

## HETEROGENEIDADE CELULAR NOS TUMORES MALIGNOS DE MAMA. IMPLICAÇÃO CLÍNICA DO ESTUDO DE RECEPTORES HORMONAIIS

MARIA ROSA QUERALTÓ UBEDA DE KASTNER<sup>1</sup> ANA MARIA DE SOUZA SCHETTINO<sup>2</sup>  
RICARDO SORAGGI<sup>3</sup>

### RESUMO

Conforme demonstrado, os tumores malignos não são entidades uniformes, constituídas por células com características idênticas.

Utilizando método histoquímico direto por conjugado hormonal fluorescente, mostra-se que os carcinomas mamários são compostos por população heterogênea, de células receptor-positivas e receptor-negativas em diversas proporções.

Nossos resultados comprovam que poucos tumores malignos de mama podem ser considerados como totalmente hormônio-dependentes. Isto explicaria por que em alguns tumores ER+e PgR+, obtêm-se apenas respostas parciais ou curtas remissões pela hormonioterapia.

As dificuldades inerentes à racionalização do tratamento são analisadas.

**UNITERMOS:** Câncer de mama. Receptores de estrogênio e progesterona. Método histoquímico. Heterogeneidade celular.

### INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje que os tumores malignos não são apenas um conjunto de células neoplásicas e sim uma estrutura complexa formada por uma população celular heterogênea que inclui, tanto células normais (derivadas de progenitores normais), como células transformadas (descendentes de células que sofreram modificações neoplásicas)<sup>18</sup>.

A existência de diferenças morfológicas entre as células que constituem uma neoplasia maligna, já foi demonstrada

exaustivamente por vários pesquisadores, empregando técnicas simples em cortes histológicos. Porém, evidências mais significativas só foram obtidas recentemente com o emprego de métodos mais sofisticados capazes de detectar os diferentes clones celulares, não só pela morfologia de suas células, mas sobretudo por suas características intrínsecas representadas pelas propriedades bioquímicas ou físico-químicas, diferenças cariotípicas, imunogenicidade, crescimento em cultura, habilidade em escapar de serem reconhecidas e

destruídas pelas reações imunológicas e susceptibilidade frente a quimio, hormônio e radioterapia.

No que se refere ao câncer de mama, técnicas bioquímicas<sup>1, 15</sup>, histoquímicas<sup>6, 13</sup> e imunocitoquímicas<sup>11, 14</sup>, possibilitaram verificar diferenças qualitativas e quantitativas de receptores hormonais em suas populações celulares. Estes resultados passaram a ser utilizados como indicadores da hormônio-dependência dos tumores.

Contudo, um terço das pacientes com neoplasia mamária

<sup>1</sup> Doutor em Ciências da Saúde  
Pesquisador do Ministério da Saúde – INCa  
Bolsista Pesquisador do CNPq

<sup>2</sup> Médica do Setor de Pesquisa Aplicada – INCa

<sup>3</sup> Médico da Seção de Mastologia – INCa

Trabalho realizado no setor de Pesquisa Aplicada,  
Serviço de Anatomia Patológica  
do Instituto Nacional do Câncer – RJ – MS.

Endereço para correspondência: Praça  
Cruz Vermelha, 23 - 20230 - Rio de  
Janeiro, RJ.

receptor-positiva, não respondem ao tratamento endócrino. Isto em parte, seria devido a heterogeneidade celular, e em parte a existência de receptores não funcionais 4, 7-10, 16, 17.

Neste trabalho pretendemos assinalar a presença de um espectro de dependência hormonal no próprio tumor, sua importância e suas implicações no fracasso ou no sucesso da hormonioterapia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 50 biópsias de tumores mamários, enviadas à Anatomia Patológica para diagnóstico histopatológico e determinação de receptores de estrogênio e progesterona (ER, PgR).

Realizamos nos cortes criostáticos a coloração pela hematoxilinaeosina (HE) com finalidade diagnóstica.

Para receptores hormonais, a técnica histoquímica de fluorescência usada foi a de Lee, conforme descrita em trabalho anterior 5.

A intensidade de fluorescência das células epiteliais normais da mama foi escolhida como sendo o controle positivo. De acordo com este critério, células neoplásicas apresentando fluorescência igual ou superior ao "standard" foram identificadas como receptor-positivas e, da mesma forma, quando a fluorescência se apresentava inferior à ductal normal, foram consideradas como negativas.

