

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**

Gabriela Rosali dos Santos

**Expressão de receptores hormonais, HER2 e Ki-67 em  
Doença de Paget da Mama**

**Porto Alegre, 2008**

**Gabriela Rosali dos Santos**

**Expressão de receptores hormonais, HER2 e Ki-67 em  
Doença de Paget da Mama**

**Trabalho realizado no Instituto Europeu de Oncologia, Milão  
sob orientação da Dra. Viviana Galimberti e do Dr. Mattia Intra**

Dissertação para a obtenção do título de Mestre apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Orientadora: Maria Isabel Albano Edelweiss

**Porto Alegre, 2008**

**S237e** Santos, Gabriela Rosali dos  
Expressão dos marcadores moleculares em Doença de Paget da mama : trabalho realizado no Instituto Europeu de Oncologia, Milão sob orientação da Dra. Viviana Galimberti e do Dr. Mattia Intra / Gabriela Rosali dos Santos ; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2008.  
103 f.

**Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2008.**

1. Doença de Paget mamária 2. Carcinoma intraductal não infiltrante 3. Neoplasias mamárias 4. Antineoplásicos 5. Marcadores biológicos de tumor 6. Receptor erbB-2 I. Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Título.

NLM: QZ 365

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

---

## Dedicatórias

---

Aos meus pais, **Neri e Zenira**, porque me fizeram ser o que sou

Ao meu irmão, **Leandro**, pelo seu jeito de ser desligado e, ao mesmo tempo,  
preocupado

Aos meus tios, **Gel e João**, por estarem sempre ao meu lado

À minha mãe de coração, **Tê**, pela sua sensatez

Aos meus amigos e mestres **Dr. Ricardo Boff, Dr. Antônio Frasson, Dr. Mauricio Magalhães e Dr. Cícero Urban**, que me estimularam a continuar  
buscando o crescimento científico

Às **pacientes**, porque são elas a razão principal do meu trabalho.

## Agradecimentos

---

À minha orientadora, **Maria Isabel Albano Edelweiss**, pelo estímulo constante,  
a positividade contagiante e o apoio incondicional

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas**, pela oportunidade de  
crescimento científico

Ao **Serviço de Mastologia do Instituto Europeu de Oncologia**, onde fiz minha  
formação em mastologia

Aos colegas do Instituto Europeu de Oncologia, **Dra. Viviana Galimberti, Dr.  
Mattia Intra e Dra. Giovanna Gatti**, pelo apoio no desenvolvimento deste  
trabalho

As *datamanagers*, **Daniela Gilardi e Claudia Sangalo**, pelo incansável apoio

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES)** pelo apoio financeiro

A **Deus**, que possibilita tudo.

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo (1) em Inglês**

**Table 1** – Patients' characteristics

**Table 2** – Disease Histology

**Table 3** – Description of events

**Table 4** - Molecular markers

### **Artigo (1) em Português**

**Tabela 1** – Características clínicas, do tumor e do tratamento

**Tabela 2** – Patologia

**Tabela 3** – Eventos

**Tabela 4** – Marcadores Moleculares

### **Artigo (2) em Inglês**

**Table 1** - Patients' characteristics and stratification for histology

**Table 2** - Disease Histology

**Table 3** - Description of events

**Table 4** - Univariate analysis: survival stratified according to clinicopathologic features

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo (1) em Inglês

**Figure 1** - MPD showing Paget cells with atypical round or oval nuclei and abundant basophilic, amphophilic or clear cytoplasm. H&E 200x

**Figure 2** - MPD showing Paget cells with negative immunoreaction for ERs. IHQ anti ER- 200x

**Figure 3** - MPD showing Paget cells with nuclear positivity for Ki67 in more than 10% of tumor cells. IHQ anti MIB1- 200x

**Figure 4** - MPD showing Paget cells with nuclear positivity for Ki67 in almost 50% of tumor cells. IHQ anti MIB 1- 100x

**Figure 5** - MPD showing Paget cells with nuclear positivity for ERs (with underlying invasive ductal carcinoma). IHQ anti ER- 100x

**Figure 6** - MPD showing Paget cells with intense complete membrane staining (3+) for Her2 in almost 100% of tumor cells. IHQ – anti HER 2- 200x

### Artigo (1) em Português

**Figura 1** - DPM mostrando células de Paget com núcleos redondos atípicos ou núcleos ovais e abundante basofílicos ou claros citoplasmas. H&E 200x

**Figura 2** - DPM mostrando células de Paget com imunorreação negativa para RE. IHQ anti RE- 200x

**Figura 3** - DPM mostrando células de Paget com positividade para Ki-67 em mais de 10% das células tumorais. IHQ anti MIB1- 200x

**Figura 4** - DPM mostrando células de Paget com positividade para Ki-67 em mais de 50% das células tumorais. IHQ anti MIB 1- 100x

**Figura 5** - DPM mostrando células de Paget com positividade para RE (carcinoma ductal invasor associado). IHQ anti ER- 100x

**Figura 6** - DPM mostrando células de Paget com intensa reação para HER2 (3+) em quase 100% das células tumorais. IHQ – anti HER 2- 200x

### **Revisão Bibliográfica**

**Figura 1** - Macrofotografia de um mamilo que demonstra ductos galactóforos com alterações características de DPM na epiderme.

**Figura 2** (a e b) - DPM associada com envolvimento de ductos do mamilo e originada pela infiltração de células de CDIS de alto grau na epiderme do mamilo. Estas células podem ser demonstradas usando imunocoloração para citoqueratinas glandulares de baixo peso molecular (b).

**Figura 3** - DPM mostrando pele da aréola com infiltração de células maiores (células de Paget) disseminadas e infiltrando o epitélio até a superfície. Os núcleos são pleomórficos e as células maiores que as normais. Na superfície vê-se o aspecto queratinizado esboçando crostas. H&E 200x.

**Figura 4** - (A) DPM mostrando células carcinomatosas intraepidermais, H&E 200x. (B) Marcada reação completa para HER-2/Neu por imuno-histoquímica, 200x. (C) Cortes de DPM com carcinoma invasor e carcinoma *in situ* moderadamente diferenciados, H&E 100x. (D) Moderada e difusa positividade de HER-2/Neu em carcinoma invasor e carcinoma *in situ*. 100x. (E) Amplificação de HER-2/Neu demonstrada por FISH, 100x. (F) DPM mostrando células intraepidermais, H&E 200x. (G) Positividade dos receptores de estrogênio por imuno-histoquímica dentro das células neoplásicas, H&E 200x. (H) Carcinoma ductal invasor moderadamente diferenciado, H&E 100x. (I) Receptores de estrogênio positivos dentro das células neoplásicas por imuno-histoquímica, 100x.

### **Artigo (2) em Inglês**

**Fig. 1** - Tumor specific survival

**Fig. 2** - Disease free survival



## LISTA DE ABREVIATURAS

ALND - *axillary lymph node dissection*

BLS - biópsia do linfonodo sentinela

CAP - complexo aréolo-papilar

CI – carcinoma infiltrante

CDIS - carcinoma *in situ*

CMF – Ciclofosfamida, Metotrexate e Fluorouracil

DA - dissecação axilar completa

DCIS - *ductal carcinoma in situ*

DPM – Doença de Paget da Mama

EIO - *European Institute of Oncology*

ER – *estrogen receptor*

FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 2

H&E - hematoxilina e eosina

IEO - Instituto Europeu de Oncologia

IHQ – imuno-histoquímica

LS – linfonodo sentinela

MRI – *Magnetic resonance imaging*

MRM - Mastectomia Radical Modificada

RM – ressonância magnética

PPGCM – Programa Pós-Graduação em Ciências Médicas

PR - *progesterone receptor*

RE – receptor de estrogênio

RP – receptor de progesterona

SLB - *sentinel node biopsy*

SNL - *Sentinel lymph node*

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1. HISTÓRICO.....	14
2.2. ETIOPATOGENIA.....	14
2.3. QUADRO CLÍNICO.....	15
2.4. HISTOPATOLOGIA .....	19
2.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	23
<b>2.5.1. HER2.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1. Receptores de estrogênio e progesterona.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1. Ki-67.....</b>	<b>28</b>
2.6. DIAGNÓSTICO.....	28
2.7. TRATAMENTO.....	30
2.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
<b>3. OBJETIVOS DO ESTUDO.....</b>	<b>33</b>
3.1.OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. ARTIGO (1) EM INGLÊS.....</b>	<b>41</b>
<b>6. ARTIGO (1) EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>63</b>
<b>7. ARTIGO (2) EM INGLÊS.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Paget na mama (DPM) foi descrita por *Sir James Paget* em 1874 <sup>1</sup>. Trata-se de uma doença infrequente, representando 0,5 a 4,3% de todos os casos de carcinoma mamário <sup>2</sup>.

Inicialmente, acreditava-se que o processo de malignização se originava nos ductos lactíferos progredindo até a epiderme, a chamada teoria epidermotrófica, o que explicaria o fato de aproximadamente 97% das pacientes com DPM apresentam um carcinoma subjacente <sup>4-10</sup>. Além disso, na maioria dos casos, a característica imunofenotípica das células de Paget é a mesma do carcinoma associado <sup>11-13</sup>.

Achados imuno-histoquímicos apontam forte evidência a favor da teoria do epidermotropismo, pois mostram uma variedade de anticorpos monoclonais específicos, que foram expressos tanto no epitélio dos ductos da mama normal quanto nas células de Paget, não sendo expressos em outras células da epiderme.

Outra teoria, a chamada teoria da transformação intra-epitelial, propõe que as células de Paget proliferam na porção terminal dos ductos lactíferos, na junção com a epiderme. Estas são células epiteliais alteradas, que são transformadas dentro do próprio epitélio. Essa teoria explica o fato que raros casos de DPM não apresentam câncer de mama subjacente <sup>6,14-16</sup> ou nos casos em que a doença de Paget e o câncer são tumores distintos <sup>17</sup>.

A DPM ocorre mais freqüentemente em mulheres pós-menopáusicas, com maior incidência entre 60 e 70 anos de idade <sup>18</sup>. Ou seja, ocorre 5 a 10 anos mais tarde que o pico de incidência do carcinoma mamário <sup>18,19,10</sup>.

O diagnóstico da DPM é eminentemente clínico, e muitas vezes, os achados mamográficos são normais.

O diagnóstico pode ser obtido por raspado citológico, biópsia superficial da epiderme, biópsia incisional ou exérese do mamilo, com posterior exame anátomo-patológico.

Os marcadores moleculares são importantes tanto para esclarecer prognóstico como para a escolha da terapia adjuvante. Na DPM, estes ainda não tem sido tão bem caracterizados.

A hiperexpressão ou amplificação de HER2 é detectada em aproximadamente 20-30% dos casos de carcinomas ductais infiltrativos da mama, e tem sido relacionada à presença de tumores mais agressivos e com prognóstico desfavorável <sup>44</sup>. É extremamente alta a incidência de HER2 nas células de Paget associadas a carcinoma. A literatura relata em torno de 80% dos casos com positividade para HER2, sugerindo que esta oncoproteína possa promover proliferação celular tumoral intraepitelial <sup>51</sup>.

A DPM parece ser um verdadeiro marcador cutâneo de risco de um câncer glandular profundo, mas com o prognóstico ligado à agressividade do carcinoma subjacente. Sua histogênese e fatores de risco não foram elucidados por completo e, sendo uma doença rara, existem poucos estudos conclusivos.

A literatura mostra positividade de HER2 na DPM associada ao carcinoma, o que falaria a favor de um pior prognóstico. Conseguindo avaliar a expressão deste marcador molecular, talvez se possa contribuir para a elucidação de alguns aspectos do comportamento desta doença, para se alcançar uma melhor abordagem terapêutica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. HISTÓRICO

A doença de Paget da mama (DPM) foi descrita por James Paget em 1874 <sup>1</sup> como uma doença incomum, que representa 0,5 a 4,3% de todos os casos de carcinoma mamário <sup>2</sup>.

Antes de Paget, em 1856, Velpeau descreveu a presença de lesão com crosta, sangramento e ulceração no complexo aréolo-papilar (CAP), mas não reconheceu a relação entre as suas observações e o câncer de mama subjacente <sup>3</sup>.

Então, em 1874, Paget publicou um estudo com 15 mulheres, que apresentavam inicialmente erupções eczematosas na papila e aréola, e que após dois anos de observação foram acometidas por um câncer na glândula mamária <sup>1</sup>. Assim, evidenciou a associação entre a lesão de pele do CAP e o câncer de mama subjacente, recebendo essa doença o seu nome, e o aspecto das células intra-epiteliais foram definidas como células de Paget.

### 2.2. ETIOPATOGENIA

Existem duas teorias para explicar a origem da DPM. A teoria epidermotrófica, descrita primeiramente por Jacobetis, que é a mais amplamente aceita, sugere que as células de Paget crescem nos ductos mamários e progridem ao longo dos sinusóides lactíferos até a epiderme do mamilo <sup>4-10</sup>. Essa teoria é baseada no fato que aproximadamente 97% das pacientes com DPM apresentam um carcinoma subjacente <sup>4-10</sup> e que na maioria dos casos, a característica imunofenotípica das células de Paget é a mesma do câncer de mama <sup>11-13</sup>.

A teoria da transformação intra-epitelial propõe que as células de Paget proliferem na porção terminal dos ductos lactíferos, na junção com a epiderme <sup>6</sup>. Trata-se de células epiteliais alteradas, que são transformadas dentro do próprio epitélio. Essa teoria é baseada no fato de que raros casos de DPM não apresentam câncer de mama subjacente <sup>6,14-16</sup> ou nos casos em que a doença de Paget e o câncer são tumores distintos <sup>17</sup>. Essa teoria presume que a DPM é um processo independente de qualquer carcinoma da mama subjacente <sup>18</sup>. Alguns estudos com microscopia eletrônica

demonstraram microvilosidades e ligação de desmossomas entre os queratinócitos e as células de Paget, achados que fariam contra a natureza migratória das células de Paget e sugerem uma origem epidérmica<sup>18</sup>. Essa teoria também explicaria os casos de DPM associada com carcinoma mamário distante do CAP<sup>18</sup>.

Embora seja mais aceita a teoria de que as células de Paget sejam originadas de um carcinoma subjacente<sup>19</sup>, a histopatogênese correta das células de Paget permanece controversa.

### **2.3. QUADRO CLÍNICO**

A DPM ocorre mais freqüentemente em mulheres pós-menopáusicas, com maior incidência entre 60 e 70 anos de idade. Isso significa 5 a 10 anos mais tarde que o pico de incidência do carcinoma mamário<sup>10, 20, 21</sup>.

A maioria das mulheres apresenta alteração do CAP, mas 10 a 28% dos casos são identificados apenas na análise histológica do CAP das peças cirúrgicas de mastectomia, ou seja, não apresentam evidência de lesão clínica<sup>22</sup>.

Não existe nenhum fator clínico ou epidemiológico conhecido que comprovadamente seja relacionado à patogênese e a uma maior predisposição ao desenvolvimento da DPM. A literatura cita alguns casos especiais, como o aparecimento da DPM após 8 anos a mastectomia subcutânea por doença fibrocística<sup>23</sup> e em um caso de uma paciente de 35 anos com esclerodermia envolvendo a pele que apresentava DPM concomitante<sup>23</sup>.

As queixas clínicas mais comuns são prurido e ardência. Geralmente, pode se apresentar com eritema, que evolui para pele espessada, áspera e rugosa. Há o aparecimento de pequenas vesículas, que sofrerão erosão com exsudação serosa ou sanguinolenta. As primeiras manifestações podem ser insignificantes, e apresentam-se como vesículas pequenas que surgem e cicatrizam, recorrem ou progridem.

Normalmente, a lesão inicia na papila e vai espalhando-se para a aréola e, raramente, envolve a pele circunjacente. Evolui para ulceração à medida que ocorre infiltração de células neoplásicas na epiderme. Nesse estágio, uma secreção serosa ou sanguinolenta pode ser observada. Também nota-se retração mamilar, embora seja mais freqüente que essa retração se deva ao tumor subjacente.

Há três formas de apresentação ao exame clínico:

- apenas com alterações no CAP,
- alterações do CAP associadas a tumor palpável na mama,
- como doença subclínica, não se observando alterações no exame clínico e o diagnóstico sendo feito apenas pelo exame anátomo-patológico da peça cirúrgica de mastectomia.

Muitas vezes, por parecer uma lesão eczematóide comum, há relutância em acreditar que uma lesão aparentemente simples possa ser uma doença maligna, então, nesses casos, o diagnóstico pode ser retardado em até 10 a 12 meses <sup>4,8-10</sup>.

A apresentação bilateral é extremamente rara. Kijima e colaboradores relatam um caso de carcinoma de mama com DPM bilateral sincrônico <sup>24</sup>.

A DPM também pode ocorrer em homens, tendo sido citados apenas 51 casos até 1982 <sup>25</sup>. Ucar e colaboradores relataram um caso de DPM associado a carcinoma ductal infiltrante bilateral em um homem de 74 anos <sup>26</sup>. Embora o comportamento clínico no homem pareça ser semelhante ao observado na mulher, parece que os homens apresentam pior prognóstico, com uma taxa de sobrevida estimada de 20 a 30% em 5 anos <sup>25</sup>.

Aproximadamente 60 % dos casos de DPM apresentam massa palpável <sup>27</sup> e, nesses casos, frequentemente, a doença está associada a um carcinoma infiltrante <sup>4,10</sup>, tendo sido relatado comprometimento axilar em 45 a 66% <sup>5</sup>.

Nos casos com lesão clínica não palpável representa uma lesão não invasiva (CDIS) em aproximadamente 90% dos casos <sup>4,10</sup>. Pode-se observar até 40% de casos de associação com carcinoma invasor, na ausência de tumor palpável, com comprometimento axilar de 5 a 13% <sup>5</sup>.





Figura 1- Macrofotografia de um mamilo que demonstra ductos galactóforos com alterações características de DPM na epiderme .Fonte: Ortega JMG et al. Disponível na web em 24/09/2005 em [http://www.conganat.org/7congresso/final/vistalmpression.asp?id\\_t](http://www.conganat.org/7congresso/final/vistalmpression.asp?id_t)

A média de idade das pacientes que apresentam massa palpável foi descrita em um estudo<sup>9</sup> como significativamente menor (49 anos) se comparada às pacientes que não apresentam massa palpável (58 anos).

Em 30-50% dos casos o diagnóstico de carcinoma subjacente à DPM é concomitante, observando-se na palpação nódulo aderido à aréola ou mais distante, sugerindo carcinoma invasor, ou por exames de imagem, como mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética (RM)<sup>28</sup>.

James Paget, já na sua descrição original, referiu a possibilidade de formas extra-mamárias da doença de Paget<sup>1</sup>, podendo estar presente na vulva, região perianal, pálpebras, esôfago, canal auricular e cavidade oral, áreas onde se observam maior quantidade de glândulas apócrinas. As formas mamárias e extra-mamárias mostram muitas características clínico-patológicas semelhantes, mas mostram algumas diferenças, principalmente no que se refere à patogênese e à associação com malignidade subjacente. Ambas as formas apresentam células de Paget em meio à epiderme, fator patognomônico para o diagnóstico.

O diagnóstico diferencial deve ser feito com eczema crônico, dermatite de contato, dermatite actínica, cancro sífilítico, psoríase, melanoma maligno, papiloma

intraductal benigno, carcinoma de células basais, doença de Bowen (carcinoma intra-epitelial), ectasia ductal mamária, leiomiomas do mamilo, pênfigo vulvar e escabiose<sup>29-31</sup>.

Existe uma variante rara chamada DPM pigmentada, que pode simular clinicamente e no exame dermatoscópico um melanoma cutâneo, sendo diferenciada pela imuno-histoquímica<sup>32</sup>. A presença de receptores de estrogênio nos núcleos das células de Paget exclui o diagnóstico de melanoma<sup>30</sup>. A positividade para proteína S-100, HMB-45, Melan A e outros marcadores de melanoma confirmam a origem melanocítica da lesão. O estudo imuno-histoquímico para AE1/AE3 e para as citoqueratinas 8-18 é positivo na DPM, confirmando também a origem epitelial da lesão, já para a citoqueratina SAB-902 é negativo<sup>31,32</sup>.

Existe uma situação que requer uma atenção especial do mastologista que é o aparecimento de eczema suspeito no CAP após tratamento conservador de câncer de mama. Existe a possibilidade de uma recorrência ipsilateral manifestar-se clinicamente como DPM<sup>36</sup>. Menzies e colaboradores citaram 3 casos de recorrência local na forma de DPM, o que correspondeu a 8% do total das recorrências observadas<sup>37</sup>. Os 3 casos apresentavam diagnóstico inicial de CDIS<sup>37</sup>. Portanto, quando houver qualquer alteração no CAP, especialmente naquelas pacientes já tratadas por câncer de mama, deve-se prosseguir a investigação.

Existem três fatores importantes que determinam a má evolução das pacientes com DPM:

- presença de massa palpável na apresentação,
- presença de carcinoma invasor da mama subjacente e
- comprometimento axilar.

O prognóstico das pacientes com DPM sem massa palpável é melhor se comparado com àquelas com massa palpável, cita-se taxas de sobrevida entre 42 e 100% (média 85%) *versus* 0 a 43% (média 32%) em 5 anos, e 75 a 90% (média 80%) e 0 a 56% (média 31%) em 10 anos, respectivamente<sup>4,6</sup>. Estudos posteriores mostraram aumento nas taxas de sobrevida (90-100% vs 20-60% em 5 anos e 85-100% vs 9-60% em 10 anos, respectivamente)<sup>5,10</sup>. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que lesões sem massa palpável representam geralmente processos não invasivos e

intraepiteliais, enquanto uma lesão palpável é frequentemente associada com carcinoma invasivo.

Mulheres que apresentam massa palpável e achados mamográficos suspeitos têm significativamente piores taxas de sobrevida livre de doença quando comparadas com àquelas sem tumor palpável e mamografia normal (60% em 5 anos *versus* 90% em 5 anos)<sup>38</sup>.

#### **2.4. HISTOPATOLOGIA**

Na DPM há células do tipo adenocarcinoma dentro da epiderme do mamilo (Fig 2 e 3). Na análise deve ser excluída invasão da epiderme por tumor infiltrando a pele. O diagnóstico de DPM deve ser sempre incluído no laudo histopatológico. O carcinoma subjacente deve ser relatado separadamente.

