo, possivelmente, a mortalidade e, certamente, a morbidade. Além disso, evitaria um tratamento cirúrgico agressivo, como é o caso da mastectomia, ou o impacto da recidiva local, com todas suas repercussões físicas, sociais e psicológicas.

2.2 TELEPATOLOGIA E QUESTIONÁRIO ELETRÔNICO: *WEB-BASED SURVEY*

A telepatologia tem avançado continuamente desde 1986. Originalmente, o termo era empregado para se referir à “prática da patologia a longa distância”. Atualmente, entende-se longa distância como qualquer distância entre o operador do microscópio e o patologista. Esta distância pode variar, estando geralmente intermediada por sistemas de telecomunicação, sendo a internet a mais frequente (WEINSTEIN et al., 2009). A telepatologia é aplicada para a transmissão de qualquer informação de pacientes em relação à patologia, que seja passível de ser transmitida por tecnologia de telecomunicação. Seu emprego tem utilidade principalmente em locais onde não há patologista disponível, como em locais distantes sem acesso a serviços de patologia, diagnóstico intraoperatório, treinamento ou obtenção de segunda opinião de diagnóstico.

Publicações recentes têm demonstrado uso freqüente da internet para realização de coleta de dados em âmbito de pesquisas. Define-se como *e-survey* ou *web-based survey* um questionário eletrônico disponível na internet (EYSENBACH, 2004). Investigadores das áreas da medicina, psicologia, sociologia, odontologia e medicina veterinária têm recrutado participantes para seus estudos através da internet. Os participantes respondem aos questionários eletrônicos e têm suas respostas enviadas normalmente através de correio eletrônico ou armazenadas após acesso a *websites* (SCHLEYER; FORREST, 2000).

A internet é uma rede global de computadores interligados, que configuram uma estrutura de telecomunicação internacional. Entre as funções da internet estão *e-mail*, *world wide web* (web ou www) e transferência de arquivos. A linguagem de hipertexto (HTML), usada para criar as páginas na rede, facilita a inclusão de imagens digitais assim como textos e links. As imagens geralmente estão disponíveis no formato GIF ou JPEG (MCDONALD, 2010).

Se um questionário está disponível em um site, ele pode ser protegido de acesso pelo emprego de um nome de usuário e senha, o que permite que apenas convidados registrados participem. Outra forma de administrar o questionário é mantê-lo aberto ao público em geral, o que permite que qualquer visitante do site possa participar e completar o questionário. Os

questionários eletrônicos disponíveis em sites da internet têm a vantagem de permitir o anonimato dos participantes, ao contrário daqueles oferecidos através de mensagem eletrônica (e-mail).

Ao conduzir estudos envolvendo questionários eletrônicos, os pesquisadores podem obter um consentimento prévio do participante em vias de responder à pesquisa. O mesmo poderá conter informações apresentando o objetivo do estudo, o grupo de pesquisadores, esclarecendo como a privacidade será assegurada e como os dados serão divulgados após a análise (EYSENBACH; WYATT, 2002).

Dentre as vantagens comumente citadas estão o fácil acesso, o armazenamento instantâneo das respostas e o baixo custo. Além disso, a internet permite que o questionário seja acessado por qualquer pessoa que disponha de computador pessoal conectado a internet, a baixo custo e tempo reduzido. Como benefícios adicionais pode-se destacar o modo de apresentação através de imagem, cor e interação facilitada com o participante, o que não é viável em um questionário em papel.

Igualmente, o formato eletrônico impede respostas múltiplas ou incompletas, não permitindo ao participante prosseguir sem corrigir alguma resposta errada ou inconsistente. O programa pode oferecer meios de controlar e evitar que participantes, inadvertidamente, deixem de informar a resposta de alguma questão. Soma-se a isso o fato de que a possibilidade de troca de respostas ou falhas são reduzidas, ou mesmo eliminadas, pelo registro e armazenamento automático dos dados coletados. Por fim, os questionários eletrônicos podem minimizar custos, facilitar a troca de informações, e oferecem a conveniência de ter as informações direta e automaticamente armazenadas em um banco de dados imediatamente disponível para análise dos resultados (SCHLEYER; FORREST, 2000).

Esse método, entretanto, está sujeito a vieses sistemáticos, que podem resultar da natureza não representativa da população que faz uso da internet e da auto-seleção dos participantes, problema conhecido como efeito voluntário.

Equipamentos necessários para a telepatologia normalmente envolvem um microscópio óptico, uma câmera fotográfica digital de alta resolução integrada ou câmera de vídeo digital, computador pessoal equipado com um software para leitura de imagens e acesso à rede de transmissão de dados.

Em muitos países desenvolvidos, patologistas estão integrando imagens digitais à prática médica (PRITT, et al., 2003). A emergência da tecnologia que sustenta a imagem digital, conjuntamente com computadores de alta capacidade de processamento, tem permitido o emprego da telepatologia. O uso de imagens digitais e métodos integrados com computação tem sido proposto como alternativa à microscopia óptica convencional de lâminas para testes de proficiência e tem provado ser um método de melhor custo-efetividade (WEINSTEIN et al., 2009).

A telepatologia pode ser empregada através de imagens estáticas (fotografias de áreas selecionadas da lâmina de patologia) ou de microscopia dinâmica e virtual (imagem do conteúdo completo de determinada lâmina de patologia) (WEINSTEIN et al., 2009). O sistema dinâmico permite a visualização das imagens sob controle do avaliador à distância, porém isso implica a transmissão de arquivos mais complexos e a disponibilidade de sistemas de transmissão de dados de maior velocidade e custo. O método de microscopia virtual, que utiliza sistemas de visualização da lâmina de patologia de modo completo, tem a vantagem de reduzir o erro de amostragem da seleção de imagens. Entretanto, assim como o sistema digital, é dependente de transmissão de um grande volume de dados, o que lhe confere um alto custo.

O processo de obtenção da imagem digital em patologia envolve uma série de operações. Cada uma delas contribui para a qualidade final da imagem apresentada no monitor de vídeo do computador. Estão incluídos nesse processo o preparo da amostra no laboratório, a microscopia óptica, a captura da imagem por câmera digital de alta definição, o armazenamento da imagem, a transmissão das imagens e o acesso dessas imagens pelo avaliador (WEINSTEIN et al. 2009).

Dois ensaios clínicos randomizados compararam a acurácia diagnóstica da microscopia convencional com microscopia digital. Li et al. (2007) investigaram a acurácia de dois patologistas cegados para o diagnóstico de 400 casos (seminoma, carcinoma ductal invasor de mama e carcinoma de cólon) apresentados através de imagens de microscopia digital. Após três semanas, foram reenviados os mesmos casos, neste momento como lâminas de patologia para leitura convencional ao microscópio óptico. Tanto o diagnóstico, quanto o tempo gasto para obtenção do mesmo, foram analisados em ambos os métodos. O diagnóstico padrão ouro foi obtido pelo consenso de pelo menos dois patologistas especialistas. As

acurácias diagnósticas foram de 97,25% e 96,25% para a microscopia convencional e 95,50% e 94,75% para a microscopia digital para os dois patologistas respectivamente. Não houve discrepância diagnóstica significativa entre os dois métodos. A média de tempo gasto foi de 3,41 e 5,24 min. para a microscopia virtual, comparada com 1,16 e 3,35 min. para a microscopia convencional, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os autores concluíram, portanto, que o método de microscopia virtual tem acurácia aceitável e possui aplicabilidade clínica em locais que dispõem de tecnologia similar para processamento de imagens (LI et al., 2007).

A fim de avaliar biópsias renais realizadas por patologistas participantes da rede de controle de qualidade de patologia renal do Reino Unido, Furness (2007) comparou a acurácia diagnóstica de microscopia digital transmitida através de internet com a de microscopia óptica. Dos 96 participantes registrados, 26 (27%) responderam o diagnóstico de 6 casos, de um total de 12, por telepatologia; 85 (89%) responderam o diagnóstico de todos os 12 casos por microscopia convencional. No total, 156 diagnósticos por telepatologia e 1018 por microscopia convencional foram analisados. Não houve diferença estatisticamente significativa na acurácia diagnóstica dos dois métodos confrontados nesse estudo (FURNESS, 2007).

O estudo de Zito et al. (2010) comparou a avaliação e classificação de microscopia virtual de lesões complexas de mama, transmitidas por internet, com a participação de 10 patologistas. O grau de concordância com o padrão ouro foi fraco (média do kappa de 0,60), assim como a concordância interobservador (média do kappa de 0,53). Concluíram, por sua vez que, quando analisados casos de difícil diagnóstico, os resultados são comparáveis a estudos de controle de qualidade para microscopia convencional (ZITO et al., 2010).

A telepatologia parece ser um recurso válido e promissor com relevante aplicação para locais distantes ou com recursos limitados para acesso a serviços de patologia. De um maneira geral, a acurácia diagnóstica da telepatologia mostra-se comparável àquela da microscopia convencional, especialmente quando aplicada como microscopia virtual (EUSEBI et al., 1997). Não se encontra na literatura estudo algum que tenha avaliado o impacto do uso da telepatologia no desfecho clínico, assim como a sua efetividade clínica de interpretar ou compartilhar informações entre laboratórios de patologia.

2.3 TESTE ESTATÍSTICO ÍNDICE DE KAPPA (κ) PARA AVALIAÇÃO DE CONCORDÂNCIA DIAGNÓSTICA

Quando se avalia a reprodutibilidade de diagnóstico feita por duas ou mais modalidades diferentes de diagnóstico, o percentual geral ou a concordância proporcional parecem ser intuitivamente uma simples e correta medida de reprodutibilidade. Dado o limitado número de possibilidades diagnósticas, é importante corrigir a concordância que possa ocorrer ao acaso. Concordância é o número de casos que tiveram o mesmo diagnóstico, de maneira geral ou proporcional, entre o mesmo ou entre diferentes observadores, considerando que há possibilidade de que parte dessa concordância possa ser atribuída, em parte, também ao acaso.

Reprodutibilidade, por sua vez, corresponde à parte da concordância que não pode ser explicada meramente pelo acaso, sendo apropriadamente avaliada pelo teste estatístico Kappa. A reprodutibilidade pode ser avaliada por dois ou mais observadores examinando o mesmo objeto (reprodutibilidade interobservador), ou pelo mesmo observador examinando o mesmo objeto em duas ou mais modalidades, ou em duas ou mais ocasiões (reprodutibilidade intraobservador) (KUNDEL; POLANSKY, 2003).

A análise estatística de concordância é feita geralmente por três razões. Em primeiro lugar, a concordância de observação fornece informações sobre a veracidade do diagnóstico. Um método válido deveria produzir boa concordância, quando usado por observadores capacitados. Segundo, a concordância pode ser usada para confirmar a consistência de um método de classificação de uma alteração, que indique a extensão ou severidade de uma determinada doença, assim como pode determinar a validade de características de doenças. Pode igualmente ser usada para comparar as performances de equipamentos e de profissionais. Terceiro, a concordância pode fornecer uma estimativa geral da validade de uma determinada técnica (KUNDEL; POLANSKY, 2003).

Os valores Kappa (κ) podem variar de -1 a +1, todavia, em termos de aplicabilidade prática considera-se a variação de valores entre 0 a 1, onde κ de 0 significa que não há concordância além daquela devida ao acaso, e κ de 1 indica concordância perfeita. Valores

intermediários têm interpretação subjetiva. Landis e Koch sugerem a seguinte interpretação para diferentes faixas de valores de κ de 0 a 0,20, a concordância é pobre ou fraca; de 0,21 a 0,40, aceitável; de 0,41 a 0,60, moderada; de 0,61 a 0,80, boa; e de 0,81 a 1,00, excelente (LANDIS; KOCH, 1977).

Relação entre concordância e acurácia:

Deve-se ter em mente que medidas de concordância não refletem necessariamente a acurácia. Alta acurácia implica alta concordância, mas alta concordância não necessariamente implica alta acurácia. Não há meio direto para inferir a acurácia de uma avaliação diagnóstica a partir da concordância de observadores. Acurácia apenas pode ser considerada como concordância, quando se admite que os observadores que concordam entre si devem também estar corretos. Dessa forma, frequentemente, assume-se a concordância como correta através de consenso de diagnóstico ou através de uma segunda opinião de diagnóstico, isso não sendo, entretanto, sempre verdadeiro.

O consenso de um grupo de médicos é, frequentemente, o único modo de determinar o diagnóstico em situações de dificuldade. Estudos de patologistas envolvidos na classificação de câncer têm mostrado grau de discordância similar àquele associado à dificuldade diagnóstica em radiologia (LANDIS; KOCH, 1977).

Uma vez assumido que a concordância represente a acurácia, pode-se usar o valor da concordância calculada como o limite inferior da acurácia. Em radiologia, a concordância interobservador normalmente é de 70%-80%, representando uma acurácia de 85%-90% (ie, $70\% + 30\%/2$ a $80\% + 20\%/2$) (KUNDEL; POLANSKY, 2003).

2.4 HISTOLOGIA MAMÁRIA

O epitélio normal da mama, originalmente, é descrito como composto por dois tipos celulares básicos: células glandulares luminais e células basais mioepiteliais, que se caracterizam por expressar, respectivamente, as citoqueratinas CK 8/18/19 e a actina de músculo liso. Estudos utilizando marcadores de citoqueratinas mostram que existe um terceiro tipo celular: a célula mamária totipotencial, localizada tanto na camada basal/parabasal, quanto no compartimento intraluminal. São células coradas pelo marcador de citoqueratina CK 5 e compreendem cerca de 5% das células mamárias (BANKFALVI et al., 2004; BOCKER et al., 2002).

A mama é constituída, basicamente, por parênquima – glândula ou tecido epitelial –, e pelo estroma, composto pelos demais tecidos presentes. O parênquima é constituído pelo sistema ductal e lobular. O sistema ductal inicia-se no mamilo, com 15 a 25 ductos principais, e se ramifica até a unidade ducto-lobular terminal. Essa unidade consiste em ductos terminais intralobulares e múltiplos ductos lobulares envolvidos pelo tecido conjuntivo perilobular. Enquanto os ductos extralobulares são revestidos por células epiteliais colunares, os intralobulares e lobulares são revestidos por células cuboidais. Os grupamentos de ductos lobulares são também denominados de ácinos (PAGE; ANDERSON, 1987). O estroma é constituído por gordura, tecido conjuntivo, vasos e nervos. O tecido conjuntivo intralobular é hormônio responsível, formado por colágeno em uma matriz de ácido mucopolissacarídico com fibroblastos e poucos linfócitos e macrófagos (PAGE; ANDERSON, 1987).

Os ductos são formados, basicamente, por dois tipos celulares: a camada interna, colunar ou cuboidal, e a camada externa, de células mioepiteliais e membrana basal (Figura 2, 3 e 4). O número de camadas celulares, nos ductos normais, pode variar de uma a duas, durante o período reprodutivo feminino (ROSEN; OBERMAN, 1993; TAVASSOLI, EUSEBI, 2009). Qualquer aumento no número de células, por exemplo, três ou quatro, já pode ser definido como hiperplasia (PAGE; ANDERSON, 1987).

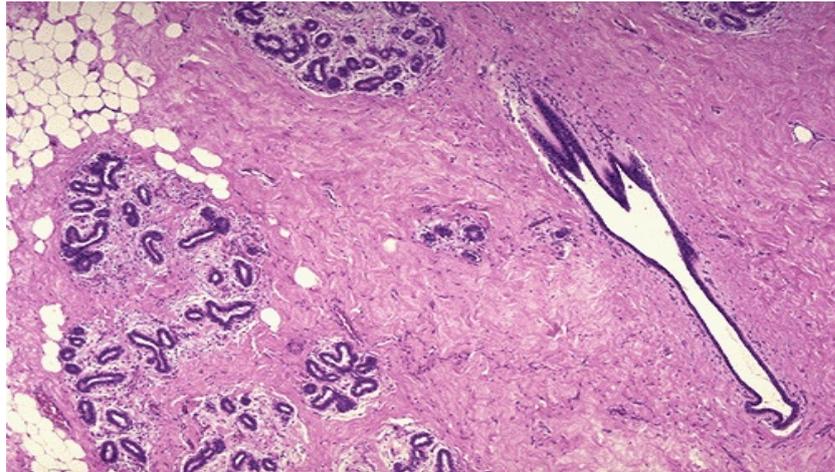


Figura 2: Aspecto normal microscópico do tecido mamário benigno. Há um ducto maior à direita e lóbulos à esquerda. Estroma, contendo colágeno, se estende entre as estruturas. A quantidade variável de tecido adiposo pode estar presente entre estes elementos normais da mama (HE, 3,2x).

Fonte: Disponível em:
 <<http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST020.jpg>> Acesso em: 4.jul.2008.

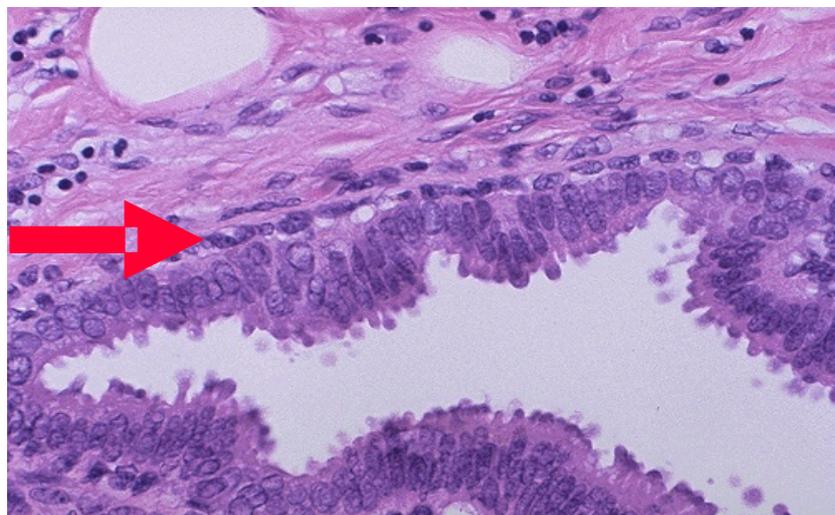


Figura 3: Em maior aumento, apresenta-se o aspecto microscópico do ácino normal. Notam-se células epiteliais revestindo a luz internamente com secreção apócrina no seu ápice. Uma camada de células mioepiteliais, algumas levemente vacuolizadas são vistas ao redor e delimitando o ácino (seta) (HE, 200x).

Fonte: Disponível em:
 <<http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST027.jpg>> Acesso em: 4.jul.2008.

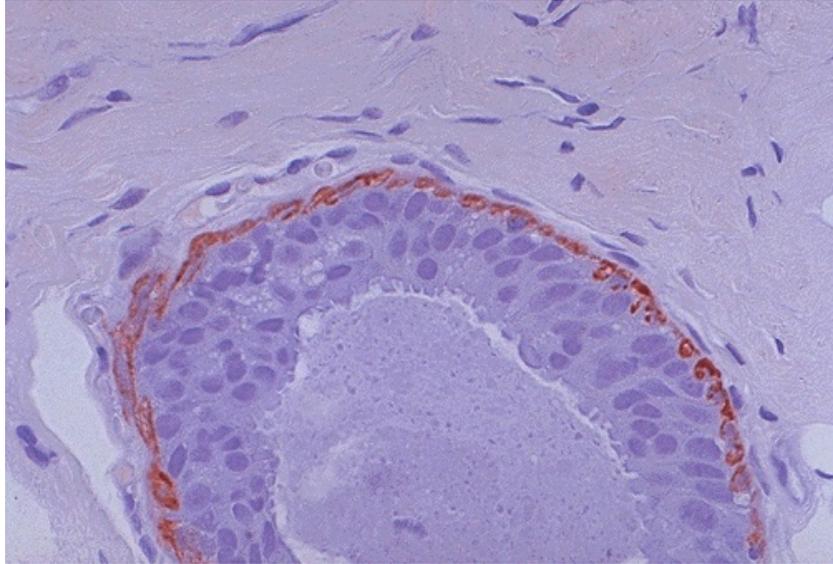


Figura 4: Coloração com anticorpo antiactina de músculo liso (HHF35) por imunohistoquímica demonstra a camada de células mioepiteliais ao redor do ácino (HHF35, 200x).

Fonte: Disponível em:
<<http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST021.jpg>> Acesso em: a 4.jul.2008.

2.5 PATOLOGIA MAMÁRIA

A definição precisa das alterações mamárias deve ser considerada de extrema importância. Entre essas alterações estão as proliferativas, associadas a um menor ou maior grau de desenvolvimento de carcinoma invasor. Tais alterações são divididas, classicamente, em três grupos: hiperplasia ductal usual (HDU), hiperplasia ductal atípica (HDA) e carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

2.5.1 Hiperplasia ductal usual

A hiperplasia ductal usual é caracterizada pelo aumento no número de células epiteliais dentro dos ductos mamários em comparação com o tecido normal. (PAGE; ANDERSON, 1987). Esse termo deve ser utilizado para descrever todos os casos de proliferação intraluminal que não apresentam atipias, podendo variar, de uma HDU mínima a uma hiperplasia florida, sem apresentar atipias (NHS, 2005). As alterações envolvem a unidade ducto lobular terminal ou os ductos interlobulares. Células epiteliais, basais e mioepiteliais estão envolvidas nesse processo e podem apresentar margens celulares indistintas. Microscopicamente, essas células podem apresentar desde uma proliferação esparsa até a oclusão e a distensão dos ductos com as células proliferadas (Figura 5). A hiperplasia pode ser papilar, variando desde a formação de múltiplas micropapilas até pequenos papilomas intraductais com delicado estroma fibrovascular. As células são uniformes e não apresentam atipias. As mitoses podem estar presentes, no entanto, são infrequentes e não apresentam figuras mitóticas anômalas (ROSEN; OBERMAN, 1993). Estudos indicam que a HDU é uma alteração heterogênea, contendo subgrupos identificados de acordo com a expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE) (SHAABAN et al., 2002).

A HDU é frequente em 20% das mulheres jovens; nas pacientes pós-menopáusicas esse número se encontra no intervalo de 20 a 50%. Não há evidências de que essa alteração esteja relacionada com fatores genéticos e, aparentemente, não parece aumentar sua frequência em mulheres com histórico familiar de câncer de mama; todavia, sabe-se que está relacionada a um pequeno aumento de risco desta doença (STOLL, 1999). A expressão do Ki-67, na HDU, está descrita com mediana de 0,99% (BANKFALVI et al., 2004).