A proporção de células ER+ varia de 0 a 100%, sendo que quanto maior o percentual de positividade, maior será a possibilidade de resposta à hormonioterapia. Assim, consideramos o tumor ER+, quando demonstra 60% ou mais de células ER+. Para um percentual de 0 a 40% a possibilidade de resposta é pequena, e consideramos o tumor ER-. No entanto, existe uma faixa percentual que pode ou não apresentar resposta ao tratamento hormonal; por isto

os tumores com 41 a 60% de células ER+ foram considerados como duvidosos.

## RESULTADOS

A existência de uma população celular heterogênea é demonstrada pela proporção variável de células ER+ e ER- em cada caso (Tabela I).

Somente em 4 casos o percentual de células positivas e negativas era igual. Em 21 casos ocorreu maior proporção de células ER+ e nos demais predominaram as células ER-.

No que se refere ao PgR, os valores encontrados foram em geral superiores aos de ER.

A Tabela II mostra o número de casos distribuídos em diversas percentagens de células ER+. Observa-se que apenas 2% dos tumores apresentaram 94-100% de suas células ER+. Os tumores positivos restantes demonstram maior heterogeneidade celular, variando de 61-90%.

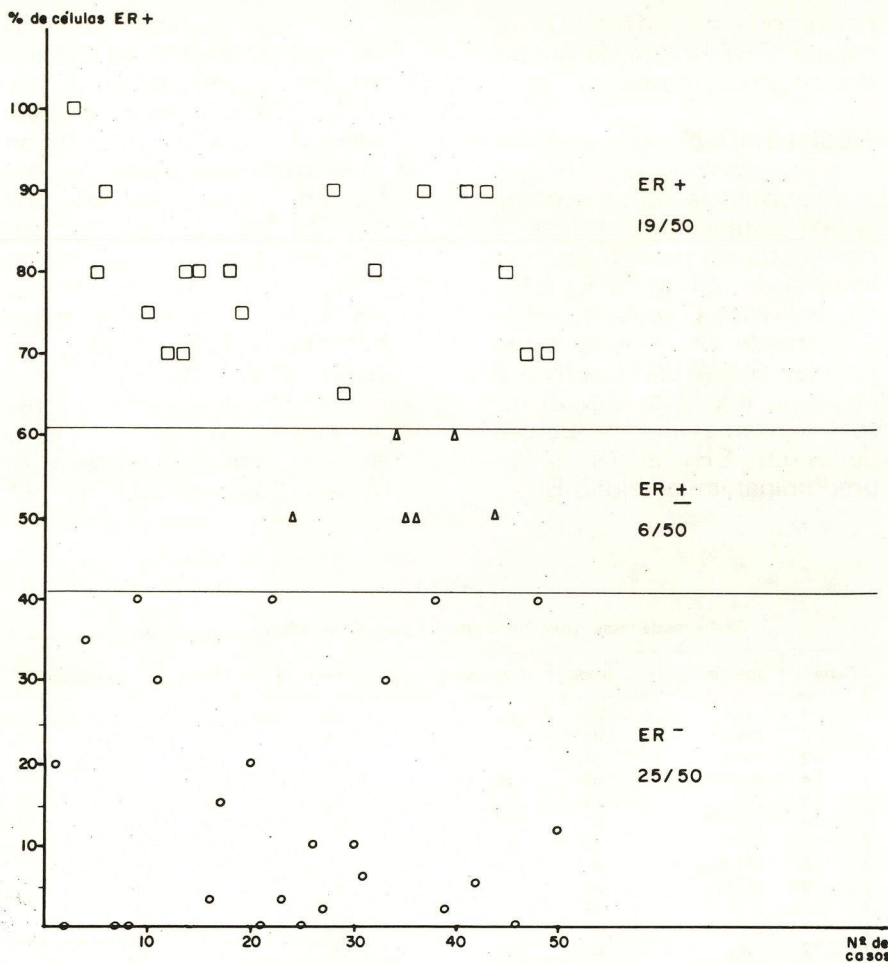
Dentre os tumores considerados como ER-, 28% apresentam pequeno número de células positivas (0-10%). Os

TABELA I

Carcinoma de mama. Diagnóstico. Idade. Estudo de ER e PgR citoplasmático.