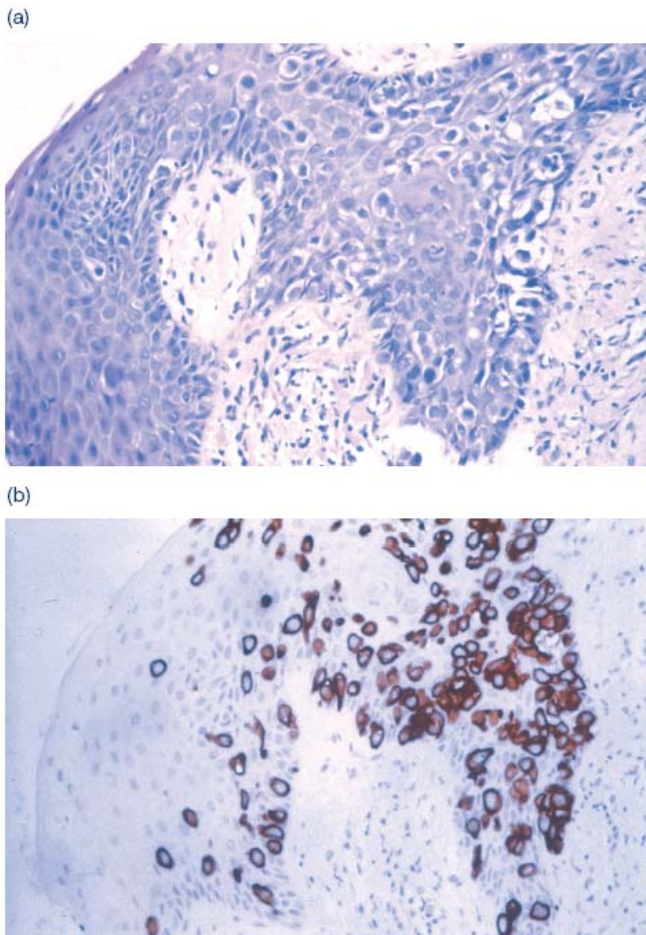


Figura 2 (a e b) DPM é associada com envolvimento de ductos do mamilo e se origina pela infiltração de células de CDIS de alto grau na epiderme do mamilo. Estas células podem ser demonstradas usando imunocoloração para citoqueratinas glandulares de baixo peso molecular (b). Fonte: NHS Cancer Screening Programmes. PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005 p.59.

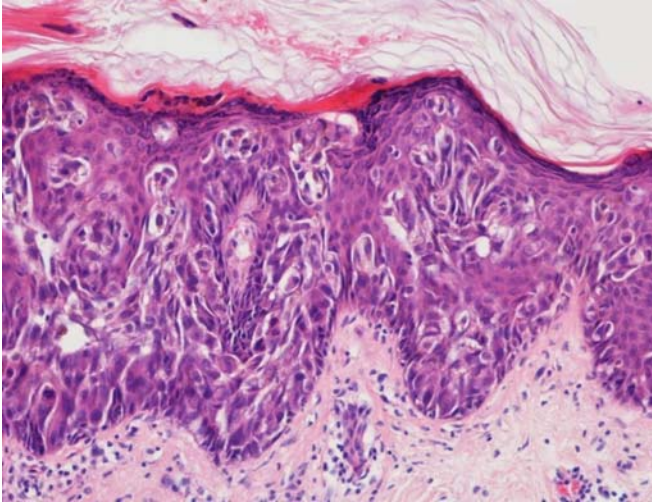


Figura 3- DPM mostrando pele da aréola com infiltração de células maiores (células de Paget) disseminadas e infiltrando o epitélio até a superfície. Os núcleos são pleomórficos e as células maiores que as normais. Na superfície vê-se o aspecto queratinizado esboçando crostas. H&E 200x. Fonte: NHS Cancer Screening Programmes. PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE. NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005 p.59.

Os tumores mamários são classificados histologicamente de acordo com a Classificação Histológica da Organização Mundial da Saúde, modificada por Rosen e Obermann<sup>39</sup>. O grau tumor é determinado de acordo com Elston e Ellis<sup>39</sup>. Esse sistema é uma modificação do sistema de graduação proposto por Bloom e Richardson, em 1957. Na formação de túbulo, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, cada um é avaliado numa escala de 1 a 3. A soma dos resultados para esses três parâmetros fornece o grau histológico total; assim, tumores para os quais a soma dos resultados é de 3 a 5 são designados grau 1 (bem diferenciado), os com soma de 6 e 7 são designados grau 2 (moderadamente diferenciado) e aqueles cujo resultado somou 8 ou 9 são designados de grau 3 (pouco diferenciado)<sup>40</sup>. A invasão vascular peritumoral é avaliada conforme Rosen e Obermann<sup>39</sup>.

A classificação TNM dos tumores malignos da União Internacional contra o câncer (UICC), já na 6ª edição<sup>41</sup>, agrupa os casos de acordo com dados clínico-patológicos no momento do diagnóstico primário e tratamento cirúrgico loco-regional; é usada para selecionar pacientes e relatar os desfechos em ensaios clínicos,

possibilitando aos clínicos avaliar com base lógica se as estratégias de tratamento relatadas na literatura serão apropriadas para seus pacientes.

A DPM é classificada como Tis quando não apresenta tumor associado, ou quando está associada a um carcinoma *in situ*, e, nos casos em que está associada a um carcinoma invasor, será classificada conforme o componente invasor.

Aproximadamente 90% dos casos de DPM apresentam associação com carcinoma *in situ* ou carcinoma infiltrativo, podendo ser multifocal<sup>4</sup>. Raramente tem sido relatada associação com tipos especiais de carcinomas, como papilar e medular<sup>4</sup> ou carcinoma ductal surgindo em papilomatose florida (adenoma) do mamilo<sup>42</sup>. A DPM é uma manifestação muito rara do carcinoma lobular *in situ*<sup>42</sup>.

A DPM parece ser mais associada aos subtipos histológicos sólido e comedo carcinomas<sup>5</sup>. Estes subtipos são considerados biologicamente mais agressivos, com alto grau nuclear, alto índice de mitoses e amplificação do oncogene c-erbB2<sup>43,44</sup>. Também tem sido associada com extenso carcinoma *in situ*<sup>45</sup>.

Focos de carcinoma ductal com padrão cribriforme e papilar podem ser encontrados, mas os ductos lactíferos ligados diretamente à DPM contêm comedo carcinoma na maioria dos casos. Carcinoma cribriforme e papilar são vistos em cerca de 10% dos casos e em 40% dos casos associados a carcinoma intraductal<sup>15</sup>.

O carcinoma invasivo associado à DPM tipicamente é pouco diferenciado, do padrão sólido, e, raramente, se desenvolve na porção superficial ou terminal dos ductos lactíferos<sup>15</sup>.

Kothari relatou que 60% de todos os casos de DPM associados a carcinoma invasor eram grau III<sup>46</sup>, significando maior predisposição a metástases e pior prognóstico. Também relatou que 96,5% dos casos com carcinoma *in situ* subjacente eram de alto grau histológico<sup>46</sup>.

Nos casos em que se realiza a biópsia do linfonodo sentinela (BLS), pode ser feita a análise trans-operatória do linfonodo sentinela (LS), tendo cada instituição a sua rotina para a avaliação do mesmo. O Instituto Europeu de Oncologia, em Milão, na Itália (IEO) realiza uma média de 60 cortes para cada linfonodo.

No IEO os linfonodos sentinelas maiores que 5 mm são cortados a fresco no seu eixo maior e fixados em formalina 10% por 6 a 8 horas, antes de serem incluídos em parafina. Os linfonodos menores que 5 mm são incluídos inteiros. Quinze pares de

secções do preparado de parafina, de 4- $\mu$ m de espessura, são seccionados a intervalos de 50- $\mu$ m. Se persiste tecido residual, pares adicionais são seccionados a intervalos de 100- $\mu$ m até que o linfonodo seja inteiramente processado. Um corte de cada par é corado com hematoxilina e eosina (H&E). Quando necessário, para definir a natureza de células atípicas vistas nos cortes de H&E, o corte correspondente do par é testado para citoqueratinas usando um método rápido de processamento (EPOS Anti-cytokeratins/HRP; Dako, Copenhagen, Denmark)<sup>47</sup>.

Os linfonodos não-sentinelas são divididos pelos níveis de Berg. Estes são cortados se maiores 5 mm, incluídos totalmente e processados rotineiramente na parafina. Cada linfonodo é seccionado a intervalos de 100-500  $\mu$ m e 3 a 6 cortes corados com H&E são examinados.

## 2.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação de receptores hormonais e da proliferação tumoral são realizadas pela técnica de imuno-histoquímica em cortes fixados em formalina e embebidos em parafina do tumor primário usando o sistema denominado de avidina-biotina-peroxidase<sup>47</sup>. Os anticorpos monoclonais para receptores de estrogênio e progesterona (Dako, Glostrup, Denmark) são usados na diluição de 1/100, e o anticorpo monoclonal anti-MIB-1 para antígeno Ki-67 (Immunotech, Marseilles, France) é usado na diluição de 1/200<sup>47</sup>. Todos revelam marcação nuclear quando positivos.

Os marcadores moleculares são importantes tanto para esclarecer prognóstico como para a escolha da terapia adjuvante. Na DPM, os marcadores moleculares ainda não tem sido tão bem caracterizados como nos carcinomas invasores.

Achados imuno-histoquímicos apresentam forte evidência a favor da teoria do epidermotropismo, pois mostram uma variedade de anticorpos monoclonais específicos, que foram expressos tanto no epitélio dos ductos da mama normal quanto nas células de Paget, não sendo expressos em outras células da epiderme. Além disto, tem sido demonstrado que as células de Paget e o carcinoma de mama apresentam imunorreatividade à caseína, às globulinas do leite, às lecitinas, ao antígeno epitelial de membrana, ao antígeno carcinoembrionário, à proteína S-100 e à proteína HER2, mostrando que o carcinoma subjacente tem fenótipo similar às células de Paget.

### 2.5.1. HER2

O gene HER2 codifica uma proteína da membrana celular expressa em praticamente todas as células epiteliais, a qual constitui o receptor de tirosina-quinase, (conhecido também como C-erbB2 e HER2/neu), pertencente a mesma família do receptor do fator de crescimento epidérmico <sup>48</sup>. Slamon e colaboradores foram os primeiros a ligar a hiperexpressão do HER2 com mau prognóstico no câncer de mama. Eles estudaram a associação entre a amplificação do gene HER2 com a recorrência e morte em pacientes com axila positiva e demonstraram que a amplificação do HER2 estava significativamente associada com a taxa de recorrência e diminuição da sobrevida; sendo estas correlações independentes de outros fatores prognósticos, e tão significativas quanto o estado da axila para recorrência e morte.

O HER2 trata-se de um proto-oncogene localizado no cromossoma 17q21, que codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade intrínseca de tirosina quinase homóloga ao receptor do fator de crescimento epidérmico. A proteína HER2, quando ligada aos fatores de crescimento tumoral, inicia uma cascata de reações que promove a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento tumoral <sup>49</sup>.

A hiperexpressão de HER2 é avaliada por imuno-histoquímica pelo Kit Dako Hercept- Test <sup>50</sup>. O resultado depende da intensidade da coloração das células na membrana citoplasmática e são descritos conforme segue abaixo <sup>51</sup>:

NEGATIVO- 0 ou 1+: significa que não houve reação das células da membrana (zero) ou ocorreu reação leve incompleta em menos de 10% das células (1+),

INDETERMINADO- 2+: significa que houve reação moderada completa em mais de 10% das células. O escore 2+ requer confirmação pelo exame de hibridização *in situ* (FISH ou CISH).

POSITIVO - 3+: significa que houve marcada reação completa em mais de 10% das células tumorais.

A hiperexpressão de HER2 é detectada em aproximadamente 20-30% dos casos de carcinomas ductais infiltrativos da mama, e tem sido relacionada a tumor mais agressivo e com prognóstico desfavorável <sup>44</sup>.



É extremamente alta a incidência de HER2 nas células de Paget associadas a carcinoma. A literatura relata em torno de 80% dos casos com positividade para HER2<sup>51</sup>, sugerindo que esta oncoproteína possa promover proliferação celular tumoral intraepitelial.

O HER2 é expresso em aproximadamente 20% dos carcinomas ductais invasivos, em 50% dos carcinomas ductais in situ e em mais de 90% dos casos de DPM<sup>44,52</sup>.

O HER2 é considerado um fator preditivo e prognóstico do câncer de mama. É considerado um fator preditivo por ser o alvo principal da terapia com Trastuzumabe, e um fator prognóstico por estar associado a maior agressividade tumoral<sup>49</sup>.

O estado do HER2 também prediz a resposta antiestrogênica e à quimioterapia citotóxica<sup>48</sup>, sendo que os pacientes com forte expressão de HER2 parecem ter uma pobre resposta aos agentes hormonais como tamoxifeno e também aos quimioterápicos não-antracíclicos<sup>53</sup>.

Acredita-se que a resistência a terapia hormonal tanto “in vitro” como “in vivo”, esta relacionada ao “bypass” do receptor de estrógeno pelo sinal do receptor do fator de crescimento. Dois grandes estudos com câncer primário de mama encontraram uma correlação significativa entre os níveis elevados de HER2 na circulação e baixos níveis de receptores de estrógenos e progesterona no tumor primário<sup>54,55</sup>.

Estudos mostram associações entre HER2 e uma variedade de outros marcadores de pior prognóstico, incluindo RE negativo, metástases nodais, maior tamanho tumoral, alto grau tumoral, tipos histológicos mais agressivos, tais como carcinoma inflamatório, ploidia de DNA aumentada, alta atividade mitótica e presença de metástases hematogênicas à distância<sup>56</sup>. A hiperexpressão de HER2 também está correlacionada com uma diminuição da sobrevida<sup>57,58</sup>.

A imunorreatividade ao HER2 leva a sugerir a hipótese de que há um fator de quimiotaxia, secretado nos queratinócitos, que atraem as células de Paget para a epiderme<sup>44</sup>.

A interpretação dos estudos que analisam a expressão do HER2 é limitada pela variabilidade de métodos empregados para detectar sua hiperexpressão. Os métodos usados podem identificar a expressão da proteína de membrana ou a própria

amplificação gênica <sup>49</sup>. As técnicas de imuno-histoquímica detectam a proteína, enquanto a técnica de Hibridização *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization* – FISH), quando usada a imunofluorescência, ou Hibridização *in situ* cromogênica (*Chromogenic in situ hybridization*- CISH), quando usada a imuno-histoquímica, medem a amplificação gênica. Sabe-se que existe uma intensa correlação entre amplificação gênica e a hiperexpressão proteica <sup>49</sup>.

Fu e colaboradores, em um estudo com 19 pacientes com DPM, demonstraram que em 93,9% dos casos houve positividade de HER2 <sup>19</sup>. Enquanto Anderson e colaboradores mostraram 80% de positividade de HER2 nos casos de DPM, com 100% de concordância com o tumor subjacente tanto por imuno-histoquímica como pelo teste de FISH, com uma casuística de 20 pacientes <sup>51</sup>. (Figura 4)

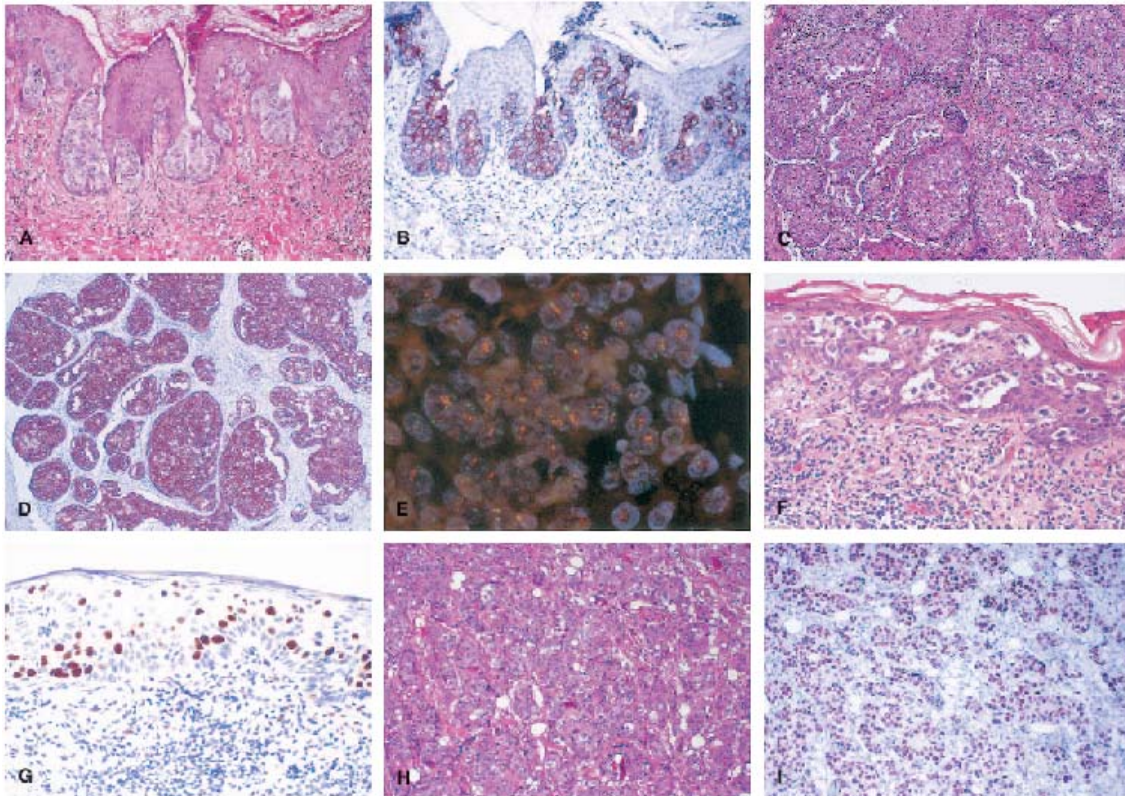


Figura 4: (A) DPM mostrando células carcinomatosas intra-epidérmicas, H&E 200x. (B) Marcada reação completa para HER2 por imuno-histoquímica (CISH), 200x. (C) Cortes de DPM com carcinoma invasor e carcinoma *in situ* moderadamente diferenciados, H&E 100x. (D) Moderada e difusa positividade de HER2 em carcinoma invasor e carcinoma *in situ*. 100x. (E) Amplificação de HER2 demonstrada por FISH, 100x. (F) DPM mostrando células intra-epidérmicas, H&E 200x. (G) Positividade dos receptores de estrogênio por imuno-histoquímica dentro das células neoplásicas, H&E 200x. (H) Carcinoma ductal invasor moderadamente diferenciado, H&E 100x. (I) Receptores de estrogênio positivos dentro das células neoplásicas por imuno-histoquímica, 100x.

Fonte: Anderson JM et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003 Jun;11(2):120-4.

### 2.5.1. Receptores de estrogênio e progesterona

Sabe-se que a expressão dos receptores hormonais tem uma relação inversa com o grau histológico e prognóstico, isto é, tumores receptores de estrogênio positivos estão associados a baixos graus histológicos, e melhor prognóstico<sup>51</sup>.

A atividade de receptor de estrógeno observada no carcinoma subjacente também exibe características semelhantes às observadas nas células de Paget. Sugere-se, então, que as células de Paget e o carcinoma subjacente possam ser histológica e biologicamente semelhantes.

### **2.5.1. Ki-67**

O Ki-67 foi identificado por Gerdes e colaboradores em 1991<sup>59</sup>, como uma proteína nuclear. O gene Ki-67 encontra-se no braço longo do cromossomo 10 (10q25)<sup>60</sup>. A proteína Ki-67, medida por técnicas de imuno-histoquímica, é considerada um marcador de proliferação tumoral. A definição de pontos de corte para o Ki-67 varia entre os estudos, parecendo ser melhor considerá-lo como uma variável contínua<sup>61</sup>. A expressão de Ki-67 é usualmente estimada em percentual de células tumorais positivamente marcadas pelo anticorpo, com a marcação nuclear sendo o critério mais comum de positividade.

Alguns estudos estabeleceram o valor preditivo do Ki-67 no diagnóstico do câncer de mama: os escores de Ki-67 correlacionam-se com outros fatores prognósticos, como grau histológico tumoral, envolvimento de linfonodos, invasão angiovascular e expressão de receptores hormonais, com risco de recorrência, com resposta a terapia, com intervalo livre de doença e sobrevida geral<sup>62</sup>. Muitos estudos têm demonstrado a correlação entre Ki-67 e a expressão de HER2, que embora pareça ser positiva, ainda não está bem definida<sup>63</sup>.

## **2.6. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico da DPM é eminentemente clínico e característico, porém um estudo da imagem mamária através mamografia é fundamental para a pesquisa de microcalcificações, que são detectadas em aproximadamente 60% dos casos<sup>64</sup>.

Os achados mamográficos variam desde uma mamografia normal até a presença de nódulo suspeito em região retroareolar. Em vários estudos, quase metade das pacientes apresentavam mamografias normais<sup>64-69</sup>. A sensibilidade da mamografia na detecção de achados malignos é significativamente alta na presença de massa palpável (97%), mas torna-se extremamente baixa na ausência de massas palpáveis (50%)<sup>67</sup>.

Kothari e colaboradores descreveram 22% de mamografias normais, em 55 casos estudados. Dentre os achados considerados alterados, descreve microcalcificações em 44% dos casos, massa subjacente em 19%, aumento da espessura da pele na região mamilar em 19%, calcificações grosseiras em 19% e aumento de densidade focal da mama em 20% <sup>46</sup>. Nesse estudo a mamografia subestimou a verdadeira extensão do carcinoma subjacente em aproximadamente 43% de todos os casos <sup>46</sup>.

Stomper e colaboradores encontraram alterações mamográficas em apenas 3 de 25 casos de DPM (12%) <sup>68</sup>.

Portanto, a mamografia pode ser insuficiente para determinar a extensão da doença. A ultrassonografia deve ser considerada, especialmente naqueles casos em que a mamografia é normal.

A ressonância magnética é altamente sensível para a detecção de câncer de mama, e parece ter grande valor nos casos de DPM na pesquisa de tumores subjacentes <sup>28</sup>.

Em um estudo recente, Frei e colaboradores estudaram 9 casos de DPM que não apresentavam massa palpável, destas 6 apresentavam mamografias normais, e 3 apresentavam grupamentos de microcalcificações, que à patologia corresponderam a CDIS <sup>28</sup>. Em 8 pacientes (88%) a ressonância magnética do mamilo estava alterada <sup>28</sup>.

Pacientes com achados mamográficos benignos e sem tumor palpável podem se beneficiar com exames de imagem adicionais que podem detectar doença oculta. Recentes estudos têm demonstrado que a RM tem uma sensibilidade em detectar câncer de mama de 88 a 100% <sup>69,70</sup>. Especialmente nos casos de carcinoma in situ, a RM tem uma sensibilidade de 95% comparada com 70% da mamografia <sup>71</sup>. Então, para pacientes com tumores não palpáveis e achados mamográficos benignos, a RM pode auxiliar na seleção de pacientes que podem ser candidatos à cirurgia conservadora <sup>38</sup>.