Segundo um estudo de caso-controle, elaborado por Shaaban et al., em 2002, no qual se observaram pacientes com biópsia de mama com HDU que, posteriormente, desenvolveram algum tipo de carcinoma de mama, o risco relativo encontrado foi de 1,53. A expressão do Ki-67 foi significativamente maior nos casos que desenvolveram carcinoma posteriormente (mediana 3,82%) do que em pacientes controles (mediana 0,77%) desse estudo (SHAABAN et al., 2002).

O desfecho para cada pessoa que apresenta uma biópsia com HDU ainda não pode ser predito. Sabe-se apenas, em nível populacional, que existe um aumento de risco de desenvolvimento do câncer de mama. Para melhor definir essas alterações, é necessário um progresso futuro que vise a identificar marcadores moleculares.

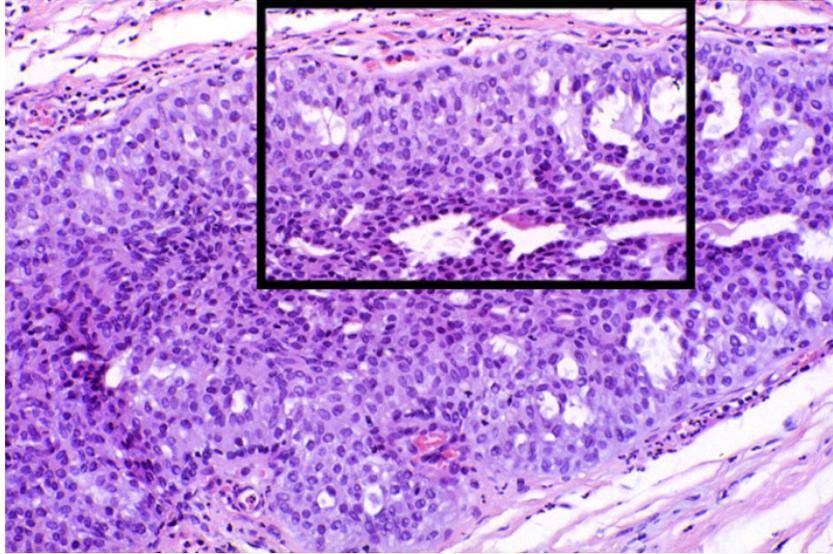


Figura 5: Ductos demonstram hiperplasia epitelial usual. Células epiteliais em multicamadas. Não há atipia. (HE, 100x).

Fonte: Disponível em:

<<http://mammary.nih.gov/reviews/tumorigenesis/Fischer001/originals/8F.jpg>> Acesso em: 4.jul. 2008.

2.5.2 Hiperplasia ductal atípica

A hiperplasia ductal atípica (HDA) é caracterizada por uma proliferação ductal com múltiplas camadas, com células que perderam a polaridade nuclear e com atipias nucleares. Define-se como atipia o aumento do núcleo e do nucléolo, que pode ser múltiplo (ROSEN; OBERMAN, 1993) (Figura 6). A HDA apresenta algumas, não todas, alterações presentes no CDIS. Mesmo que o ducto envolvido apresente as características de um carcinoma intraductal, a não ser que haja mais de um ducto envolvido, o diagnóstico será de HDA. Segundo o estudo de DuPont e Page (1985), o risco relativo da HDA é de 5,3, sendo que, se for associado a histórico familiar de câncer, o valor é praticamente duplicado (DUPONT;

PAGE, 1985). Pelos critérios de Page, a HDA é a alteração proliferativa que apresenta características de um CDIS, mas não preenche todos os critérios para tal (PAGE; ANDERSON, 1987). Os critérios de Tavassoli e Norris, que são bastante semelhantes aos de Dupont, consideram que a HDA tem os critérios do CDIS, porém com diâmetro menor que 2 mm (TAVASSOLI; NORRIS, 1990).

A distinção da HDA do CDIS de baixo grau e da HDU é fundamental. A dificuldade dessa distinção reside no fato de que as alterações se expressam no número de células, no tamanho dos espaços ductais e nas características nucleares das células, que não variam quanto a polarização nuclear (PAGE; ANDERSON, 1987).

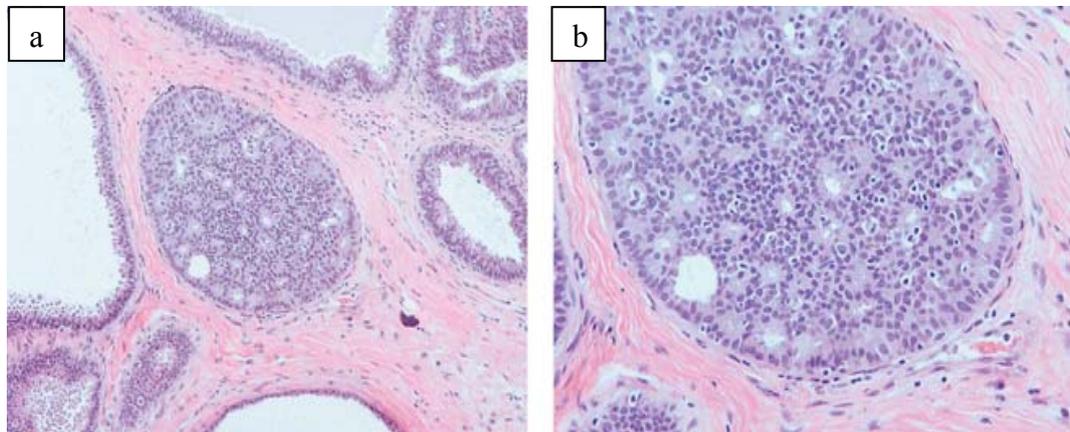


Figura 6a e 6b: Hiperplasia ductal atípica da mama com atipias celulares e células mioepiteliais remanescentes (HE, 100 e 200 x).

Fonte: Disponível em: Rosen's Breast Pathology. Copyright © 2009 Wolter Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins.

Em se tratando da variação interobservador, distinguir lesões que podem apresentar um contínuo evolutivo provavelmente será um problema (GHOFRANI; TAPIA; TAVASSOLI, 2006). A definição de atipia é necessária para a estratificação de risco das pacientes. A distinção entre HDA e CDIS pode ser muito complexa, especialmente, quando se apresenta um carcinoma intraductal bem diferenciado não comedônico (TAVASSOLI; DEVILLEE, 2003). Nesses casos, a utilização de marcadores imuno-histoquímicos pode ajudar na distinção.

A HDA é encontrada em cerca de 10% das mulheres, e sua frequência, em pacientes com câncer de mama, atinge o pico máximo em torno dos 40 anos, regredindo em frequência após os 55 anos (STOLL, 1999).

2.5.3 Carcinoma ductal *in situ*

O carcinoma de mama desenvolve-se dentro do sistema ductal, frequentemente, na unidade ducto lobular terminal. O CDIS, que também recebe a terminologia de carcinoma intraductal, é uma neoplasia que não apresenta invasão do estroma mamário. Segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), o CDIS é a neoplasia intraductal caracterizada pelo aumento da proliferação epitelial com atipias celulares, variando de sutis a acentuadas, com uma tendência de progressão à carcinoma invasor. Tem, como sinônimo, o termo neoplasia intraepitelial ductal (DIN1 a DIN3). Essa nomenclatura, adotada pela OMS, procura categorizar as lesões proliferativas ductais dentro de um gradiente, conforme Tabela 1. O espaço de tempo para a transformação de um epitélio hiperplásico atípico em CDIS não é bem estabelecido. O estroma periductal também apresenta alterações com presença de elastose periductal e estromal. Na classificação TNM, o CDIS é definido como TisN0M0, estágio 0 (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Tabela 1: Neoplasias intra-epiteliais ductais

Terminologia clássica	DIN
Hiperplasia ductal usual	–
Atipia epitelial plana	1A
Hiperplasia ductal atípica	1B
Carcinoma ductal <i>in situ</i> , grau I	1C
Carcinoma ductal <i>in situ</i> , grau II	2
Carcinoma ductal <i>in situ</i> , grau III	3

Fonte: World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003.

Sob o ponto de vista histológico, o CDIS é uma lesão heterogênea podendo constituir um espectro de lesões. O crescimento intraductal pode apresentar uma grande variedade de padrões arquiteturais: cribriforme, papilar, micropapilar, sólido e comedo, na sua forma pura ou combinada. O componente intraductal pode ser bem diferenciado, com proliferação monótona e uniforme, como nos casos micropapilares e cribriformes; já nos casos de comedocarcinoma, há um acentuado pleomorfismo celular com evidentes mitoses anômalas (ELLIS et al., 1998; PAGE; ANDERSON, 1987; JAFFER; BLEIWEISS, 2002).

O padrão arquitetural cribriforme é o mais comumente encontrado no CDIS de baixo grau. As células, em geral, apresentam tamanhos e formatos uniformes, com núcleo de localização central. O grau nuclear pode variar de alto a baixo grau. Ocasionalmente, o padrão cribriforme pode estar associado à necrose (JAFFER; BLEIWEISS, 2002) (Figura 7).

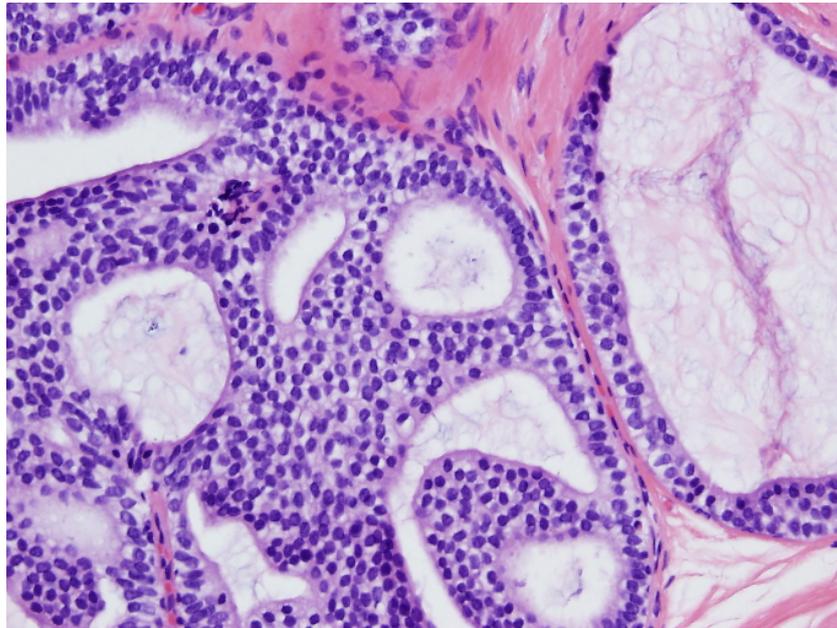


Figura 7: Carcinoma ductal *in situ*: padrão cribriforme (HE, 200x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

O CDIS papilar é um tipo arquitetural associado ao grau nuclear moderado ou baixo, constituído por população uniforme de células, em torno de eixos conjuntivo-vasculares, que formam prolongamentos papilares para dentro dos ductos. A forma micropapilar não exhibe o eixo conjuntivo-vascular e, na forma pura, tem grande tendência à multicentricidade (JAFFER; BLEIWEISS, 2002) (FIGURA 8).

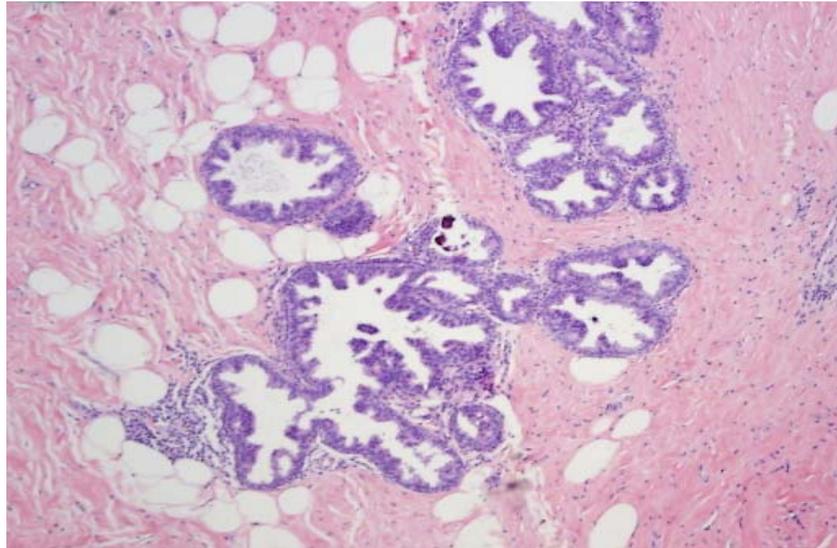


Figura 8: Carcinoma ductal *in situ*: padrão micropapilar (HE, 100x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

O CDIS de padrão sólido caracteriza-se por obliteração completa da luz ductal e pela proliferação celular, podendo variar o grau nuclear de baixo a alto (JAFFER; BLEIWEISS, 2002) (FIGURA 9).

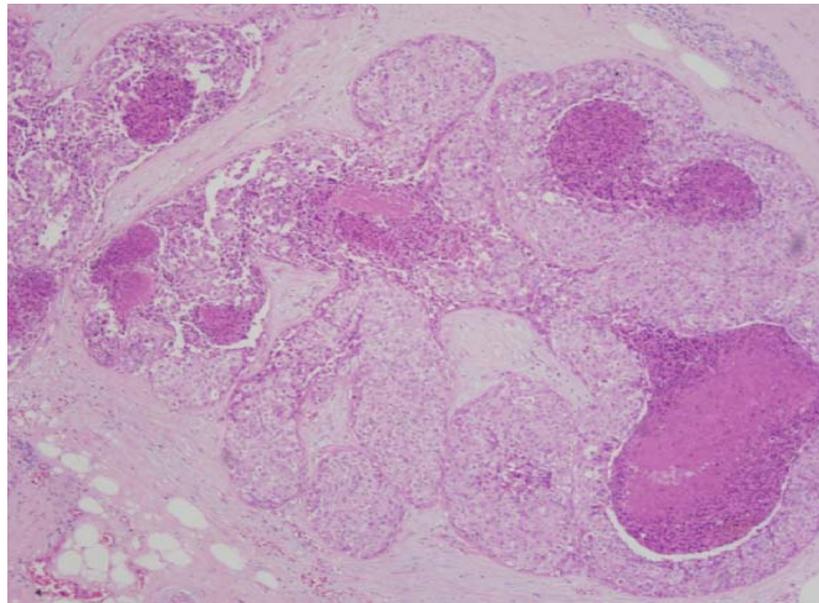


Figura 9: Carcinoma ductal *in situ*: padrão sólido (HE, 100x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

Por fim, a categoria comedo é relacionada ao pior prognóstico. É composta por células grandes, com acentuada atipia nuclear, necrose extensa e, frequentemente, associada a microcalcificações (JAFFER; BLEIWEISS, 2002) (FIGURA 10).

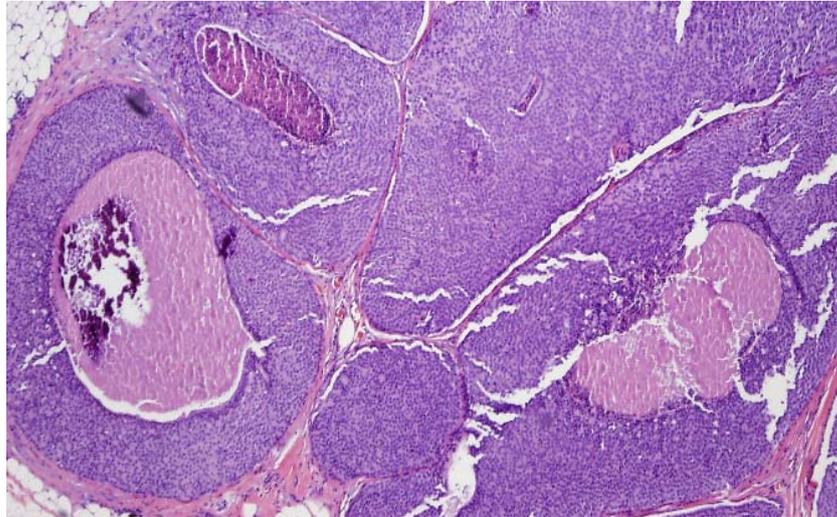


Figura 10: Carcinoma ductal *in situ*: padrão comedo (sólido com comedonecrose) (HE, 100x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

Existem, ainda, alguns tipos raros, como o apócrino, o endócrino e o hipersecretor, que apresentam comportamentos biológicos pouco definidos (ELLIS et al., 1998; PAGE; ANDERSON, 1987; JAFFER; BLEIWEISS, 2002).

O diagnóstico diferencial do CDIS de baixo grau e da HDA, principalmente quando há lesões sem comedonecrose, pode ser uma tarefa árdua ao patologista. Não existe um critério específico de diagnóstico. Enquanto alguns autores requerem um envolvimento total de um único ducto com as características celulares e arquiteturais, outros descrevem-no como o comprometimento de um ou mais ductos, excedendo 2 mm de diâmetro (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

A distinção de CDIS com lesões francamente invasoras também pode não ser facilmente percebida (CONSENSUS..., 1997). O carcinoma lobular *in situ* (CLIS), em raras ocasiões, pode não ser prontamente diferenciado do CDIS, assim como ambos podem coexistir na mesma mama ou na mesma unidade ducto-lobular (HARRIS et al., 2010).

A interpretação diagnóstica de algumas alterações mamárias proliferativas pode ser bastante controversa. Em um estudo realizado por Ghofrani, para analisar a concordância diagnóstica entre casos de HDA e carcinoma ductal *in situ* de baixo grau, foram distribuídos questionários com ênfase em cinco alterações proliferativas mamárias diferentes para cerca de 230 patologistas. As respostas quanto ao diagnóstico foram avaliadas, verificando discrepâncias entre os diagnósticos. Com desenhos esquematizando alterações mamárias, 56,5% dos patologistas consideraram essas alterações uma HDA, enquanto 43,5% consideraram ser um CDIS de baixo grau, o que evidencia a ocorrência de uma discrepância diagnóstica muito grande com importantes consequências clínicas (GHOFRANI; TAPIA; TAVASSOLI, 2006).

Em outro estudo realizado em 1991, Rosai distribuiu 17 casos de alterações proliferativas mamárias, tipo ductal e lobular, para cinco especialistas em patologia mamária. Ao comparar os diagnósticos, não verificou, em qualquer dos casos, concordância diagnóstica entre os cinco patologistas (ROSAI, 1991). Isso ressalta a dificuldade diagnóstica imposta pelas alterações mamárias de CDIS, pois, mesmo com critérios estabelecidos desde 1985, por Page, e, em 1990, por Tavassoli, muitas vezes, o diagnóstico parece ser dúbio, principalmente, entre os casos de HDA e CDIS de baixo grau (PAGE et al., 1985; TAVASSOLI; NORRIS, 1990).

Na Tabela 2, encontram-se os critérios histológicos diferenciais entre HDU, HDA e CDIS.

Tabela 2: Diferenças histológicas entre HDU/HDA/CDIS

Característica histológicas	Hiperplasia ductal usual	Hiperplasia ductal atípica	Carcinoma ductal <i>in situ</i> de baixo grau
Tamanho	Variável, mas raramente extenso, a não ser que associado a outro processo benigno proliferativo.	Usualmente pequeno (<2 - 3 mm), a não ser que associado a outro processo benigno proliferativo.	Raramente menor que 2-3 mm, podendo ser bastante extenso.
Composição celular	Mista: com células epiteliais luminais e células basais fusiformes. Pode apresentar linfócitos e macrófagos. Pode ocorrer hiperplasia da camada mioepitelial.	População celular uniforme, mas com áreas de HDU aparecendo no mesmo espaço ductal. As células basais fusiformes podem se misturar com células proliferativas.	População celular uniforme com monotonia celular. As células basais fusiformes não são vistas. Células mioepiteliais são visíveis ao redor dos ductos, mas podem estar atenuadas.
Arquitetura celular	Variável.	Micropapilar, cribiforme ou padrão sólido.	Micropapilas bem desenvolvidas, cribiforme ou sólido.
Lúmen	Irregular, às vezes com espaços similares a poros periféricos mal definidos, que são úteis para distinção.	Pode ser bem formado com espaços arredondados com padrão cribiforme. Lúmen mal definido pode estar presente.	Bem delimitado com padrão cribiforme.
Orientação celular	Frequente agregado de células com longos eixos de núcleos, arranjados em paralelo à direção das pontes celulares.	Os núcleos celulares estão em ângulo reto às pontes intercelulares com padrão tipo cribiforme, formando estruturas aparentemente rígidas.	Estruturas micropapilares com indiscerníveis cordões fibrovasculares em espaços geométricos bem delimitados. Pontes celulares rígidas, no padrão cribiforme, com núcleos orientados em direção ao espaço luminal.
Espaços nucleares (<i>nuclear spacing</i>)	Nunca.	Podem aparecer ou não.	Sempre.
Característica celular epitelial	Pequenas e ovais, mas com formatos diferentes.	Pequenas ou médias com monotonia celular focal.	Monotonia celular em células pequenas.
Nucléolo	Indistinto.	Único e pequeno.	Único e pequeno.
Mitoses	Infrequentes e usuais.	Infrequentes com raros formatos anormais.	Infrequentes com raros formatos anormais.
Necrose	Rara	Rara	Às vezes presente

Fonte: NHS Cancer Screening Programmes. Pathology reporting of breast disease. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists, 2005.

Nota: Adaptada do NHSBSP 05.

2.5.4 Carcinoma ductal invasor

O carcinoma ductal invasor (CDI) é o tumor maligno mais frequente na mama, representando de 41% a 77% de todos os carcinomas desse sítio (TAVASSOLI; EUSEBI, 2009). Na classificação da OMS, é definido, por exclusão, como aquele que não se enquadra em nenhuma das demais categorias de carcinoma invasor de mama. Tem como termos sinônimos: carcinoma ductal invasor sem outras especificações (SOE) (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). O componente invasor do carcinoma é avaliado, histologicamente, sendo definido como grau I, II e III, considerando-se a formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Quanto maior o grau histológico, menos diferenciado é o tumor e mais agressivo é seu comportamento biológico (ROSEN; OBERMAN, 1993; TAVASSOLI; EUSEBI, 2009) (Figura 11).