Casos	Iniciais	Idade	Diagnóstico	% ER	% PgR	Resultados
1	HCA	59	CDI	20	25	-
2	GAOM	42	CLI	0	0	-
3	EFL	66	CLI	100	100	+
4	AA	83	CDI	35	35	-
5	JAG	64	CDI	80	80	+
6	DSO	60	CDI	90	90	+
7	LGG	72	CDI	0	0	-
8	LM	41	CDI	0	0	-
9	RLS	36	CDI	40	35	-
10	DPL	63	CLI	75	80	+
11	LRM	52	CDI	30	35	-
12	HN	52	CDI	70	70	+
13	RS	45	CDI	70	70	+
14	AGB	38	CLI	80	85	+
15	MMF	43	CDI	80	83	+
16	EC	48	CLI	3	5	-
17	CFF	71	CDI	15	25	-
18	JAS	58	CDI	80	90	+
19	LML	60	CDI	75	75	+
20	MLFS	67	CDI	20	20	-
21	CFL	60	CDI	0	0	-
22	AS	70	CDI	40	45	-
23	LMC	71	CDI	3	5	-
24	OSR	57	CDI	50	55	±
25	LRC	46	CDI	0	0	-
26	MJRC	60	CDI	10	15	-
27	HAC	56	CDI	2	5	-
28	OMS	69	CDI	90	95	+
29	LRSB	56	CDI	65	80	+
30	CDS	48	CDI	10	10	-
31	CRMP	52	CDI	6	6	-
32	VML	79	CLI	80	85	+
33	IPF	50	CDI	30	30	-
34	JS	62	CDI	60	90	+
35	LMP	45	CDI	50	70	±
36	HBB	53	CDI	50	80	±
37	DPM	58	CDI	90	90	+
38	JAS	75	CDI	40	60	±
39	RBB	49	CDI	2	4	-
40	ESG	49	CDI	60	70	+
41	MNAP	44	CDI	90	90	+
42	NTF	56	CDI	5	5	-
43	IFS	58	CDI	90	90	+
44	AB	57	CDI	50	90	±
45	IRR	43	CDI	80	80	+
46	MFSM	29	CDI	0	0	-
47	EMS	58	CDI	70	90	+
48	MMS	79	CDI	40	40	-
49	ICM	64	CDI	70	85	+
50	BVS	74	CDI	12	25	-

CDI - carcinoma ductal infiltrante  
CLI - carcinoma lobular infiltrante



TAB. II CARCINOMA DE MAMA: PERCENTUAL DE CÉLULAS ER+ EM 50 CASOS

demais oscilam entre 11-40% de células ER+.

Assim, tanto nos tumores considerados ER+ como ER-, encontramos um determinado percentual de células ER+, que determinará a maior ou menor sensibilidade à hormonioterapia.

## DISCUSSÃO

Os tumores são constituídos por tecido proliferativo específico, que geralmente é acompanhado pelo crescimento do tecido conectivo-vascular, necessário a nutrição e sustentação das células neoplásicas.

Nos casos dos tumores malignos espontâneos, as células do parênquima derivam sempre de outras preexistentes jovens e ainda não plenamente diferenciadas, e suas resul-

tantes poderão reproduzir ou não as matrizes (tumores diferenciados e indiferenciados, respectivamente). Além disto, apresentam variações e alterações essenciais que lhes conferem uma série de novas propriedades em seus caracteres biológicos, morfológicos, funcionais, imunológicos e mesmo físico-químicos. Esta diversidade ou heterogeneidade celular, segundo opinião geral, resulta do aparecimento de mutantes durante a progressão tumoral.

Para Novell<sup>12</sup>, a maioria dos tumores humanos teriam uma origem unicelular, e o seu crescimento progressivo e rápido, determinaria o aparecimento de ampla gama de subpopulações com fenotipos diversos.

A amplificação da diversidade celular tumoral, depen-

derá também de outros fatores, derivados do próprio hospedeiro (mecanismos de defesa, irrigação sanguínea, etc.), ou da terapia aplicada. Por outro lado, por ser o crescimento tumoral dinâmico, as interações entre as diversas sub-populações impõem uma estabilidade fenotípica relativa, que poderá ou não permitir a formação de novas mutantes.

Acredita-se que os tumores malignos em progressão, apresentam um mosaico de clones fenotipicamente variado, sendo seu número exato desconhecido. Provavelmente, os não invasivos e os com capacidade metastática, representam seus extremos.