A cintilografia mamária pode ser útil na avaliação das pacientes com DPM, mas seu real benefício ainda deve ser melhor estudado. Sabe-se que as células de Paget possuem forte captação do Tecnésio 99 MIBI, devido à alta proliferação e crescimento tumoral.

O diagnóstico pode ser obtido por raspado citológico. É possível reconhecer células carcinomatosas de Paget na citologia exfoliativa do CAP, mas esse método não

é adequado para diagnóstico definitivo de DPM, ou seja, quando os achados são negativos, não se exclui a doença, sendo considerado um método diagnóstico pouco sensível.

As células de Paget são células intra-epiteliais grandes redondas ou ovais, com abundante citoplasma claro, grandes núcleos pleomórficos e hipercromáticos, e discretos nucléolos. O uso de citologia com corantes confirmatórios para antígeno carcinoembrionário (CEA), mucina, ou HER2 tem sido sugerida para aumentar a acurácia desse método <sup>18</sup>.

Achados citopatológicos positivos confirmam o diagnóstico, entretanto, nos casos de citologia negativa, o diagnóstico definitivo será com o exame anátomo-patológico.

## 2.7. TRATAMENTO

Enquanto a origem das células de Paget permanece controversa, o tratamento também é discutível. Se as células de Paget se originam no epitélio do mamilo, a indicação de mastectomia em todas as pacientes com DPM não é uma unanimidade, especialmente naquelas sem massa palpável ou sem alterações mamográficas <sup>5,43</sup>. Já na teoria epidermotrófica, que considera a presença de um carcinoma subjacente da mama, podemos considerar a possibilidade de nodulectomia nos casos de massa palpável ou alteração mamográfica, e a mastectomia nos casos sem massa palpável e mamografia normal <sup>18</sup>. Essas opções terapêuticas devem ser discutidas pelas equipes cirúrgicas e oncológicas responsáveis pelo caso, sempre respeitando a opção da paciente.

A DPM tem sido considerada um marcador de um câncer de mama ipsilateral <sup>18</sup>, e por isto a mastectomia foi estabelecida como terapia padrão no tratamento dessa doença por muito tempo <sup>6,10</sup>.

O tratamento conservador tem sido considerado em casos selecionados de DPM. Cita-se ressecção parcial ou total do CAP, podendo ser associada à radioterapia, setorectomia central, também podendo ser associada à radioterapia, e apenas radioterapia, sem ressecção cirúrgica <sup>18,43</sup>. Então, aqueles casos de doença limitada ao CAP, pacientes idosas, pacientes sem condições clínicas, ou aquelas que se negam a realizar mastectomia, podem se beneficiar com tratamento conservador. Nesses casos,

deve-se seguir rigoroso controle com mamografia. Mastectomia seria indicada apenas para os casos de recorrência <sup>72-74</sup>.

Portanto, diante de uma lesão clínica e radiologicamente unifocal, podemos realizar quadrantectomia central com ressecção do CAP. Se as margens são livres, se procede com radioterapia. Se as margens são comprometidas, ou se houver evidência de multicentricidade na peça cirúrgica, devemos considerar mastectomia com biópsia de linfonodo sentinela.

Sabe-se que o prognóstico da DPM depende do estágio do câncer subjacente, então é mandatório determinar a natureza e a extensão deste antes de decidir o tipo de terapêutica cirúrgica a ser proposta para a paciente.

Alguns estudos sugerem o uso da radioterapia, sem ressecção cirúrgica, naquelas pacientes sem massa palpável ou alteração mamográfica, como tratamento para a DPM <sup>53</sup>. Fourquet relatou uma série de 20 pacientes com DPM limitada ao CAP tratadas com radioterapia, com uma taxa de 15% de recorrência local <sup>75</sup>. Stockdale relatou 16% de recorrência em 19 casos de DPM sem massa palpável ou alterações mamográficas tratados apenas com radioterapia após 5 anos de seguimento <sup>45</sup>.

O tratamento para a DPM deve seguir a mesma linha das outras formas de carcinoma de mama. Nos casos de carcinoma ductal *in situ* tratados com cirurgia conservadora, deve-se preconizar o uso de radioterapia, e não indicar a exérese do LS. Sendo esta, então, reservada para os casos de carcinoma ductal *in situ* extenso com indicação de mastectomia. Nos casos de carcinoma invasor, a BLS será indicada nos casos de axila clinicamente negativa e tumores com até 3 cm.

A BLS deve ser preconizada em todos os casos em que a axila é clinicamente negativa. Os linfonodos sentinelas podem ser identificados pela técnica radioguiada ou com o azul patente. Na primeira técnica, o radiofármaco é injetado na tarde anterior à cirurgia, ou na manhã da cirurgia. A técnica consiste na injeção de 5 a 10 MBq de tecnécio-99m ligado a partículas de albumina humana (diâmetro de 50 a 200 nm) diluídos em 0.2 ml de solução salina próximo ao tumor. A injeção é subdérmica nos casos de tumor superficial e peritumoral nos casos de lesão profunda. Subsequentemente se realiza linfoscintilografia da mama e da axila nas projeções anterior e oblíqua-anterior para determinar a exata posição do linfonodo sentinela. De 4 a 20 horas após a injeção do radiofármaco, a BLS será realizada durante a cirurgia

mamária. O probe envolto por uma capa estéril é usado para identificar o linfonodo sentinela radioativo, e facilitar a sua remoção<sup>47</sup>. A técnica com azul patente consiste na injeção peritumoral ou subareolar de 2 a 4 ml de azul patente, que após 5 a 10 minutos possibilita identificar o LS através da sua coloração azulada em contraste com o tecido adiposo circunjacente. Alguns vasos linfáticos também são visualizados na periferia e no hilo do linfonodo sentinela.

## 2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DPM parece ser mais associada aos subtipos histológicos considerados biologicamente mais agressivos, o sólido e o comedo carcinomas<sup>5,67</sup>, que são relacionados a alto grau nuclear, alto índice de mitoses e amplificação do oncogene HER2<sup>43,44</sup>. A positividade de HER2 está relacionada a pior prognóstico, taxas de menor sobrevida livre de doença e de sobrevida geral<sup>51</sup>. Também tem sido associada com extenso carcinoma *in situ*, receptores hormonais negativos, alta taxa de proliferação celular, positividade de p53, parecendo servir para estratificar as pacientes em baixo e alto risco para recorrência<sup>45</sup>.

Muitos estudos mostram aumento de risco de recidiva e morte em pacientes com câncer de mama HER2 positivo<sup>49</sup> e resistência ao tamoxifeno tem sido relatada<sup>18</sup>. Gregory relatou que, pacientes com tumores HER2 positivo parecem, mais comumente, não apresentar resposta à quimioterapia<sup>76</sup>. A positividade de HER2 também tem sido relacionada à resistência a quimioterapia com CMF<sup>52,77</sup> e às melhores taxas de resposta com esquemas quimioterápicos com adriamicina<sup>77</sup>.

Há relatos que 60% de todos os casos de DPM associados a carcinoma invasor são grau III<sup>46</sup>, significando maior predisposição a metástases e pior prognóstico. Também observamos que 96,5% dos casos com carcinoma *in situ* subjacente são de alto grau histológico<sup>46</sup>.

O conhecimento da expressão dos receptores hormonais, de HER2 e de Ki-67 na DPM pode ser útil na decisão das estratégias terapêuticas, principalmente naqueles pacientes com doença recorrente.



### 3. OBJETIVOS

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Este estudo tem o objetivo de avaliar a expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais, HER2 e Ki-67 nos casos de DPM associada a carcinoma infiltrativo e a carcinoma intraductal, e avaliar a sobrevida e a recidiva local em pacientes operadas no IEO.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever os aspectos clínicos e histopatológicos, bem como as formas de tratamento nas pacientes do IEO.

Avaliar a sobrevida global, a sobrevida livre de doença e as taxas de recidiva local nas mesmas pacientes.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Paget J. On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St. Barts Hospital Rep* 1874; 10:87.
2. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget Disease of the Breast: Analysis of 41 Patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 397-400.
3. Velpeau S. *Treatise on diseases of the breast and mammary region*. London: Sydenham Society 1856.
4. Ashikari R, Park K, Huvos AG *et al*. Paget's disease of the nipple. *Cancer* 1970; 26: 680-685.
5. Chaudary MA, Millis RR, Lane B *et al*. Paget's disease of the nipple: a 10-years review including clinical, pathological and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 8: 139-146.
6. Nance FC, DeLoach DH, Welsh RA *et al*. Paget's disease of the breast. *Ann Surg* 1970; 171: 864-874.
7. Inwang ER, Fentiman IS. Paget's disease of the nipple. *Br J Hosp Med* 1990; 44: 392-395.
8. Jamali FR, Ricci A, Deckers PJ. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 76: 365-381.
9. Kister A, Haagensen C. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 119: 606-609.
10. Paone J, Baker R. Pathogenesis and treatment of Paget's disease of the breast. *Cancer* 1981; 48: 825-829.
11. Jahn H, Osther P, Nielsen E, Rasmussen G, Anderson J. An electron microscopic study of clinical Paget's disease of the nipple. *APMIS* 1995; 103: 628.
12. Cohen C, Guarner J, DeRose PB. Mammary Paget's disease and associated carcinoma: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 291.
13. Wood W, Hegodus C. Mammary Paget's disease and intraductal carcinoma: histologic histochemical and immunocytochemical comparison. *Am J Dermatopathol* 1988; 10: 183.
14. Sagebiel RW. Ultrastructural observations on epidermal cells in Paget's disease of the breast. *Am J Pathol* 1969; 57: 49.

15. Rosen PP, Oberman HÁ. Atlas of tumor pathology: tumors of the mammary gland. Third series. Vol. 7. Armed Forces Institute of Pathology. Washington: Fasciclez, 1993: 266.
16. Jones RE Jr. Mammary Paget's disease without underlying carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1985; 7: 361.
17. Muir R. Further observations on Paget's disease of the nipple. *J Pathol Bacteriol* 1939; 49: 299.
18. Sakorafas GH, Blamchard K, Sarr MG, Farley DR. Paget's disease of the breast: a clinical perspective. *Langenbecks Arch Surg* 2001 Nov; 386(6):444-50. Epub 2001 Oct 17. Review.
19. Fu W, Loboeki CA, Silberberg BK, Chelladurai M, Yong SC. Molecular Markers in Paget Disease of the Breast. *J Surg Oncol* 2001 Jul; 77(3):171-8.
20. Jamali FR, Ricci A, Deckers PJ. Paget's disease of the nipple-areola complex. *Surg Clin North Am* 1996; 76: 365-381.
21. Kister A, Haagensen C. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 119: 606-609.
22. Mendez-Fernandez MA, Henly WS, Geis RC, Schoen FJ, Hausner RJ. Paget's disease of the breast after subcutaneous mastectomy and reconstruction with a silicone prosthesis. *Plast Reconstr Surg* 1980; 65:683-685.
23. Suster S, Ronnen M, Huszar M, Bubis JJ. Paget's disease of the breast with underlying carcinoma arising in systemic scleroderma. *J Dermatol Surg Oncol* 1988; 14:648-650.
24. Kijima Y, Owaki T, Yoshinaka H, Aikou T. Synchronous bilateral breast cancer with Paget's disease and invasive ductal carcinoma: report of a case. *Surg Today*. 2003;33(8):606-8.
25. Holloway KB, Ramos -Caro FA, Flowers FP. Paget's disease of the breast in a man with neurofibromatosis. *Int J Dermatol* 1997; 36: 604-18.
26. Ucar AE, Korukluoglu B, Ergul E, Aydin R, Kusdemir A. Bilateral paget disease of the male nipple: First report. *Breast* 2007 Dec 31; [Epub ahead of print]

27. Ordonez NG, Awalt H, Mackay B. Mammary and extramammary Paget's disease. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Cancer* 1987; 59:1173–1183.
28. Frei K, Bonel H, Pelte M, Hylton N, Kinkel K. Paget disease of the breast: findings at magnetic resonance imaging and histopathologic correlation. *Invest Radiol* 2005; 40: 363-367.
29. Lundquist K, Kohler S, Rouse RV. Intrepidermal cytokeratin 7 expression is not restricted to Paget cells but is also seen in Toker cells and Merkel cells. *Am J Surg Pathol* 1999;23:212-219.
30. Miller L, Tyler W, Maroon M, Miller OF. Erosive adenomatosis of the nipple: a benign imitator of malignant breast disease. *Cutis* 1997; 59:91-92.
31. Haier J, Haensch W, Schon M. Liomyoma as a rare diagnosis of Paget's disease of the nipple. *Acta Obstret Gynecol Scand* 1997; 76:490-491.
32. Longo C, Fantini F, Cesinaro AM, Bassoli S, Seidenari S, Pellacani G. Pigmented mammary Paget disease: dermoscopic, in vivo reflectance-mode confocal microscopic, and immunohistochemical study of a case. *Arch Dermatol* 2007 Jun;143(6):752-4.
33. Tani EM, Skoog L. Immunocytochemical detection of estrogen receptors in mammary Paget cells. *Acta Cytol* 1988; 23:825–828.
34. Boneti F, Colombari R, Manfrin R. Breast carcinoma with positive results from melanoma marker (HMB-45). *Am J Clin Pathol* 1998;150:539-43.
35. Dwarakanath S, Lee AKC, DeLellis RA, Siverman ML, Frasca ML, Wolfe HJ. S-100 protein positivity in breast carcinomas: a pagetoid pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1987;18:1144-48.
36. Schmitt SJ, Conolly J, Khettry U et al. Pathologic findings on re-excision of the primary site in breast cancer patients considered for treatment by primary radiation therapy. *Cancer* 1987;79:675-681.
37. Menzies D, Barr L, Ellis H. Paget's Disease of the nipple occurring after local incision and radiotherapy for carcinoma of the breast. *Eur J Surg Oncol* 1989;15:271-273.
38. Zacaria S, Pantvaidya G, Ghosh K, Degnim AC. Paget's disease of the breast: accuracy of preoperative assessment. *Breast Cancer Res Treat* 2007 Apr;102(2):137-42.

39. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, Robertson C, Sacchini V, Veronesi P, Orvieto E, De Cicco C, Intra M, Tosi G, Scarpa D. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst* 1999 Feb 17;91(4):368-73.
40. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991;19: 403-410. *Histopathology* 2002 Sep;41(3A):151.
41. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006 Jan-Feb;56(1):37-47.
42. Rosen PP, Caicco J. Florid papillomatosis of the nipple: a study of 51 patients including nine having mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:87–101.
43. Lagios MD, Westdahl PR, Rose MR, Concannon S. Paget's disease of the nipple. Alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma. *Cancer* 1984; 54: 545-551.
44. De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994 Dec;25(12):1264-8.
45. Stockdale AD, White WF, Brierley JD, Folkes A, Rostom AY. Radiotherapy for Paget's disease of the nipple. A conservative alternative. *Lancet* 1989;2:664-666.
46. Kothari AS, Beechey-Newman N, Hamed H, Fentiman IS, D'Arrigo C, Hanby AM, et al. Paget disease of the nipple: a multifocal manifestation of higher-risk disease. *Cancer* 2002 Jul 1;95(1):1-7.
47. Intra M, Zurrada S, Maffini F, Sonzogni A, Trifirò G, Gennari R, Arnone P, Bassani G, Opazo A, Paganelli G, Viale G, Veronesi U. Sentinel lymph node metastasis in microinvasive breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003 Dec;10(10):1160-5.
48. Munster PN, Norton L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):361-4.
49. Boff RA e Wisintainer F: Mastologia Moderna – Abordagem Multidisciplinar. Ed. Mesa Redonda Ltda, 2006.
50. Tagliabue E, Agresti R, Casalini P, Mariani L, Carcangiu ML, Balsari A, Veronesi U, Ménard S. Linking survival of HER2-positive breast carcinoma patients with surgical invasiveness. *Eur J Cancer* 2006 May;42(8):1057-61.

51. Anderson JM, Ariga R, Govil E, Bloom KJ, Francescatti D, Reddy VB, Gould VE, Gattuso P. Assessment of Her-2/Neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in mammary Paget disease and underlying carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003 Jun;11(2):120-4.
52. Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B *et al.* Pathogenesis of Paget's disease: epidermal heregulin-alpha, motility factor, and the HER receptor family. *J Natl Cancer Inst* 2000 Apr 19;92(8):622-8.
53. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, Grant C. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2003;9(4):226-31.
54. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jäger W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997 Mar;43(1):87-95.
55. Molina R, Jo J, Zanón G, Filella X, Farrus B, Muñoz M, Latre ML, Pahisa J, Velasco M, Fernandez P, Estapé J, Ballesta AM. Utility of C-erbB-2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15.3. *Br J Cancer* 1996 Oct;74(7):1126-31.
56. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast* 2005 Dec;14(6):458-65.
57. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, Krontiras H, Urist MM, Bland KI. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg* 2001 May;233(5):630-8.
58. Slamon DJ. Proto-oncogenes and human cancers. *N Engl J Med* 1987 Oct 8;317(15):955-7.
59. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991 Apr;138(4):867-73.
60. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 1991 Oct;11(2):476-7.

61. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Oct 1;23(28):7212-20.
62. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, Li M, Hwang H, Krummenauer F, Trouet S, Gown AM. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Hum Pathol* 1999 Nov;30(11):1314-20.
63. Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, Eaton CL, Gullick WJ, Dixon AR, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* 1993;29A(7):1018-23.
64. Sawyer RH, Asbury DL. Mammographic appearances in Paget's Disease of the Breast. *Clin Radiol* 1994; 49:185-188.
65. Ceccherini AFA, Evans AJ, Pinder SE et al. Is ipsilateral mammography worthwhile in Paget's Disease of the Breast? *Clin Radiol* 1996;51:35-38.
66. Rickard MT, Selopranoto US. Paget's Disease of the Breast: what the radiologist may expect to find. *Australasia Radiol* 1995;39:27-30.
67. Ikeda DM, Helvie MA, Frank TS et al. Paget Disease of the nipple: radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1993;189:89-94.
68. Stomper P, Penetrante R, Carson W. Sensitivity of mammography on patients with Paget's Disease of the nipple. *Breast Dis* 1995;8:173-178.
69. Gundry KR. The application of breast MRI in staging and screening for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005 Feb;19(2):159-69; discussion 170, 173-4, 177. Review.
70. Teifke A, Hlawatsch A, Beier T et al. Undetected malignancies of the breast: dynamic contrast-enhanced MR imaging at 1.0 T. *Radiology* 2002 Sep;224(3):881-8.
71. Soderstrom CE, Harms SE, Copt DS et al. Three-dimensional RODEO breast MR imaging of lesions containing ductal carcinoma in situ. *Radiology* 1996 Nov;201(2):427-32.
72. Pierce LJ, Haffty BG, Solin LJ, McCormick B, Vicini FA, Wazer DE, et al. The conservative management of Paget's disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 1997 Sep 15;80(6):1065-72.

73. Bijker N, Rutgers EJT, Duchateau L, Peterse JL, Julien JP, Cataliotti L, *et al.* Breast-conserving therapy for Paget disease of the nipple: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer study of 61 patients. *Cancer* 2001 Feb 1;91(3):472-7.
74. Marshall J, Griffith K, Haffty B, Solin LJ, Vicini FA, McCormick B, Wazer DE, Recht A, Pierce LJ. Conservative management of Paget disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 2003;97:2142-2149.
75. Fourquet A, Campana F, Vielh P *et al.* Paget's disease of the nipple without detectable breast tumor: conservative management with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13:1463-1465.
76. Wolber RA, Dupuis BA, Wick MR. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1991 Aug;96(2):243-7.
77. Meissner K, Riviere A, Haupt G, Loning T. Study of neu-protein expression in mammary Paget's disease with and without underlying breast carcinoma and in extramammary Paget's disease. *Am J Pathol* 1990 Dec;137(6):1305-9.



## 5. VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 1

### **Mammary Paget's disease: expression of hormonal receptors, HER2 and Ki-67 and outcome analysis of 148 consecutive cases**

Dos Santos GR<sup>1,4</sup>, Edelweiss MIA<sup>2</sup>, Galimberti V<sup>1</sup>, Intra M<sup>1</sup>, Gatti G<sup>1</sup>, Viale V<sup>3</sup>, Luini A<sup>1</sup>, Veronesi U<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Division of Breast Surgery of European Institute of Oncology

<sup>2</sup> Division of Pathology at University of the Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Division of Pathology of European Institute of Oncology

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Medical Sciences of Faculdade de Medicina at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

#### Correspondence to:

Gabriela R. dos Santos

Rua Marques de Sapucaí 100 apto 905 Novo Hamburgo – RS

CEP: 93336-360

Phone: 051-92381180

E-mail: gabriela@centrodemama.med.br

## **Abstract**

### **Background**

Mammary Paget's disease (MPD) of the nipple is a rare form of intraepithelial breast cancer, with a frequency of 0.5% to 4.3% of all breast carcinomas. MPD is almost exclusively associated with a high grade ductal carcinoma *in situ* (DCIS) or underlying invasive breast carcinoma. The aim of this study was to investigate the presence of the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR), Ki-67 and HER2 in cases treated at the European Institute of Oncology (EIO).

### **Patients and Methods**

We retrospectively reviewed data from 148 consecutive patients with MPD from November 1996 to February 2003. Formalin fixed and paraffin embedded sections were analyzed using antibodies ER, PR, Ki-67 and HER2 according to standardized procedures. The patients were separated into three groups: 1) "MPD only" (intraepithelial), 2) "MPD with an underlying DCIS" and 3) "MPD with an underlying invasive carcinoma."

### **Results**

The "MPD only" group was composed of 8 patients (5.4%), the "MPD with an underlying invasive carcinoma" group included 90 patients (60.74%) and the "MPD with an underlying DCIS" group had 50 patients (33.79%).

In the "MPD only" group, all cases were negative to ER, PR and Ki-67; in the "MPD with DCIS" group, we found positive immunoreactions for ER, PR and Ki-67 in 35.6%, 24.4% and 70.5%, respectively.

We observed a significant difference ( $P = 0,009$ ) in the expression of HER2 in the three groups, showing 100% of positivity in the cases of "MPD only," 97.0% in the "MPD with DCIS" group and 76.1% in the group "MPD and underlying invasive carcinoma."

### **Conclusions**

Almost all cases of MPD associated with an underlying DCIS or an invasive carcinoma showed immunoexpression of ER, PR and Ki-67 as opposed to the "MPD only" carcinomas that were negative. In decreasing intensity in all three groups, this study showed 100%, 97.0% and 76.1% of positive immunoreactions to HER2 ( $P =$

0.009) expressed in MPD. These findings can be useful in making therapeutic decisions and identifying those patients who can benefit from the use of Herceptin.