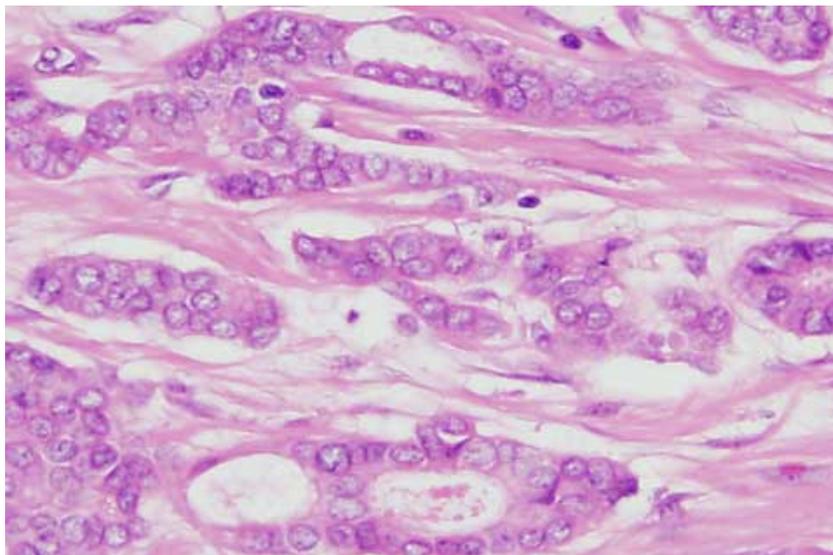


Figura 11: Carcinoma ductal invasor (HE, 200x).

Fonte: Disponível em: <<http://www.breastpathology.info/index.html>> Acesso em: 4 jul. 2008.

Microscopicamente, é formado por células que podem formar ninhos ou infiltrar o estroma isoladamente, havendo maior ou menor diferenciação túbulo-glandular. A morfologia celular também é variável e deve ser analisada em cada caso, podendo haver variação na forma e no tamanho da célula e do núcleo (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

No CDI, a avaliação de fatores prognósticos é fundamental para o planejamento terapêutico. Classicamente, a avaliação dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais importante (ROSEN; OBERMAN, 1993).

2.6 SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CARCINOMA DUCTAL *IN SITU*

A proposta de que a morfologia nuclear de células tumorais poderia ter implicações no seu comportamento biológico foi introduzida por Hanseman em 1890; seus estudos foram o ponto de partida para a concepção de muitos sistemas de gradação de carcinomas. O pesquisador levou em consideração o índice mitótico e a ocorrência de mitoses como importantes características e concluiu que, quanto maior o grau de anaplasia, maior seria a tendência do tumor metastatizar. Broders, em 1940, propôs um sistema de gradação para o câncer de mama. Salomon (1913), estudando a relação entre evolução clínica do câncer de mama e alterações morfológicas, concluiu que o grau de anaplasia tinha importância prognóstica. Posteriormente, outros autores destacaram a importância tanto das alterações citológicas quanto histológicas para prever o comportamento biológico de tumores de mama (STENKVIST et al., 1979).

Por muitos anos, a classificação do CDIS foi tomada, essencialmente, como um exercício acadêmico, uma vez que todas as pacientes, frente a esse diagnóstico, eram tratadas com mastectomia. Com o crescente emprego de tratamento cirúrgico conservador para o CDIS, vários sistemas de classificação com relevância clínica têm sido propostos, a fim de oferecer informações quanto ao risco de recorrência e progressão para carcinoma invasor (SCHNITT; HARRIS; SMITH, 1996).

O método tradicional de classificação do CDIS baseava-se nas características arquiteturais ou no padrão de crescimento e reconhecia, essencialmente, cinco subtipos histológicos: papilar, micropapilar, cribriforme, sólido e comedo (MILLIS, 1996).

Os critérios diagnósticos para algumas dessas cinco categorias não são bem estabelecidos, assim como não são considerados achados potencialmente importantes para prever o comportamento biológico dessas lesões (SCHNITT; HARRIS; SMITH, 1996).

O maior problema em determinar o padrão arquitetural predominante é a falta de reprodutibilidade de seu diagnóstico. Isso se deve, principalmente, à heterogeneidade arquitetural e à presença, em uma mesma lesão, de diferentes padrões arquiteturais. O programa de qualidade do *United Kingdom National External Quality Assessment*, contando com a participação de até 250 patologistas, obteve um baixo índice Kappa de 0,23 para

avaliação do padrão arquitetural predominante de casos de CDIS. Nesse mesmo estudo, a concordância foi melhor para aqueles do tipo comedo ($\kappa = 0,44$) e pior para o padrão tipo misto ($\kappa = 0,06$) (SLOANE; ELLMAN; ANDERSON, et al). Em 1998, onze patologistas avaliaram o grau de reprodutibilidade do padrão arquitetural de 25 casos de CDIS e obtiveram um valor Kappa de 0,44. Avaliados, separadamente, o padrão comedo e o padrão misto registraram concordâncias de Kappa = 0,60 e Kappa = 0,13, respectivamente (BETHWAITE et al., 1998).

Outro estudo, conduzido por Douglas-Jones et al. (1996), também avaliando a concordância diagnóstica de casos de CDIS, teve como resultado 34,4% de discordância para o padrão arquitetural, sendo avaliados 180 casos por dois observadores especialistas em patologia mamária (DOUGLAS-JONES et al., 1996).

No estudo de Salles et al. (2005), foi avaliada a variação interobservador no diagnóstico e graduação histopatológica do CDIS, observando-se baixos índices de concordância em ambos. Os resultados mostraram dificuldade na utilização dos critérios diagnósticos mais empregados na literatura para interpretação dessas lesões, e apontaram a necessidade de treinamento específico dos patologistas não especialistas no diagnóstico dessas lesões (SALLES et al., 2005).

Lagios et al., em 1989, foram os primeiros a sugerir uma relação entre achados histológicos e o risco de recorrência local em pacientes tratados com cirurgia conservadora de mama. Esse estudo foi muito importante, porque o sistema de classificação utilizado fundamenta-se, primariamente, no grau nuclear e necrose, ao invés do padrão arquitetural. Além disso, foi possível estratificar essas lesões em dois grupos: um de alto risco para recorrência local (aqueles com alto grau nuclear) e outro com uma taxa muito baixa de recorrência local (aqueles com baixo grau nuclear) após somente excisão isolada. Vários estudos subsequentes, incluindo ensaios clínicos randomizados, avaliando tanto pacientes submetidos à biópsia excisional, associada ou não à radioterapia, têm evidenciado que lesões com alto grau nuclear, e presença ou não de comedonecrose, estão associadas com maior taxa de recorrência local, se comparadas com lesões privadas dessas características (BADVE et al., 1998; COLLINS, 1997; FISHER et al., 1995; OTTESEN et al., 1992; SCHWARTZ et al., 1992; SOLIN et al., 1996; SNEIGE et al., 1995).

Vários sistemas de classificação histológica têm sido propostos para o CDIS. Essa classificação deve ter significado clínico, auxiliando a melhor compreensão da doença,

escolha terapêutica e definição de prognóstico. De fato, desde a publicação do estudo de Lagios, em 1989, pelo menos seis novas classificações foram sugeridas (HOLLAND et al., 1994; SCHNITT; CONNOLLY, 1997; SCOTT et al., 1997; SILVERSTEIN et al. 1996).

Todos esses sistemas de classificação, propostos a partir de então, consideram primariamente o grau nuclear e a necrose, reservando o padrão arquitetural para um segundo plano ou desconsiderando-o. As classificações diferem quanto à terminologia e critérios empregados em sua composição, porém assemelham-se quanto ao reconhecimento de três subtipos principais de CDIS: alto, intermediário e baixo grau. Estudos têm demonstrado que lesões de alto grau que perdem a expressão de receptores de estrogênio e progesterona têm alta taxa de proliferação celular, exibem aneuploidia e, frequentemente, apresentam angiogênese no estroma adjacente. Por outro lado, lesões de baixo grau são geralmente positivas para receptores de estrogênio e progesterona, têm baixa taxa de proliferação celular e raramente mostram alterações como c-erbB2, p53 ou bcl-2 e angiogênese no estroma adjacente. As lesões classificadas como de grau intermediário dividem as características dos dois grupos precedentes (SCHNITT, CONNOLLY, 1997).

A classificação de Holland (HL), utilizada pelo European Pathologists Working Group, enfatiza primariamente a diferenciação citonuclear, e, secundariamente, a diferenciação arquitetural (polarização celular). Esse sistema classifica CDIS em três grupos: pouco, moderado (intermediário) e bem diferenciado. O termo “comedonecrose” não é empregado como um critério diagnóstico. Necrose é definida como um achado frequentemente associado, que pode se apresentar como necrose central dentro do ducto ou como necrose celular individual e autofagocitose. Outros achados, que costumam ser relatados, são a descrição do padrão de crescimento e do tipo de calcificação. A classificação exclui a observação de tipos raros de CDIS, como apócrino, mucinoso ou anel de sinete, porque é incerto em qual grupo estes tipos especiais deveriam ser incluídos (HOLLAND et al., 1994).

A escala de Van Nuys (VN) valoriza o grau nuclear e a presença ou ausência de necrose tipo comedo. A presença de grau nuclear alto, com ou sem comedonecrose, define o grupo 3. Das lesões remanescentes não alto grau, aquelas com necrose tipo comedo são inseridas no grupo 2, e as sem necrose tipo comedo, no grupo 1. Tipos especiais de CDIS são incluídos nesta classificação (SILVERSTEIN et al., 1996).

O grau nuclear de Black, utilizado principalmente por patologistas norte-americanos na avaliação de neoplasias mamárias, tanto invasoras quanto intraductais, avalia as características nucleares das neoplasias de mama (BLACK et al., 1975; BLACK et al., 1955). Estes autores inicialmente propuseram um sistema de graduação nuclear com cinco graus e, contrariamente à prática comum, os graus foram estabelecidos de maneira inversa; ou seja, graus 0 e 1 designaram tumores pouco diferenciados e graus 3 e 4, tumores bem diferenciados. Esta inversão da ordem numérica contribuiu para a falta de apoio na aplicação dessa metodologia; no entanto, tais autores encontraram alta correlação deste sistema com a sobrevida das pacientes estudadas.

Alguns anos mais tarde, Fisher et al. apresentaram uma proposta de graduação nuclear que reduzia os graus de cinco para três e invertia a ordem numérica estabelecida por Black et al. Eles uniram os graus 0 e 1 dentro do grupo dos tumores bem diferenciados e os graus 3 e 4, no grupo dos tumores pouco diferenciados (FISHER; REDMOND; FISHER et al., 1980). Os autores concluíram que, em carcinomas de mama axila-negativos, o grau nuclear é melhor marcador prognóstico do que o receptor de estrógeno (BLACK et al., 1955). Diante das evidências de que a morfologia nuclear é um indicador prognóstico mais importante do que as alterações arquiteturais no carcinoma de mama, sistemas de graduação baseados puramente em detalhes nucleares foram adaptados para punção aspirativa com agulha fina (PAAF) (CAJULIS et al., 1990; SNEIGE et al., 1999). O sistema de graduação nuclear de Black modificado por Fisher foi utilizado por Cajulis et al., em 1990, para avaliar a concordância cito-histológica na graduação do carcinoma de mama e a aplicabilidade deste método em citologia. No MD Anderson Cancer Center, Universidade do Texas, leva-se em consideração apenas o grau nuclear de Black com a argumentação de se permitir, assim, uma melhor correlação da histologia com a citologia de mama, visto que na avaliação citológica perde-se a arquitetura do tecido.

Várias classificações citoprognósticas têm sido propostas, aplicáveis para preparados citológicos e histológicos (CORNFELD et al., 2004; DUCATMAN et al., 1993; MOROZ et al., 1997). Algumas classificações baseiam-se em critérios exclusivamente nucleares; enquanto outras associam-se também a aspectos arquiteturais (CAJULIS et al. 1994; LOPES et al., 2002).

A Tabela 3 e 4 apresenta os critérios para composição de três classificações para determinar o grau histológico do CDIS e o grau nuclear de Black modificado.

Tabela 3: Sistemas de classificação do CDIS

Sistema	Grau nuclear	Polarização celular	Necrose celular	Grau final
Holland (HL)	• Pouco diferenciado	• Ausente ou focal	N/A	• Pouco diferenciado
	• Moderadamente diferenciado	• Presente, não proeminente		• Moderadamente diferenciado
	• Bem diferenciado	• Proeminente		• Bem diferenciado
Lagios (LA)	• Alto	N/A	• Extensa	• Alto grau
	• Intermediário		• Focal	• Grau intermediário
	• Baixo		• Ausente	• Baixo grau
				• Tipo especial
Van Nuys (VN)	• Alto	N/A	• Presente ou ausente	• Grupo 3
	• Intermediário ou baixo		• Presente (comedo)	• Grupo 2
	• Intermediário ou baixo		• Ausente (comedo)	• Grupo 1
Grau Nuclear de Black Modificado (GNBM)	• Alto	N/A	N/A	• Grau 3
	• Intermediário			• Grau 2
	• Baixo			• Grau 1

Nota: N/A, não avaliável.

Fonte: Adaptado de WENDY, A. et al. Pathologists' Agreement with experts and reproducibility of breast ductal carcinoma *in situ* classification schemes. **Am J Surg Pathol**, v. 24, n.5, p. 651-59, 2000.

Tabela 4: Resumo dos critérios para determinação do grau nuclear de Black modificado

Grau Nuclear de Black Modificado			
	Alto grau	Grau intermediário	Baixo grau
Núcleo	Pleomórfico Anisonucleose Localização irregular Geralmente grandes	Pleomorfismo discreto Localização mista (alguma Variação de forma e tamanho) Contorno sem a monotonia do baixo grau	Grosseiramente esféricos Núcleos monomórficos Localização central Geralmente pequenos
Diâmetro nuclear	Diâmetro de 3 vezes dos núcleos normais	Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais	Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais
Cromatina	Vesicular	Mista	Uniforme
Nucléolo	Um ou mais nucléolos	Infrequente	Ausente
Mitoses	Presentes	Ocasionalmente presente	Raras ou ausentes

Para que uma determinada classificação tenha aplicabilidade, ela deve apresentar boa concordância entre os patologistas (CONSENSUS..., 1997). As definições precisas conduzem a uma observação mais objetiva e restringem o componente subjetivo, proporcionando a redução da variabilidade interobservador (DOUGLAS-JONES et al., 1996).

Um estudo, comparando a reprodutibilidade de dois sistemas de classificação distintos (HL e VN), teve como resultado uma melhor concordância para o esquema de VN ($\kappa = 0,66$ verso $\kappa = 0,57$) (BETHWAITE et al., 1998).

Em outro estudo conduzido por Douglas-Jones et al. (1996), dois patologistas classificaram o componente CDIS, em 180 casos de carcinoma invasor de mama, usando seis diferentes sistemas de classificação. A maior concordância foi obtida pelo sistema de VN (DOUGLAS-JONES et al., 1996). Posteriormente, em outro estudo desse mesmo autor, 19 patologistas avaliaram 60 casos de CDIS reafirmando maior concordância da classificação de VN (DOUGLAS-JONES et al., 2000).

A European Commission Working Group on Breast Screening Pathology apresentou um estudo avaliando cinco sistemas de classificação. A maior concordância interobservador foi obtida com a escala de VN ($\kappa = 0,42$). A classificação de HL, por sua vez, obteve um escore de concordância Kappa de 0,37 (SLOANE et al., 1998).

Três sistemas de classificação – HL, LA, VN – tiveram sua concordância interobservador investigada, em um estudo de Wells, em 2000, no qual, divergindo dos estudos precedentes, verificou-se uma maior concordância para o sistema de HL ($\kappa = 0,46$). LA e VN tiveram escores semelhantes para essa concordância ($\kappa = 0,26$) (WELLS et al., 2000).

O sistema de classificação de CDIS adotado pela OMS, denominado DIN (neoplasia intra-ductal), não foi avaliado por qualquer estudo quanto a sua reprodutibilidade diagnóstica. Sugerem os autores dessa nova nomenclatura que a sua vantagem seria de reduzir o impacto de diferentes termos usados para as mesmas lesões, quando avaliadas por diferentes observadores (CDIS vs HDA) (TAVASSOLI; EUSEBI, 2009).

Um estudo recente de Schuh, em 2010, avaliou a concordância diagnóstica de características histopatológicas para três classificações de CDIS – HL, LA, VN. Nesse estudo, quando avaliado separadamente os critérios para composição dos sistemas de classificação, constatou-se melhor concordância para os critérios de necrose e pleomorfismo nuclear e pior

concordância interobservador para o índice mitótico e presença de nucléolo. Também verificou-se que a classificação de VN foi a mais concordante entre todos os patologistas participantes ($\kappa = 0,37$). Uma análise comparando a concordância entre subgrupos de patologistas, estratificados pelo seu interesse em patologia mamária, evidenciou uma concordância superior entre os profissionais autodenominados especialistas em relação àqueles em treinamento para exercício da anatomia patológica (SCHUH, et al, 2010).

A Tabela 5 resume os achados dos estudos que avaliaram diferentes sistemas de classificação de CDIS.

Tabela 5: Sumário de estudos de avaliação de reprodutibilidade de sistemas de classificação de CDIS

	Casos n	Observadores N	Holland κ	Lagios κ	Van Nuys κ
Sloane, 1998	33	23	0,37	–	0,42
Bethwaite, 1998	25	11	0,57	–	0,66
Sneige, 1999	125	6	–	0,46	–
Wells, 2000	40	7	0,46	0,26	0,26
Douglas-Jones, 2000	60	19	0,47	–	0,58
Schuh, 2010	43	12	0,27	0,34	0,37

κ : índice de Kappa

Para a composição dos sistemas de classificação, é utilizada uma série de características citonucleares, citoarquiteturais e padrões de necrose. Os achados que devem ser documentados para a avaliação do núcleo celular são: pleomorfismo nuclear, diâmetro, presença de nucléolo e padrão da cromatina celular (CONSENSUS..., 1997).

Assim, observam-se variações para cada característica. Descrevem-se núcleos pleomórficos, com anisonucleose e localização irregular, assim como aqueles com pleomorfismo discreto, mostrando alguma variação de forma e tamanho, localização mista. Há, também, núcleos, grosseiramente esféricos, monomórficos e de localização central (CONSENSUS..., 1997) (Figuras 12 e 13).

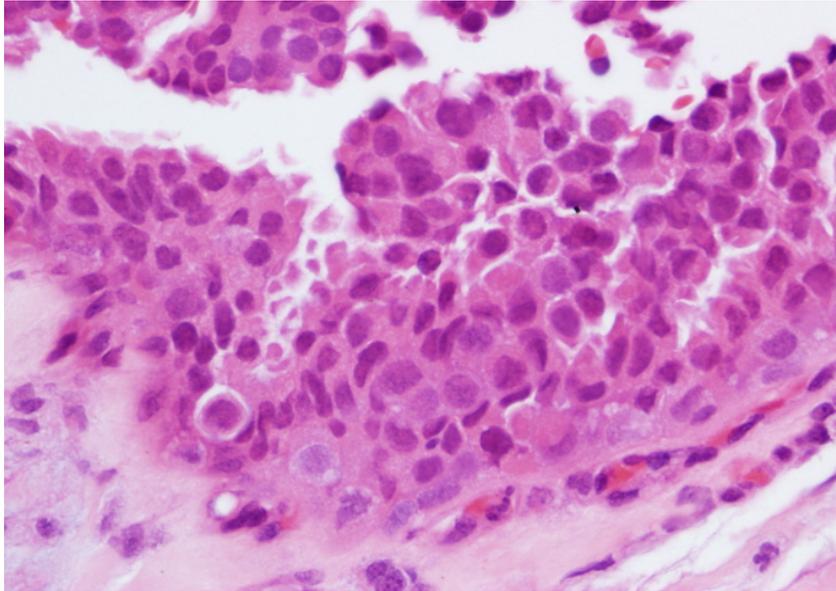


Figura 12: Carcinoma ductal *in situ*: núcleos pleomórficos com variação de forma e tamanho (HE, 400x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

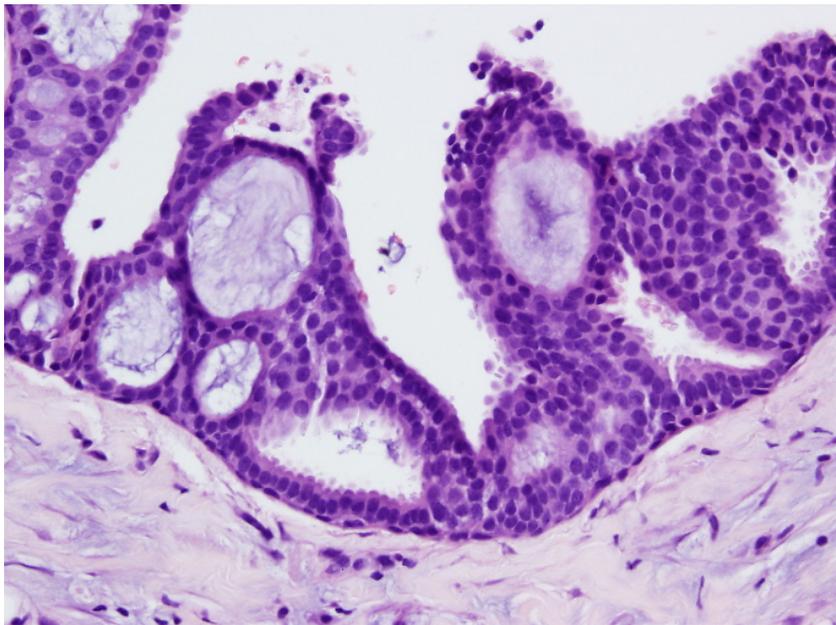


Figura 13: Carcinoma ductal *in situ*: padrão cribriforme núcleos monomórficos com localização central na célula (HE, 400x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

O diâmetro nuclear também pode estar entre os critérios para composição do grau nuclear. Essa característica é descrita comparando o diâmetro de hemácias; os referenciais

são: maior que 2 hemácias, entre 1,5 a 2 hemácias, e menor que 1,5 hemácia (Figura 14). Também é possível utilizar a dimensão dos núcleos de ductos normais como referência, classificando-os de acordo com o tamanho apresentado: núcleos 3 vezes maiores, 2 vezes maiores ou de tamanho semelhante.