Para Fidler<sup>2</sup>. O processo metastático é seqüencial e nem todas as células de um tumor primário são capazes de completar o ciclo; destas, só sobrevivem aquelas que têm condições de crescer no parênquima de órgãos distantes. Este conceito passa a substituir o anterior, pelo qual acreditava-se que qualquer célula procedente de um tumor maligno seria capaz de metastatizar.

Neste trabalho, realizamos o estudo de dois receptores hormonais (ER e PgR), objetivando demonstrar que os tumores humanos de mama apresentam heterogeneidade celular, o que explicaria em parte, as diferentes respostas clínicas à hormonioterapia.

Com o método histoquímico conseguimos constatar células com diferentes quantidades e mesmo total ausência de receptores, distribuídas regular ou irregularmente na massa tumoral, o que comprova a diversidade de tipos celulares na neoplasia maligna de mama.

Quando analisamos a proporção de células consideradas ER+, comprovamos que sua percentagem varia entre limites muito amplos. Assim, quando o percentual de células ER+ é de 0-40%, consideramos o tumor como ER- ou seja, com pouca susceptibilidade a

hormonioterapia. Quando a proporção de células ER+ é de 61-100% o tumor é ER+, e portanto passível de bons resultados pelo tratamento endócrino. Já nos tumores com percentuais de 41-60% de células ER+, o tratamento hormonal poderá ou não ser efetivo.

A presença de PgR+ foi utilizada como um dado adicional, pois sua presença demonstra a existência de um sistema ER operante no câncer de mama. Portanto, do ponto de vista prático, a presença de PgR em grande número de células neoplásicas indicaria possivelmente melhor resposta à terapia hormonal, auxiliando principalmente a orientação dos casos em que o percentual de ER+ oscila de 41 a 60%.

Um programa terapêutico baseado somente no tratamento a uma subpopulação, servirá para agredir e destruir estas células, porém produzirá também um impacto potencial no equilíbrio dos clones que sobrevivem, estimulando a formação de novas variantes a partir das populações remanescentes. Isto explicaria o fato de que um tratamento endócrino utilizado em tumores receptor-positivos, pode determinar inicialmente uma regressão, e posteriormente manifestar recidiva completamente autônoma.

Se aceitamos a hipótese de que os tumores ER+, apresentam proliferação mais lenta e menor agressividade<sup>3</sup>, a destruição destas células hormônio-sensíveis, poderá liberar a proliferação do clone não hormônio-responsivo, que é mais agressivo e proporciona menor sobrevida.

A rapidez no uso de um protocolo de tratamento sucessivo ou concomitante nos casos que apresentam uma percentagem moderada ou pequena de ER+, permitirá destruir não somente as subpopulações sobreviventes ao primeiro tratamento, antes destas gerarem grande número de

novas variantes, como destruí-las à medida que apareçam.

Como nem todas as células são capazes de metastatizar, podemos encontrar metástases formadas por subclones fenotipicamente iguais ou diferentes do clone predominante do tumor primário. Por outro lado, o agente utilizado no primeiro protocolo de tratamento pode influenciar o tipo do clone sobrevivente. Assim, os casos tratados por hormonioterapia têm maior possibilidade de apresentar metástases constituídas por subclones resistentes a esta terapêutica, e aqueles que sofreram tratamento químico ou radioterápico, tenderão a apresentar metástases ER+. De acordo com este raciocínio, também as recidivas poderão ser constituídas por células fenotipicamente diferentes do tumor original.

## CONCLUSÕES

1. Uma melhor compreensão da heterogeneidade entre as diversas subpopulações de um tumor, é muito importante para prever a resposta a terapia.
2. A vantagem do método histoquímico no estudo dos receptores hormonais no câncer de mama, é permitir uma avaliação das proporções de células receptor-positivas e negativas entre o total das células neoplásicas.
3. A heterogeneidade celular nos tumores de mama, determinando diferentes percentuais de células receptor-positivas, explica em parte, as variadas respostas clínicas à hormonioterapia.
4. A probabilidade de que um só agente para tratamento seja efetivo para todos os subclonés é muito pequena, sobretudo em estágios progressivos clinicamente avançados, onde as variações fenotípicas entre as diversas subpopulações devem ser extremas.
5. O uso de protocolo de tratamento em sucessão ou

concomitante, permitirá obter melhores resultados.