**Keywords:** Paget's disease of the breast, breast carcinoma, HER2, ductal carcinoma

## Background

Mammary Paget's disease (MPD) of the nipple was first described by Sir James Paget in 1874 <sup>1</sup>. It is a rare form of intraepidermal breast cancer, with a frequency that varies from 0.5 to 4.3% of all breast carcinomas <sup>2</sup>.

MPD typically presents as a distinct change in the nipple and areola of the involved breast. Most women report a change in sensation of the nipple and areola with itching and burning that may mimic inflammatory and infectious skin diseases. The epithelial surface changes slowly, producing a scaly appearance of the nipple and the areola often with associated erythema and nipple discharge. Controversy exists regarding the cells of origin in MPD.

MPD occurs most commonly in post-menopausal women, with the peak incidence between the sixth and seventh decades of life at a mean age of 54 years, 5 to 10 years greater than the overall peak incidence of invasive carcinoma <sup>3-5</sup>.

In most cases (>90%), MPD is associated with an underlying high grade *in situ* ductal carcinoma or invasive ductal breast carcinoma that may be multifocal <sup>6</sup>. A lesion without a palpable mass usually reflects a non-invasive process (*in situ* carcinoma in about 90% of cases) whereas a palpable mass is frequently associated with invasive carcinoma <sup>5-9</sup>. MPD appears to be most commonly associated with the solid / comedo histological forms <sup>8,10</sup>. This subtype is considered to be the most biologically aggressive, with a high nuclear grade, a large number of mitoses and amplification of the proto-oncogene HER2 <sup>11,12</sup>.

The etiology and treatment of this disease remains controversial. The etiology has been widely accepted as the result of epidermal spread of an associated primary ductal carcinoma of the breast because nearly all patients with MPD have been found to have underlying breast carcinoma <sup>5</sup> and immunohistochemistry has shown that almost all types of underlying breast carcinoma have shared antigens with the disease at the nipple <sup>11,12</sup>. However, uncertainty still remains because a small subgroup of patients shows only MPD at the nipple with no evidence of underlying breast carcinoma.

Over the past decade, several studies have described the expression of estrogen and progesterone receptors in mammary Paget disease. The role of steroid receptors in the management and treatment of patients is well established. More recently, several publications with a limited number of cases have examined HER2 (also known as c-erb-

B2) expression in MPD<sup>13,14</sup>. HER2 is a prognostic and predictive parameter used in breast carcinoma.

The overexpression of HER2 in an unusually high percentage of patients with MPD suggests that HER2 may play an important role in the pathogenesis of this disease<sup>14</sup>. HER2 overexpression is seen in 20% of invasive breast carcinomas, in 50% of DCIS carcinomas and has been reported in as many as 90% of intraepithelial MPD<sup>12,15</sup>. HER2 overexpression is associated with poor patient prognosis and aggressive disease potential<sup>16</sup>. The prognosis for these patients is determined by the extent of the associated carcinoma<sup>4</sup>.

In recent studies, the incidence of axillary lymph node metastases in patients without a palpable mass has been found to be 0-15%<sup>6,8</sup>, rising to 60% in the presence of a palpable mass<sup>5,6</sup>. Treatment has traditionally consisted of mastectomy because of the high incidence of multifocal *in situ* and invasive disease identified in mastectomy specimens<sup>18</sup>. Several studies have shown that breast conservation with radiation therapy is an oncologically safe option<sup>18,19</sup>.

Sentinel lymph node (SLN) biopsy has become a standard of care as a less invasive method to stage patients with early invasive breast cancer rather than completion of an axillary lymph node dissection (ALND). Advantages of SLN biopsy include a decreased risk of lymphedema, paresthesias and infections. In studies of patients with back-up completion ALND, SLN biopsy has had an accuracy rate of 97% and a false-negative rate of only 5%<sup>19</sup>. This procedure can be a valuable tool in patients at high risk for underlying invasive carcinoma<sup>20</sup>. Because the risk of underlying invasive carcinoma is higher in patients with Paget's disease of the breast, the SLN biopsy appears to be effective in detecting metastatic disease to the ALND<sup>19</sup>.

The aim of this study is to review, retrospectively, data from 148 patients with MPD at the European Institute of Oncology (EIO) from November 1996 to February 2003. This study was developed to evaluate the prevalence of the expression of the estrogen and progesterone receptors, Ki-67 and HER2 by means of immunohistochemistry in cases of MPD. In addition to patient and tumor characteristics, we reviewed the treatment modalities, locoregional recurrence patterns and survival.

## **Methods**

### *Patients*

This was an observational study of a historical non-concurrent cohort of 148 patients with MPD, treated at the EIO in the Breast Cancer Division from November 1996 to February 2003, with a median follow-up of 64.36 months, last updated in May 2007. Medical records and surgical pathology files were reviewed.

All patients underwent surgical treatment at the EIO, after a preoperative evaluation with bilateral mammography, cytological or histopathological analyses. Bilateral breast ecography was frequently requested and magnetic resonance imaging (MRI) was an option in select cases.

The patients were separated into three groups: 1) "MPD only"; 2) "MPD with an underlying invasive carcinoma" and 3) "MPD with an underlying DCIS".

Follow-up examinations were performed routinely every 6 months and those patients who did not return were contacted by telephone. Breast cancer recurrence and survival data were also studied.

### *Surgery*

The surgical approach consisted of conservative treatment or mastectomy. Conservative treatment was performed by a classical Veronesi's quadrantectomy technique or wide resection.

Sentinel node biopsy (SLB) was always performed when the axilla was clinically negative. All the SLB were performed with a radioguided technique. A radioactive tracer was injected in the evening before or on the same day of the surgery. The technique consisted of an injection of 5 to 10 MBq of technetium-99m-labeled particles of colloidal human albumin (each 50 to 200 nm in diameter) in 0.2 ml of saline solution, injected close to the tumor. Injection was subdermal in cases of superficial tumors, and was peritumoral in cases of deep lesions. Anterior and anterior-oblique lymphoscintigraphic projections of the breast and axilla were subsequently obtained to determine the exact position of the sentinel node. Four to 20 hours after the injection of the tracer, SLB was performed during breast surgery. A gamma-ray-detecting probe in a sterile glove was used to identify the radioactive sentinel node and facilitate its removal<sup>21</sup>.

### *Histopathological Examination*

The surgically removed breast lesions were thoroughly sampled for histopathological examination, a routine protocol at EIO.

Tumors were classified histologically according to the World Health Organization Histological Classification of Breast Tumors, modified by Rosen and Obermann <sup>22</sup>. Tumor grading was assessed according to Elston and Ellis <sup>22</sup>. We looked for peritumoral vascular invasion as recommended by Rosen and Obermann <sup>22</sup>.

In all of cases, an analysis of the sentinel node was performed intra-operatively by frozen section examination, as is also routinely performed at EIO. If the sentinel node was positive, ALND was performed, and if it was negative, no further surgical treatment was done in the axilla.

Estrogen and progesterone receptor status and proliferative index (Ki-67) were assessed immunohistochemically on paraffin-embedded tissue blocks and mounted on precoated glass slides. The sections were deparaffinized, rehydrated and rinsed in distilled water. Immunohistochemical assays for ER, PR, and Ki-67 antigen (MIB-1) were performed on consecutive paraffin sections of tumor using an indirect avidin- biotin-peroxidase staining system <sup>21</sup>. After antigen retrieval with citrate buffer (0,01 M, pH 6,0) in a microwave oven <sup>21</sup>, immunostaining was carried out in an automatic immunostainer (Techmate 500; Dako-Biotech, Glostrup, Denmark). Primary monoclonal antibodies to estrogen receptors and progesterone receptors (Dako, Glostrup, Denmark) were used at 1/100 dilution, and an MIB-1 monoclonal antibody to the Ki-67 antigen (Immunotech, Marseilles, France) was used at 1/200 dilution <sup>21</sup>. Incubation with the primary antibody was performed, followed by incubation with the secondary, biotinylated antibody for 30 minutes. After being washed, sections were incubated with streptavidin-peroxidase for 30 minutes. Finally, the enzyme was visualized after a 15-minute incubation with diaminobenzidine. Counterstaining was performed with hematoxylin. Samples were scored as positive only when at least 10% of the nuclei were immunoreactive. HER2 overexpression was investigated immunohistochemically, using a specific polyclonal antiserum (Dako, Copenhagen, Denmark) and the Envision detection reagent (Dako, Copenhagen, Denmark) was used, according to the manufacturer's protocol and scoring guidelines. The staining results were recorded on a 4-tier scale from 0 to 3+, based on the percentage of immunoreactive cells and the intensity and completeness of membrane staining <sup>21</sup>. Only a score of 3+ in more than 10% of the tumor cells was

regarded as a positive result for HER2 overexpression. The positive cases for HER2 were confirmed by FISH (Fluorescence In situ Hybridization) in another laboratory.

The SLN examination was performed as described in a previous study<sup>23</sup>. Briefly, SLNs larger than 5 mm were bisected fresh along the major axis and fixed in 10% formalin for 6 – 8 hours before being embedded in paraffin. Lymph nodes < 5 mm were embedded uncut. Fifteen pairs of paraffin-embedded sections, 4- $\mu$ m thick, were cut at 50- $\mu$ m intervals. If residual tissue remained, additional pairs of sections were cut at 100- $\mu$ m intervals until the lymph node was entirely sectioned. One section of each pair was stained with hematoxylin and eosin (H&E). To ascertain the nature of atypical cells seen on the H&E sections (whenever needed), the mirror sections were immunostained for cytokeratins, using a rapid staining method (EPOS Anti-cytokeratins/HRP; Dako, Copenhagen, Denmark). Non-sentinel axillary lymph nodes were tagged by Berg level. If larger than 5mm, the nodes were bisected and routinely processed for embedding in paraffin. Three to six H&E stained sections per lymph node, cut at 100-500  $\mu$ m intervals, were examined.

#### *Statistical Analysis*

The categorized data were shown in absolute frequency and partial relative frequency.

Differences in proportions were evaluated by the Chi-square (Mehta and Patel, 1983), following multiple comparisons of percentiles.

The statistical significance was considered as two-sided  $P \leq 0.05$ . The Statistical Package for Social Science (SPSS - version 13.0 Chicago, Illinois) was used for statistical analysis.

#### *Ethical Aspects*

This study was approved by the local Ethics Committee at UFRGS.



## Results

The cases included in this study were of MPD, surgically treated at EIO.

Patients' characteristics evaluated in this study are summarized in Table 1.

Table 1: Patients', Tumor and Treatment Characteristics

Variable	CLASSIFICATION	Total No. (%)
All patients		148
Menopausal status <sup>†</sup>	Premenopausal	62 (41.9)
	Postmenopausal	81 (54.7)
pT <sup>†‡</sup>	pT1	48 (32.4)
	pT2	29 (19.6)
	pT3	9 (6.1)
	pT4	5 (3.4)
	PTis	57 (38.5)
pN	pN0	32 (21.6)
	pN1	47 (31.8)
	pN <sub>sentneg</sub>	23 (15.5)
Vascular invasion <sup>†‡</sup>	PNx	46 (31.1)
	Absent	98 (66.2)
Grading <sup>†</sup>	Present	32 (21.6)
	G1	4 (2.7)
Surgery	G2	37 (25.0)
	G3	85 (57.4)
Adjuvant systemic therapy <sup>†</sup>	Mastectomy	93 (62.8)
	Breast conserving surgery	55 (37.2)
	Chemotherapy alone	34 (22.9)
Adjuvant systemic therapy <sup>†</sup>	Endocrine therapy alone	25 (16.9)
	Chemotherapy + endocrine therapy	34 (22.9)
	No therapy	55 (37.2)

<sup>†</sup>Missing values for some patients

<sup>‡</sup>Calculated on invasive disease only

The mean age in the cohort of patients was 55 years, ranging between 27 and 88 years. Eighty-one patients (54.73%) were postmenopausal.

According to the World Health Organization (WHO) classification, the tumor size and clinical TNM stage were described according to the invasive component. The groups were designated as “MPD only” and the “MPD with an underlying DCIS” groups were considered to be clinical TNM stage pTis.

The nodal stage was determined according to the BLS or ALND (Table 1).

The vascular invasion and grading were described according to the invasive component, present in 32 (21.6%) of the cases.

Surgical techniques performed included 93 (62.8%) mastectomies and 55 (37.2%) breast conserving surgical treatments.

There were 102 patients submitted to axillary evaluation, of whom 47 (31.76%) had axillary metastasis.

As adjuvant systemic therapy, we performed chemotherapy alone in 22.9% of the cases, endocrine therapy alone in 16.9% of the cases and chemotherapy plus endocrine therapy in 22.9% of the cases. The data relative to radiotherapy is unknown.

All cases of MPD showed Paget cells with atypical round and oval nuclei and abundant basophilic, amphophilic or clear cytoplasm. The morphological appearance of the Paget cells in all groups was identical. The Paget cells were present as single cells, small clusters and present throughout all layers of the epidermis. The mitotic index was variable. The group with neoplastic cells restricted to the epidermis, referred to as “MPD only,” included 8 patients (5.4%). In those slides where MPD was associated with an underlying high-grade DCIS, there were 50 patients (33.79%) and where MPD was associated with an underlying invasive breast cancer, there were 90 patients (60.74%). Details of the histopathology slides are shown in Table 2.

The most commonly observed histological group was invasive ductal carcinoma in 86 (58.1%) of the cases.

Table 2: Disease Category and Histological Diagnosis in 148 Patients with MPD at EIO

<b>HISTOLOGICAL CLASSIFICATION</b>		No. (%)
<b>ALL PATIENTS</b>		148
MPD only	MPD only	8 (5.4)
MPD and DCIS	MPD and comedo DCIS	13 (8.8)
	MPD and solid DCIS	17 (11.5)
	MPD and micropapillary DCIS	2 (1.3)
	MPD and cribriform DCIS	8 (5.4)
	MPD and apocrine DCIS	2 (1.3)
	MPD and NOS DCIS	8 (5.4)
MPD and Invasive Carcinoma	MPD and Ductal Carcinoma	86 (58.1)
	MPD and Lobular Carcinoma	1 (0.7)
	MPD and Invasive Carcinoma NOS	3 (2.0)

MPD: Mammary Paget's Disease; DCIS: Ductal Carcinoma *In situ*; NOS: Not Otherwise Specified

The molecular markers for immunoexpression are shown in Table 3 and Figures 1-6.

Table 3: Molecular Markers Studied in 148 Breast Biopsies with MPD

Groups	ER †	PR †	Ki-67 †	HER2 †
<b>MPD only</b>	0/2	0/4	0/2	2/2 (100%)
<b>MPD and DCIS</b>	16/45 (35,6%)	11/45 (24,4%)	31/44 (70,5%)	32/33 (97%)
<b>MPD and Invasive carcinoma</b>	42/89 (47,2%)	31/89 (34,8%)	67/87 (77,0%)	54/71 (76,1%)
<b>p-value</b>	0,141	0,106	0,042	0,009

†Missing values for some patients

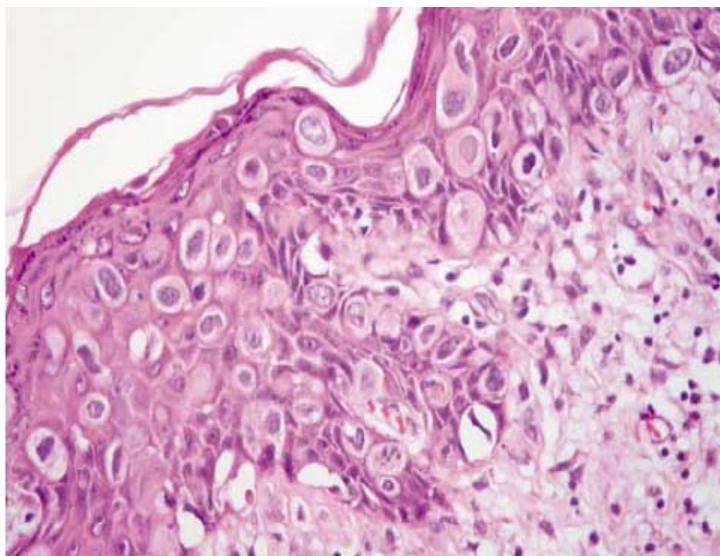


Figure 1. MPD showing Paget cells with atypical round or oval nuclei and abundant basophilic, amphophilic or clear cytoplasm. H&E 200x

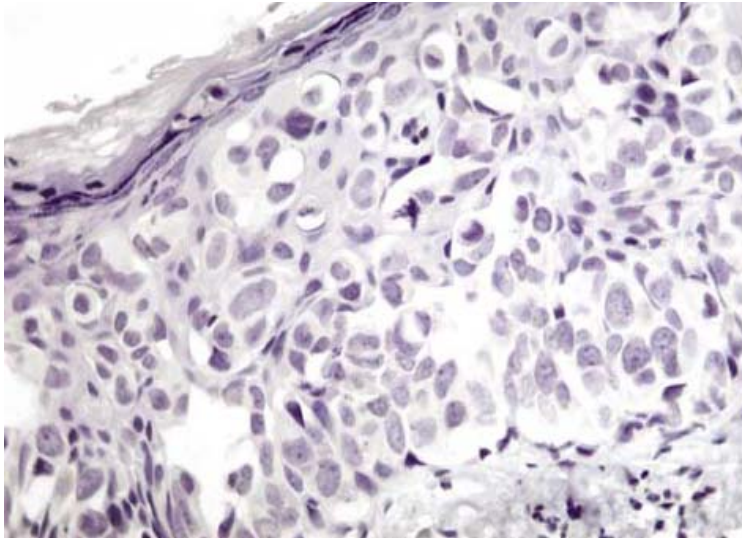


Figure 2. MPD showing Paget cells with negative immunoreaction for ERs. IHQ anti ER- 200x

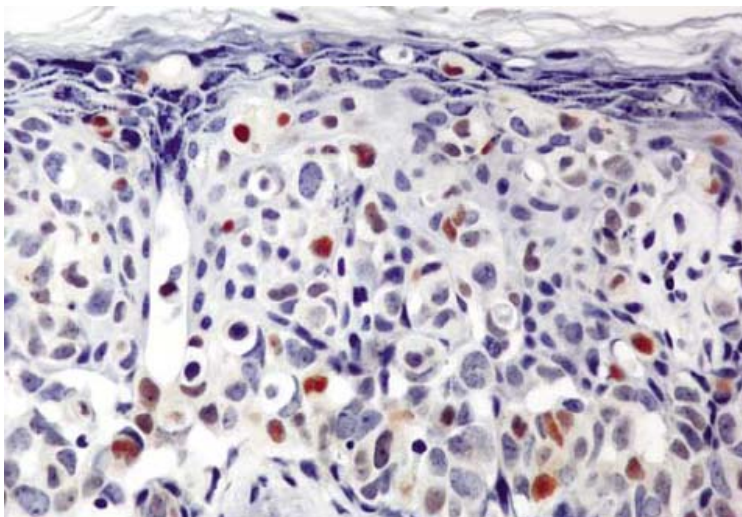


Figure 3. MPD showing Paget cells with nuclear positivity for Ki67 in more than 10% of tumor cells. IHQ anti MIB1- 200x

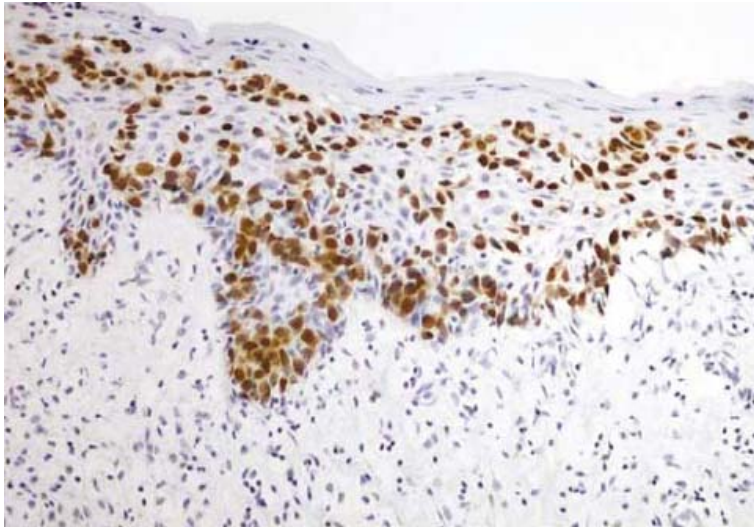


Figure 4. MPD showing Paget cells with nuclear positivity for Ki-67 in almost 50% of tumor cells. IHQ anti MIB 1- 100x

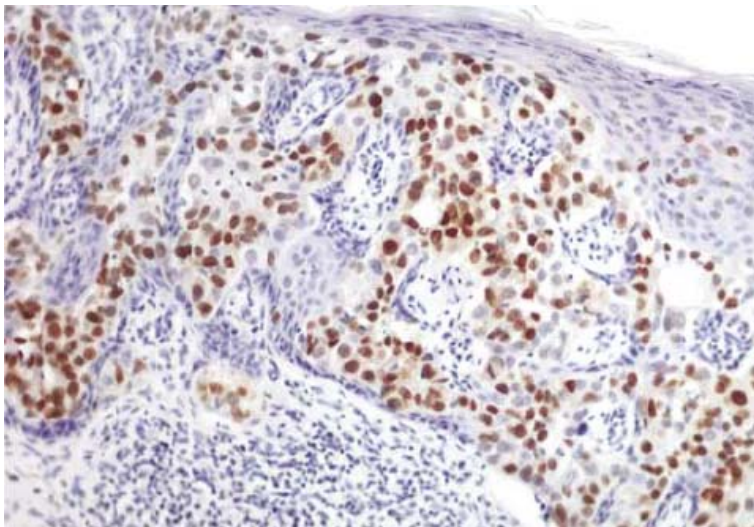


Figure 5. MPD showing Paget cells with nuclear positivity for ERs (with underlying invasive ductal carcinoma). IHQ anti ER- 100x

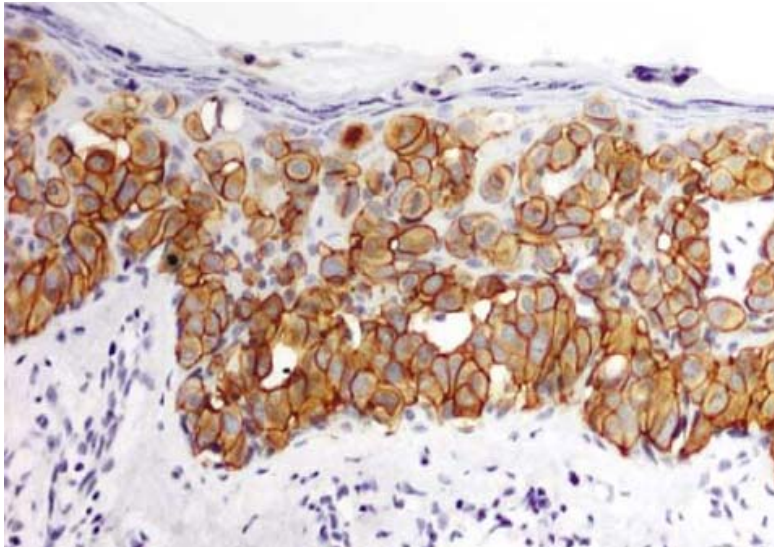


Figure 6. MPD showing Paget cells with intense complete membrane staining (3+) for HER2 in almost 100% of tumor cells. IHC – anti HER2- 200x

The mean follow-up was 64.36 months (3.87 – 115.31).