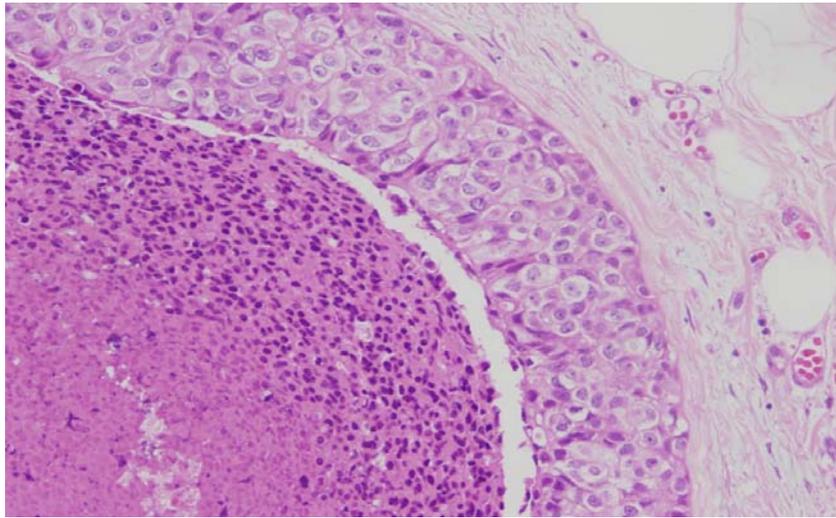


Figura 14: Carcinoma ductal *in situ*: correlação do núcleo com o tamanho da hemácia no campo histológico. (HE, 200x).

Fonte: Caso do autor, 2006.

A cromatina pode apresentar-se como vesicular com granulações, mista ou uniforme. Pode ainda indicar a presença de nucléolos, destacando-os como evidentes, infrequentes ou ausentes (Figuras 15 e 16).

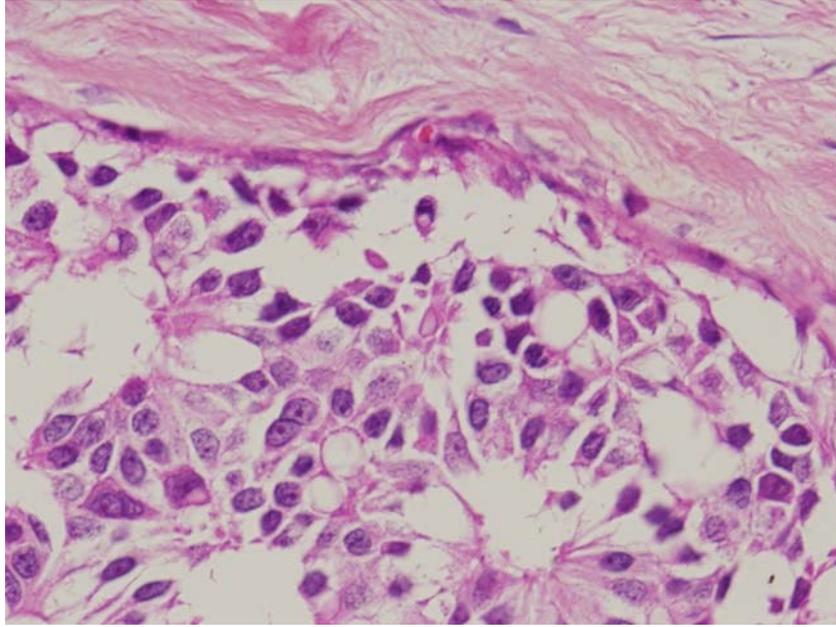


Figura 15: Padrões diferentes de cromatina nuclear em CDIS: vesicular, com nucléolos evidentes e irregulares (HE, 400x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

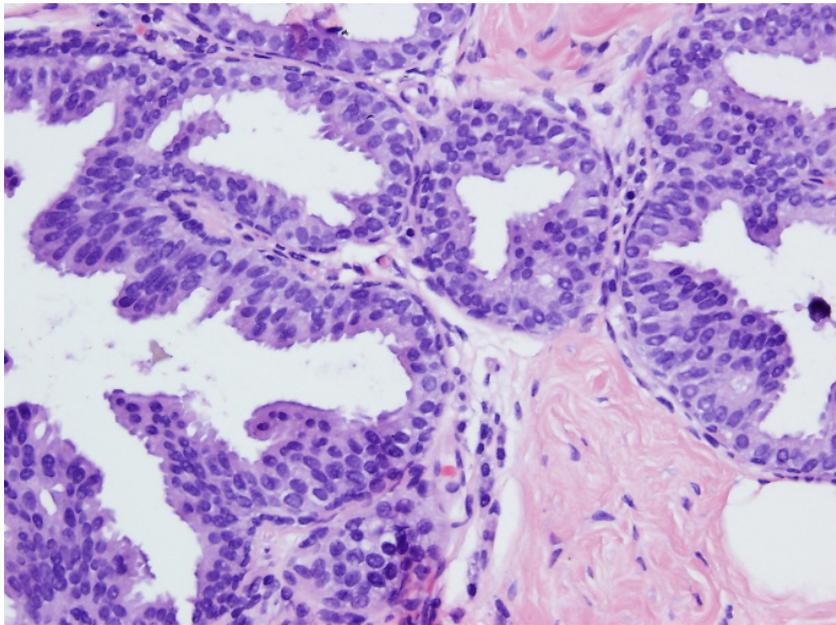


Figura 16: Padrões diferentes da cromatina nuclear em CDIS: padrão mais homogêneo com nucléolos inconspícuos (HE, 200x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

A polarização celular reflete a orientação das células em torno dos espaços intercelulares de aspecto luminal. Pode estar ausente ou apresentar-se como focal, presente e

não proeminente; ou ainda presente e proeminente. (HOLLAND et al., 1994) (Figuras 17 e 18).

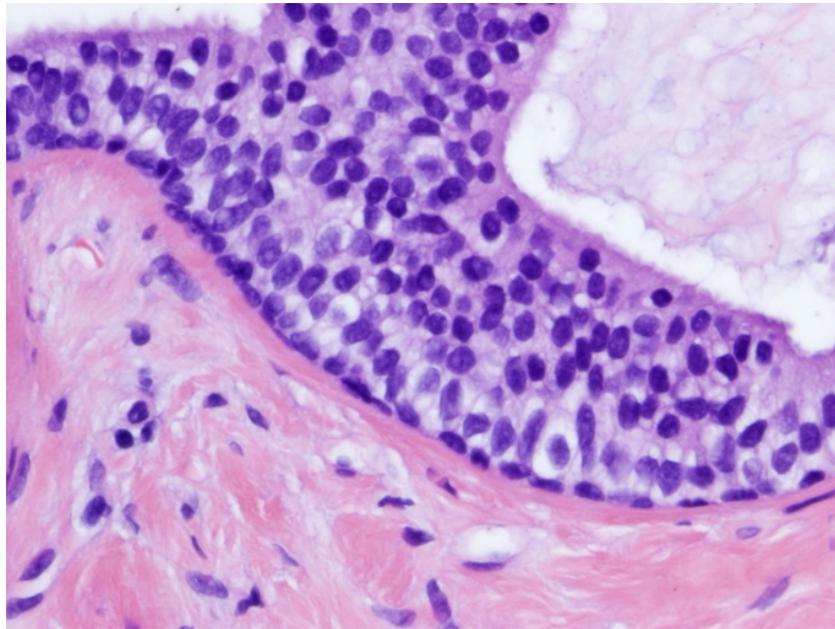


Figura 17: Presença de polarização nuclear em CDIS (HE, 400x).
Fonte: Caso do autor, 2006.

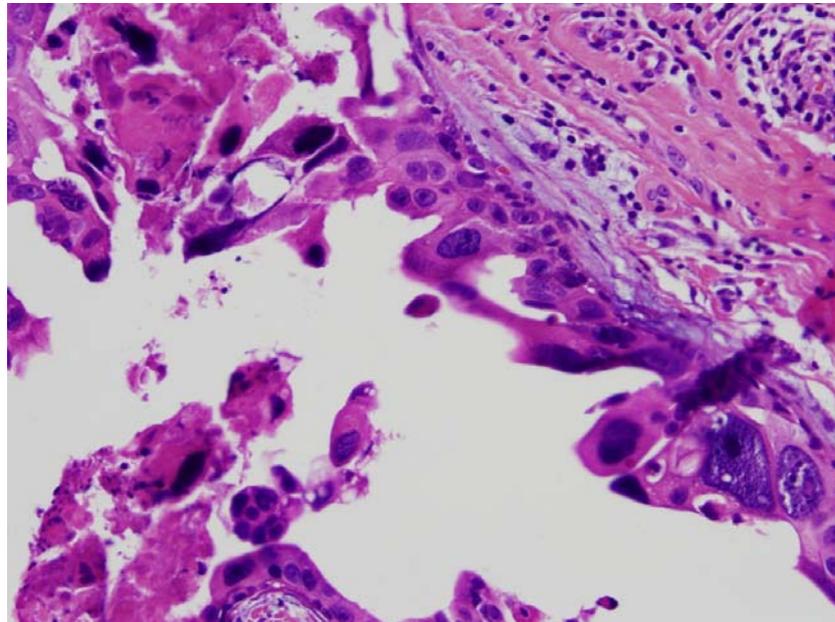


Figura 18: CDIS com ausência de polarização e desorganização nuclear além de intenso pleomorfismo (HE, 400x).
Fonte: Caso do autor, 2006.

A necrose é definida como debris celular eosinofílica, contendo cinco ou mais núcleos picnóticos. As lesões são classificadas em três categorias: necrose ausente, quando nenhum

ducto apresenta necrose; necrose presente, quando se manifesta em qualquer ducto, independentemente do diâmetro de sua extensão; necrose extensa ou comedo, definida quando 50% ou mais de qualquer ducto contém material ou calcificação com evidência de necrose (CONSENSUS..., 1997; SILVERSTEIN et al., 1996) (Figura 19).

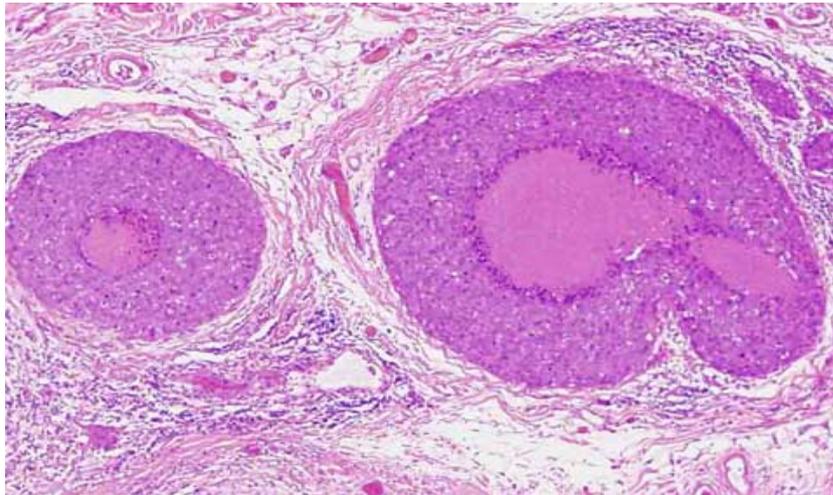


Figura 19: CDIS com evidência de necrose dentro da luz (HE, 100x).

Fonte: Casos do autor, 2006.

A contagem do número de figuras mitóticas ou do Índice Mitótico (IM) é um dos primeiros métodos utilizados para avaliar a proliferação celular. A contagem mitótica tem sido utilizada na avaliação histológica, principalmente no diagnóstico de tumores, desde a introdução da microscopia. A fácil utilização e a necessidade de apenas um microscópio e de uma boa coloração com hematoxilina-eosina fazem com que este método seja utilizado com frequência (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998).

O IM depende do número de mitoses por dez campos de grande aumento. Sendo o grande aumento variável entre os microscópios, é necessário verificar o diâmetro do campo de grande aumento e correlacionar com tabelas para que se possa calcular o índice mitótico de forma adequada (NHS Cancer..., 2005) (Figura 20).

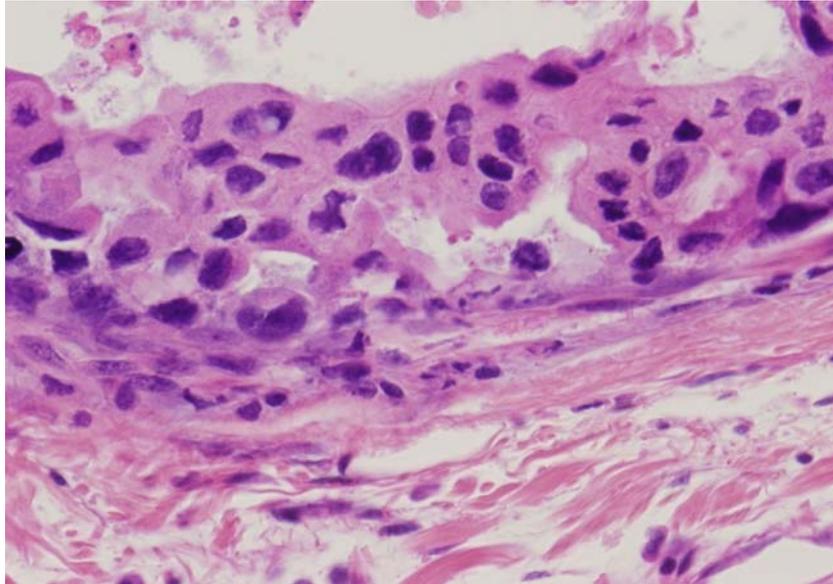


Figura 20: CDIS com campo de grande aumento mostrando numerosas atipias e mitoses (HE, 400x).
Fonte: Casos do autor, 2006.

Alguns estudos levam em consideração o número de mitoses por unidade de medida (como cinco mitoses por mm^2) e outros, pelo número de mitoses em relação ao número total de células em determinado volume tumoral (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). De modo geral, descreve-se a presença ou não de mitoses, observando a microscopia em campo de grande aumento. Quando presentes, quantificam-se como frequentes, se houver mais de 20 mitoses por 10 campos; ocasionais, entre 10 e 20 mitoses por 10 campos; e infrequentes, quando houver menos de 10 mitoses por 10 campos.

Crítérios bem definidos devem ser utilizados para definir uma mitose. Essas se apresentam como pontos escuros dos cromossomos, que podem ser reconhecidos pela presença de extensões filamentosas. Para tanto é necessário focalizá-las, para cima e para baixo, no micrômetro, quando o envelope está ausente e o citoplasma está mais basofílico do que eosinofílico (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). Os cromossomos podem estar com a configuração de metáfase, anáfase ou telófase.

Uma classificação ideal para o CDIS deveria, em primeiro lugar, ser útil clinicamente, correlacionando o grau com a taxa de recorrência local e a progressão para carcinoma invasivo. Em segundo lugar, deveria apresentar definições precisas e inequívocas dos termos usados e ser aplicável a todos os diferentes tipos e manifestações do CDIS. Deveria ser simples e de fácil aplicação, mesmo quando apenas um pequeno número de ductos

comprometidos por CDIS está disponível. Por fim, deveria apresentar uma alta taxa de concordância entre os patologistas.

2.7 QUESTIONÁRIO INFORMATIZADO PARA DIAGNÓSTICO DE GRADUAÇÃO PATOLÓGICA DE CARCINOMA DUCTAL *IN SITU* DE MAMA

A avaliação histológica das alterações proliferativas mamárias decorre de uma interpretação subjetiva dos patologistas, podendo apresentar variações intra e interobservadores (GHOFRANI; TAPIA; TAVASSOLI, 2006).

A criação de um questionário informatizado, como ferramenta de auxílio na determinação do grau tumoral do CDIS, pode ajudar a diminuir a variação das interpretações. Não se encontra na literatura nenhum estudo que tenha desenvolvido semelhante sistema informatizado para obtenção da graduação de casos de CDIS, através de diferentes escalas de classificação.

Um instrumento de coleta de dados foi desenvolvido para evidenciar os elementos mais importantes de cada sistema de classificação, a fim de permitir a comparação das respostas dos participantes. Dessa forma será possível determinar a concordância intra e interobservador. Criou-se um *software* no formato de *Web Site* (www.mayer.art.br/cainsitu/site3), que oferece um questionário eletrônico contendo as características utilizadas para a composição de quatro sistemas de classificação de CDIS (Anexo A), assim como as imagens digitalizadas da microscopia dos casos. Todos os patologistas avaliaram os casos de CDIS por meio de um questionário padrão disponível no site.

A página inicial do site apresenta o projeto de pesquisa e permite ao patologista convidado a conhecer os diferentes sistemas de classificação do CDIS (figura 21). Para acessar o site, os participantes receberam um nome de usuário e senha (figura 22). Feito o *login*, a próxima página consiste em um consentimento que esclarece a participação do visitante na pesquisa e informa o compromisso dos pesquisadores em utilizar os dados

coletados apenas com o propósito do estudo (figura 23). Concordando em participar, abre-se a página seguinte, onde encontra-se um pequeno questionário de dados demográficos: idade, tempo de atuação como patologista, nível de graduação, interesse por patologia mamária, sistema de classificação de CDIS utilizado em sua prática clínica (figura 24). Respondido este questionário, inicia-se a apresentação dos casos junto com o questionário padronizado, contendo as características para composição dos escores dos sistemas de classificação do estudo (figura 25). Durante a visualização dos casos, se necessário, é possível ampliar imagens para uma melhor avaliação dos critérios solicitados (figura 26). Ao final da análise de cada caso, o próprio programa, a partir da avaliação dos dados obtidos através de um sistema de pontos (Anexo B), informa a graduação histológica obtida para os três sistemas de classificação (figura 27). Os critérios também estão disponíveis no site para consulta, bem como as referências bibliográficas das classificações analisadas.



Figura 21: Site: página inicial.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>

Acesso em: 10. jan. 2011.



Figura 22: Site: login.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>

Acesso em: 10. jan. 2011.



Figura 23: Site: consentimento informado.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>

Acesso em: 10. jan. 2011.

Projeto de Pesquisa - Fernando Schuh

Grau de concordância diagnóstica entre patologistas na avaliação de sistemas de classificação do carcinoma ductal "in situ" de mama
Interobserver Reproducibility of Breast Ductal Carcinoma in Situ Classification Schemes

Leia mais sobre o Trabalho - [Read more about this Work](#)

Change Password Logout

Dados demográficos dos patologistas participantes

Dados Pessoais

Cidade / País de Origem:

Idade:
 20-30 anos
 31-40 anos
 41-50 anos
 51-60 anos
 mais de 60 anos

Tempo de Exercício de Patologia:
 0-3 anos
 4-6 anos
 7-15 anos
 mais de 15 anos

Posição Profissional:
 Médico residente de patologia 1º ano
 Médico residente de patologia 2º ano
 Médico residente de patologia 3º ano

Figura 24: Site: dados demográficos.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>
 Acesso em: 10. jan. 2011.

Projeto de Pesquisa - Fernando Schuh

Grau de concordância diagnóstica entre patologistas na avaliação de sistemas de classificação do carcinoma ductal "in situ" de mama
Interobserver Reproducibility of Breast Ductal Carcinoma in Situ Classification Schemes

Leia mais sobre o Trabalho - [Read more about this Work](#)

Change Password Logout

Marque as características presentes no caso apresentado:

Núcleo:

Pleomórfico, anisonucleose, localização irregular, geralmente grandes

Pleomorfismo discreto, localização mista (Alguma variação de forma e tamanho) contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau

Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos

Diâmetro do Nucleo:

Diâmetro > 2 hemácias

Diâmetro 1,5 - 2 hemácias

Diâmetro de 1-1,5 hemácias

Cromatina:

Cromatina vesicular

Cromatina mista

Cromatina uniforme

Clique nas imagens para ampliá-las

Figura 25: Site: questionário eletrônico.

Fonte: Disponível em: <<http://www.cainsitu3.mayer.art.br>> Acesso em: 10. jan. 2011.

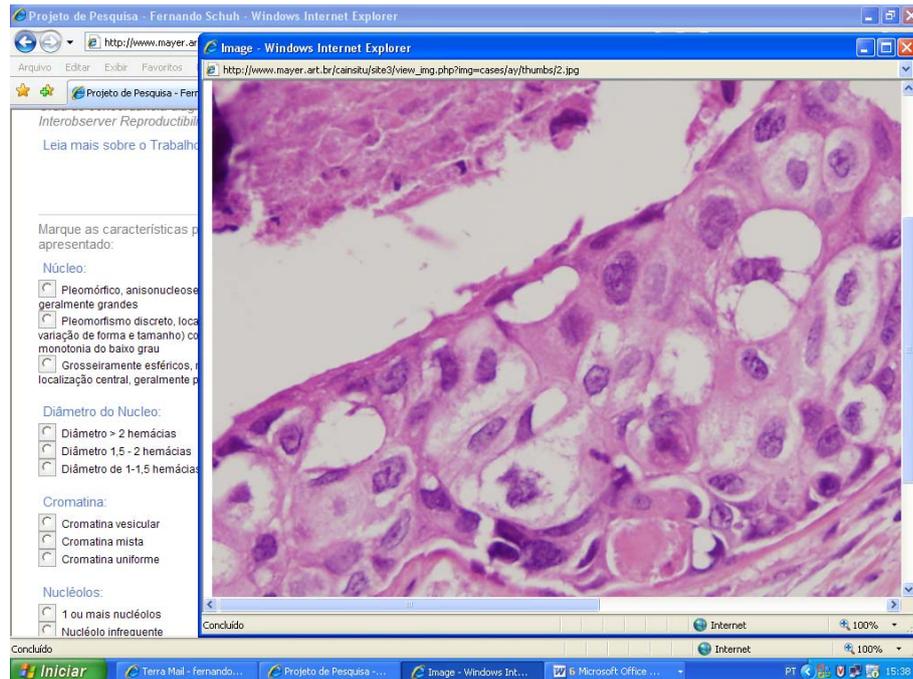


Figura 26: Site: magnificação das fotos digitalizadas.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>

Acesso em: 10. jan. 2011.