6. O clone metastático e as recidivas, poderão ser receptor-positivo ou negativo independentemente do tumor primário.

## SUMMARY

*It has been shown that malignant tumors are not uniform entities composed of cells with similar characteristics.*

*Therefore, a direct histochemical approach using a fluorescent hormone conjugate indicates that mammary carcinomas are composed of heterogeneous populations of receptor-positive and receptor-negative cancer cells in varying proportions.*

*Our present data clearly demonstrates that only very few breast cancers can be labeled as totally hormone-dependent. This could explain why some ER+ and PgR+ tumors show only partial or short-term remissions during hormonal therapy.*

*Difficulties concerning rational treatment are discussed.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORJESSON, B. W.; SARFATY, G. A. *Estradiol Receptors in Subpopulations of Breast Cancer Cells isolated from Human Primary Tumors.* Cancer 47 : 1828-1833, 1981.
2. FIDLER, I. J.; BURGER, M. M. *UICC Study Group in Basic and Clinical Cancer Research: Cancer Metastasis.* Int. J. Cancer 33 : 1-3, 1984.
3. FISHER, E. R.; REDMOND, C. ET AL. *Correlation of Estrogen Receptor and Pathologic Characteristics of Invasive Breast Cancer.* Cancer 45 : 349-353; 1980.
4. JENSEN, E. V. *Hormone Dependency of Breast Cancer.* Cancer 47 : 2319-2326; 1981.
5. KASTNER, M. R. Q.; SCHETTINO, A. M. S. ET AL. *Determinação de Receptores Hormonais em Câncer de Mama: Método Histoquímico.* Rev. Bras. de Cancerologia 29 : 32-39; 1983.
6. LEE, S. H. *Cytochemical Study of Estrogen Receptor in Human Mammary Cancer.* Amer. J. Clin. Pathol. 70 : 197-203; 1978.
7. LEUNG, B. S.; MOSELEY, H. S. ET AL. *Estrogen Receptors in Prediction of Clinical Responses to Endocrine Ablations.* In: *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer.* McGuire, W. L.; Carbone, P. P.; Volmer, E. P. Eds. New York, Raven Press. p. 107-130, 1975.

8. LIPPMAN, M. E.; ALLEGRA, J. C. *Current Concepts in Cancer: Receptors in Breast Cancer*. N. Engl. J. Med. 299 : 930-933; 1978.
9. MAAS, H.; JONAT, W. ET AL. *The problem of nonresponding Estrogen Receptor-positive Patients with. Advance Breast Cancer*. Cancer 46 : 2835-2837; 1980.
10. McGUIRE, W. L.; HORWITZ, K. B. ET AL. *Current status of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer*. Cancer 39 : 2934-2947; 1977.
11. MERCER, W. D.; LIPPMAN, M. E. ET AL. *The Use of Immunocytochemical Techniques for the Detection of Steroid Hormones in Breast Cancer Cells*. Cancer 46 : 2859-2868; 1980.
12. NOVELL, P. C. *The Clonal evolution of Tumor Cell Populations. Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression*. Science 194 : 23-28; 1976.
13. PERTSCHUK, L. P.; GAETJENS, E. ET AL. *An Improved Histochemical Method for Detection of Estrogen Receptors in Mammary Cancer. Comparison with Biochemical Assay*. Am. J. Clin. Pathol. 71 : 504-508; 1979.
14. PERTSCHUK, L. P.; TOBIN, E. H. ET AL. *Immunofluorescent detection of Estrogen Receptors in Breast Cancer*. Cancer 41 : 907-911; 1978.
15. RAO, B. R.; MEYER, J. S. *Estrogen and Progesterone Receptors in Normal and Cancer Tissues. In: Progesterone Receptors in Normal and Neoplastic Tissues*. McGUIRE, W. L.; RAYNAUD, J. P.; BAULIEU, E. E. Eds. New York, Raven Press p. 155-169, 1977.
16. SILFVERSWARD, C.; SKOOG, L. ET AL. *Intratumoral variation of Cytoplasmic and Nuclear Receptor in Human Breast Carcinomas*. Eur. J. Cancer 16 : 59-65; 1980.
17. WALKER, R. A.; COVE, D. H. ET AL. *Histological Detection of Estrogen Receptor in Human Breast Carcinomas* Lancet 1 (8161) : 171-173; 1980.
18. WOODRUFF, M. F. A. *Cellular Heterogeneity in Tumors* Dr. J. Cancer 47 : 589-594; 1983.