During this period of time, 24 patients (16.22%) developed distant metastasis, 12 patients (8.11%) developed local recurrence and 2 patients (1.35%) developed axillary metastasis.

The overall survival observed over 5 years was 81% (IC<sub>95%</sub>: 74.2 – 86.8%).

At the end of this study, there were 100 patients without disease. Local recurrence or progress of the disease was found in 48 patients (32.43%), and of those patients, 28 died: 20 (13.5%) died from the primary disease and 8 (5.4%) from other causes (Table 4).

Table 4: Description of Events in Mammary Paget's Disease

Description of Events	Total
<b>All patients</b>	<b>148</b>
Distant metastasis	24 (16.2%)
Local recurrence	13 (8.8%)
Axillary metastasis	2 (1.3%)
Contralateral breast tumor	4 (2.7%)
Other invasive primary tumor	5 (3.4%)
Death (any cause)	8 (5.4%)
Death (tumor-related)	20 (13.5%)

## Discussion

MPD is an uncommon disease that occurs in 0.5% to 4.3% of all cancers of the breast<sup>1</sup>. Most of the patients have an underlying cancer and the prognosis depends on the apprenticeship of the neoplasia. Due to the rarity of MPD, limited research has been conducted, thus hindering comparisons among therapeutic modalities.

This study evaluated 148 patients with MPD at the European Institute of Oncologia (IEO) from November 1996 to February 2003, with the objective of studying the expression of the molecular markers. Also studied were therapeutic modalities, the rates of local recurrence and global survival.

The average age of the group studied was 55 years, similar to data referred to in the literature where patients ranged in age from 50 to 60 years, slightly older than the group with carcinoma diagnosis but without MPD.

The number of cases of MPD associated with an underlying carcinoma was 94.6% in our casuistry, similar to the percentiles mentioned in the literature (82% to 100%)<sup>24</sup>.



In various studies, the histological type most frequently associated with MPD was the comedo type<sup>7</sup>. In our study, with regard to the group referred to as "MPD and DCIS," the most frequently found histological types were solid (11.5%) and the comedo (8.78%).

Several previous studies of breast carcinomas revealed biological and therapeutical significance of ER and PR<sup>25</sup>. Those studies indicated that MPD was mostly ER and PR negative<sup>16</sup>. In our study, in which we analyzed 3 groups, this failure to express steroid hormone receptors was consistent with the literature.

Regarding Ki-67, in this study, the group "MPD only" was negative but was positive when MPD was associated with DCIS or invasive cancer, where the lesion was more aggressive (70.5% in "MPD and DCIS" and 77.0% in "MPD and invasive carcinoma").

In this study, HER2 overexpression was observed in MPD in 76.1% to 100% of the cases. In the vast majority, the tumor cells of invasive ductal carcinoma or DCIS showed an identical staining pattern to that of intraepithelial Paget's cells, revealing ER and PR negativity and progressive positivity of Ki-67. The opposite occurred in the immunoexpression of HER2. The results of HER2 staining of the underlying carcinoma or DCIS were identical to those of the intraepidermal Paget's cells. This observation raises an important question about the role of HER2 in the pathogenesis and biology of Paget's disease. In addition, the heterogeneity of carcinoma cells with respect to steroid receptor positivity and the relative distribution of each steroid receptor in the carcinoma cells may possibly influence the activity in a proliferative or inhibitory direction.

HER2 oncogene and its relationship to breast cancer has been widely investigated<sup>26</sup> but data about its role in Paget's disease are limited<sup>27, 28</sup>.

The HER2 oncogene is a 185 kDA transmembrane glycoprotein with close homology to the epidermal growth factor receptor. The gene is located on chromosome 17q12<sup>27</sup>. HER2 overexpression has been found to correlate with poor prognosis in breast cancer patients, especially node-positive ones<sup>29</sup>. Recently, it has been shown that the spread of Paget's cells through the epidermis is induced by a motility factor that acts via the HER2 receptor<sup>15</sup>. Most previous studies revealed a high expression of HER2 in mammary Paget's disease, ranging from 71% to 100%<sup>13</sup>. The reported data of HER2 expression in extramammary Paget's disease, however, are conflicting. Previous reports have demonstrated overexpression of HER2 in extra-mammary Paget's disease ranging from 5% to 55%<sup>13</sup>.

Currently, patients with breast carcinoma with cancer cells that overexpress HER2 are treated with Trastuzumab (Herceptin). Trastuzumab (Herceptin) is a recombinant DNA-derived humanized human monoclonal immunoglobulin G (IgG) antibody that binds to p185 HER2. The possible antiproliferative mechanisms of Trastuzumab include downregulations of HER2 receptors, activation of immune effector cells (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), reduction of S-phase cell-cycle progression, and reduction of vascular endothelial growth factor <sup>30</sup>.

The treatment of MPD consists of mastectomy or more conservative surgery followed by radiotherapy. Patients treated with conservative surgery present discharge rates of local recurrence (33%), with local control improved significantly with the addition of radiotherapy (87% in 10 years) <sup>31</sup>. The survival and recurrence rates are certain for the underlying neoplasia.

The treatment for MPD should follow treatment for other forms of breast carcinoma. In cases of carcinoma ductal *in situ* treated with conservative surgery, radiotherapy is recommended rather than sentinel lymph node biopsy (SNL) which should be reserved for cases of carcinoma ductal in extensive *situ* where mastectomy is recommended. In cases of infiltrative carcinoma, SLN is indicated in cases of negative axillary. SLN is a valuable weapon in the evaluation of the axillary, for decreasing morbidity as well as in affording fewer lymphedema risks, less pain and infection.

Because the prognosis of MPD depends on the stage of the underlying cancer, it is mandatory to determine the nature and extensiveness of the underlying cancer before selecting the type of surgical therapeutics to offer.

We observed a significant difference ( $P = 0.009$ ) in the expression of HER2 in the three groups studied, with 100% positive in cases of "MPD only," as compared to 76.1% positive in the group "MPD with underlying invasive carcinoma."

Findings reported in the literature note that when associated with MPD, the infiltrating carcinomas express HER2 in higher percentages, thus leading us to believe that in the presence of MPD, the invasive carcinomas may serve to worsen the prognostics so that more aggressive therapeutic alternatives should be considered.

Studies suggest that the positivity of HER2 may predict the answer to the anthracyclins and reduce the benefit of the outline with CMF <sup>32</sup>. Preliminary results of clinical studies in humans using Herceptin (Genentech, South San Francisco, CA) have been promising, indicating that although women with HER2 overexpression present

resistance to multiple therapies, 11% to 37% show objective response to and stabilization of the disease <sup>16</sup>.

In summary, ER, PR and Ki-67 were absent in the group referred to as “MPD only” and present in 35.6% 24.4% and 70.5% of the “MPD associated with DCIS” group and in 47.2%, 34.8% and 77% of “MPD with underlying invasive cancer” group. HER2 overexpression was also observed in 100% of the “MPD only” group, in 97% of the “MDP associated with DCIS” group and in 76.1% ( $p=0,009$ ) of the “MDP with underlying invasive carcinoma” group. These findings can be useful in making therapeutic decisions as well as in identifying those patients who can benefit from the use of Herceptin, in addition to predicting the response to treatment with tamoxifen <sup>32</sup>. Knowledge about frequent overexpression of HER2 in MPD may play a significant role in the development of new adjuvant therapeutic strategies, particularly for those patients with recurrent disease. The most important recommendation, based on the findings of this study, is to individualize cases and offer the best treatment option for each patient.

## References

1. Paget J. On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St. Barts Hospital Rep* 1874; 10:87.
2. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget Disease of the Breast: Analysis of 41 Patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 397-400.
3. Jamali FR, Ricci A, Deckers PJ. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 76: 365-381.
4. Kister A, Haagensen C. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 119: 606-609.
5. Paone J, Baker R. Pathogenesis and treatment of Paget's disease of the breast. *Cancer* 1981; 48: 825-829.
6. Yim JH, Wick MR, Philpott GW *et al.* Underlying pathology in mammary Paget's disease. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 287-292.
7. Ashikari R, Park K, Huvos AG *et al.* Paget's disease of the nipple. *Cancer* 1970; 26: 680-685.
8. Chaudary MA, Millis RR, Lane B *et al.* Paget's disease of the nipple: a 10-years review including clinical, pathological and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 8: 139-146.
9. Nance FC, DeLoach DH, Welsh RA *et al.* Paget's disease of the breast. *Ann Surg* 1970; 171: 864-874.
10. Ikeda DM, Helvie MA, Frank TS *et al.* Paget Disease of the nipple: radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1993;189:89-94.
11. Lagios MD, Westdahl PR, Rose MR, Concannon S. Paget's disease of the nipple. Alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma. *Cancer* 1984; 54: 545-551.
12. De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994 Dec;25(12):1264-8.
13. Wolber RA, Dupuis BA, Wick MR. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1991 Aug;96(2):243-7.

14. Meissner K, Riviere A, Haupt G, Loning T. Study of neu-protein expression in mammary Paget's disease with and without underlying breast carcinoma and in extramammary Paget's disease. *Am J Pathol* 1990 Dec;137(6):1305-9.
15. Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B *et al.* Pathogenesis of Paget's disease: epidermal heregulin-alpha, motility factor, and the HER receptor family. *J Natl Cancer Inst* 2000 Apr 19;92(8):622-8.
16. Anderson JM, Ariga R, Govil E, Bloom KJ, Francescatti D, Reddy VB, Gould VE, Gattuso P. Assessment of Her-2/Neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in mammary Paget disease and underlying carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003 Jun;11(2):120-4.
17. Kawase K, DiMaio DJ, Tucker SL, *et al.* Paget's disease of the breast: there is a role for breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol* 2005 May;12(5):391-7.
18. Pierce LJ, Haffty BG, Solin LJ, *et al.* The conservative management of Paget's disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 1997 Sep 15;80(6):1065-72.
19. Vijayakumar V, Boerner PS, Jani AB, Vijayakumar S. A critical review of variables affecting the accuracy and false-negative rate of sentinel node biopsy procedures in early breast cancer. *Nucl Med Commun* 2005 May;26(5):395-405. Review.
20. Sukumvanich P, Bentrem DJ, Cody HS 3rd, Brogi E, Fey JV, Borgen PI, Gemignani ML. The role of sentinel lymph node biopsy in Paget's disease of the breast. *Ann Surg Oncol* 2007 Mar;14(3):1020-3.
21. Intra M, Zurrada S, Maffini F, Sonzogni A, Trifirò G, Gennari R, Arnone P, Bassani G, Opazo A, Paganelli G, Viale G, Veronesi U. Sentinel lymph node metastasis in microinvasive breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003 Dec;10(10):1160-5.
22. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, Robertson C, Sacchini V, Veronesi P, Orvieto E, De Cicco C, Intra M, Tosi G, Scarpa D. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst* 1999 Feb 17;91(4):368-73.
23. Veronesi U, Zurrada S, Mazzarol G, Viale G. Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection. *World J Surg*. 2001 Jun;25(6):806-8.

24. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget disease of the breast: analysis of 41 patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:397-400.
25. Manni A, Arafah B, Pearson OH. Estrogen and progesterone receptors in the prediction of response of breast cancer to endocrine therapy. *Cancer* 1980;46:2838-2841.
26. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:283-291.11.
27. Hanna W, Alowami S, Malik A. The role of HER-2/neu oncogene and vimentin filaments in the production of the Paget's phenotype. *Breast J* 2003;9:485-490.
28. Nakamura G, Shikata N, Shoji T, et al. Immunohistochemical study of mammary and extramammary Paget's disease. *Anticancer Res* 1995;15:467-470.
29. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4332-4337.
30. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-4289.
31. Marshall J, Griffith K, Haffty B, Solin LJ, Vicini FA, McCormick B, Wazer DE, Recht A, Pierce LJ. Conservative management of Paget disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 2003;97:2142-2149.
32. Sakorafas GH, Blamchard K, Sarr MG, Farley DR. Paget's disease of the breast: a clinical perspective. *Langenbecks Arch Surg* 2001 Nov; 386(6):444-50.

## 6. VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO 1

### **Doença de Paget da mama: expressão de receptores hormonais, HER2 e Ki-67 em 148 casos**

Dos Santos GR<sup>1,4</sup>, Edelweiss MIA<sup>2</sup>, Galimberti V<sup>1</sup>, Intra M<sup>1</sup>, Gatti G<sup>1</sup>, Viale V<sup>3</sup>, Luini A<sup>1</sup>, Veronesi U<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Serviço de Mastologia do Instituto Europeu de Oncologia (IEO)

<sup>2</sup> Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Serviço de Patologia do Instituto Europeu de Oncologia (IEO)

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

#### Correspondência:

Gabriela R. dos Santos

Rua Marques de Sapucaí 100 apto 905 Novo Hamburgo – RS

CEP: 93336-360

Telefone: 051-92381180

E-mail: gabriela@centrodemama.med.br

## **Introdução**

A doença de Paget da mama (DPM) é uma forma rara de câncer de mama, variando entre 0,5 e 4,3% de todos os casos de carcinomas mamários. Na maioria dos casos, a DPM é associada com carcinoma *in situ* ou invasor. O objetivo do estudo é avaliar a presença de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), Ki-67 e HER2 em um grande número de casos.

## **Pacientes e Métodos**

Nós estudamos retrospectivamente 148 pacientes com DPM tratadas no Instituto Europeu de Oncologia (IEO) de novembro de 1996 a fevereiro de 2003.

Os pacientes foram separados em 3 grupos: 1) “DPM pura”, 2) “DPM com carcinoma invasivo adjacente” e 3) “DPM com carcinoma *in situ* adjacente”.

## **Resultados**

O grupo “DPM pura” foi composto de 8 pacientes (5,4%), “DPM e CDIS” foi composto de 50 pacientes (33,79%) e “DPM e carcinoma infiltrante” foi composto de 90 pacientes (60,74%).

No grupo “DPM pura” todos os casos eram negativos para RE, RP e Ki-67; no grupo “DPM e CDIS” foram positivos RE em 35,6%, RP em 24,4% e Ki-67 em 70,5%.

Observamos uma diferença significativa ( $P= 0,009$ ) na expressão de HER2 nos três grupos estudados, mostrando 100% de positividade nos casos de “Paget puro”, diferindo apenas do grupo “Paget com carcinoma invasivo adjacente” (76,1%).

## **Conclusões**

Quase todos os casos de DPM associada a um CDIS ou a um carcinoma invasor mostraram positividade para RE, RP e Ki-67, diferente do grupo “DPM pura”, que teve esses marcadores moleculares negativos.

O nosso estudo mostrou 76,1% de positividade de HER2 ( $P= 0,009$ ) nos casos de DPM associada a carcinoma invasor. Esses achados podem ser úteis nas decisões terapêuticas e na identificação de pacientes que podem se beneficiar com o uso de Trastuzumabe.

**Palavras-chaves:** Doença de Paget da mama, carcinoma, HER2, fatores prognósticos

---



## Introdução

---

A doença de Paget do mamilo foi descrita pela primeira vez por James Paget em 1874 <sup>1</sup>, como uma rara forma de câncer de mama, correspondendo em 0,5 a 4,3% de todos os cânceres de mama <sup>2</sup>.

A doença de Paget da mama (DPM) se apresenta tipicamente com uma alteração do complexo aréolo-mamilar (CAM) da mama envolvida. Muitas mulheres relatam alteração na sensibilidade do CAM, com prurido e ardência. As mudanças superficiais progridem lentamente, produzindo uma aparência áspera do CAM, associada à eritema e descarga papilar.

A DPM ocorre mais freqüentemente em mulheres pós-menopáusicas, com pico de incidência entre 60 e 70 anos de idade, 5 a 10 anos mais tarde que o pico de incidência do carcinoma mamário <sup>3-5</sup>.

Na maioria dos casos (>90%), DPM é associada a um carcinoma *in situ* ou invasivo, podendo ser multifocal <sup>6</sup>. Uma lesão sem massa palpável associada representa um processo não-invasivo (carcinoma *in situ*) em aproximadamente 90% dos casos, enquanto quando aparece uma massa palpável freqüentemente está associada a um carcinoma invasivo <sup>5-9</sup>. A DPM aparece mais comumente associada aos subtipos histológicos sólido ou comedo <sup>8,10</sup>, sendo estes considerados biologicamente mais agressivos, com alto grau nuclear, maior número de mitoses e amplificação do proto-oncogene HER2 <sup>11,12</sup>.

A etiologia e o tratamento desta doença permanecem controversos. A etiologia mais aceita sugere que as células Paget crescem nos ductos mamários e prosseguem até a epiderme do mamilo, baseada no fato de que, cerca de 97% das pacientes com DPM, apresentam um carcinoma subjacente <sup>5</sup> e que na maioria dos casos, a característica imunohistoquímica do carcinoma mamário subjacente tem mostrado semelhança com a doença do mamilo <sup>11,12</sup>. No entanto, ainda existem controvérsias, por causa de um pequeno grupo de pacientes que apresenta apenas doença de Paget do mamilo sem evidência de um carcinomama mamário subjacente.

Na última década, vários estudos descreveram a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona na DPM. Mais recentemente, algumas publicações relataram a hiperexpressão de HER2 na DPM <sup>13,14</sup>. A hiperexpressão de HER2 é excepcionalmente alta nos pacientes com DPM, o que sugere uma possível relação importante na patogênese desta doença <sup>12,15</sup>. A hiperexpressão de HER2 é descrita

em cerca de 20% dos carcinomas mamários invasivos, em 50% dos carcinomas mamários *in situ* e em cerca de 90% dos casos de DPM<sup>30,31</sup>, o que fala a favor de pior prognóstico e potencial agressividade da doença<sup>16</sup>. O prognóstico destes pacientes é determinado pela extensão do carcinoma associado<sup>4</sup>.

Em recentes estudos, a incidência de metástases axilares em pacientes que não apresentavam massa palpável foi de 0-15%<sup>6,8</sup>, a qual aumentou para 60% na presença de massa palpável<sup>5,6</sup>.

O tratamento convencional consiste na mastectomia, por causa da alta incidência de doença multifocal identificada nas peças cirúrgicas de mastectomias<sup>18</sup>, embora vários estudos tenham demonstrado que cirurgia conservadora seguida de radioterapia é uma opção segura de tratamento<sup>18,19</sup>.

A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) tem se tornado um método *standard* para pacientes com doença inicial, sendo um procedimento menos invasivo que a dissecação axilar completa (DA). As vantagens da BLS incluem menos riscos de linfedema, parestesias e infecções. Estudos mostram que a BLS tem uma acurácia de 97% e uma taxa de falso-negativo de apenas 5%<sup>19</sup>. Este procedimento pode ser uma ferramenta importante naqueles pacientes com alto risco de carcinoma invasor subjacente<sup>20</sup>. Portanto, como o risco de carcinoma invasor é alto nos pacientes com DPM, a BLS parece ser tão efetiva quanto a DA na detecção de metástases<sup>19</sup>.

Nós estudamos retrospectivamente 148 pacientes com DPM tratadas no Instituto Europeu de Oncologia (IEO) de novembro de 1996 a fevereiro de 2003. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a positividade dos marcadores moleculares. Ainda foram estudadas as modalidades terapêuticas, as taxas de recorrência locorregional e sobrevida global.

## **Método**

---

### *População*

Este é um estudo observacional de uma coorte histórica (retrospectiva) não concorrente de 148 pacientes com DPM tratadas no Instituto Europeu de Oncologia (IEO) de novembro de 1996 a fevereiro de 2003, com um tempo de seguimento médio de 64.36 meses, com amplitude de 3,87 a 115,81, com fechamento do estudo em maio de 2007.

Foram revisados os registros médicos e histopatológicos.

Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia no IEO, após uma avaliação pré-operatória com mamografia bilateral, análise citológica e/ou histopatológica. Em alguns casos, a avaliação ainda contava com ecografia mamária bilateral e ressonância magnética.

Os pacientes foram separados em 3 grupos: 1) “DPM pura”, 2) “DPM com carcinoma invasivo adjacente”, 3) “DPM com carcinoma in situ adjacente”.

Foram feitas avaliações rotineiramente a cada 6 meses, e aqueles pacientes que não compareciam às consultas eram contatados por telefone.

### *Cirurgia*

O tratamento cirúrgico consistiu na cirurgia conservadora ou na mastectomia. A cirurgia conservadora foi realizada conforme a clássica técnica de quadrantectomia de Veronesi ou ampla ressecção.

A BLS foi realizada nos casos em que a axila era clinicamente negativa. Todos os linfonodos sentinelas foram identificados com a técnica radioguiada. O radiofármaco foi injetado na tarde anterior à cirurgia, ou na manhã da cirurgia. A técnica consistia na injeção de 5 a 10 MBq de tecnécio-99m ligado a partículas de albumina humana (diâmetro de 50 a 200 nm) diluídos em 0.2 ml de solução salina próximo ao tumor. A injeção era subdérmica nos casos de tumor superficial e peritumoral nos casos de lesão profunda. Subsequentemente era realizada linfoscintilografia da mama e da axila nas projeções anterior e oblíqua-anterior para determinar a exata posição do linfonodo sentinela. De 4 a 20 horas após a injeção do radiofármaco, a BLS era realizada durante a cirurgia mamária. O probe envolto por uma capa estéril era usado para identificar o linfonodo sentinela radioativo, e facilitar sua remoção <sup>21</sup>.

### *Exame histopatológico*

Em todos os casos, foi realizada a análise trans-operatória do linfonodo sentinela, com uma media de 60 secções para cada linfonodo, o que tem sido rotina na instituição. Nos casos em que o linfonodo sentinela foi positivo, a dissecação axilar (DA) foi efetuada, enquanto, nos casos em que foi negativo, nenhum tratamento cirúrgico foi efetuada na axila.

Os tumores foram classificados histologicamente de acordo com a Classificação Histológica dos tumores mamários da Organização Mundial da Saúde, modificada por Rosen e Obermann <sup>22</sup>. O grau tumor foi determinado de acordo com Elston e Ellis <sup>22</sup>. A invasão vascular peritumoral foi avaliada conforme Rosen e Obermann <sup>22</sup>.