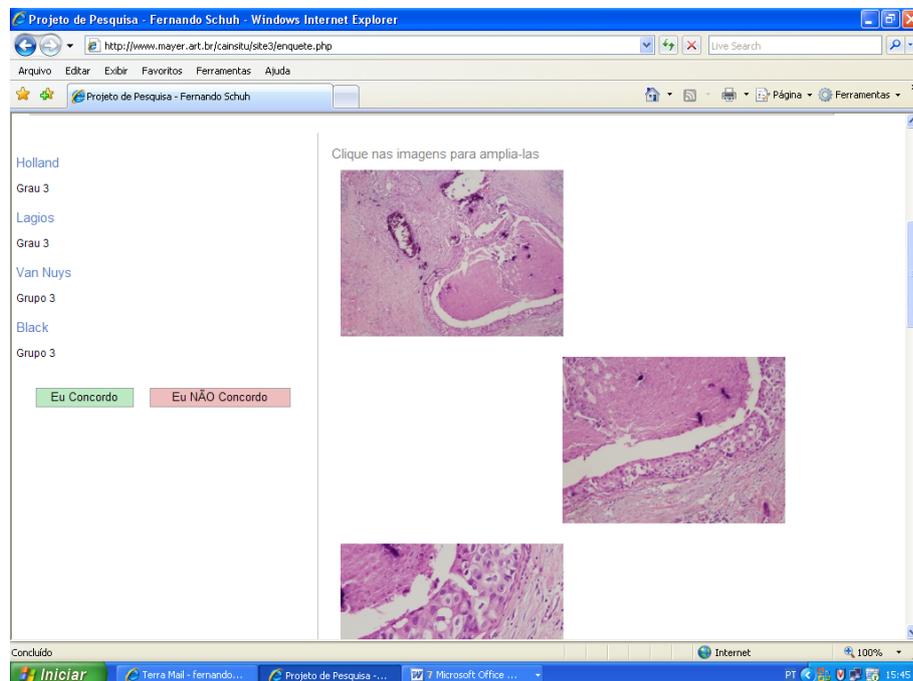


Figura 27: Site: resultado das classificações estudadas.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>>

Acesso em: 10. jan. 2011.

Em um segundo momento, após um período superior a seis meses da primeira avaliação, três patologistas autodenominados especialistas em patologia mamária, dentre aqueles que finalizaram o preenchimento do questionário, foram novamente alocados para classificar os mesmos casos de CDIS. Nessa fase, os patologistas tiveram de acessar um novo endereço eletrônico (<http://mayer.art.br/cainsitu/site2>), que apresentou os mesmos casos e solicitou que esses fossem classificados de acordo com um dos sistemas apresentados (figura 28). Neste momento, porém, o diagnóstico final foi dado pelo patologista sem auxílio do questionário inicial contendo os critérios ou sistema de pontos para definir o diagnóstico. Cada patologista foi responsável por uma determinada classificação.

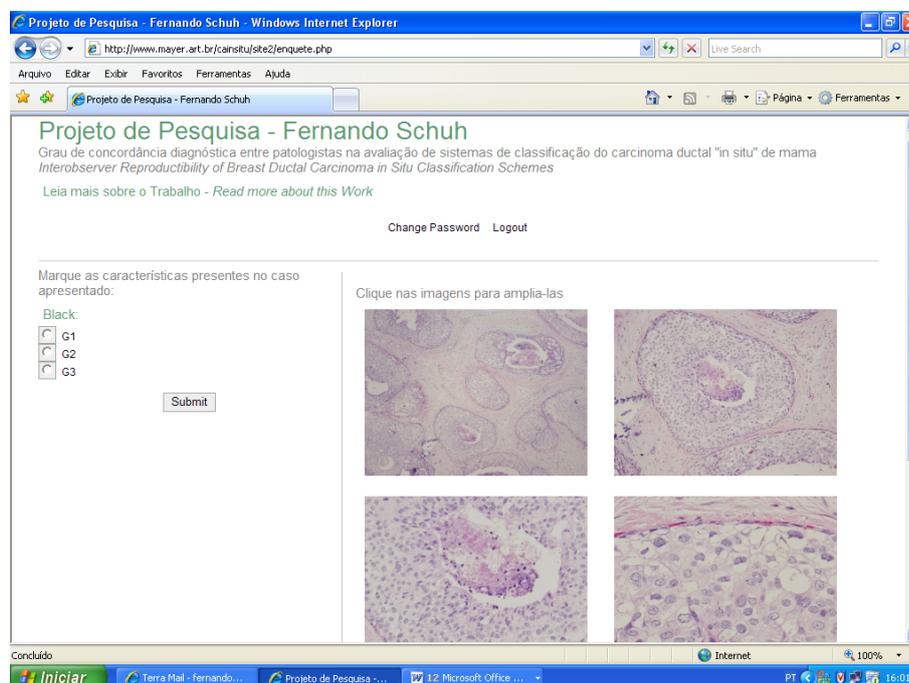


Figura 28: Site: releitura subjetiva.

Fonte: Disponível em: <<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site2>>

Acesso em: 10. jan. 2011.

3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo está de acordo ética e metodologicamente com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde). Os autores da presente pesquisa se comprometeram a manter sigilo dos dados coletados em prontuários e bases de dados referentes aos pacientes e aos relatórios elaborados pelos patologistas envolvidos no estudo. As informações foram utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se o anonimato dos pacientes.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o número 10-247.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

4.1.1. Determinar o grau de concordância entre o diagnóstico obtido através de um questionário eletrônico com um sistema de pontos desenvolvidos para este estudo (*web-based survey*) e o diagnóstico feito por patologistas, em sua prática clínica, a partir de imagens digitalizadas da microscopia de casos de CDIS de mama, segundo as classificações de Holland, Van Nuys e grau nuclear de Black modificado.

4.1.2. Determinar a concordância diagnóstica entre patologistas para os sistemas de graduação histológica de Holland e Black modificado de casos de DCIS de mama utilizando esse *web-based survey*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar a reprodutibilidade diagnóstica do questionário eletrônico e sistema de pontos disponíveis em um website para três diferentes classificações de CDIS, comparando resultados intraobservadores;

4.2.2. Avaliar a concordância interobservador de sistemas de classificação de CDIS de mama (Holland e grau nuclear de Black modificado) através de um questionário eletrônico e de um sistema de pontos desenvolvidos para este estudo;

4.2.3. Identificar, dentre os sistemas em estudo, aquele que apresenta maior acurácia diagnóstica.

**5 REFERÊNCIAS DA
REVISÃO DE LITERATURA**

ALLRED, D.C. et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of *in situ* to invasive breast cancer. **Hum Pathol**, n. 23, p. 974-9, 1992

AUBELE, M.M. et al. Accumulation of chromosomal imbalances from intraductal proliferative lesions to adjacent *in situ* and invasive ductal breast cancer. **Diagn Mol Pathol**, n. 9, p. 14-19, 2000.

BADVE, S. et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma *in situ* of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. **Hum Pathol**, n. 29, p. 915-23, 1998.

BANKFALVI, A. et al. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. **Mod Pathol**, v.17, n. 9, p. 1051-61, 2004.

BERRY DA, CRONIN KA, PLEVRITIS SK, et al.: Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N Engl J Med**, 353 (17): 1784-92, 2005.

BETHWAITE, P. et al. Reproducibility of a new classification schemes for pathology of ductal carcinoma *in situ* of the breast. **J Clin Pathol**, n. 51, p. 450-454, 1998.

BLACK, M.M. et al. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. **Cancer**, n. 36, p. 2048-55, 1975.

BLACK M.M, OPLER SR, SPEER FD. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. **Surgery Gynecology & Obstetrics**, n. 100, p. 543-51, 1955.

BOCKER, W. et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Lab Invest**, v. 82, n. 6, p. 737-46, 2002.

BURSTEIN, H.J. et al. Ductal carcinoma *in situ* of the breast. **N Engl J Med**, n. 350, p. 1430-41, 2004.

CAJULIS, R.; SNEIGE, N. et al. Cytologic nuclear grading of fine needle aspirates of breast carcinoma: concordance with corresponding histologic grading and flow cytometric data. **Mod Pathol**, n. 3, p. 14A, 1990.

CAJULIS, RS.; HESSEL, RG. et al. Simplified nuclear grading of fine-needle aspirates of breast carcinoma: concordance with corresponding histologic nuclear grading and flow cytometric data. **Diagn Cytopathol**, n. 11, p. 124-30, 1994.

COLLINS, L. et al: Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) treated with excision alone: Predictors of local recurrence. **Mod Pathol**, n. 10, p. 17, 1997 [abstr].

CONSENSUS CONFERENCE ON THE CLASSIFICATION OF DUCTAL CARCINOMA *IN SITU*. **Hum Pathol**, v. 28, n. 11, p. 1221-5, 1997.

CORNFELD, D.B. et al. The prognostic significance of multiple morphologic features and biologic markers in ductal carcinoma *in situ* of the breast: a study of a large cohort of patients treated with surgery alone. **Cancer**, n. 100, p. 2317-27, 2004.

DOUGLAS-JONES, A.G. et al. A critical appraisal of six modern classifications of ductal carcinoma *in situ* of the breast (DCIS): correlation with grade of associate invasive carcinoma. **Histopathology**, v. 29, n. 5, p. 397-409, Nov. 1996.

DOUGLAS-JONES, A.G. et al. Consistency in the observation of feature used to classify duct carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast. **J Clin Pathol**, n. 53, p. 596-602, 2000.

DUCATMAN, BS. et al. Correlation of histologic grade of breast carcinoma with cytologic features on fine-needle aspiration of the breast. **Mod Pathol**, n. 6, p. 539-43, 1993.

DUPONT, W.D.; PAGE, D.L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **N Engl J Med**, v. 312, n. 3, p. 146-51, 1985.

ELLIS, I.O. et al. Ductal carcinoma *in situ*. In: ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. **The Breast**. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 249-82, 1998.

ERNSTER, V.L. et al. Incidence of and treatment for ductal carcinoma *in situ* of the breast. **JAMA**, n. 275, p. 903-18, 1996.

ERNSTER VL, BARCLAY J, KERLIKOWSKE K, et al.: Mortality among women with ductal carcinoma *in situ* of the breast in the population-based surveillance, epidemiology and end results program. **Arch Intern Med**, 160 (7): 953-8, 2000.

EUSEBI, V., FOSCHINI, L., ERDE, S., ROSAI, J., Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. **Hum Pathol**, 28:13-16, 1997.

EYSENBACH G. Improving the quality of web surveys: the checklist for reporting results of internet e-surveys (CHERRIES). **J Med Internet Res**, 6(3): e34, 2004.

EYSENBACH G, WYATT J. Using the internet for surveys and health research. **J Med Internet Res**, 4(2): e13, 2002.

FARABEGOLI, F. et al. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma *in situ*. **J Pathol**, n. 196, p. 280-6, 2002.

FISHER, E.R. et al: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) protocol B-17: Intraductal carcinoma (ductal carcinoma *in situ*). **Cancer**, n.75, p. 1310-19, 1995.

FISHER B, DIGNAM J, WOLMARK N, et al.: Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. **J Clin Oncol**, 16 (2): 441-52, 1998.

FISHER, ER.; REDMOND, C.; FISHER, B. Histologic grading of breast cancer. **Pathol Annu**, n. 15, p. 239-51, 1980.

FURNESS P. A randomized controlled trial of the diagnostic accuracy of internet-based telepathology compared with conventional microscopy. **Histopathology**, Jan; 50(2): 266-73, 2007.

GHOFRANI, M.; TAPIA, B; TAVASSOLI, F.A. Discrepancies in the diagnosis of intraductal proliferative lesions of the breast and its management implications: results of a multinational survey. **Virchows Arch**, v. 449. n. 6, p. 609-616, 2006.

GOLDHIRSCH, A. et al. Meeting highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. **Annals of Oncology**, n. 16, p. 1569-83, 2005.

GUPTA, P.B.; KUPERWASSER, C. Disease models of the breast. **Drug Discovery Today: Disease Models**, n. 1, p. 9-16, 2004.

HARRIS, J.R. et al. **Diseases of the Breast**. 4 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2010.

HOLLAND, R. et al. Carcinoma *in situ*: A proposal for a new classification. **Semin Diagn Pathol**, n. 11, p. 167-170, 1994.

INCA. Instituto Nacional do Câncer, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> . Acesso em: 09.nov.2010 [Ref Type: Electronic citation]

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I.J. Histologic classification of ductal carcinoma in situ. **Microsc Res Tech**, n. 59, p. 92-101, 2002.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, MURRAY T, et al. Cancer Statistics, **Cancer J Clin**, 58(2): 71-96, 2008.

KUNDEL H.L., POLANSKY M. Measurement of Observer Agreement. **Radiol**, 228;303-308, 2003.

LAGIOS, M. D. et al. Mammographically detected duct carcinoma *in situ*: frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. **Cancer**, n. 77, p. 2267-74, 1996.

LANDIS JR, KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n. 33, p. 159-74, 1977.

LI X, LIU J, XU H, GONG E, MCNUTT MA, LI F, ET AL. A feasibility study of virtual slides in surgical pathology in China. **Hum Pathol**, Dec; 38(12): 1842-8, 2007.

LOPES, M.C. et al. Gradação nuclear do carcinoma invasivo de ductos mamários em punção aspirativa por agulha fina: estudo comparativo com grau histológico e avaliação da concordância intra e interobservador. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 12, n. 1, p. 13-16, 2002.

MACDONALD, M. **Criação de Sites: O Manual que Faltava**. 1 ed. Universo dos Livros, 2010.

MIETTINEN, M. et al. Estrogen metabolism as a regulator of estrogen action in the mammary gland. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 5, n. 3, p.259-70, 2000.

MILLIS, R.R. Classification of ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Adv Anat Pathol**, n. 3, p. 114-29, 1996.

MOROZ, K. et al. Cytologic nuclear grade of malignant breast aspirates as a predictor of histologic grade: light microscopy and image analysis characteristics. **Acta Cytol**, n. 41, p. 1107-11, 1997.

NCI. National Cancer Institute, 2008. Disponível em: <<http://www.cancer.gov>> Acesso em: 09. nov.2010. [Ref Type: Electronic citation]

NHS Cancer Screening Programmes. Pathology reporting of breast disease. **NHS Cancer Screening Programmes Jointly with the Royal College of Pathologists**, 2005.

O'CONNELL, P. et al. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. **J Natl Cancer Inst**, n. 90, p. 697-703, 1998.

OTTESEN, G.L. et al: Ductal carcinoma *in situ* of the female breast. Short-term results of a prospective nationwide study. **Am J Surg Pathol**, n. 16, p. 1183-96, 1992.

PAGE, D.L. et al. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. **Cancer**, v. 55, n. 11, p. 2698-708, 1985.

PAGE, D.L.; ANDERSON, T.J. Diagnostic Histopathology of the Breast. **Churchill Livingstone**, p. 120-92, 1987.

PAGE DL, DUPONT WD, ROGERS LW, et al.: Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy. **Cancer**, 76 (7): 1197-200, 1995.

PRITT BS, GIBSON PC, COOPER K. Digital imaging guidelines for pathology: A proposal for general and academic use. **Adv Anat Pathol**, 10: 96-100, 2003.

RADFORD, D.M. et al. Allelic loss and the progression of breast cancer. **Cancer Res**, n. 55, p. 5180-3, 1995. [Erratum, **Cancer Res**, n. 56, p. 935, 1996].

ROSAI J. Borderline epithelial lesions of the breast. **Am J Surg Pathol**, v. 15, n. 3, p. 209-21, 1991.

ROSEN, P.P. **Rosen's Breast Pathology**. 3 ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2009.

ROSEN, P.P.; OBERMAN, H. Tumours of the mammary gland. In: **Atlas of tumour pathology**. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1993.

ROSNER D, BEDWANI RN, VANA J, et al. Non-invasive breast carcinoma: Results of a national survey by the American College of Surgeons. **Ann Surg**, 192: 139-147, 1980.

RUDAS, M. et al. Protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular *in situ* carcinomas of the breast. **Eur J Cancer**, n. 33, p. 39-44, 1997.

SALLES, M.A. et al. Análise interobservador no diagnóstico histopatológico do carcinoma ductal *in situ* da mama. **Rev Brasil Ginecol Obstet**, n. 27, p. 1-6, 2005.

SALLES, M.A. et al. Abordagem atual do carcinoma ductal *in situ* da mama. **Femina**, n. 35, p. 19-27, 2007.

SCHLEYER T.K.L, FORREST J.L. Methods for the design and Administration of web-based surveys. **J Am Med Inform Assoc**, 7: 416–425, 2000.

SCHNITT, S.J.; CONNOLLY, J.L. Classification of ductal carcinoma *in situ*: striving for clinical relevance in the era of breast conserving therapy. **Hum Pathol**, n. 28, p. 877-80, 1997.

SCHNITT, S.J.; HARRIS, J.R.; SMITH, B.L. Developing a prognostic index for ductal carcinoma *in situ* of the breast *Are We There Yet?* **Cancer**, n. 11, p. 2189-92, 1996.

SCHUH, F.; BIAZÚS, J.V.; RESETKOVA, E.; BENFICA, C.Z.; EDELWEISS, M.I.A. Reproducibility of three classification systems of ductal carcinoma *in situ* of the breast using a web-based survey. **Pathol Res and Pract**, n. 206, p. 705–711, 2010.

SCHWARTZ, G.F. et al. Subclinical ductal carcinoma *in situ* of the breast. Treatment by local excision and surveillance alone. **Cancer**, v. 70, p. 2468-74, 1992.

SCOTT, M.A. et al. Ductal Carcinoma *in situ* of the Breast: Reproducibility of Histological Subtype Analysis. **Hum Pathol**, n. 28, p. 967-73, 1997.

SHAABAN, A.M. et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. **Am J Pathol**, v. 160, n. 2, p. 597-604, 2002.

SILVERSTEIN, M.J. et al. A prognostic index for Ductal carcinoma *in situ*. **Cancer**, n. 77, p. 2267-74, 1996.

SILVERSTEIN MJ. et al. The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. **Am J Surg**, 186 (4): 337-43, 2003.

SLOANE, J.P.; ELLMAN, R.; ANDERSON, T.J. et al. Consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening: findings of the U.K. National External Quality Assessment (EQA) Scheme. U. K. National Coordinating Group for Breast Screening Pathology. **Eur J Cancer**, 30A:1414-9, 1994.

SLOANE, J.P. et al. Consistency achieved by 23 European pathologists in categorizing ductal carcinoma *in situ* of the breast using five classifications. **Hum Pathology**, v. 29, n. 10, p. 1056-62, Oct. 1998.

SNEIGE et al. Ductal carcinoma *in situ* treated with lumpectomy and irradiation: Histopathological analysis of 49 specimens with emphasis on risk factors and long term results. **Hum Pathol**, n. 26, p. 642-49, 1995.

SNEIGE, N.; LAGIOS, M.D.; SCHWARTING, R. et al. Interobserver reproducibility of the Lagios nuclear grading system for ductal carcinoma in situ. **Hum Pathol**, n. 30, p. 257-62, 1999.

SOLIN, L.J. et al: Fifteen-year results of breast-conserving surgery and definitive breast irradiation for the treatment of ductal carcinoma *in situ* of the breast. **J Clin Oncol**, n. 14, p. 754-63, 1996.

STENKVIST B, WESTMAN-NAESER S, VEGELIUS J, et al. Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma. **J Clin Pathol**, 32: 979-985, 1979.

STOLL, B.A. Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer. **Eur J Cancer**, 35(5): 693-697, 1999.

STRATTON, M.R. et al. Loss of heterozygosity in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **J Pathol**, n. 175, p. 195-201, 1995.

TAFURI, L.S. et al. Cell cycle related proteins in hyperplasia of usual type in breast specimens of patients with and without breast cancer. **BMC Cell Biol**, n. 7, p. 29, 2006.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. **World Health Organization classification of tumours**. Lyon: Iarc Press, 2003.

TAVASSOLI, F.A.; EUSEBI, V. Tumours of the mammary gland. In: **Atlas of tumour pathology**. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 2009.

TAVASSOLI, F.A.; NORRIS, H.J. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. **Cancer**, v. 65, n.3, p. 518-29, 1990.

TIEZZI DG. **Epidemiologia do câncer de mama**. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 31(5): 213-5, 2009.

VAN DIEST, P.J.; BRUGAL, G.; BAAK, J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J Clin Pathol**, v. 51, p. 10,716-24, 1998.

VIRNIG BA; TUTTLE TM; SHAMLIYAN T; KANE RL. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. **J Natl Cancer Inst**, Feb 3;102(3): 170-8, 2010.

WEINSTEIN R.S., et al. Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. **Human Pathology**, 40, 1057–1069, 2009.

WELLS, W.A. et al. Pathologists' agreement with experts and reproducibility of breast ductal carcinoma in situ classification schemes. **Am J Surg Pathol**, n. 24, p. 651-9, 2000.

ZITO FA, VERDERIO P, SIMONE G, ANGIONE V, APICELLA P, BIANCHI S, et al. Reproducibility in the diagnosis of needle core biopsies of non-palpable breast lesions: An international study using virtual slides published on the world-wide web. **Histopathology**, 56(6): 720-6, 2010.

Sites:

- <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST020.jpg>
- <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST027.jpg>
- <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg3/BREST021.jpg>
- <http://mammary.nih.gov/reviews/tumorigenesis/Fischer001/originals/8F.jpg>
- <http://www.breastpathology.info/index.html>
- <http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>
- <http://www.mayer.art.br/cainsitu/site2>

6 ARTIGO 1 EM INGLÊS

HISTOPATHOLOGICAL GRADING OF BREAST DUCTAL CARCINOMA *IN SITU*: VALIDATION OF A WEB-BASED SURVEY THROUGH INTRAOBSERVER REPRODUCIBILITY ANALYSIS

Fernando Schuh¹, Jorge Villanova Biazús², Erika Resetkova³, Camila Zanella Benfica¹, Alessandra de Freitas Ventura⁴, Diego Uchoa⁵, Márcia Graudenz^{1,5}, Maria Isabel Albano Edelweiss^{1,5}

Faculdade de Medicina - Programa de Pós-graduação: Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹ Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

² Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil

³ Departamento de Patologia MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, EUA

⁴ Breast surgeon, Hospital São Cristóvão, São Paulo, Brazil

⁵ Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil

Corresponding author at:

Rua Duque de Caxias 1191/304, Porto Alegre, Brazil.

Tel: +55 51 3234 6137.

e-mail: fernandoschuh@hotmail.com (F.Schuh).

ABSTRACT

Introduction: Histopathological grading diagnosis of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) may be very difficult, even if done by experts. The challenge may be due to the inaccurate and/or subjective application of the diagnosis criteria. This study aims to develop a method of systematic application of diagnostic criteria for composition of the histological grade of DCIS lesions, through a questionnaire available in a website, and to determinate its reliability and applicability in clinical practice.

Material and methods: The most important criteria to grade DCIS lesions in histopathological bases were selected to compose the point scoring system according to their relevance to three different DCIS classifications. A software was created in order to be accessed through Internet, in website format (<http://mayer.art.br/cainsitu/site3>). This website offers a questionnaire containing the characteristics used to compose the three DCIS classification systems in our study, and also the digitized microscopy images of 43 DCIS cases selected. Three pathologists, who are specialists in breast pathology, analyzed the same set of digitized images in this web-based survey. In the first phase, they answered a questionnaire with the characteristics used to compose the modified Black nuclear grade system and the classification systems of Holland and Van Nuys. After at least 6 months, the pathologists read again the same images, but without the help of the questionnaire, indicating subjectively the diagnoses, using the grading system of their daily practice. The intraobserver agreement analysis was employed to validate this innovative web-based survey.

Results: Overall, diagnostic reproducibility was similar for all systems of histologic grading classification, with kappa values of 0.57 ± 0.10 , 0.67 ± 0.09 and 0.67 ± 0.09 for Holland, Van Nuys classification and modified Black nuclear grade system respectively.

Conclusion: The intraobserver diagnostic reproducibility of DCIS with the use of digital images in a web-based survey compared to subjective analysis with the use of a point scoring system is moderate to good for Holland, Van Nuys and modified Black nuclear grade system. The use of scoring point system does not appear to pose a major risk of presenting large (2-step) diagnostic disagreements. These findings indicate that the use of this point scoring system in this web-based survey to grade objectively DCIS lesions is a promising, useful and a reliable diagnostic tool.

Keywords: Classification, ductal carcinoma *in situ*, scoring system, intraobserver reproducibility

INTRODUCTION

Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast consists in lesions with different cytological and architectural characteristics. DCIS lesions are originated in the terminal ductolobular unit and are associated with a variable risk of invasive carcinoma development^{5,13,21,30}.

From a practical perspective, the precise definition of the histological grade as a predictor of biological behavior is very important, especially in regard to DCIS, because of its association with the risk of developing invasive carcinoma¹¹.

It is very important to establish reproducible diagnosis that can help the choice of the best treatment for each patient. Therefore, the degree of tumor differentiation is a biological variable which can be used as a prognostic factor⁶. Therapeutic decisions are made based on the histological classification, associated with other factors such as histopathological grading, size of lesion, state of margins, age of patient, mammographic correlation, and other biological markers of tumor aggressiveness assessed by molecular techniques^{17,20,26,31}.

Since treatment of DCIS may vary according to the potential of evolution and recurrence of the lesion, it is necessary to have clearly defined criteria to classify these lesions¹. Considering that surgical treatment may vary from an isolated segmental resection, through a segmental resection with radiation therapy, up to a mastectomy, and given the irreversibility of therapeutic action, it is essential that the diagnosis is based on objective criteria that can be easily reproduced in daily practice⁷. Several studies have looked at the issue of diagnostic reliability and intraobserver reproducibility according to the classification studied^{2,8,22,23,24,25,27,28,37}.

Although several classification systems for DCIS have been proposed, there is only a regular level of diagnostic agreement between pathologists⁸. Many reasons may be suggested to explain this condition. Prior studies differ in how DCIS cases are presented, with variations of the origin and characteristics of the samples, core biopsy or excisional biopsies, association with invasive carcinoma, convenience or random sampling, cases with difficult grade diagnosis or representative cases. Also, there is great variation of professionals included to perform the diagnosis: some are specialists in breast pathology, while others are surgical pathologists directly involved in the diagnosis routine, not exclusively in the interpretation of

breast tumors.

Furthermore, instruments to gather data differ in the studies conducted so far, which contribute to the difficulty of comparing them, as well as affect the quality of reported information. Classifications that take into account only parameters related to nuclear morphology have been proposed. These classifications have higher correlation with breast cancer biological behavior than those that take into consideration cytoarchitectural features. Therefore, they provide important clinical information with prognostic value¹⁹.

Telepathology has been studied extensively as a mean of diagnosis and consultation in surgical pathology^{12,15,32,33,34,35,36}. Eusebi et al. (1997) have studied the telepathology diagnostic accuracy of pathologists in cases with difficult diagnosis and shown the accuracy of telepathology to be high (agreement of 75.0%)⁹. However, before telepathology can be used confidently, thorough evaluation of its true diagnostic reproducibility is needed.

For all these reasons, this study intends to validate an electronic questionnaire available on Internet, which through a scoring point system generates the diagnosis of pathological grading of DCIS lesions in different grading systems. This study aims to assess the ability of the created questionnaire and its scoring system to reproduce the diagnosis of the pathologists in their work routine for two classification systems of DCIS (Holland and Van Nuys) and the Black modified nuclear grade.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A cross-sectional study was carried out to evaluate the diagnostic agreement of the electronic questionnaire developed for this study and its point system for obtaining the final diagnosis in 3 different grading systems for DCIS of the breast with the diagnosis obtained through the usual interpretation given by the pathologists.

The privacy of all data obtained was ensured, and this information was used exclusively for the scientific purpose expressed in this research project.

This project was approved by the Ethics and Research Committee of the Graduate and Research Group (GPPG) at “Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

Cases in the study

Slides of 43 DCIS cases of the breast, diagnosed at ‘Hospital de Clínicas de Porto

Alegre' (HCPA) and at MD Anderson Cancer Center, USA, were chosen by convenience sampling. Typical examples of DCIS were considered to select these cases, as well as those in which _/histological material was well processed. The slides selected were reviewed by two experienced pathologists (MIE and ER) without knowledge of the clinical and demographic characteristics of the patients. The cases were not selected based on ease of diagnosis, but because they represented different grades of tumor differentiation. Cases in which there was evident invasive ductal carcinoma associated or divergence between the original anatomopathological diagnosis and the review performed at selection were excluded. The case slides were stored at HCPA Pathology Service and in the Pathology Department of University of Texas MD Anderson Cancer Center, and they were prepared from surgical specimens fixed in buffered formalin and placed in paraffin blocks, using 4 µm thick sections stained with hematoxylin–eosin.

The cases were presented in digital photographs to the pathologists participating in this study. The reviewing pathologists (MIE and ER) obtained several colored digital photomicrographs of the selected DCIS cases. The website provides images of the same field in three different magnifications (100, 200, and 400×). During analysis, the pathologist could enlarge each image provided. Each case had at least 5 images stored in JPEG format, which the observers could access freely with or without magnification.

Participating Pathologists

Three pathologists (E.R., M.G., D.U.) were invited to participate in this study. They declare themselves experts in breast pathology and perform their activities in hospitals with health care service to patients with breast cancer. For classifying Holland, Van Nuys and modified Black nuclear grade pathologists with specific experience in the use of these ratings were invited.

As a reference for modified Black nuclear grade, an expert in breast pathology from the MD Anderson Cancer Center, USA was invited. For Holland and Van Nuys ratings, two experts in breast pathology that perform their activities in a university hospital in the city of Porto Alegre, Brazil, were invited.

Classification Systems Assessed

A series of cytonuclear, cytoarchitectural characteristics and patterns of necrosis was used to compose the classification systems (Tables 1 and 2). The documented findings that

concerned the evaluation of the nucleus were: nuclear pleomorphism, diameter of the nucleus, presence of the nucleolus, and chromatin pattern.

Table 1: Morphological characteristics analyzed for the classification systems.

Systems	Nuclear Grade	Cell Polarization	Cell Necrosis	Final Grade
Holland (HL)	Poorly differentiated	Absent or focal		Poorly differentiated
	Intermediately differentiated	Present, not prominent	N/A	Intermediately differentiated
	Well differentiated	Prominent		Well differentiated
Van Nuys (VN)	High		Present or absent (comedo)	G3
	Intermediate or Low	N/A	Present (comedo)	G2
	Intermediate or Low		Absent (comedo)	G1
Black (BMNG)	High			High grade
	Intermediate	N/A	N/A	Intermediate grade
	Low			Low grade

Note: N/A, not available.

Table 2: Summary of the criteria to determine the nuclear grade for the DCIS classifications studied.

Holland			
	High grade	Intermediate grade	Low grade
Nuclei	Pleomorphic nuclei, anisonucleosis, irregular location, usually but not always large	Slight pleomorphism, nuclei showing some variation in size, outline and spacing	Monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing, usually small
Chromatin	Vesicular	Fine to coarse	Uniform, fine
Nucleoli	1 or more	Infrequent	No nucleoli
Mitoses	Often present	Occasionally present	Rare
Van Nuys			
	High grade	Intermediate grade	Low grade
Nuclei diameter	>2 RBC	1.5–2 RBC	1–1.5 RBC
Chromatin	Vesicular	Fine to coarse	Uniform, fine
Nucleoli	1 or more	Infrequent	No nucleoli
Comedo-necrosis	Present or absent	Present	Absent

Table continues on the next page

Black Modified Nuclear Grade			
	High grade	Intermediate grade	Low grade
Nuclei	Pleomorphic nuclei, anisonucleosis, irregular location, usually but not always large	Slight pleomorphism, nuclei showing some variation in size, outline and spacing	Monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing, usually small
Nuclei diameter	Up to 3 times the diameter of normal nuclei	Up to 2 times the diameter of normal nuclei	Same as normal nuclei
Chromatin	Vesicular	Fine to coarse	Uniform, fine
Nucleoli	1 or more	Infrequent	No nucleoli
Mitoses	Often present	Occasionally present	Rare

The modified Black nuclear grade, used mainly by American pathologists in the evaluation of both invasive and intraductal breast cancer, evaluates the nuclear characteristics of breast cancers. Black and colleagues^{3,4} proposed a nuclear grading system with five grades. Contrary to common practice, grade 0 and 1 were used to designate the most poorly differentiated, or anaplastic neoplasms, whereas grade 4 reflected the well-differentiated tumors. This reversal of the numerical order remained a disturbing aspect of this nuclear grading system and contributed to a lack of wide support for its application. The nuclear-grading system of Black and colleagues has been found to be useful in predicting prognosis¹⁰. Fischer and coworkers devised a grading method and modified the Black nuclear grading system by reducing it from five to three grades after combining grades 0 and 1 into one group, and grades 3 and 4 into another. Furthermore, they inverted the numerical order so that grade 1 corresponds to the well differentiated carcinomas, and grade 3 reflects the most poorly differentiated tumors. In this study, the participant pathologist classified cytonuclear differentiation (nuclear grade) according to criteria published¹⁰.

Holland's classification, used by the European Pathologists Working Group, primarily emphasizes cytonuclear differentiation and secondarily architectural differentiation (cellular polarization). This system classifies DCIS in three groups: poorly, moderately (intermediately), and well differentiated. The term 'comedonecrosis' is not used as a diagnostic criterion¹⁴. In this study, the participant assessed the criteria to compose the degree of cytonuclear differentiation (nuclear grade), as well as the cellular polarization, according to the criteria published.

The Van Nuys scale values the nuclear grade and the presence or absence of comedo-

type necrosis. The presence of any high nuclear grade (with or without comedo-type necrosis) is defined as Group 3. Among the remaining non-high nuclear grade lesions, those with comedo-type necrosis are defined as Group 2, and those without comedo-type necrosis are defined as Group 1. Special types of DCIS are included in this classification²⁶. The participant of this study identified both presence and absence of comedo-type necrosis and also the remaining criteria necessary to compose the nuclear grade, according to the literature published.

Method

Partially, the methodology of this study was already published in a previous paper, Schuh et al. (2010)²⁴.

We created two computer software programs which can be accessed through Internet, in website format. In one of them (<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site3>), a data collection instrument was developed to show the most important elements of each classification system and to allow comparison of the participants' answers in order to determinate intra and interobserver agreement. This website offers a questionnaire containing the characteristics used to compose the three DCIS classification systems in our study, and also the digitized microscopy images of the DCIS cases. A scoring system was developed to allow the determination of the histological grade of the cases (Table 3). This electronic questionnaire and the diagnostic scoring point system compose the web-based survey that it is proposed to validate in this study. Each analyzed histological characteristic receives a value which is higher if the characteristic of the lesion tends to be undifferentiated and lower if it tends to be well differentiated. Based on the evaluation of the data obtained at the end of each case, the program itself accesses the histological grade for the three classification systems. Each one of the three classifications considers certain histological characteristics; therefore, different final scores can be found for each classification.

Table 3: Equations for the generation of the final score of histological grade for the DCIS classification systems: Holland, Van Nuys and modified Black nuclear grade system

Holland	Van Nuys	Modified Black Nuclear Grade System
<p>GI < 6</p> <p><i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(1) no mitoses</i></p> <p><i>(1) all the cells have a well-defined apex and show polarization</i></p>	<p>GI < 50</p> <p><i>(10) Nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) Nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(10) fine to coarse chromatin</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(2) nucleoli insignificant</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(10) any confluent necrosis</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) no necrosis</i></p>	<p>GI < 6</p> <p><i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(1) Nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(1) no mitoses</i></p>
<p>G2 > 5 e < 90</p> <p><i>(10) nuclei showing some variation in nuclear size, outline and spacing</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(10) fine to coarse chromatin</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(2) nucleoli insignificant</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(10) mitoses present</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) absent</i></p> <p><i>(10) polarization present but not pronounced</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) all the cells have a well-defined apex and show polarization</i></p>	<p>G2 > 1000 < 1030</p> <p><i>(10) Nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) Nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(10) fine to coarse chromatin</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(2) nucleoli insignificant</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(1000) proeminent central necrosis - comedonecrosis</i></p>	<p>G2 > 5 < 90 or >13 < 16 if no mitoses</p> <p><i>(10) nuclei showing some variation in nuclear size, outline and spacing</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(10) nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(10) fine to coarse chromatin</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(2) nucleoli insignificant</i></p> <p><i>or</i></p> <p><i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(1) no mitoses</i></p>

Table continues on the next page

<p>G3 > 95</p> <p><i>(100) pleomorphic nuclei, anisonucleosis, usually but not always large</i> or <i>(10) nuclei showing some variation in nuclear size, outline and spacing</i> or <i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(100) coarse, clumped chromatin</i> or <i>(10) fine to coarse chromatin</i> or <i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(10) evident nucleoli</i> or <i>(2) nucleoli insignificant</i> or <i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(10) mitoses present</i> or <i>(1) mitoses absent</i></p> <p><i>(100) no true polarization of the cells with orientation toward a lumen</i> or <i>(10) polarization present but not pronounced</i> or <i>(1) all the cells have a well-defined apex and show polarization</i></p>	<p>G3 > 100 < 320 or >1100</p> <p><i>(100) nuclei > 2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 3 fold variation in nuclear diameter</i> or <i>(10) nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter</i> or <i>(1) nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(100) coarse, clumped chromatin</i> or <i>(10) fine to coarse chromatin</i> or <i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(10) evident nucleoli</i> or <i>(2) nucleoli insignificant</i> or <i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(1000) prominent central necrosis - comedonecrosis</i> or <i>(10) any confluent necrosis</i> or <i>(1) no necrosis</i></p>	<p>G3 > 95 or >13<16 if present mitoses</p> <p><i>(100) pleomorphic nuclei, anisonucleosis, usually but not always large</i> or <i>(10) nuclei showing some variation in nuclear size, outline and spacing</i> or <i>(1) monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing</i></p> <p><i>(100) nuclei > 2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 3 fold variation in nuclear diameter</i> or <i>(10) nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter</i> or <i>(1) nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement</i></p> <p><i>(100) coarse, clumped chromatin</i> or <i>(10) fine to coarse chromatin</i> or <i>(1) uniform, fine chromatin</i></p> <p><i>(10) evident nucleoli</i> or <i>(2) nucleoli insignificant</i> or <i>(1) no nucleoli</i></p> <p><i>(10) present mitoses</i> or <i>(1) absent</i></p>
--	--	---

The criteria used to compose the final histological grade for the three classification systems, the description of these classifications, and the references remained available to the participants for consultation while the data was being collected.

Every participant pathologist received a username and password to be able to access the site. Primarily, they evaluated the cases through this standard questionnaire. In a second moment, the same three pathologists were again assigned to classify the same cases of DCIS. In this phase, the pathologists should go online to access the second website (<http://www.mayer.art.br/cainsitu/site2>). In this moment, however, the final diagnosis would be given by the pathologist without the aid of the questionnaire containing the criteria and scoring system for diagnosis. Each pathologist was responsible for a particular classification system.

Statistical analysis

The Kappa statistical method was used to assess the diagnosis agreement of each classification system by comparing the scoring point system and the subjective reading of the digital images on a web-based survey. Intraobserver reproducibility was calculated using Cohen's κ statistics. Intraobserver reproducibility between the two methods (scoring point system and subjective analysis) using digital images was calculated for each pathologist^{16,29}.

For each classification, the proportion of the different histologic grades found for all cases by the scoring point system and the subjective reading was also estimated.

The histological grading diagnoses were considered semi quantitative variables and were aggregated into 3 categories, with each diagnosis corresponding to a step from well differentiated to undifferentiated. The ordering of these 3 diagnostic categories was low, moderated and high grade. Any difference in diagnostic category between the two methods using digitized images was considered a diagnostic disagreement by 1 or 2 steps. Therefore, diagnoses that fell into the same category were considered concordant.

Program SPSS v.14.0 and PEPI (programs for epidemiologists) v.4.0 were used for statistical analysis of the data.

According to the sample calculation, for a 0.7 Kappa, 95% confidence interval and 15% margin of error, at least 43 different cases of DCIS would be needed.

RESULTS

Table 4 shows the proportion of cases found in each histological grade in the three classification systems studied, obtained by the diagnostic scoring system and by the subjective reading of the digital images of DCIS.

Table 4: Proportion of cases found in each histological grade in the three classification systems studied.

Systems	Nuclear Grade	Diagnostic Scoring System n (%)	Subjective Reading n (%)
Black	Grade 1	12 (27.9)	11 (25.6)
	Grade 2	10 (23.3)	13 (30.2)
	Grade 3	21(48.8)	19 (44.2)
Holland	Grade 1	2 (4.7)	8 (18.6)
	Grade 2	19 (44.2)	15 (34.9)
	Grade 3	22 (51.2)	20 (46.5)
Van Nuys	Group 1	17 (39.5)	17 (39.5)

Group 2	5 (11.6)	9 (20.9)
Group 3	21 (48.8)	17 (39.5)

The intraobserver κ values comparing the scoring point system and the subjective reading of digital images of DCIS for each of the three grading systems are shown in **Table 5**. A κ value of 1 reflects perfect agreement among all observers. When agreement is only by chance, the κ value is 0, and with $\kappa < 0$ the observers generally disagree. Although there are no formal criteria to qualitatively describe κ values, many observers consider that $\kappa > 0.81$ indicate excellent reproducibility, κ from 0.61 to 0.80 good reproducibility, κ from 0.41 to 0.60 moderate reproducibility, κ from 0.21 to 0.40 acceptable reproducibility, and κ from 0 to 0.20 poor or weak reproducibility¹⁶. By these criteria, our results show fair to good intraobserver diagnostic reproducibility. There was no statistically significant difference between kappa values of Holland classification if compared to others ($p = 0.317$).

Table 5: Intraobserver reproducibility between the scoring point system and the subjective reading for the three different DCIS grading classifications studied.

CDIS Classification Systems	Kappa Values ($\kappa \pm EP$)
Holland	0.57 ± 0.10
Van Nuys	0.67 ± 0.09
Black modificado	0.67 ± 0.09

Table 6 shows the degree of disagreement found in this study between the web-based survey and the subjective reading of the digital images of DCIS, for each classification system studied.

Only two 2-step diagnostic disagreements were found, one for Holland and another for Van Nuys. Both cases were superestimated by the web-based survey (Grade 1 subjectively and grade 3 objectively). The case of Holland got grade 3 by the scoring point system because of nuclear grade 1 with absence of polarization. The Van Nuys case scored 3 because the nucleolus was marked as very evident.

1-step diagnostic disagreements were seen in 9 cases of modified Black grade system, 10 cases of Holland classification and 8 Van Nuys classification cases. These 1-step situations mostly have occurred by the scoring point system super estimation.

Table 6: Degree of disagreements between the web-based survey and the subjective reading in the three classification systems studied.

	1-step disagreement			2-step disagreement		
	Super-estimated * n (%)	Sub-estimated * n (%)	Total n (%)	Super-estimated * n (%)	Sub-estimated * n (%)	Total n (%)
Holland	8 (18.6)	2 (4.6)	10 (23.2)	1 (2.3)	0 (0.0)	1 (2.3)
Van Nuys	5 (11.6)	3 (7.0)	8 (18.6)	1 (2.3)	0 (0.0)	1 (2.3)
Black	5 (11.6)	4 (9.3)	9 (20.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

* Superestimated and Subestimated by the web-based survey vs the subjective reading.

DISCUSSION

Two different methodological approaches have been advocated for telepathologic diagnosis. In dynamic systems, images are viewed live and in real time as the receiving viewer directly controls specimen orientation, field selection and fine focus of the microscope via robotic controls¹⁸. In static systems, images are captured in a digital format on an image frame grabber board and then transmitted individually as still images to the receiving viewer. The receiving viewer usually has little or no direct control over microscope functions^{31,32,34,35}. Although dynamic imaging is unquestionably the most powerful technological approach, the substantial lower cost favors the use of static imaging methods for review of histological slides³⁴, as used in this study.

When evaluating the reproducibility of diagnosis made through two or more different method diagnosis modalities, the overall percentage or proportional agreement appears to be a simple and intuitively correct measure of reproducibility. Given the limited number of diagnostic possibilities, it is important to correct for chance agreement. *Agreement* is the overall or proportional number of cases given the same diagnosis between or within observers, including that part of the agreement which may be attributable to chance. *Reproducibility*, part of the agreement that may not be explained purely by chance, is appropriately measured by the κ statistic²⁸. Reproducibility may be evaluated at the level of 2 or more observers examining the same specimen (interobserver reproducibility) or at the level of the same observer examining a specimen via 2 or more modalities or in 2 or more

occasions (intraobserver reproducibility)²⁸.

We found that the intraobserver diagnostic reproducibility for digital images using a web-based survey was moderate to good, with κ values ranging from $0.57 \pm 0,10$ to $0.67 \pm 0,09$ for intraobserver reproducibility. Factors such as initial selection of slide fields for imaging and transmission, technical factors (digitization, transmission and display), and viewer expertise and comfort when viewing and interpreting computer images seem to play a great role in determining intrapathologist disagreements in the final diagnosis. As instrumentation improves and pathologists gain more experience in sending, receiving and interpreting digital images, the diagnostic reproducibility of digital images is likely to improve^{15,32,34,35}. In this study, however, what was confronted was a diagnostic scoring system with a subjective reading just using the static telepathology with the same set of digitized microscopy images of the DCIS cases.