A avaliação de receptores hormonais e a fração de proliferação tumoral foram realizadas por imuno-histoquímica na parafina do tumor primário usando um sistema indireto de avidina-biotina-peroxidase <sup>21</sup>. Os anticorpos monoclonais para receptores de estrogênio e progesterone (Dako, Glostrup, Denmark) foram usados na diluição de 1/100, e MIB-1 para Ki-67 antígeno (Immunotech, Marseilles, France) usado na diluição de 1/200 <sup>21</sup>. Após a incubação com o primeiro anticorpo, incubação com o segundo por 30 minutos. Após lavar, foram revelados com o sistema estreptavidina peroxidase por 30 minutos. Finalmente, as enzimas são visualizadas após 15 minutos de incubação com diaminobenzina. Também foram realizados cortes com hematoxilina para correlação histológica. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram mais de 10% dos núcleos imunorreativos. A positividade de Her2/neu foi avaliada por imuno-histoquímica pelo Dako Hercep- Test <sup>21</sup>. Os resultados são descritos de 0 a 3+, sendo considerado positivo apenas o resultado 3+ (mais de 10% das células reativas), e esses casos foram confirmados por *FISH test (Fluorescence In Situ Hybridization)*.

A BLS foi previamente descrita <sup>23</sup>. Os linfonodos sentinelas maiores que 5 mm foram cortados a fresco no seu eixo maior e fixados em formalina 10% por 6 a 8 horas, antes de serem embebidos em parafina. Os linfonodos menores que 5 mm eram embebidos inteiros. Quinze pares de seções do preparado de parafina, de 4- $\mu$ m de espessura, eram seccionados a intervalos de 50- $\mu$ m. Se restava tecido residual, pares adicionais eram seccionados a intervalos de 100- $\mu$ m até que o linfonodo fosse inteiramente processado. Um corte de cada par era corado com hematoxilina e eosina (H&E). Quando necessário, para definir a natureza de células atípicas vistas nos cortes de H&E, o corte correspondente do par era testado para citoqueratinas usando um método rápido de processamento (EPOS Anti-cytokeratins/HRP; Dako, Copenhagen, Denmark). Os linfonodos não-sentinelas eram divididos pelos níveis de Berg. Estes eram cortados se maiores 5 mm, e processados rotineiramente na parafina. Cada linfonodo era seccionado a intervalos de 100-500  $\mu$ m e 3 a 6 cortes corados com H&E eram examinados.

### *Análise Estatística*

As variáveis categóricas são descritas pela frequência absoluta e pela frequência relativa parcial.

As diferenças nas proporções são avaliadas pelo Chi-square (Mehta and Patel, 1983) seguido de comparações múltiplas de percentuais.

Foi considerado estatisticamente significativo  $P \leq 0.05$ . Usamos o SPSS - version 14.0 Chicago, Illinois, para a análise estatística.

### *Aspectos Éticos*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## **Resultados**

---

Os casos incluídos neste estudo fizeram tratamento cirúrgico por DPM no IEO.

A média de idade das pacientes foi de 55 anos, variando de 27 a 88 anos. Oitenta e uma pacientes (54,73%) eram pós-menopáusicas.

As variáveis avaliadas no estudo são descritas na tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas, do tumor e do tratamento

Variáveis	CLASSIFICAÇÃO	Total No. (%)
Total de pacientes		148
Estado menopausal <sup>†</sup>	Pré-menopausa	62 (41.9)
	Pós-menopausa	81 (54.7)
pT <sup>†‡</sup>	pT1	48 (32.4)
	pT2	29 (19.6)
	pT3	9 (6.1)
	pT4	5 (3.4)
	pTis	57 (38.5)
	pN0	32 (21.6)
pN	pN1	47 (31.8)
	pN <sub>sentneg</sub>	23 (15.5)
	pNx	46 (31.1)
Invasão vascular <sup>†‡</sup>	Ausente	98 (66.2)
	Presente	32 (21.6)
Grau <sup>†</sup>	G1	4 (2.7)
	G2	37 (25.0)
	G3	85 (57.4)
Cirurgia	Mastectomia	93 (62.8)
	Cirurgia conservadora	55 (37.2)
Terapia sistêmica adjuvante <sup>†</sup>	Quimioterapia	34 (22.9)
	Hormonioterapia	25 (16.9)
	Quimioterapia + hormonioterapia	34 (22.9)
	Nenhuma terapia	55 (37.2)

<sup>†</sup>Valores perdidos para alguns casos

<sup>‡</sup>Calculado no componente invasor

O tamanho do tumor e o estadiamento foram descritos conforme o componente invasor, conforme recomendação da WHO, e para o grupo do “MPD pura e CDIS” considerou-se o estadiamento como pTis.

O estadiamento linfonodal foi feito conforme a pesquisa do linfonodo sentinela ou esvaziamento axilar e os resultados podem ser observados na tabela 1.

A presença de invasão vascular e grau histológico do tumor foi somente avaliada no componente invasor, nos casos com esta característica presente em 21,6% dos casos (32 casos).

Em relação ao tratamento, 55 pacientes (37,2%) foram submetidas à cirurgia conservadora, e 93 (62,8%) à mastectomia.

Cento e duas pacientes foram submetidas à avaliação axilar, sendo que destas 47 (31,76%) apresentavam metástase axilar.

A terapia adjuvante sistêmica foi feita por quimioterapia somente (22,9%), homonioterapia somente (16,9%), ambas (22,9%). Os dados sobre a radioterapia são desconhecidos.

O grupo “DPM pura” foi composto de 8 pacientes (5,4%), “DPM e CDIS” foi composto de 50 pacientes (33,79%) e “DPM e carcinoma infiltrante” foi composto de 90 pacientes (60,81%). (Tabela 2)

Tabela 2: Histologia em 148 pacientes com DPM no IEO

<b>CASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA</b>		No. (%)
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>		148
DPM pura	DPM pura	8 (5,4)
DPM e CDIS	DPM e CDIS comedo	13 (8.8)
	DPM e CDIS sólido	17 (11.5)
	DPM e CDIS micropapilar	2 (1.3)
	DPM e CDIS cribriforme	8 (5.4)
	DPM e CDIS apócrino	2 (1.3)
	DPM e CDIS NE	8 (5.4)
DPM e carcinoma invasor	DPM e carcinoma ductal	86 (58.1)
	DPM e carcinoma lobular	1 (0.7)
	DPM e carcinoma NE	3 (2.0)

DPM: Doença de Paget da Mama; CDIS: Carcinoma ductal *in situ*; NE: Não especificado

Os dados referentes aos marcadores moleculares estão descritos na tabela 3 e nas figuras de 1 - 6.

Tabela 3: Marcadores moleculares estudados em 148 casos com DPM

Grupos	ER †	PR †	Ki-67 †	HER2 †
<b>DPM pura</b>	0/2	0/4	0/2	2/2 (100%)
<b>DPM e CDIS</b>	16/45 (35,6%)	11/45 (24,4%)	31/44 (70,5%)	32/33 (97%)
<b>DPM e carcinoma invasor</b>	42/89 (47,2%)	31/89 (34,8%)	67/87 (77,0%)	54/71 (76,1%)
<b>Valor p</b>	0,141	0,106	0,042	0,009

†Valores perdidos para alguns casos

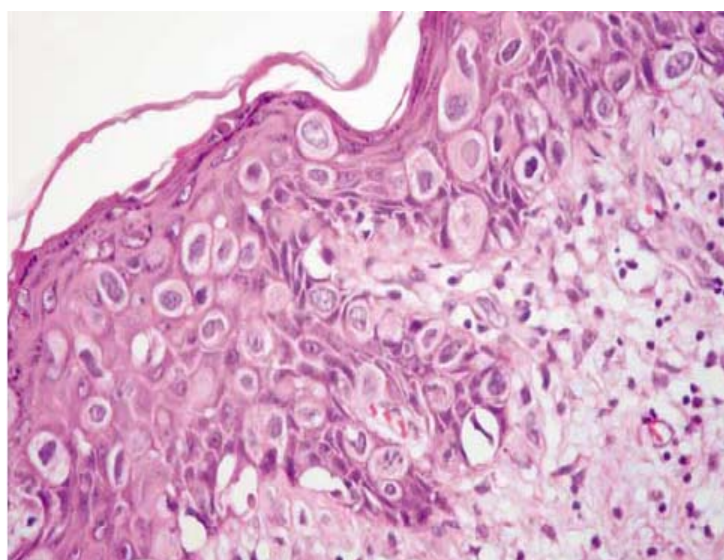


Figura 1- DPM mostrando células de Paget com núcleos redondos atípicos ou núcleos ovais e abundante citoplasma basofílico ou claro. H&E 200x



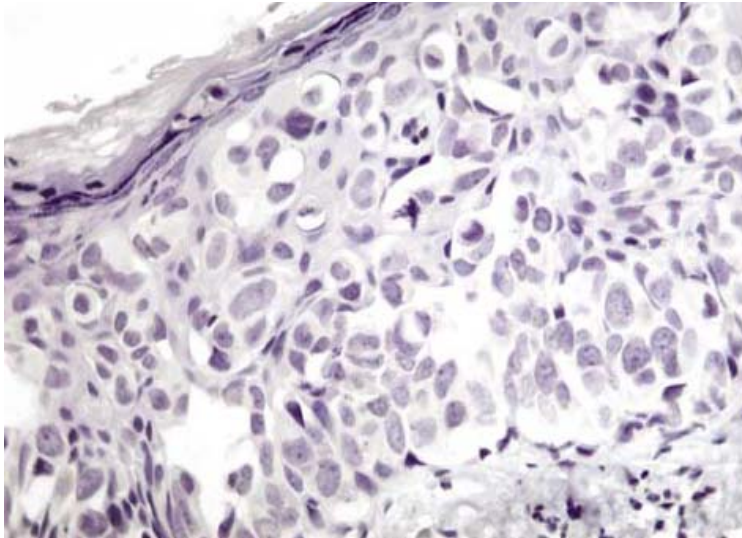


Figura 2- DPM mostrando células de Paget com imunorreação negativa para RE. IHQ anti RE- 200x

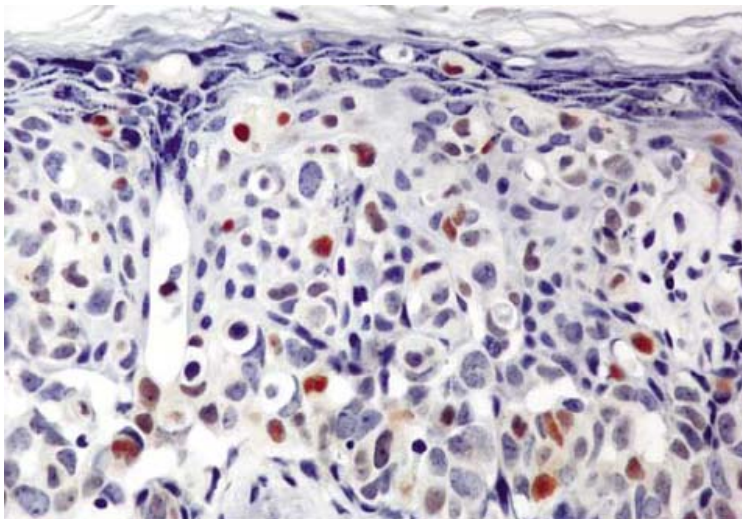


Figura 3- DPM mostrando células de Paget com positividade para Ki-67 em mais de 10% das células tumorais. IHQ anti MIB1- 200x

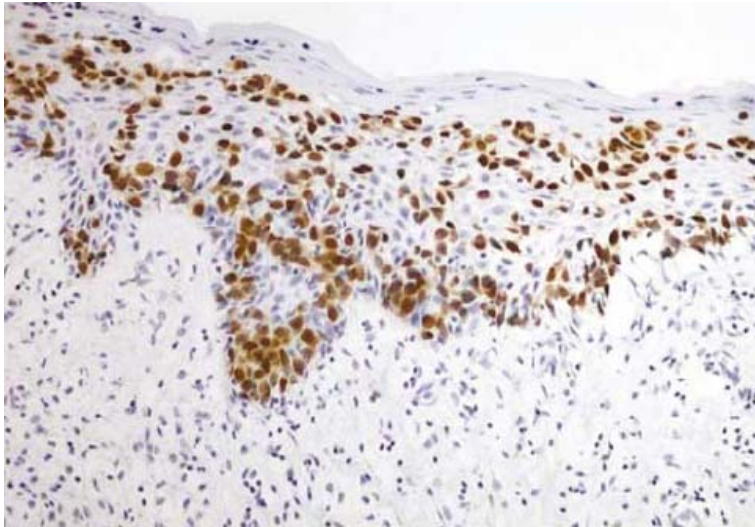


Figura 4- DPM mostrando células de Paget com positividade para Ki-67 em mais de 50% das células tumorais. IHQ anti MIB 1- 100x

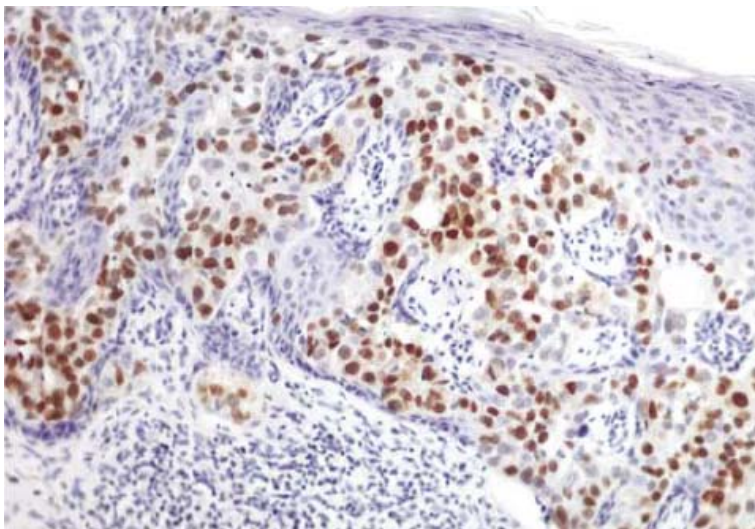


Figura 5- DPM mostrando células de Paget com positividade para RE (carcinoma ductal invasor associado). IHQ anti RE- 100x

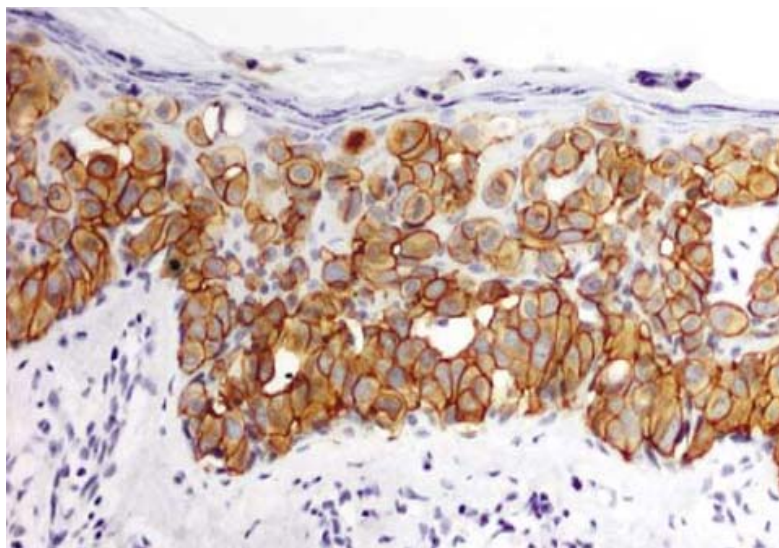


Figura 6- DPM mostrando células de Paget com intensa reação para HER2 (3+) em quase 100% das células tumorais. IHQ – anti HER2- 200x

O seguimento médio foi de 64,36 meses (3,87 – 115,31).

Durante este período, 24 pacientes (16,22%) desenvolveram metástase à distância, 13 (8,8%) desenvolveram recorrência local e 2 (1,35%) metástase axilar.

A sobrevida global observada em 5 anos foi de 81% (IC 95%: 74,2 – 86,8%).

No fechamento do estudo, 100 pacientes estavam livres de doença. Recorrência local ou progressão da doença ocorreu em 48 paciente (32,43%), e destas 28 pacientes morreram, 20 (13,5%) por causa do tumor primário e 8 (5,4%) por outras causas. (Tabela 4)

Tabela 4: Descrição dos eventos em 148 pacientes com DPM no IEO

Descrição dos eventos	Total
<b>Total de pacientes</b>	<b>148</b>
Metástase à distância	24 (16.2%)
Recorrência local	13 (8.8%)
Metástase axilar	2 (1.3%)
Tumor mama contralateral	4 (2.7%)
Outro tumor primário	5 (3.4%)
Morte (outra causa)	8 (5.4%)
Morte (tumor primário)	20 (13.5%)

## Discussão

---

A DPM é uma doença incomum correspondendo a 0,5 a 4,3% de todos os cânceres de mama <sup>1</sup>. A raridade da DPM limita os estudos e, conseqüentemente, dificulta a comparação entre as modalidades terapêuticas.

O presente estudo avaliou 148 pacientes com DPM tratadas no Instituto Europeu de Oncologia (IEO) de novembro de 1996 a fevereiro de 2003, tendo como objetivo estudar a expressão dos marcadores moleculares. Além disso, foram avaliadas as modalidades terapêuticas, as taxas de recorrência locorregional e a sobrevida global.

A média de idade do grupo estudado foi de 55 anos, semelhante aos dados referidos na literatura (50 a 60 anos), representando uma faixa etária ligeiramente maior que a com diagnóstico de carcinoma sem DPM.

A incidência de carcinoma subjacente a DPM referida em estudos anteriores é de 82 a 100% dos casos <sup>24</sup>. Na nossa casuística observamos um percentual de 94,6%.

Em diferentes estudos, o subtipo histológico mais freqüentemente associado à DPM é o tipo comedo <sup>7</sup>. No nosso estudo, no grupo “DPM + CDIS” o subtipo mais encontrado foi o sólido (11,5%) seguido pelo comedo (8,78%).

Vários estudos têm demonstrado a significância biológica e terapêutica dos receptores de estrogênio e progesterona. Alguns estudos têm demonstrado que na DPM os receptores de estrogênio e progesterona são negativos <sup>16</sup>. No nosso estudo, analisando os três grupos, concluímos que esses dados são condizentes com a literatura, pois no grupo “DPM pura” esses receptores foram negativos. Esses receptores passam a se mostrar positivos quando a DPM se associa a carcinoma invasor ou a CDIS.

O Ki-67 se mostrou negativo no grupo “DPM pura”, mas foi positivo nos grupos “DPM e CDIS” (70,5%) e “DPM e carcinoma invasor” (77,0%), o que nos faz pensar em lesão mais agressiva.

O HER2 foi observado em 76,1 a 100% dos casos neste estudo. Na maioria dos casos, as células tumorais dos carcinoma invasor e CDIS mostraram um idêntico padrão das células de Paget, revelando negatividade para RE e RP e progressiva positividade para Ki-67. O oposto ocorre na imuno-expressão de HER2. Os resultados de HER2 no carcinoma invasor e no CDIS subjacente foi idêntico aos resultados nas células de Paget. Portanto, a heterogenicidade das células carcinomatosas pode influenciar na atividade de proliferação ou inibição.

A relação do HER2 no câncer de mama tem sido bem descrita <sup>26</sup>, mas na DPM esse papel ainda não está bem claro <sup>27,28</sup>.

A positividade de HER2 tem sido correlacionada a pior prognóstico nos pacientes com câncer de mama, especialmente naqueles com linfonodos positivos <sup>29</sup>. Muitos estudos têm demonstrado a positividade de HER2 na DPM, variando de 71 a 100% <sup>13</sup>. Os relatos sobre a positividade de HER2 na doença de Paget extra-mamária entretanto são conflitantes. Alguns estudos mostram a positividade de HER2 na doença de Paget extra-mamária em 5 a 55% <sup>13</sup>.

Pacientes com carcinoma de mama metastático e HER2 positivo se beneficiam com tratamento com Trastuzumabe (Herceptin).

Trastuzumab (Herceptin) é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao HER2 inibindo a dimerização com outros receptores, o que provoca a inibição na proliferação e no crescimento celular, aumento da apoptose, possivelmente, reversão da resistência a agentes quimioterápicos <sup>30</sup>.

O tratamento cirúrgico da DPM permanece controverso. Por muito tempo, a mastectomia foi considerada o tratamento padrão. Esse conceito se manteve porque os estudos de peças cirúrgicas de mastectomia mostravam 20 a 40% de multicentricidade ou multifocalidade, o que pode ser subestimado pela mamografia. A cirurgia conservadora seguida de radioterapia tem se mostrado segura no tratamento dessas pacientes. Pacientes tratados apenas com cirurgia conservadora apresentam altas taxas de recidiva local (33%), melhorando significativamente o controle local na adição de radioterapia (87% em 10 anos) (105, 106). A sobrevida e a recidiva são determinadas pela neoplasia subjacente.

O tratamento para a DPM deve seguir a mesma linha das outras formas de carcinoma de mama. Nos casos de carcinoma ductal in situ tratados com cirurgia conservadora, deve-se preconizar o uso de radioterapia, e não indicar a exérese do linfonodo sentinela. Sendo esta então reservada para os casos de carcinoma ductal in situ extenso com indicação de mastectomia. Nos casos de carcinoma invasor, a BLS será indicada nos casos de axila clinicamente negativa.

A BLS é uma arma valiosa no estadiamento axilar, por diminuir a morbidade, com menos riscos de linfedema, dor ou infecção.

O prognóstico da DPM depende do estágio do câncer subjacente, sendo mandatório determinar a natureza e a extensão deste antes de decidir o tipo de terapêutica cirúrgica se pode oferecer.

Observamos uma diferença significativa ( $P= 0,009$ ) na expressão de HER2 nos três grupos estudados, mostrando 100% de positividade nos casos de “DPM pura”, diferindo apenas do grupo “DPM com carcinoma invasivo” (76,1%).

Os achados da literatura referem que, quando associado à DPM, os carcinomas invasores expressam HER2 num percentual maior. Isso nos leva a crer que, na presença de DPM, os carcinomas invasores podem estar relacionados a piores prognósticos, o que faz com que alternativas terapêuticas mais agressivas devam ser cogitadas.

Estudos sugerem que a positividade de HER2 pode prever a resposta às antraciclina e reduzir o benefício do esquema com CMF<sup>32</sup>. Resultados preliminares de estudos clínicos em humanos usando Herceptin (Genentech, South San Francisco, CA) têm sido promissores, mostrando que mulheres com HER2 superexpresso embora apresentem resistência a múltiplas terapias, 11 a 37% mostram resposta objetiva e estabilização da doença<sup>16</sup>.