A number of prior studies have addressed the issue of interobserver and intraobserver reproducibility in the diagnosis of proliferative breast lesions^{2,8,22,23,24,26,27,36}.

In a study examining the diagnostic accuracy of conventional examination of DCIS section slides, Douglas-Jones et al. (2000) found an interobserver κ of 0,57 to 0,58 for Van Nuys classification. In that study, 19 participating pathologists reviewed all 60 cases studied⁸. Although in our study we used intraobserver concordance to compare diagnoses by the scoring system and the conventional reading of digital images, the kappa values were very similar to that study.

The diagnostic categories used in this study are semiquantitative in nature, limited to three categories: low, moderated and high grade. For quality assurance purpose, a minor discrepancy is often defined as a 1-step difference between the original and the observer diagnoses and a major discrepancy as a 2-step difference. It is a relevant aspect to be considered because differences of more than one step may be expected to result in significantly different follow-up/treatment approaches. However in the present study, only two 2-step diagnostic disagreements occurred, one for Holland and another for Van Nuys.

One conclusion that can be drawn from this study is that its results demonstrate for the first time that histological grading of DCIS, evaluated by three different systems, can be applied with a high degree of consistency using the available scoring point system on this innovative web-based survey. In fact, the level of observer agreement we obtained in this study was higher than that seen in prior studies of observer agreement in proliferative breast

lesions^{2,8,22,23,24,26,27,36}.

There are a number of potential limitations to this study. First, it could be argued that our results may not be representative of the level of agreement attainable in general pathology practice, because all pathologists participating in this study have a particular interest in breast pathology. Second, the pathologists in this study were asked to render their diagnoses following examination of selected digital images rather than following examination of whole histological sections under the microscope, as is done in routine clinical practice. However, given that the goal of this study was to assess observer variability in the classification of specific lesions, we believe that the use of digital images could be viewed as a strength of the study, as it required the participants to base their diagnoses only in the microscopic features of the lesions in question, without the aid of surrounding histological clues.

In summary, the intraobserver diagnostic reproducibility of DCIS with the use of digital images in a web-based survey comparing subjective analysis with the use of a point scoring system is fair to good for Holland, Van Nuys and modified Black nuclear grade system. The use of scoring point system does not appear to pose a major risk of presenting large (2-step) diagnostic disagreements. These findings indicate that the use of this point scoring system in this web-based survey to objectively grade DCIS lesions is a promising, useful and a reliable diagnostic tool.

REFERENCES

1. Badve, S.; A'Hern, R.P.; Ward, A.M.; Millis, R.R.; et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. *Hum Pathol*, 29:915-23, 1998.
2. Bethwaite, P.; Smith, N.; Delahunt, B.; Kenwright, D. Reproducibility of a new classification schemes for pathology of ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol*. 51:450-4, 1998.
3. Black, M.M.; et al. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer*, n. 36, p. 2048-55, 1975.
4. Black, M.M; Opler, S.R.; Speer, F.D. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg Gynecol Obstet*, n.100, p. 543-51, 1955.
5. Burstein, H.J.; Polyak, K.; Wong, J.S.; Lester, S.C.; Kaelin, C.M. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*, 350:1430-41, 2004.

6. Consensus conference on the classification of ductal carcinoma in situ, *Hum. Pathol.* 28 (1997) 1221–1225.
7. Douglas-Jones, A.G.; et al. A critical appraisal of six modern classifications of ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS): correlation with grade of associate invasive carcinoma. *Histopathology*, Nov;29(5):397-409, 1996.
8. Douglas-Jones, A.G.; Morgan, J.M.; Appleton, M.A.; et al. Consistency in the observation of feature used to classify duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *J Clin Pathol*, 53:596-602, 2000.
9. Eusebi, V., Foschini, L., Erde, S., Rosai, J., Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. *Hum Pathol*, 28:13-16, 1997.
10. Fisher, E.R.; Redmond, C.; Fisher, B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu*, n.15, p.239-51, 1980.
11. Goldhirsch, A.; Glick, J.H.; Gelber, A.S.; et al. Meeting Highlights: International expert consensus on the primary therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology*, 16:1569-83, 2005.
12. Halliday, B.E.; Bhattacharyya, A.K.; Graham, A.R.; et al., Diagnostic accuracy of an international static-imaging telepathology consultation service. *Hum Pathol*, 28:17–21, 1997.
13. Harris, J.R.; Lippman, M.E.; Morrow, M.; Osborne, C.K. *Diseases of the breast*. 3.th. Lippincott Williams e Wilkins, p.321-360, 2004.
14. Holland, R.; Peterse, J.L.; Millis, R.R.; Eusebi, V.; Faverly, van de Vijver, M.J.; Zafrani, B.; et al. Ductal carcinoma in situ: A proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol*, 11:167-70, 1994.
15. Kayser, K. Telepathology in Europe. Its practical use. *Arch Anat Cyto Pathol*, 43:196–199, 1995.
16. Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-74, 1977.
17. Lagios, M.D.; Margolin, F.R.; Westdahl, P.R.; et al: Mammographically detected duct carcinoma in situ. Frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer*, 63:618-624, 1989.
18. Mun, S.K.; Esayed, A.M.; Tohme, W;G.; et al., Teleradiology/telepathology requirements and implementation. *J Med Sys*, 19:15–164, 1995.
19. Pinder, S.E. Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Modern Pathology*, 23:S8-S13, 2010.
20. Ponzzone, R.; Dominguez, A.; Marra, V.; et al., Pathological classification of ductal carcinoma in situ of the breast correlates with surgical treatment and may be predicted by mammography, *Breast*, 16:495-502, 2007.

21. Rosen, P.P.; Oberman, H. Tumors of the mammary gland. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 135 -152, 1993.
22. Salles, M.A.; Mattos, M.A.; Resende, I.M.; Gobbi, H. Análise interobservador no diagnóstico histopatológico do carcinoma ductal in situ da mama. *Rev Brasil Ginecol Obstet*, 27:1-6, 2005.
23. Schnitt, S.J.; Connolly, J.L.; Tavassoli, F.A.; et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol*. 16:1133-43, 1992.
24. Schuh, F.; Biazús, J.V.; Resetkova, E.; Benfica, C.Z.; Edelweiss, M.I.A. Reproducibility of three classification systems of ductal carcinoma in situ of the breast using a web-based survey. *Pathol Res and Pract*, n. 206, p. 705–711, 2010.
25. Scott, M.A. et al. Ductal Carcinoma in situ of the Breast: Reproducibility of Histological Subtype Analysis. *Hum Pathol*, n. 28, p. 967-73, 1997.
26. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al: A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 77:226 - 2274, 1996.
27. Sloane, J.P.; et al. Consistency achieved by 23 European pathologists in categorizing ductal carcinoma in situ of the breast using five classifications. *Hum Pathol*, Oct;29(10):1056-62, 1998.
28. Sneige, N.; Lagios, M.D.; Schwarting, R.; et al. Interobserver reproducibility of the Lagios nuclear grading system for ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*, 30:257-62, 1999.
29. Svanholm, H.; Staklint, H.; Gundersen, H.J.G.; et al. Reproducibility of histomorphologic diagnoses with special reference to the kappa statistic. *APMIS*, 97:689-698, 1989
30. Tavassoli, F.A.; Devilee, P. (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press: Lyon, 60-81, 2003.
31. Van de Vijner, M.J. Biologic variables and prognosis of DCIS. *Breast*, 14:509-519, 2005.
32. Weinberg, D.S.; Allaert, F.A.; Dusserre, P.; et al., Telepathology diagnosis by means of digital still images: an international validation study. *Hum Pathol*, 27:111–118, 1996.
33. Weinstein, L.J.; Epstein, J.I.; Edlow, D.; et al. Static image analysis of skin specimens: the application of telepathology to frozen section evaluation. *Hum Pathol*, 28:22–29, 1997. 28.
34. Weinstein, R.S.; Bhattacharyya, A.K.; Graham, A.R.; et al. Telepathology: A ten year progress report. *Hum Pathol*, 28:1–7, 1997.
35. Weinstein, R.S.; Bloom, K.J.; Rozek, L.S. Telepathology: Long-distance diagnosis. *Am J Clin Pathol*, 91:39–42, 1989.

36. Weinstein, R.S.; Graham, A.R.; Lynne C. Richter, L.C.; et al. Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future Human Pathology, 40, 1057–1069, 2009.
37. Wells, W.A.; Carney, P.A.; Eliassen, M.S.; Grove, M.R.; Tosteson, N.A. Pathologists' agreement with experts and reproducibility of breast ductal carcinoma in situ classification schemes. *Am J Surg Pathol*, 24:651-9, 2000.

7 ARTIGO 2 EM INGLÊS

DUCTAL CARCINOMA *IN SITU* OF THE BREAST: MODIFIED BLACK NUCLEAR GRADING SYSTEM REVISITED

Fernando Schuh^a, Jorge Villanova Biazús^b, José Antônio Cavalheiro^b, Christiane Cardoso Falcão^c, Alessandra de Freitas Ventura^d, Erika Resetkova^e, Maria Isabel Edelweiss^{a,f}

Faculdade de Medicina - Programa de Pós-graduação: Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^a Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^b Serviço de Mastologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

^c Breast Surgeon - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^d Breast Surgeon, Hospital São Cristóvão, São Paulo, Brazil

^e Department of Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

^f Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

Corresponding author at:

Rua Duque de Caxias 1191/304, Porto Alegre, Brazil.

Tel: +55 51 3234 6137.

e-mail: fernandoschuh@hotmail.com (F.Schuh).

ABSTRACT

This study aims to determine the pathologists' agreement of modified Black nuclear grading system and classification of Holland applied to cases of ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Forty-three cases of breast lesions diagnosed as DCIS were selected to interobserver analysis. Twelve pathologists received the same set of digitized images from microscopy of the DCIS cases, and answered a questionnaire containing the criteria to compose the modified Black nuclear grading system and Holland classification system. In order to determine interobserver agreement and diagnostic accuracy, a web-based survey was created. It organizes the information collected from each pathologist participant providing the histological grading of the cases in both classification systems. The reliability for the modified Black nuclear grade applied to cases of DCIS was acceptable, with Kappa value of 0.23 ± 0.02 . Comparing the two classifications studied, there was a similar agreement among both schemes, showing Kappa value of 0.27 ± 0.03 for the Holland classification. Analyzing a subgroup of pathologists rated according to their interest in breast pathology, a higher diagnostic reproducibility was found for the group of breast pathology experts in relation to the pathology residents only for the modified Black nuclear grading system ($\kappa = 0.43 \pm 0.07$ vs. $\kappa = 0.11 \pm 0.05$; $p = 0.002$). The agreement among all pathologists and the gold standard pathologist similarly followed the results of the interobserver concordance, showing to be acceptable, with Kappa for the overall mode value 0.32 ± 0.10 for both classifications. The findings of Kappa for the mode values among specialists in breast pathology and pathology residents were, respectively, 0.34 ± 0.11 (acceptable) and 0.19 ± 0.08 (weak) for the modified Black nuclear grade and 0.33 ± 0.11 (acceptable) and 0.19 ± 0.08 (weak) for Holland classification. Breast pathology specialists showed greater reproducibility for both evaluated classifications than pathologists not devoted to this subject. The diagnostic accuracy was similar for the modified Black nuclear grading system regarding the Holland's classification system.

Keywords: Classification, ductal carcinoma *in situ*, scoring system, interobserver reproducibility

INTRODUCTION

The introduction of mammographic screening in the 1980s generated an explosive increase in the incidence of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) by more than 500% from 1983 to 1992. Currently it represents approximately 30–40% of all mammographically detected breast cancers. Consequently this has led to an increased interest in the biology, classification, clinical behaviour, and treatment of DCIS^{9,10,19,32}.

It has been estimated that if left untreated, DCIS will develop into invasive carcinoma in a significant proportion of cases, generally within 10 years of diagnosis. Clinical trials showed beneficial effect of lumpectomy especially with adjuvant radiation in cases of DCIS^{11,12,17,18}. In some instances, DCIS may recur locally, and 50% recurs as invasive carcinomas^{6,15,23}. Clearly, the most important determinant of recurrence is the adequacy of surgical excision, but pathological assessment of excision margins is beset with technical difficulties^{21,26}.

The DCIS is strictly defined as a proliferation of epithelial cells with malignant cytological and histological features within the terminal duct-lobular unit of the breast, confined within the basement membrane. DCIS is not a single morphological entity but a heterogeneous group of proliferative breast lesions with different malignant potentials that varies according to cytology and growth pattern. This reflects its clinical presentation, histopathology, radiologic features, expression of biological markers, and clinical behaviour^{6,15,23}. DCIS classification has traditionally been based on growth pattern; a number of studies have shown a relation between this aspect and behaviour. Growth pattern, however, often varies from one part of the tumour to another, which at least partly explains why architectural classifications are associated with a low level of observer consistency^{2,14,21,22,23,26}.

Sub categorization of the ductal proliferations is far more difficult and has resulted in persistent interobserver variability among experienced pathologists, even when the same criteria are applied^{3,8,24,25,28,29,33}. Cytonuclear, cytoarchitectural characteristics and patterns of necrosis were used to compose the different classification systems^{16,21,25,27}.

The classification of Holland¹⁶, used by the European Pathologists Working Group, emphasizes primarily cytonuclear differentiation and secondarily architectural differentiation (cellular polarization). This system classifies DCIS in three groups: poorly, moderately (intermediately), and well differentiated¹⁶.

Black and colleagues^{4,5} evaluated the prognostic significance of the tubule formation and the nuclear features separately and concluded that only nuclear morphology is a significant prognostic factor. They proposed a nuclear grading system with five grades. Contrary to common practice, grade 0 and 1 were used to designate the most poorly differentiated, or anaplastic neoplasms, whereas grade 4 reflected the well-differentiated tumors. This reversal of the numerical order remained a disturbing aspect of this nuclear grading system and contributed to a lack of wide support for its application. The nuclear-grading system of the Black and colleagues has been found to be useful in predicting prognosis³¹.

Fisher and coworkers¹³ devised a grading method and modified the Black nuclear grading system by reducing it from five to three grades after combining grades 0 and 1 into one group, and grades 3 and 4 into another. Furthermore, they inverted the numerical order so that grade 1 corresponded to the well differentiated carcinomas and grade 3 reflected the most poorly differentiated ones. There is no report in literature that has explored the issue of interobserver reproducibility and diagnostic accuracy according to the modified Black nuclear grading system.

Table 1 shows the morphologic criteria for the two classification systems studied, as well as their graduation.

Table 1: Morphologic criteria for each classification system analyzed in this study.

System	Nuclear grade	Cell polarization	Final DCIS grade
Holland (HL)	Well differentiated	Prominent	• Well differentiated
	Intermediately differentiated	Present, not prominent	• Intermediately differentiated
	Poorly differentiated	Absent/very focal	• Poorly differentiated
Modified Blacks Nuclear Grade (MBNG)	1	N/A	• Grade 1 (low grade)
	2		• Grade 2 (intermediate grade)
	3		• Grade 3 (high grade)

Note: N/A, no available.

OBJECTIVE

This study was performed to assess reproducibility, comparing interobserver results, and to determine the accuracy of the histological grade of modified Black nuclear grading system¹³ and classification of Holland¹⁶ for DCIS, using a web-based program developed to facilitate the classification. Based on these findings, we identified, among the systems studied, the one with the highest degree of agreement and reliability. The factor of study was the analysis of DCIS classification systems comparing modified Black nuclear grading system²⁶ with the Holland's classification²⁷. The outcome was the degree of interobserver concordance.

MATERIALS AND METHODS

Slides of 43 cases of DCIS of the breast, diagnosed at "Hospital de Clínicas de Porto Alegre" (HCPA), Brazil, and at MD Anderson Cancer Center, USA, were chosen by convenience sampling. Typical examples of DCIS were considered to select these cases, as well as those where histological material was well processed. The slides selected were reviewed by two pathologists (MIE and ER) without knowledge of the clinical and demographic characteristics of patients. The cases were not selected based on ease of diagnosis, but because they represented different grades of tumor differentiation. Cases in which there was evident invasive ductal carcinoma associated or divergence between the original anatomopathological diagnosis and the review performed at selection were excluded. The case slides were stored at the HCPA Pathology Service and in the Pathology Department of University of Texas MD Anderson Cancer Center, and they were prepared from surgical specimens fixed in buffered formalin and placed in paraffin blocks, using thick sections stained with hematoxylin-eosin. The cases were presented in digital photographs, in JPEG format, to the pathologists participating in this study. The reviewing pathologists (MIE and ER) obtained several colored digital photomicrographs of the selected DCIS cases. The website created for this study provides images of the same field in three different magnifications (100, 200, and 400×). During analysis, the pathologist has the opportunity to enlarge each image provided. Each case had at least 5 images stored in JPG format, which the observers could access freely during the assessment with or without magnification.

A cross-sectional study was carried out to diagnose the grading of DCIS cases in order to assess the degree of agreement between pathologists in the city of Porto Alegre, Brazil. The privacy of all data obtained was ensured, and this information was used exclusively for the scientific purpose expressed in this research project, with a guarantee that the identity of participants would be kept confidential. This project was approved by the Ethics and Research Committee of the Graduate and Research Group (GPPG) at “Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

Participating Pathologists

Pathologists, who work in Porto Alegre hospitals with breast cancer services, were invited to participate in this study. Among 35 pathologists invited by the researchers, 12 agreed to the terms of the letter of free and informed consent to participate in the study: 4 university lecturers, 4 medical assistants, and 4 medical residents. Three of them said that they were specialists in breast pathology. The invited physicians, except for the residents, had the title of specialist in pathology, and were associated members of the Brazilian Society of Pathology. All of them work at hospitals connected to centers of academic training. A pathologist specializing in breast pathology from the MD Anderson Cancer Center, USA (ER) was invited to act as gold standard.

Statistical Analysis

The Kappa statistical method¹ was used to assess interobserver variability and agreement of invited pathologists with the expert pathologist for diagnosis in each classification system. The Kappa (κ) values vary from 0 to 1, and 1 indicates perfect agreement. Lands and Koch (1977) suggest the following interpretation for different ranges of Kappa values: from 0 to 0.20 agreement equals poor or weak; from 0.21 to 0.40 agreement is acceptable; from 0.41 to 0.60 equals moderate; from 0.61 to 0.80 equals good; and from 0.81 to 1.00 equals excellent²⁰.

To evaluate the diagnostic agreement between pathologists, the value of κ was estimated for multiple categories and multiple observers. Statistical comparison of agreement between classifications was done using a comparison test between Kappa values for subgroups of pathologists using the formula from Svanholm et al. (1989)³⁰.

For each classification, the proportion of cases in which most pathologists agreed with the expert (gold standard) was also estimated. Moreover, the subgroups of pathologists were also evaluated by the mode value. Whenever there was a draw, it was assumed the higher grade one as the mode value. In order to estimate diagnostic accuracy, the value of Kappa was calculated for each pathologist and for the pathologist subgroups mode values. Program SPSS v.14.0 was used for statistical analysis of the data. According to the calculation, for a 0.7 Kappa, 95% confidence interval and 15% margin of error, at least 43 different cases of DCIS would be needed.

RESULTS

None of the participants (experts and non-specialists) disagreed with the diagnosis of DCIS in the 43 cases evaluated. The twelve pathologists perform their professional activities in hospitals linked to academic training centers. Three of the pathologists are experts in breast pathology. Ten pathologists mentioned that they generally employ Van Nuys classification to grade intraductal lesions of the breast; one pathologist adopts Holland classification, and one pathologist uses modified Lagios classification^{21,25}. Except for the resident doctor, all participants confirmed that they had practiced pathology for more than 5 years. Among the specialists in breast pathology, two had more than 15 years of practice, and one between 7 and 15 years. The expert pathologist defined as gold standard reports using modified Black classification for nuclear grade and Van Nuys in her routine to classify DCIS, and had practiced pathology between 7 and 15 years.

Table 2 shows the proportion of cases diagnosed for the two different classification schemes by the pathologist gold standard (the expert in breast pathology from the MD Anderson Cancer Center, USA).

Table 2: DCIS cases classified in each histological grade in the two classification systems, by the gold standard reference pathologist.

	Grade3 Poorly differentiated n (%)	Grade 2 Intermediately differentiated n (%)	Grade 1 Well differentiated n (%)
Modified Black Nuclear Grading System (MBNGS)	21 (48.8)	10 (23.3)	12 (27.9)
Holland (HL)	24 (55.8)	10 (23.3)	9 (20.9)

Table 3 shows the proportion of diagnosed cases according to Holland classification and modified Black nuclear grading system by each of the 12 pathologists, separated by subgroups: breast pathology specialists, not experts in breast pathology and pathology residents.

Table 3 Distribution of histological grading scores of 43 DCIS cases evaluated by the 12 pathologists.

Type	Pathologist	Modified Black Nuclear Grade			Holland		
		Grade 3 n (%)	Grade 2 n (%)	Grade 1 n (%)	Poorly differ. n (%)	Interm. differ. n (%)	Well differ. n (%)
Pathologists specialized in breast disease	A	27 (62.8)	13 (30.2)	3 (7.0)	22 (51.2)	19 (44.1)	2 (4.7)
	B	28 (65.1)	13 (30.2)	2 (4.7)	33 (76.7)	6 (14.0)	4 (9.3)
	C	23 (53.5)	13 (30.2)	7 (16.3)	25 (58.0)	9 (21.0)	9 (21.0)
Pathologists no specialized in breast disease	D	27 (62.8)	8 (18.6)	8 (18.6)	25 (58.1)	11 (25.6)	7 (16.3)
	E	17 (39.5)	17 (39.5)	9 (21.0)	21 (48.8)	14 (32.6)	8 (18.6)
	F	33 (76.7)	8 (18.6)	2 (4.7)	27 (62.8)	14 (32.6)	2 (4.7)
	G	20 (46.5)	22 (51.2)	1 (2.3)	18 (41.9)	24 (55.8)	1 (2.3)
	H	27 (62.8)	15 (34.9)	1 (2.3)	20 (46.5)	23 (53.5)	0 (0.0)
Pathology residents	I	26 (60.5)	16 (37.2)	1 (2.3)	25 (58.1)	16 (37.2)	2 (4.7)
	J	33 (76.7)	4 (9.3)	6 (14.0)	32 (74.4)	10 (23.3)	1 (2.3)
	K	21 (48.8)	18 (41.9)	4 (9.3)	31 (72.1)	11 (25.6)	1 (2.3)
	L	29 (67.4)	12 (27.9)	2 (4.7)	30 (69.7)	11 (25.6)	2 (4.7)

The classification systems evaluated in this study presented acceptable interrater reliability, as shown in Table 4. The classification systems of DCIS of the breast showed a

similar overall diagnostic reproducibility and obtained Kappa index of 0.23 ± 0.02 for Black and 0.27 ± 0.03 for Holland. Subdividing the pathologists according to their interest in breast pathology, there was a clear superiority of agreement among experts in breast pathology in relation to residents; comparing both ratings the difference was more significant in the modified Black nuclear grading scheme.

Table 4: Degree of interobserver agreement of breast CDIS for the two systems studied.

	All participating pathologists n = 12 $\kappa \pm SE$	Pathologists specialized in breast disease n = 3 $\kappa \pm SE$	Pathology residents n = 4 $\kappa \pm SE$
Modified Black Nuclear Grading System (MBNGS)	0.23 ± 0.02	0.43 ± 0.07	0.11 ± 0.05
Holland (HL)	0.27 ± 0.03	0.38 ± 0.09	0.23 ± 0.09
p-values:	0.002 when comparing specialists with residents for MBNGS. 0.156 when comparing specialists with residents for HL.		

Table 5 shows the degree of agreement between the pathologists and the gold standard pathologist (accuracy) for the two classification systems covered in this study.

For modified Black nuclear grading system, there was agreement among the 12 pathologists and the gold standard in 5 cases (11.6%). Taking experts into consideration, there was complete concordance with the gold standard in 20 cases (46.5%), 18 of those correspond to high-grade DCIS and only 2 cases, to low and moderate. The accuracy for each pathologist was estimated with Kappa statistics, and ranged from 0.02 ± 0.08 to 0.63 ± 0.10 , considered weak and good, respectively. The finding of Kappa values for the mode value representing all participating pathologists was 0.32 ± 0.10 . For the experts in breast diseases Kappa values ranged from 0.18 ± 0.10 to 0.63 ± 0.10 (weak and good, respectively), and for the residents, from 0.09 to 0.31 (weak and acceptable, respectively). Using the mode value, the Kappa value for experts was 0.34 ± 0.11 (acceptable), while for residents it was 0.19 ± 0.08 (weak).

Considering the Holland classification, there was a complete agreement among the 12 pathologists and the expert also in five cases (11.6%). The observed agreement between the pathologists and the gold standard pathologist had the test Kappa index ranging from 0.13 ± 0.13 to 0.64 ± 0.13 , considered weak and good, respectively, corresponding to the Kappa index of 0.32 ± 0.10 for the mode value. As noted, the accuracy was better in the expert

pathologists group, Kappa values ranged from 0.35 ± 0.15 to 0.64 ± 0.13 , values considered acceptable and good, respectively. For the mode value, the experts had a Kappa index of 0.33 ± 0.11 (acceptable). In this group, there was complete concordance with the gold standard in 23 cases (53.5%), comprising 19 cases of DCIS poorly differentiated, two cases of intermediately differentiated and two cases of well differentiated.

Comparing the Modified Black System and the Holland Classification there was no statistical significance difference between the Kappa of the mode for all groups of pathologists ($p > 0.842$).

Table 5: Degree of agreement of the pathologists with the expert pathologist (gold standard) for the two classification systems studied

Type	Pathologists	Modified Black $\kappa \pm EP$	Holland $\kappa \pm EP$
Pathologists specialized in breast disease	A	0.38 ± 0.10	0.48 ± 0.13
	B	0.18 ± 0.10	0.35 ± 0.15
	C	0.63 ± 0.10	0.64 ± 0.13
	MODE	0.34 ± 0.11	0.33 ± 0.11
Pathologists no specialized in breast disease	D	0.49 ± 0.11	0.40 ± 0.13
	E	0.40 ± 0.11	0.47 ± 0.12
	F	0.02 ± 0.08	0.29 ± 0.14
	G	0.21 ± 0.10	0.13 ± 0.13
	H	0.27 ± 0.10	0.20 ± 0.13
	MODE	0.26 ± 0.10	0.28 ± 0.10
Pathology residents	I	0.28 ± 0.10	0.26 ± 0.13
	J	0.09 ± 0.09	0.18 ± 0.15
	K	0.31 ± 0.11	0.57 ± 0.15
	L	0.26 ± 0.11	0.43 ± 0.14
	MODE	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.08
Total	MODE	0.32 ± 0.10	0.32 ± 0.10

p-values: 0.122 when comparing the mode for specialists with residents for MBNGS.

0.149 when comparing the mode for specialists with residents for HL.

DISCUSSION

Several studies have examined the degree of agreement in DCIS classifications^{3,7,28,33}. All of them varied in details, such as number of cases, origin of cases, divergence in the diagnosis of difficult cases, mode of exhibition of the cases, association with invading component, number of readings performed, pathologists origin and experience, and also whether there was some form of training prior to evaluating the cases. All the classification systems proposed consider primarily nuclear grade and necrosis, leaving the architectural pattern aside, or not taking it into account at all. The terminology of the classifications and the criteria used to compose them are different, but they share the recognition of three main subtypes of DCIS: high, intermediate, and low grade^{23,32}.

An ideal classification for DCIS should present a sort of characteristics. Firstly, it should be clinically useful, correlating the histological grade with the rate of local recurrence and progression to invasive carcinoma. Secondly, it should provide precise and unambiguous terms to define the characteristics of all different types of DCIS. Furthermore, it should be simple and easy to apply, even in cases with minimal DCIS compromised ducts. A high rate of agreement among pathologists is also important⁷.

This study included 43 cases of DCIS selected by convenience sampling. The data analyzed were obtained through a standardized questionnaire on Internet containing the criteria to classify the cases of DCIS of the breast. The use of a computer program, created in our institution, makes the process of classification simpler and faster, since the program itself determines the final grade in each system studied. This model was also adopted to restrain the subjective description of the histopathological criteria evaluated. Likewise, the cases were presented in digitized images, allowing every pathologist to evaluate the same area of interest of the histological section in each case.

Even using this method that provides a more objective analysis, it was observed that the reproducibility remained low for the systems evaluated. Moreover, the use of digitized images may have impaired the evaluation of the number of mitoses, due to the lack of microscopic fields, so the pathologist had to estimate this information for each case. As the modified Black nuclear grade take into account the number of mitoses, it could have contributed to low degree of concurrence shown in our study.

The comprehensive evaluation of five DCIS classifications by 23 European pathologists (the European Commission Working Group on Breast Screening Pathology) found that the inclusion of cell polarization, besides the nuclear grade, in reaching a final DCIS grade using Holland classification neither improved nor worsened the level of consistency that could be achieved by using nuclear grade only²⁸. In the current study, the reproducibility of Holland classification and modified Black nuclear grading were similar, confirming that previous affirmative. However, there is still no evidence that any characteristic beyond nuclear grade and necrosis has prognostic significance.

Our study showed low interobserver agreement on the final histological grade for the Holland and modified Black nuclear grading system. Whenever participants were divided into subgroups according to their interest in breast pathology, greater agreement was found among those self-named breast specialists. This fact suggests that probably the criterion that has greater influence on pathologists' agreement is the appropriate training and the development of precise definitions.

The most important aspect that can be drawn from the current study is that the modified Black nuclear grading system showed the same interobserver reproducibility and accuracy than the classification of Holland for DCIS. Therefore, the modified Black nuclear system can be an alternative to classify DCIS breast lesions. Pathologists specialized in breast pathology showed greater reproducibility and accuracy for both classifications compared to the others subgroups. These findings lead us to conclude that the academic institutions of this city should introduce training and quality-control programs in order to improve the rates of diagnostic agreement.

There are a number of potential limitations in this study. First, it could be argued that our results may not be representative of the level of agreement attainable in general pathology practice because of the small numbers of participating pathologists. We must also consider the fact that the participants were volunteers who made themselves available to participate in this study. Second, the pathologists in this study were asked to render their diagnosis following examination of selected digital images rather than following examination of whole histological sections under the microscope, as it is done in routine clinical practice. However, given that the goal of this study was to assess observer variability in the classification of specific lesions, we believe that the use of digital images could be regarded as a strength of

the study as it required the participants to base their diagnosis solely on microscopic features of the lesions in question without the aid of surrounding histological cues.

Regardless, our results should be analyzed with some caution, because this is a study with a unique methodology, both in case presentations and in the determination of the histological grade, based on criteria of a standardized questionnaire.

6. REFERENCES

1. Agresti, A. *Categorical data analysis*. 1st ed. New York: Wiley, 1990.
2. Badve, S.; A'Hern, R.P.; Ward, A.M.; Millis, R.R.; et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. *Hum Pathol*, 29: 915-23, 1998.
3. Bethwaite, P.; Smith, N.; Delahunt, B.; Kenwright, D. Reproducibility of a new classification schemes for pathology of ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol*. 51: 450-4, 1998.
4. Black, M.M.; et al. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer*, n. 36, p. 2048-55, 1975.
5. Black, M.M.; Opler, S.R.; Speer, F.D. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surgery Gynecology & Obstetrics*, n. 100, p. 543-51, 1955.
6. Burstein, H.J.; Polyak, K.; Wong, J.S.; Lester, S.C.; Kaelin, C.M. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*, 350: 1430-41, 2004.
7. Douglas-Jones, A.G.; et al. A critical appraisal of six modern classifications of ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS): correlation with grade of associate invasive carcinoma. *Histopathology*, Nov;29(5): 397-409, 1996.
8. Douglas-Jones, A.G.; et al. Consistency in the observation of feature used to classify duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *J Clin Pathol*, 53: 596-602, 2000.
9. Ernster, V.L.; Ballard-Barbash, R.; Barlow, W.E.; Zheng, Y.; Weaver, D.L.; Cutter, G.; Yankaskas, B.C.; Rosenberg, R.; Carney, P.A.; Kerlikowske, K.; Taplin, S.H.; Urban, N.; Geller, B.M. Detection of ductal carcinoma *in situ* in women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1546–1554, 2002.
10. Ernster, V.L.; Barclay, J.; Kerlikowske, K.; Grady, D.; Henderson, C. Incidence of and treatment for ductal carcinoma *in situ* of the breast. *JAMA*, 275: 913–918, 1996.

11. Fisher, B.; Dignam, J.; Wolmark, N; Mamounas, E.; Costantino, J; Poller, W.; Fisher, E.R.; Wickerham, D.L.; Deutsch, M.; Margolese, R.; Dimitrov, N.; Kavanah, M. Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *Journal of Clinical Oncology*, February 1, vol. 16 no. 2: 441-452, 1998.
12. Fisher, E.R.; Costantino, J.; Fisher, B.; et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) protocol B-17: Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ). *Cancer*, 75: 1310-19, 1995.
13. Fisher, E.R.; Redmond, C.; Fisher, B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu*, n. 15, p. 239-51, 1980.
14. Goldhirsch, A.; Glick, J.H.; Gelber, A.S.; et al. Meeting Highlights: International expert consensus on the primary therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology*, 16: 1569-83, 2005.
15. Harris, J.R.; Lippman, M.E.; Morrow, M.; Osborne, C.K. Diseases of the breast. 3.th. Lippincott Williams e Wilkins, p. 321-360, 2004.
16. Holland, R.; Peterse, J.L.; Millis, R.R.; Eusebi, V.; Faverly, van de Vijver, M.J.; Zafrani, B.; et al. Ductal carcinoma *in situ*: A proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol*, 11: 167-70, 1994.
17. Julien, J.P.; Bijker, N; Fentiman, I.S.; Peterse, J.L.; Delledonne, V.; Rouanet, P.; Avril, A.; Sylvester, R.; Mignolet, F.; Bartelink, H.; Van Dongen, J.A.. Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *Lancet*, Feb 12;355(9203): 528-33, 2000.
18. Kane, R.L.; Virnig, B.A.; Shamliyan, T.; Wang, S.; Tuttle, T.M.; Wilt, T.J. The Impact of Surgery, Radiation, and Systemic Treatment on Outcomes in Patients With Ductal Carcinoma In Situ. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (41): 130-133, 2010.
19. Kerlikowske, K. Epidemiology of Ductal Carcinoma In Situ *J Natl Cancer Inst Monogr*, (41): 139-141, 2010.
20. Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33: 159-74, 1977.
21. Lagios, M.D.; Margolin, F.R.; Westdahl, P.R.; et al: Mammographically detected duct carcinoma in situ. Frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer*, 63: 618-624, 1989.
22. Page, D.L.; Dupont, W.D.; Rogers, L.W.; et al: Intraductal carcinoma of breast: Follow up after biopsy only. *Cancer*, 49:751-758, 1982.
23. Rosen, P.P.; Oberman, H. *Tumors of the mammary gland*. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 135 -152, 1993.

24. Salles, M.A.; Mattos, M.A.; Resende, I.M.; Gobbi, H. Análise interobservador no diagnóstico histopatológico do carcinoma ductal in situ da mama. *Rev Brasil Ginecol Obstet*, 27: 1-6, 2005.
25. Scott, M.A. et al. Ductal Carcinoma *in situ* of the Breast: Reproducibility of Histological Subtype Analysis. *Hum Pathol*, n. 28, p. 967-73, 1997.
26. Schwartz, G.F.; Finkel, G.C.; Garcia, J.C.; Patchefsky, A.. Subclinical ductal carcinoma in situ of the breast. Treatment by local excision and surveillance alone. *Cancer*, 70: 2468-74, 1992.
27. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al: A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 77: 226 - 2274, 1996.
28. Sloane, J.P.; et al. Consistency achieved by 23 European pathologists in categorizing ductal carcinoma in situ of the breast using five classifications. *Hum Pathol*, Oct;29(10): 1056-62, 1998.
29. Sneige, N.; Lagios, M.D.; Swarting, R.; et al. Interobserver reproducibility of the Lagios nuclear grading system for ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*, 30: 257-62, 1999.
30. Svanholm, H.; Staklint, H.; Gundersen, H.J.G.; et al. Reproducibility of histomorphologic diagnosis with special reference to the kappa statistic. *APMIS*, 97: 689-698, 1989.
31. Tavassoli, F.A. *Patology of the Breast*. McGraw-Hill, 2 nd. p. 205 -312, 1999.
32. Tavassoli, F.A.; Devilee, P. (eds): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. IARC Press: Lyon, 60-81, 2003.
33. Wells, W.A.; Carney, P.A.; Eliassen, M.S.; Grove, M.R.; Tosteson, N.A. Pathologists' agreement with experts and reproducibility of breast ductal carcinoma in situ classification schemes. *Am J Surg Pathol*, 24: 651-9, 2000.

8 CONCLUSÕES

Respondendo aos objetivos propostos neste estudo, conclui-se que:

1. A reprodutibilidade do diagnóstico obtido através do questionário eletrônico em relação à leitura habitual, utilizando-se de imagens digitalizadas de cortes histológicos de lesões de CDIS de mama, foi semelhante quando aplicadas para os sistemas de classificação de Holland, Van Nuys e grau nuclear de Black modificado. Tanto o grau nuclear de Black modificado, quanto a classificação de Van Nuys apresentaram concordância intraobservador considerada boa, enquanto a de Holland apresenta uma concordância considerada moderada;
2. O emprego do questionário eletrônico e do sistema de pontos disponível no formato de website podem ser utilizados como métodos auxiliares para o diagnóstico de graduação histológica das lesões de CDIS de mama para a classificação de Holland, Van Nuys e grau nuclear de Black modificado;
3. Comparando o grau nuclear de Black modificado em relação à classificação de Holland, obteve-se semelhante reprodutibilidade diagnóstica entre os patologistas;
4. A acurácia diagnóstica, estimada através da comparação da moda para os diagnósticos de graduação histológica entre os patologistas avaliados com o padrão ouro, foi idêntica para o grau nuclear de Black e a classificação de Holland. Patologistas especialistas em patologia mamária mostraram maior reprodutibilidade em relação aos patologistas em geral, não dedicados à patologia mamária;
5. O emprego do grau nuclear de Black modificado, assim como a consulta a patologistas experientes em diagnóstico de alterações mamárias, pode contribuir para o diagnóstico de casos de CDIS de mama. São necessários novos estudos, que envolvam um maior número de participantes oriundos da comunidade e contenham um maior número de casos, para avaliar a sua aplicabilidade.

ANEXOS

ANEXO A: CRITÉRIOS PARA COMPOSIÇÃO DOS TRÊS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CDIS – HOLLAND, LAGIOS MODIFICADO E VAN NUYS.

Núcleo (*nuclei*):

- (100) Pleomórfico, anisonucleose, localização irregular, geralmente grandes (*pleomorphic nuclei, anisonucleosis, usually but not always large*)
- (10) Pleomorfismo discreto, localização mista, alguma variação de forma e tamanho, contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau (*nuclei showing some variation in nuclear size, outline and spacing*)
- (1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos (*monomorphic nuclei of uniform size, regular outline and spacing*)

- (100) Diâmetro > 2 hemácias ou Diâmetro de 3 vezes dos núcleos normais (*nuclei > 2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 3 fold variation in nuclear diameter*)
- (10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais (*nuclei 1.5 -2 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: 2 fold variation in nuclear diameter*)
- (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais (*nuclei 1-1.5 RBC diameter or nuclear size in relation to normal duct: similar, minimal enlargement*)

- (100) Cromatina vesicular (*coarse, clumped chromatin*)
- (10) Cromatina mista (*fine to coarse chromatin*)
- (1) Cromatina uniforme (*uniform, fine chromatin*)

- (10) 1 ou mais nucléolos (*evident nucleoli*)
- (2) Nucléolo infrequente (*nucleoli insignificant*)
- (1) Nucléolo ausente (*no nucleoli*)

Mitoses (*mitoses*):

- (10) Presente (*present*)
- (1) Ausente (*absent*)
- (100) > 20 por 10 campos (*> 20 mitoses per 10 HPF*)
- (10) 10-20 por 10 campos (*10-20 mitoses per 10 HPF*)
- (1) < 10 por 10 campos (*< 10 mitoses per 10 HPF*)

Polaridade (*polarization*):

- (100) Ausente / focal (*no true polarization of the cells with orientation toward a lumen*)
- (10) Presente, não proeminente (*polarization present but not pronounced*)
- (1) Proeminente (*all the cells have a well-defined apex and show polarization*)

Necrose (*necrosis*):

- (1000) Extensa - comedonecrose (*proeminent central necrosis - comedonecrosis*)
- (10) Focal (*any confluent necrosis*)
- (1) Ausente (*no necrosis*)

ANEXO B: EQUAÇÕES PARA GERAÇÃO DO ESCORE FINAL DO GRAU HISTOLÓGICO PARA OS SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DE CDIS: HOLLAND, VAN NUYS E GRAU NUCLEAR DE BLACK MODIFICADO

Holland	Van Nuys	Grau Nuclear de Black Modificado
<p>G1 < 6</p> <p>(1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p> <p>(1) Cromatina uniforme</p> <p>(1) Nucléolo ausente</p> <p>(1) Mitoses ausentes</p> <p>(1) Polarização proeminente</p>	<p>G1 < 50</p> <p>(10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais ou (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p> <p>(1) Cromatina uniforme</p> <p>(2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(10) Necrose focal ou (1) Necrose ausente</p>	<p>G1 < 6</p> <p>(1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p> <p>(1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p> <p>(1) Cromatina uniforme</p> <p>(1) Nucléolo ausente</p> <p>(1) Mitoses ausentes</p>
<p>G2 > 5 e < 90</p> <p>(10) Pleomorfismo discreto, localização mista, alguma variação de forma e tamanho, contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau ou (1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p> <p>(10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(10) Mitoses presentes ou (1) Mitoses ausentes</p> <p>(10) Polarização presente, não proeminente ou (1) Polarização proeminente</p>	<p>G2 > 1000 < 1030</p> <p>(10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais ou (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p> <p>(10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(1000) Extensa - comedonecrose</p>	<p>G2 > 5 < 90 ou >13 < 16 se mitoses ausentes</p> <p>(10) Pleomorfismo discreto, localização mista, alguma variação de forma e tamanho, contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau ou (1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p> <p>(10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais ou (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p> <p>(10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(1) Mitoses ausentes</p>
<p>G3 > 95</p> <p>(100) Pleomórfico, anisonucleose, localização irregular, geralmente grande ou (10) Pleomorfismo discreto, localização mista, alguma variação de forma e tamanho, contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau ou (1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p>	<p>G3 > 100 < 320 ou >1100</p> <p>(100) Diâmetro > 2 hemácias ou Diâmetro de 3 vezes dos núcleos normais ou (10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais ou (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p>	<p>G3 > 95 ou >13 < 16 se mitoses presentes</p> <p>(100) Pleomórfico, anisonucleose, localização irregular, geralmente grande ou (10) Pleomorfismo discreto, localização mista, alguma variação de forma e tamanho, contorno irregular, sem a monotonia do baixo grau ou (1) Grosseiramente esféricos, núcleos monomórficos, localização central, geralmente pequenos</p>

<p>(100) Cromatina vesicular ou (10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(10) Nucléolos evidentes ou (2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(10) Mitoses presentes ou (1) Mitoses ausentes</p> <p>(100) Polarização ausente / focal ou (10) Polarização presente, não proeminente ou (1) Polarização proeminente</p>	<p>(100) Cromatina vesicular ou (10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(10) Nucléolos evidentes ou (2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(1000) Extensa - comedonecrose ou (10) Necrose focal ou (1) Necrose ausente</p>	<p>(100) Diâmetro > 2 hemácias ou Diâmetro de 3 vezes dos núcleos normais ou (10) Diâmetro 1,5-2 hemácias ou Diâmetro de até 2 vezes dos núcleos normais ou (1) Diâmetro de 1-1,5 hemácias ou Diâmetro similar aos núcleos dos ductos normais</p> <p>(100) Cromatina vesicular ou (10) Cromatina mista ou (1) Cromatina uniforme</p> <p>(10) Nucléolos evidentes ou (2) Nucléolo infrequente ou (1) Nucléolo ausente</p> <p>(10) Mitoses presentes ou (1) Mitoses ausentes</p>
--	---	---