Em conclusão, RE, RP e KI-67 são negativos na DPM pura, e positivos em 35,6%, 24,4% e 70,5% quando a DPM está associada a CDIS e 47,2%, 34,8% e 77% quando está associada a carcinoma invasor. Nosso estudo mostrou 76,1% de positividade de HER2 ( $P= 0,009$ ) nos casos de DPM associada a carcinoma invasor. Esses achados podem ser úteis nas decisões terapêuticas e na identificação de pacientes que podem se beneficiar com o uso de Herceptin, além de prever a resposta do tratamento com tamoxifeno <sup>32</sup>. O conhecimento sobre a positividade de HER2 na DPM pode ser útil na decisão das estratégias terapêuticas, principalmente naqueles pacientes com doença recorrente. O mais importante é individualizar os casos e oferecer as melhores opções de tratamento para cada paciente.

## Referências

1. Paget J. On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St. Barts Hospital Rep* 1874; 10:87.
2. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget Disease of the Breast: Analysis of 41 Patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 397-400.
3. Jamali FR, Ricci A, Deckers PJ. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 76: 365-381.
4. Kister A, Haagensen C. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 119: 606-609.
5. Paone J, Baker R. Pathogenesis and treatment of Paget's disease of the breast. *Cancer* 1981; 48: 825-829.
6. Yim JH, Wick MR, Philpott GW *et al.* Underlying pathology in mammary Paget's disease. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 287-292.
7. Ashikari R, Park K, Huvos AG *et al.* Paget's disease of the nipple. *Cancer* 1970; 26: 680-685.
8. Chaudary MA, Millis RR, Lane B *et al.* Paget's disease of the nipple: a 10-years review including clinical, pathological and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 8: 139-146.
9. Nance FC, DeLoach DH, Welsh RA *et al.* Paget's disease of the breast. *Ann Surg* 1970; 171: 864-874.
10. Ikeda DM, Helvie MA, Frank TS *et al.* Paget Disease of the nipple: radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1993;189:89-94.
11. Lagios MD, Westdahl PR, Rose MR, Concannon S. Paget's disease of the nipple. Alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma. *Cancer* 1984; 54: 545-551.
12. De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994 Dec;25(12):1264-8.
13. Wolber RA, Dupuis BA, Wick MR. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1991 Aug;96(2):243-7.



14. Meissner K, Riviere A, Haupt G, Loning T. Study of neu-protein expression in mammary Paget's disease with and without underlying breast carcinoma and in extramammary Paget's disease. *Am J Pathol* 1990 Dec;137(6):1305-9.
15. Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B *et al.* Pathogenesis of Paget's disease: epidermal heregulin-alpha, motility factor, and the HER receptor family. *J Natl Cancer Inst* 2000 Apr 19;92(8):622-8.
16. Anderson JM, Ariga R, Govil E, Bloom KJ, Francescatti D, Reddy VB, Gould VE, Gattuso P. Assessment of Her-2/Neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in mammary Paget disease and underlying carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003 Jun;11(2):120-4.
17. Kawase K, DiMaio DJ, Tucker SL, *et al.* Paget's disease of the breast: there is a role for breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol* 2005 May;12(5):391-7.
18. Pierce LJ, Haffty BG, Solin LJ, *et al.* The conservative management of Paget's disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 1997 Sep 15;80(6):1065-72.
19. Vijayakumar V, Boerner PS, Jani AB, Vijayakumar S. A critical review of variables affecting the accuracy and false-negative rate of sentinel node biopsy procedures in early breast cancer. *Nucl Med Commun* 2005 May;26(5):395-405. Review.
20. Sukumvanich P, Bentrem DJ, Cody HS 3rd, Brogi E, Fey JV, Borgen PI, Gemignani ML. The role of sentinel lymph node biopsy in Paget's disease of the breast. *Ann Surg Oncol* 2007 Mar;14(3):1020-3.
21. Intra M, Zurrada S, Maffini F, Sonzogni A, Trifirò G, Gennari R, Arnone P, Bassani G, Opazo A, Paganelli G, Viale G, Veronesi U. Sentinel lymph node metastasis in microinvasive breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003 Dec;10(10):1160-5.
22. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, Robertson C, Sacchini V, Veronesi P, Orvieto E, De Cicco C, Intra M, Tosi G, Scarpa D. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst* 1999 Feb 17;91(4):368-73.
23. Veronesi U, Zurrada S, Mazzarol G, Viale G. Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection. *World J Surg*. 2001 Jun;25(6):806-8.

24. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget disease of the breast: analysis of 41 patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:397-400.
25. Manni A, Arafah B, Pearson OH. Estrogen and progesterone receptors in the prediction of response of breast cancer to endocrine therapy. *Cancer* 1980;46:2838-2841.
26. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:283-291.11.
27. Hanna W, Alowami S, Malik A. The role of HER-2/neu oncogene and vimentin filaments in the production of the Paget's phenotype. *Breast J* 2003;9:485-490.
28. Nakamura G, Shikata N, Shoji T, et al. Immunohistochemical study of mammary and extramammary Paget's disease. *Anticancer Res* 1995;15:467-470.
29. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4332-4337.
30. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-4289.
31. Marshall J, Griffith K, Haffty B, Solin LJ, Vicini FA, McCormick B, Wazer DE, Recht A, Pierce LJ. Conservative management of Paget disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 2003;97:2142-2149.
32. Sakorafas GH, Blamchard K, Sarr MG, Farley DR. Paget's disease of the breast: a clinical perspective. *Langenbecks Arch Surg* 2001 Nov; 386(6):444-50.

## 7. VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 2

### **Paget's disease of the breast: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature**

Mujgan Caliskan, MD<sup>1</sup>, Giovanna Gatti, MD<sup>1</sup>, Irina Sosnovsky, MD<sup>1</sup>, Nicole Rotmensz, MSc<sup>2</sup>, Edoardo Botteri, BSc<sup>2</sup>, Simona Musmeci, BSc<sup>1</sup>, Gabriela Santos, MD<sup>1</sup>, Giuseppe Viale, MD<sup>3,4</sup>, and Alberto Luini, MD<sup>1,4</sup>

*Divisions of <sup>1</sup>Breast Surgery, <sup>2</sup>Epidemiology and Biostatistics, <sup>3</sup>Pathology European Institute of Oncology, Milan, Italy, and <sup>4</sup>University of Milan School of Medicine*

#### Correspondence to:

Alberto Luini, MD

Via Ripamonti 435, 20141 Milan, Italy

Tel: + 39 02 57489725

Fax: + 39 02 57489780

e-mail address: [alberto.luini@ieo.it](mailto:alberto.luini@ieo.it)

*Aceito na Revista Breast Cancer Research and Treatment em Dezembro de 2007*

## **Abstract**

### **Background:**

Paget's disease of the breast is an uncommon presentation of breast malignancy, accounting for 1 to 3% of all the breast tumors and presents in different histopathologic patterns: in association with an underlying invasive or non invasive carcinoma, or without any underlying neoplasia. In the literature, different methods are used for the treatment. Mastectomy with or without axillary dissection has been considered as the standard treatment procedure for many years. Several studies have already shown that breast conservation with radiation therapy is an oncologically safe option. Regarding the axillary approach, several studies have documented the presence of positive sentinel lymph node even in Paget's disease alone. The objective of this study was to retrospectively analyze outcome of patients affected by Paget's breast disease and to define our institutional experience.

### **Patients and methods:**

Between May 1996 and February 2003, 114 patients with confirmed Paget's disease of the breast were retrieved and underwent surgery at the European Institute of Oncology of Milan, Italy. The median age of the patients was 54 years at the time of the diagnosis. In our study, the histopathological examination of the operated specimen revealed one hundred seven patients with Paget's disease associated with an underlying invasive or non invasive carcinoma, and seven patients without underlying carcinoma. Patients underwent either conservative breast surgery or mastectomy, with or without sentinel lymph node biopsy and/or axillary surgery. Each patient was evaluated after surgery at a multidisciplinary meeting to selecting systemic therapy.

### **Results:**

Seven patients had "pure" Paget's disease of the breast and one hundred seven had the disease associated with an underlying carcinoma. As surgical techniques 71 mastectomies and 43 breast conserving surgeries have been performed. Complete axillary dissection was done in patients with clinically positive lymph node and/or sentinel lymph node biopsy positive. Sentinel lymph node biopsy was performed in nineteen patients with invasive component and five were positive and underwent axillary dissection. Eleven sentinel lymph node biopsies were done in patients with non invasive component and none of them was positive. Adjuvant systemic therapies were based on the final tumor, node and metastasis

stage: thirty patients received adjuvant chemotherapy alone, fourteen received endocrine treatment alone, twenty-six patients were evaluated to receive both chemo and endocrine therapy. The median duration of follow up was 73 months and was updated in the last 6 months. Five patients developed local recurrence, one had regional recurrence, another two had loco-regional recurrences and fourteen had distant metastasis as a first event. Malignancy-related deaths were censored in the statistical analyses cancer for and due to another tumor in eleven patients. Additionally, deaths were not related to malignancy totally in thirteen patients.

**Conclusions:**

Screening examination and imaging techniques are fundamental. Breast conserving surgery combined with breast irradiation for patients with invasive and non invasive breast carcinoma has become the treatment of first choice. All surgical conservative approaches should include the complete nipple-areolar complex and margins of resected specimen free of tumor. Thanks to the evolution of the conservative approach, good cosmetic result can be obtained. To be informed about the axillary lymph node status and to avoid the patient to have a second surgical approach, sentinel lymph node biopsy should be performed.

**Keywords:** Paget's disease of the breast, breast surgery, sentinel lymph node biopsy

## Introduction

Paget's disease of the nipple was first described in 1856 by Velpeau as an uncommon entity of the breast [1], followed by the description of Sir James Paget in 1874, as a syndrome in which ulceration of the nipple was associated with an underlying cancer [2]. Paget's disease of the breast is an uncommon presentation of breast malignancy, accounting for 1 to 3% of all the breast tumors [3-5]. Clinically, it is characterized by nipple or areolar erythema, eczema, ulceration, bleeding and itching. The diagnosis of Paget's disease is often delayed for months because of its mistaken diagnosis for a benign dermatologic disease involving the nipple. The histopathologic diagnosis is confirmed with a full-thickness biopsy of the nipple and areola.

Paget's disease of the breast presents in different histopathologic patterns: in association with an underlying invasive or non invasive carcinoma, or without any underlying neoplasia. The underlying carcinoma can be located in any part of the breast. The incidence of the multifocality or multicentricity of the associated underlying carcinoma in Paget's disease has been reported in 32% to 41% of patients [6,7]. It is characterized histopathologically by the infiltration of the nipple epidermis with large round and ovoid tumor cells with abundant pale cytoplasm and vesicular nuclei with hyperchromatic nuclei with prominent nucleoli [8]. The pathogenesis of Paget's disease still remains debatable: there are two theories about the origin of the Paget's cells. Transformation theory proposes that Paget's cells are transformed in situ keratinocytes of the epidermis of the nipple [9] and, whereas the most widely accepted second theory assumes that Paget's cells are ductal carcinoma cells that have migrated from the underlying mammary ducts to the epidermis of the nipple [10,11]. Lagios et al in their experience reported although Paget's disease of the nipple, without associated underlying breast carcinoma [12]. The second theory on the pathogenesis of Paget's disease is supported by the presence of associated underlying breast carcinoma in nearly all patients [3,4,13].

In the literature, different methods are used for the treatment of Paget's disease of the breast: nipple excision alone, radiotherapy alone, central lumpectomy or quadrantectomy with or without radiation, total mastectomy. Mastectomy with or without axillary dissection has been considered as the standard treatment procedure for these patients for many years [3,4,11,14,15]. However, it is reasonable to consider applicability of breast-conserving surgery: it has demonstrated similar long term survival rates than mastectomy in long-term follow-up studies [8,16,17,18]. Several studies have already shown that breast conservation with radiation therapy is an oncologically safe option [19]. Regarding the axillary approach,

several studies have documented the presence of positive sentinel lymph node even in Paget's disease alone; sentinel lymph node biopsy should be considered to evaluate the axilla in all patients with Paget's disease [20,21]. This report may be supported by the fact that there is almost always an associated underlying carcinoma.

The objective of this study was to retrospectively analyze outcome of patients affected by Paget's breast disease and to define our institutional experience.

### **Patients and methods**

Between May 1996 and February 2003, 148 patients underwent surgery for Paget's disease of the breast at the European Institute of Oncology of Milan, Italy, and were included into a specific database: the information was completed using data from the Institutional Breast database and additional specific data directly from medical records. Patients with recurrent breast carcinoma, other primary tumor, metastatic disease, those who received neoadjuvant treatment, and male patients were excluded from the analysis. Finally, hundred fourteen patients with confirmed Paget's disease of the breast were retrieved, and Table 1 shows the patient's characteristics and stratification for invasive/non invasive tumors.

The median age of the patients was 54 years (range 27-88) at the time of the diagnosis. A preoperative mammogram was performed at presentation in 106 patients with clinical findings of Paget's disease. In our study, the histopathological examination of the operated specimen revealed one hundred seven (94%) patients with Paget's disease associated with an underlying invasive or non invasive carcinoma, and seven (6%) patients without underlying carcinoma. As a surgical approach, patients underwent either conservative breast surgery (including a complete excision of the nipple-areola complex) or mastectomy, with or without sentinel lymph node biopsy and/or axillary surgery.

Each patient was evaluated after surgery at a multidisciplinary meeting to selecting systemic therapy. The presence of invasive carcinoma was a recommendation for systemic adjuvant chemotherapy treatment. Endocrine therapy was indicated for patients with endocrine responsive disease. Thirty-five out of forty-three patients in the group of the breast conserving surgery were evaluated to receive breast irradiation, including boost, intraoperative and standard radiotherapy, and four patients of the mastectomy group received chest wall irradiation.

### **Statistical methods**

Cancer specific survival (CSS) was measured from the date of resection to the date of death due to breast cancer, with patients alive at the end of observation or those who died from causes other than breast cancer being censored in survival analyses. Disease free survival (DFS) was measured from the date of resection to the date of any first event, with patients free of disease at their last follow-up visit being censored in survival analyses. The Log-rank test was used to assess survival differences between groups in the univariate analysis. Multivariate analysis was not performed due to the limited number of events. All analyses were performed with the SAS software (SAS Institute, Cary, NC).

## Results

Regarding the age classification, the number of patients affected is higher between 35-49 years old in cases of Paget's disease associated with an invasive carcinoma and after 65 years old in cases of Paget's disease associated with a non invasive carcinoma. As expected, the rate between the presence and absence of an associated underlying tumor was significantly different: seven patients (6%) had "pure" Paget's breast disease and one hundred seven (94%) had the disease associated with an underlying carcinoma. Table 2 shows the histopathologic findings at definitive surgery. There were seven patients without underlying carcinoma, thirty-nine (34%) patients with Paget's disease associated with an in situ carcinoma: solid (n=13), comedo (n=9), cribriforme (n=7), micropapillary (n=2), apocrine (n=2) and others (n=6). The disease of sixty eight (60%) patients was associated with an underlying invasive carcinoma: ductal (n=64), lobular (n=1), mucinous (n=1) and invasive Paget's disease (n=2). Pathological assessment included evaluation of histological type and size of the tumor, lymph node status, tumor grading, estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) status, Ki-67 labeling index, c-erbB-2 overexpression and vascular invasion. We noticed that patients with Paget's disease had more likely ER and PR negativity, a high histologic grade and an overexpression of c-erbB-2 oncoprotein.

As surgical techniques we have performed 71 (62%) mastectomies and 43 (38%) breast conserving surgical treatments: a more detailed description is 50 (74%) mastectomies and 18 (27%) breast conserving surgery for disease associated with an underlying invasive component, 21 mastectomies (46%) and 25 (54%) breast conserving surgeries for Paget's disease associated with an underlying non invasive carcinoma or pure Paget nipple disease. Complete axillary dissection was done in patients with clinically positive lymph node and/or sentinel lymph node biopsy positive. Of 85 patients who had axillary lymph nodes



examination, 35 patients had axillary metastasis. Sentinel lymph node biopsy was performed in nineteen patients with invasive component and five were positive and underwent axillary dissection. Eleven sentinel lymph node biopsies were done in patients with non invasive component and none of them was positive.

Adjuvant systemic therapies were based on the final tumor, node and metastasis stage and the multidisciplinary evaluation was so: thirty patients received adjuvant chemotherapy alone, fourteen received endocrine treatment alone, twenty-six patients were evaluated to receive both chemo and endocrine therapy. In the non invasive group, twelve patients received endocrine therapy. Seventeen of eighteen patients who underwent breast conserving surgery because of presence of underlying carcinoma received breast irradiation: thirteen (72%) were evaluated for boost radiotherapy followed by post-operative breast radiotherapy, four patients (22%) received standard breast irradiation and one patient did not receive radiotherapy. Due to specific histological findings making us suspect a higher risk of local relapse of disease, an external radiotherapy to the chest wall was delivered in four patients treated with mastectomy. In the non invasive group with breast conserving surgery, two patients (8%) received intraoperative radiotherapy with electrons (ELIOT), fourteen received the standard breast irradiation, other two were evaluated for boost radiation and the remaining seven patients (28%) did not receive radiotherapy.

Table 3 describes the events related to breast cancer: five patients developed local recurrence, one had regional recurrence, another two had loco-regional recurrences and fourteen had distant metastasis as a first event. Among forty-three patients who underwent conservative surgery, after a median follow-up of 73 months, we observed six loco-regional recurrences, four invasive and two non invasive, and no distant metastasis. Regarding the breast conserving surgery group, the three local disease recurrences indicated in the pathologic findings for the non invasive group were: non invasive component in one patient (treated with mastectomy and lymph node biopsy), invasive component in another patient (treated with conservative breast surgery and lymph node biopsy), and in the remaining patient, Paget's disease reappearance on the surgical scar (underwent conservative surgery). One patient who had received mastectomy suffered of local recurrence with invasive component and underwent soft tissue excision of chest wall. In the invasive group, only one local recurrence occurred and the patient underwent mastectomy.

Table 4 depicts univariate survival analysis. Vascular invasion was the only statistically significant prognostic factor for both CSS and DFS. Even if not statistically significant, early age, tumor diameter larger than 2 cm and nodal involvement were

consistently associated with worse CSS and DFS. CSS was significantly poorer for patients with invasive disease ( $P=0.03$ ; Figure 1). DFS was similar in the two groups ( $P=0.64$ ; Figure 2)

The median duration of follow up was 73 months and was updated in the last 6 months. No patient was lost to follow-up. Malignancy-related deaths were censored in the statistical analyses cancer for and due to another tumor in eleven patients. Additionally, deaths were not related to malignancy totally in thirteen patients.

## Discussion

Paget's disease, as a special form of breast cancer, remains unusual. In our study, the median age of the patients was 54 years old, similar with the given literature where the peak incidence of is between 50-60 years old, a population of women older than breast cancer without Paget's disease. The most frequently reported symptoms are nipple discharge, scaling or eczematous changes, like erythema, eczema or ulceration. Most of our patients had two or more symptoms at presentation. The eczematous reaction almost always appears first on the nipple, subsequently spreading to the areola [22, 23].

Paget's disease of the breast is diagnosed primarily by clinical exam, so it should be diagnosed at the moment of the nipple changes when no palpable mass in the breast is present. In patients whose disease is confined to the nipple, prognosis is better than in those accompanied by a palpable mass in the breast and suspicious mammogram [24].

The presence of a palpable breast mass or suspicious mammogram is with a high probability accompanied with an underlying cancer, usually an invasive carcinoma, and prognosis is determined by the stage of the malignancy. In our series, we reported 21 cases (19%) without radiologic findings [6 (9%) in invasive group and 15 (33%) in non invasive group] and 85 cases (77%) with radiologic findings [57 (86%) in invasive group and 28 (62%) in non invasive group]. In a recent study including 40 women with a benign mammogram and no palpable mass, the majority (68%) had non invasive ductal carcinoma and invasive cancer occurred in 5% of the patients [24]. Magnetic resonance imaging and breast ultrasound have been considered for screening and diagnosis (25): in case of non invasive breast cancer, magnetic resonance imaging (MRI) has a sensitivity of 95% compared to 70% with mammography (26) and seems able to differentiate the normal from the abnormal nipple and tumors confine to the retroareolar tissue from tumor involving the nipple/areolar complex (25). As underlying carcinoma is common even in women with a benign mammogram and no

palpable mass, breast ultrasound and MRI may be useful in detecting distant lesions specially in young women.

Compared with those of the given literature, the rate of associated underlying carcinoma in Paget's disease of the breast in our series (94%) was similar as the other studies (82% to 100%) (3,6,7,11). Other series concluded that an underlying breast tumor is present in nearly 96-100% of these patients, reflecting the prognosis of the disease [3,4,8]. The majority of the patients have underlying cancer and their prognosis depends primarily by the presence or absence of an invasive component [3, 5]. In our study, even if not statistically significant, early age, tumor diameter larger than 2 cm and nodal involvement were consistently associated with worse prognosis.

In different series, the most associated underlying non invasive carcinoma is the "comedo" type [3,4]. In our study, the "solid" type (33%) was higher than the "comedo" type (23%). Invasive cancer associated with Paget disease was more commonly estrogen and progesterone negative, with high pathological grade [17]. We confirmed this report in our study: in the invasive disease group, we found 38 of 68 (56%) patients with estrogen receptor negative, 44 of 68 (65%) with progesterone receptor negative, and 41 of 66 (62%) cases were histologically Grade III and 25 of 66 (38%) were Grade II . A more pronounced affirmation of these data is seen in the non invasive disease group (Table 2). A high positivity for c-erbB-2 in Paget's breast disease with underlying invasive and non invasive carcinoma was demonstrated in several studies [27,28,29]. C-erbB-2 overexpression in breast carcinoma is known to be associated with an aggressive disease potential and with worse prognosis [30,31,32]. In our findings 71 of 81 patients (88%) had an overexpressed c-erbB-2 oncoprotein.

To achieve adequate local control in a disease in which almost always an underlying carcinoma is associated, mastectomy has been the standard treatment for the Paget's disease of the breast. Several studies have shown that 20% to 40% of mastectomy specimens from patients with Paget's disease have multifocal or multicentric component and were often underestimated in mammography [4,5,6]. In these cases a breast conserving surgical approach without mastectomy is problematic. Dixon et al. and Polgar et al reported a high local recurrence rate in patients with underlying carcinoma treated with local excision alone and concluded that local excision alone was not an appropriate treatment [5, 33]. Among our forty-four patients who underwent conservative surgery, after a median follow-up of 73 months, we observed six loco-regional recurrences, four invasive and two non invasive, and no distant recurrence. Breast conserving surgery is safe in patients with Paget's disease,

as it provides acceptable local control when the disease is adequately excised. Regarding our series, the non invasive Paget group undergoing breast conserving surgery, local or loco-regional relapse was seen at three of five patients who did not receive breast irradiation. Stockdale et al. reviewed 28 patients with Paget's disease of the nipple treated with nipple biopsy and radiotherapy alone and three of them having an underlying mass developed recurrence and died of metastatic disease [34]. Invasive recurrence is associated with poor prognosis after breast-conserving surgery in patients with Paget disease of the nipple [5,6]. Three of our five recurred patients of the non invasive group developed invasive breast carcinoma and two of them were of the high Grade III and associated with axillar metastasis too. The first results of the current study were so, although long term follow-up will be required. However, few studies have suggested in recent years a role for breast-conserving therapy in selected groups of patients, including patients without the presence of palpable mass or mammographic changes. Pierce et al. reported experience on selected patients that the combination of conservative breast surgery and radiation treatment is an alternative to mastectomy [18]. Data from Marshall et al confirm excellent rates of local control, disease-free survival, and overall survival at 10 and 15 years following breast conserving therapy and radiotherapy for Paget's disease of the breast and this study continues to support the recommendation of local excision and definitive breast irradiation as an alternative to mastectomy in the treatment of selected patients [35]. Chen C et al. in their recent large analysis concluded that patients who underwent central lumpectomy and mastectomy for Paget's disease of the breast had similar outcomes [17].

Breast conserving surgery and sentinel lymph node biopsy are the treatment of choice for most women with early-stage breast cancer [36,37]. Since its introduction in the mid-1990s, sentinel lymph node biopsy has been rapidly adopted for axillary staging of clinically node-negative breast cancer patients [38]. As confirmed in the definitive histopathologic specimen, Paget's disease of the breast is almost always associated with an underlying breast cancer, even in absence of clinical and/or radiological findings. So patients should be treated similar to other breast cancer. Sentinel lymph node biopsy should be performed to evaluate the axilla when invasive breast cancer and in selected patients with associated ductal intraepithelial neoplasia [21,39]. Sukumvanich et al described in their "Paget only" cohort including 39 patients, that invasive cancer was found in 27% of cases and the frequency of positive sentinel lymph node biopsy was found in 11% patients [20].

The rarity of Paget's disease of the breast does not allow for randomized trials comparing treatment modalities, with the aid of improved mammographic and radiotherapy

techniques, the breast-conserving approach has been considered as a treatment option in selected patients [24,35]. Although long term follow-up will be required, data from previous studies suggest that the type of surgical treatment did not result in differences in DSS and RFS. Due to the limited small number of patients, different classification of selected patients and required long term follow-up, there are no randomized trials to choose to best treatment for each case.

### **Conclusions**

In Paget's disease of the breast, screening examination and imaging techniques are fundamental. Comparing our findings to those of published studies, we believe that breast conserving surgical therapy combined with breast irradiation for patients with invasive and non invasive breast carcinoma has become the treatment of first choice. To reduce the risk of local recurrence in Paget's disease, all surgical conservative approaches should include the complete nipple-areolar complex and margins of resected specimen free of tumor. Nowadays, thanks to the evolution of the conservative approach to breast cancer, nipple reconstruction and nipple tattoo, good cosmetic result can be obtained. To be informed about the axillary lymph node status and, in case of associated underlying invasive or microinvasive carcinoma and to avoid the patient to have a second surgical approach, sentinel lymph node biopsy should be performed, even if clinical and radiological exams are negative.

## References

1. Velpeau A. On Disease of the Mammary Areola Preceding Cancer of the Mammary Region (translation by H. Mitchell). London: Sydenham Society, 1856.
2. Paget J. On disease of the mammary areola preceding carcinoma of the mammary gland. *St Bartholomews Hospital Report* 1874;10:87–9.
3. Ashikari R, Park K, Huvos AG, Urban JA. Paget's disease of the breast. *Cancer* 1970;26:680-5.
4. Chaudary MA, Millis RR, Lane EB, Miller NA. Paget's disease of the nipple: a ten-year review including clinical, pathological, and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res Treat* 1986;8:139 – 46.
5. Dixon AR, Galea MH, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Paget's disease of the nipple. *Br J Surg* 1991;78:722 – 3.
6. Kothari AS, Beechey-Newman N, Hamed H, Fentiman IS, D'Arrigo C, Hanby AM. Paget disease of the nipple: a multifocal manifestation of higher-risk disease. *Cancer* 2002;95:1-7.
7. Fu W, Mittel VK, Young SC. Paget disease of the breast: analysis of 41 patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:397-400.
8. Bijker N, Rutgers EJ, Duchateau L, Peterse JL, Julien JP, Cataliotti L et al. Breast-conserving therapy for Paget's disease of the nipple. *Cancer* 2001;91:472-77.
9. Muir R. Pathogenesis of Paget's disease of the nipple and associated lesions. *BR J Surg* 1935;22:728-37.
10. Inglis K. Paget's disease of the nipple, with special reference to changes in the ducts. *Am J Pathol* 1946;22:1-33.
11. Yim JH, Wick MR, Philpott GW, Norton JA, Doherty GM. Underlying pathology in mammary Paget's disease. *Ann Surg Onc* 1997; 4:287-92.
12. Lagios MD, Westdahl PR, Rose MR, Concannon S. Paget's disease of the nipple. Alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma. *Cancer* 1984;54:545-51.
13. Kollmorgen DR, Varanasi Js, Edge SB, Carson WE III. Paget's disease of the breast: a 33-year experience. *J Am Coll Surg* 1998;187:171-7.
14. Paone JF, Baker RR. Pathogenesis and treatment of Paget's disease of the breast. *Cancer* 1981;48:825-9.
15. Freud H, Maydovnik M, Laufer N, Durst A. Paget's disease of the breast. *J Surg Oncol* 1977;9:93-8.

16. Kawase K, Dimaio DJ, Tucker SL, Buchholz TA, Ross MI, Feig BW, et al. Paget's disease of the breast: There is a role for breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol* 2005; 1:21–7.
17. Chen C, Sun L and Anderson B. Paget Disease of the Breast: Changing Patterns of Incidence, Clinical Presentation, and Treatment in the U.S. *Cancer* , 2006 ; 107 ; 1448 – 1458
18. Pierce LJ, Haffty BG, Solin LJ, McCormick B, Vicini FA, Wazer DE, et al. The conservative management of Paget's disease of the breast with radiotherapy. *Cancer* 1997;80:1065–72.
19. P.Joseph KA, Ditkoff BA, Estabrook A., et al. Therapeutic options for Paget's disease: a single institution Long-Term Follow-up study. *Br J* 2007; volume 13 Number 1:110-111.
20. Sukumvanich P, Bentrem DJ, Cody HS, et al. The role of sentinel lymph node biopsy in Paget's disease of the Breast. *Ann Surg Oncol*.2007 Mar;14(3):1020-3.
21. Laronga C, Nasson D, Hoover S, et al. Paget's disease in the era of sentinel lymph node biopsy. *Am J Surg* 2006 Oct; 192(4):481-3
22. Osther PJ, Balslev E, Blichert-Toft M. Paget's disease of the nipple. *Acta Chir Scand* 1990; 156 : 343–352.
23. Jamali FR, Ricci A, Deckers PJ. Paget's disease of the breast. *Am J Surg* 1970; 76: 365–381.
24. Zakaria S, Pantvaidya G, Gosh K, Degnim AC. Paget's disease of the breast: accuracy of preoperative assessment. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 102(2):137-42.
25. Friedman EP, Hall-Craggs MA, Mumtaz H, Schneidau A. Breast MR and the appearance of the normal and abnormal nipple. *Clin Radiol* 1997; 52:854-61.
26. Soderstrom CE, Harms SE, Copit DS et al (1996) 3D RODEO breast MRI of lesions containing ductal carcinoma in situ. *Radiology* 201:427-432.
27. Haerslev T and Krag JG. Expression of citokeratin and erbB-2 oncoprotein in Paget's disease of the nipple. An immunohistochemical study, *APMIS* 100 (1992), 1041-1047.
28. Wolber RA, Dupuis BA, Wick MR. Expression of c-erb-B2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am J Clin Pathol* 1991;96:243-47.
29. Lammie Ga, Barnes DM, Millis RR, Gullick WJ. An immunohistochemical study of the presence of c-erbB-2 protein in Paget's disease of the nipple. *Histopathology* 1989;15:505-14.

30. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S et al. The long term significance of c-erbB-2 in primary breast cancer, *Br.J.Cancer* 63 (1991), 447-450.
31. McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM et al. Prognostic significance of c-erbB-2 and oestrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res.*51 (1991), 3296-3303.
32. Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JF, Bell J, Nicholson R et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br.J.Cancer* 63 (1991), 439-443.
33. Polgar C, Orosz Z, Kovacs T, Fodor J. Breast-conserving therapy for Paget disease of the nipple: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Study of 61 patients. *Cancer* 2002;94:1904-5
34. Stockdale AD, Brierley JD, White WF, Folkes A, Rostom AY. Radiotherapy for Paget's disease of the nipple: a conservative alternative. *Lancet* 1989;2:664-6.
35. Marshall JK, Griffith KA, Haffty BG, Solin LJ, Vicini FA, McCormick B et al. Conservative management of Paget disease of the breast with radiotherapy: 10- and 15-year outcomes. *Cancer* 2003;97(9):2142-9.
36. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N England J Med* 2002; 347:1233-41
37. Shivers S, Cox C, Leight G, et al. Final results of the Department of Defense multicenter breast lymphatic mapping trial. *Ann Surg Oncol* 2002;9:248-55
38. Lucci JrA, Kelemen PR, 3rd Miller C et al. National practice patterns of sentinel lymph node dissection for breast carcinoma. *J Am Coll Surg*2001; 192(4): 453-8
39. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:546-53.



Table 1: Patients' characteristics and stratification for histology

Variable	CLASSIFICATION N	Total No. (%)	Invasive Disease*	Non invasive Disease**
			No. (%)	No. (%)
<b>All patients</b>		114	68	46
<b>Age</b>	< 35 years	11 (9.6)	9 (13.2)	2 (4.3)
	35-49 years	41 (36.0)	27 (39.7)	14 (30.4)
	50-64 years	36 (31.6)	23 (33.8)	13 (28.3)
	≥ 65 years	26 (22.8)	9 (13.2)	17 (37.0)
<b>Radiologic diagnosis<sup>†</sup></b>	Positive Mammogram	85 (76.6)	57 (86.4)	28 (62.2)
	Negative Mammogram	21 (18.9)	6 (9.1)	15 (33.3)
	No Mammogram	5 (4.5)	3 (4.5)	2 (4.5)
<b>Sentinel node biopsy (SNB)</b>	Positive SNB	5 (4.4)	5 (7.4)	0 (0.0)
	Negative SNB	25 (21.9)	14 (20.6)	11 (23.9)
	No SNB	84 (73.7)	49 (72.1)	35 (76.1)
<b>pT<sup>†‡</sup></b>	pT1	37 (54.4)	37 (54.4)	-
	pT2	23 (33.8)	23 (33.8)	-
	pT3	5 (7.4)	5 (7.4)	-
	pT4	2 (2.9)	2 (2.9)	-
	pTx	1 (1.5)	1 (1.5)	-
<b>pN</b>	pN0	50 (43.9)	29 (42.6)	21 (45.7)
	pN1	22 (19.3)	22 (32.4)	-
	pN+	13 (11.4)	13 (19.1)	-
	pNx	29 (25.4)	4 (5.9)	25 (54.3)
<b>Vascular invasion<sup>‡</sup></b>	Absent	43 (63.2)	43 (63.2)	-
	Present	25 (36.8)	25 (36.8)	-

<b>Oestrogen Receptors<sup>†</sup></b>	Positive	43 (41.3)	30 (44.1)	13 (36.1)
	Negative	61 (58.7)	38 (55.9)	23 (63.9)
<b>Progesterone Receptors<sup>†</sup></b>	Positive	33 (31.7)	24 (35.3)	9 (25.0)
	Negative	71 (68.3)	44 (64.7)	27 (75.0)
<b>Grading<sup>†</sup></b>	G1	3 (2.9)	0 (0.0)	3 (7.9)
	G2	33 (31.7)	25 (37.9)	8 (21.1)
	G3	68 (65.4)	41 (62.1)	27 (71.0)
<b>Her2/neu<sup>†</sup></b>	Overexpressed	71 (87.7)	45 (83.3)	26 (96.3)
	Not overexpr.	10 (12.3)	9 (16.7)	1 (3.7)
<b>Ki-67<sup>†</sup></b>	< 20 %	26 (25.7)	15 (22.4)	11 (32.4)
	≥ 20 %	75 (74.3)	52 (76.5)	23 (67.6)

\* Invasive disease: Paget's disease and underlying Invasive Breast Cancer (66) and Invasive Paget's Disease (2); \*\* Non Invasive disease: Paget's disease and underlying Ductal Intraepithelial Neoplasia (39) and Paget's Disease only (7); <sup>†</sup>Missing values for some patients; <sup>‡</sup>Calculated on invasive disease only.

Table 2: Disease Histology

CLASSIFICATION		No. (%)
<b>ALL PATIENTS</b>		114
<b>Non invasive disease</b>	Pag Dis only	7 (6.1)
	Pag Dis and comedo DIN	9 (7.9)
	Pag Dis and solid DIN	13 (11.4)
	Pag Dis and micropapillary DIN	2 (1.8)
	Pag Dis and cribriform DIN	7 (6.1)
	Pag Dis and apocrine DIN	2 (1.8)
	Pag Dis and NOS DIN	6 (5.3)
<b>Invasive disease</b>	Pag Dis only	2 (1.8)
	Pag Dis and Ductal Carcinoma	64 (56.1)
	Pag Dis and Lobular Carcinoma	1 (0.9)
	Pag Dis and Mucinous carcinoma	1 (0.9)

Pag Dis: Paget's Disease; DIN: Ductal Intraepithelial Neoplasia; NOS: Not Otherwise Specified

Table 3: Description of events

Description of Events	Total	Breast Conserving Surgery		Mastectomy	
		Invasive disease	Non invasive disease	Invasive disease	Non invasive disease
All patients	114	18	25	50	21
First event					
Local (Invasive)	3	1	1	0	1
Local (In situ)	1	0	1	0	0
Paget disease reappearance	1	0	1	0	0
Regional	1	0	0	0	1
Local (invasive) and Regional	2	0	2	0	0
Distant	14	0	0	14	0
Contra lateral breast tumour (invasive)	5	1	3	1	0
Other invasive primary tumour	2	0	1	0	1
Death as first event (any cause)	2	0	2	0	0
<b>Death (any cause)</b>	13	0	1	10	2
<b>Death (tumour related)</b>	11	0	0	10	1

Table 4 Univariate analysis: survival stratified according to clinicopathologic features

Classification	Disease Free Survival Non invasive disease		Disease Free Survival Invasive disease		Overall Survival Invasive disease		
	No. of events (5 yrs cumul. incidence %)	<i>p</i> -value	No. of events (5 yrs cumul. incidence %)	<i>p</i> -value	No. of events (5 yrs cumul. incidence %)	<i>p</i> -value	
<b>All patients</b>	14 (25.7)		17 (25.1)		10 (7.5)		
<b>Age</b>	< 35 years	1 (50.0)	0.881	4 (37.5)	0.386	2 (20.0)	0.421
	35-50 years	4 (22.1)		7 (28.1)		5 (11.1)	
	51+ years	9 (24.7)		6 (24.2)		3 (6.6)	
<b>pT</b>	pT1	-	-	8 (21.0)	0.319	4 (2.8)	0.298
	pT2/3	-		9 (31.2)		6 (13.5)	
<b>pN</b>	pN0	-	-	6 (23.7)	0.390	3 (3.5)	0.242
	pN+	-		11 (28.3)		7 (15.1)	
<b>Vascular invasion</b>	Present	-	-	7 (19.3)	<b>0.030</b>	3 (2.4)	<b>0.019</b>
	Absent	-		10 (34.1)		7 (20.9)	
<b>Receptor status</b>	Negative ER / PR	6 (24.5)	0.832	9 (29.8)	0.563	4 (6.4)	0.506
	At least one positive	4 (18.8)		8 (20.3)		6 (8.6)	
<b>Grading</b>	G1	0 (0.0)	0.807	-	0.073	-	0.671
	G2	3 (16.7)		9 (33.8)		4 (8.5)	
	G3	8 (28.2)		7 (19.3)		5 (4.9)	
<b>Her2/Neu</b>	Not overexpressed	-	-	1 (12.5)	0.406	1 (11.1)	0.878
	Overexpressed	-		11 (44.8)		6 (6.7)	
<b>Ki67</b>	≤ 20	4 (36.5)	0.500	5 (30.2)	0.559	2 (7.7)	0.838
	> 20	6 (18.5)		12 (27.3)		8 (7.7)	

Fig. 1 Tumor specific survival

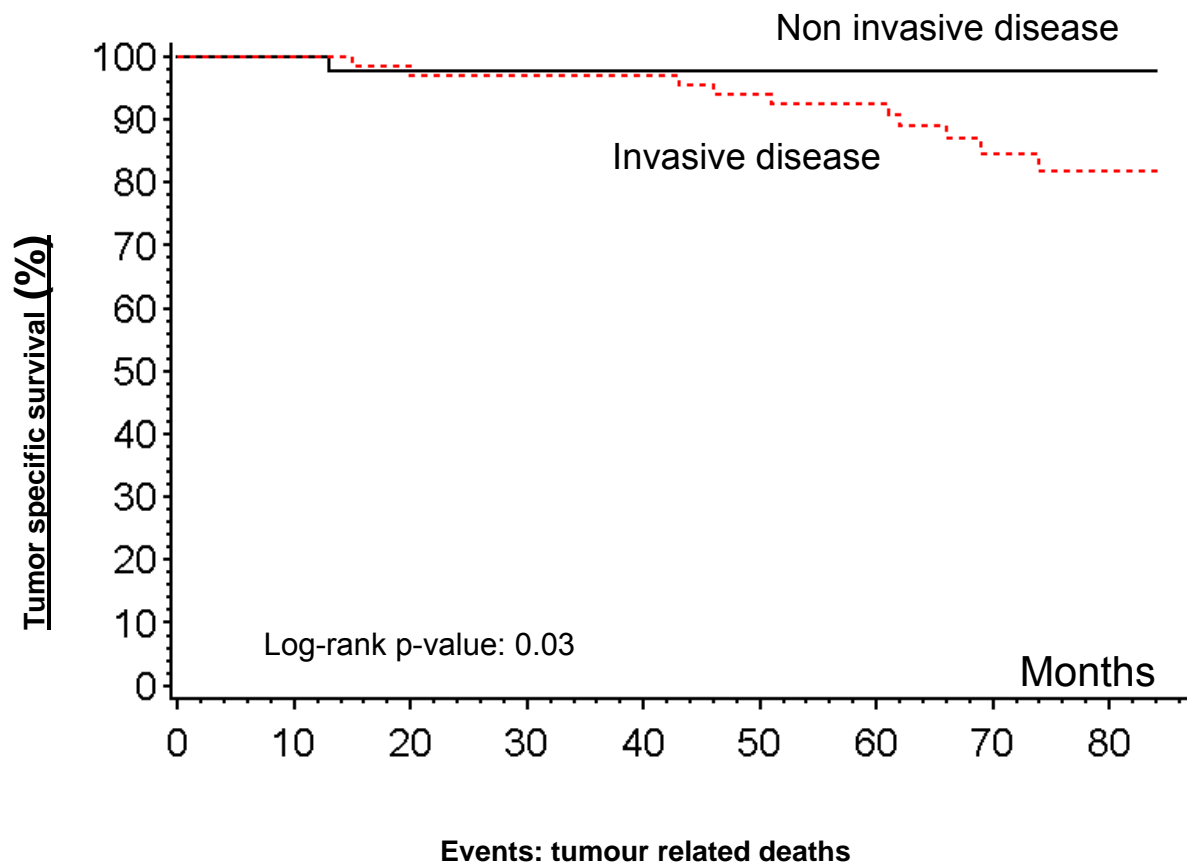
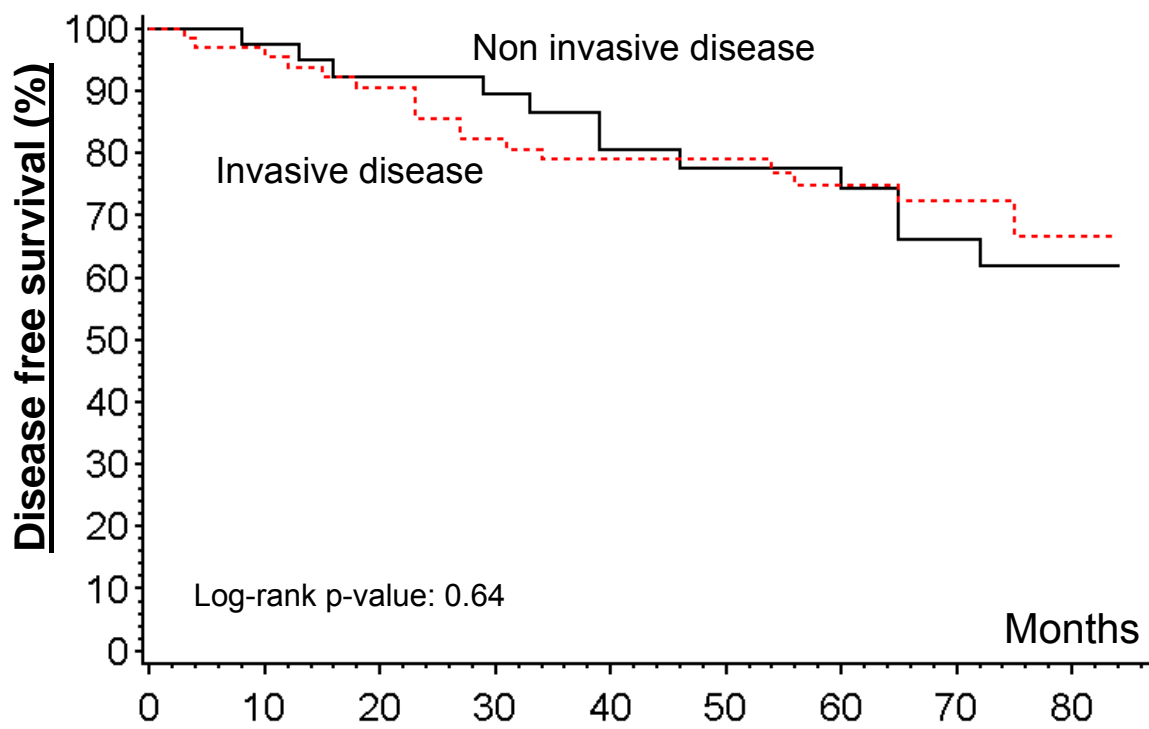


Fig. 2 Disease free survival



Events: any first event