

"ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS RECEPTORES HORMONAIS ESTEROÍDICOS (estrógeno e progesterona) E O GRAU DE ELASTOSE NO CARCINOMA MAMÁRIO DUCTAL INVASOR".

FRANCISCO MANUELITO LIMA DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. Italo Baruffi

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Medicina na área de Tocoginecologia.

Ribeirão Preto - 1984

"Trabalho realizado nos Departamentos de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatria e Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo".

"A beleza dum rio,
se faz graças a
sua nascente".

"Eis os degraus para esta minha formação".

Rosalba de Lima, minha mãe
Ulduwina e Marcellus, manos

Prof. Dr. José Galba de Araujo e
Alice Lorene Araujo

Às famílias:

Aspazia Mazoti - Ribeirão Preto-SP.
Maria Alves Costa - Campinas-SP.
Maria Irles Alencar - Fortaleza-CE.
Dra. Maria de Lourdes C.M. Furtado - Fortaleza-CE.
Dns. Simplicio e Socorro Barbosa - São Paulo-SP.

"Agradecimento Especial"

Dalva Pizeta
Diva Carvalho
Dulcinéia Della Motta

"Muito Obrigado"

- Aos Professores, Pós-Graduandos, Residentes e Funcionários do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatría da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Aos Professores, Pós-Graduandos, Residentes e Funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Aos Professores, Pós-Graduandos e Funcionários do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Aos Funcionários da Secção de Atividades Administrativas.
- Aos Funcionários da Biblioteca.
- Aos Funcionários da Secção de Pós-Graduação.
- Precisei do apoio de vocês e fui atendido no momento preciso, no dia a dia, na realização deste trabalho.

Ana Lúcia de Azevedo (Lab. Tocoginecologia).

Auristela de Mello Martins (Patologia).

Celina T. Fujiyama (Lab. de Oncologia Experimental).

Prof. Dr. Gerson Muccillo (FFCLRP-USP. - Matemática).

Prof. Dr. José Eduardo de Salles Roselino (Fisiologia).

Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sã (Lab. Tocoginecologia).

Profa. Dra. Maria Angeles S.L. Velludo (Patologia).

Mércia Medeiros Pacheco (Lab. de Oncologia Experimental).

- As instituições que confiaram em mim e alimentaram o meu ideal:

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior).

FUSEC (Fundação de Saúde do Estado do Ceará).

MEAC (Maternidade Escola Assis Chateaubriand).

UFC (Universidade Federal do Ceará).

"Agradecimento Ímpar"

Prof.Dr. Ítalo Baruffi, por ter me dado a oportunidade de engatinhar pelo caminho da pesquisa científica, sob sua orientação.

Prof.Dr. José Antunes Rodrigues, quem me proporcionou a oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

Prof.Dr. José Barbieri Neto, simplicidade e cabedal científico.

Profa.Dra. Maria Mitzi Brentani, uma observadora científica e excelente colaboradora.

Prof.Dr. Nelson Augusto, compreensão e diálogo fácil.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. MATERIAL	11
2.2. MÉTODOS	13
2.2.1. DETERMINAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS	13
2.2.1.1. PREPARAÇÃO DO CITOSOL	13
2.2.1.2. HOMOGENEIZAÇÃO	14
2.2.1.3. CENTRIFUGAÇÃO	14
2.2.1.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA	14
2.2.1.5. DETERMINAÇÃO DOS RECEPTORES ESTRÓGENO E PROGESTERONA CITOSÓLICOS PELO MÉTODO DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-DEXTRANA	16
2.2.1.6. CONTAGEM DE RADIOATIVIDADE	17
2.2.1.7. CÁLCULOS	17
2.2.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	22
2.2.2.1. COLETA DO MATERIAL	22
2.2.2.2. MÉTODO DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	22
2.2.2.3. MÉTODO DE COLORAÇÃO VOEHERFF VAN GIESON ..	25
2.2.3. DOSAGEM DE ESTRADIOL E PROGESTERONA PLASMÁTIC COS	26
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	55
6. SUMÁRIO	56
7. SUMMARY	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. APÊNDICE	71

1-INTRODUÇÃO

Desde o século XIX, estudos da neoplasia maligna mamária têm demonstrado a existência de uma relação entre o crescimento tumoral e a influência hormonal. Astley Cooper (1829) comentou nas suas observações clínicas, que certos tumores mamários apresentavam alguma regressão ou melhora na sua sintomatologia, de acordo com a fase do ciclo menstrual.

Também Schinzinger (1889), 60 anos mais tarde mostrou que as pacientes jovens portadoras de carcinoma mamário, vinham a falecer mais cedo do que as pacientes idosas, e com esta premissa, ele apresentou empiricamente sugestões para que se realizasse a primeira terapia endócrina ablativa. Esta terapêutica se baseia na supressão dos principais hormônios gonadais, o estrógeno e a progesterona, com o propósito de levar à modificação do ambiente hormonal onde o tumor tenha se desenvolvido, ocasionando como resposta clínica a regressão ou parada do crescimento tumoral em algumas pacientes.

Entretanto, os primeiros trabalhos sobre o carcinoma mamário e sua resposta à ooforectomia, foram realizados no Glasgow Cancer Hospital por Thomas Beatson (1896), o qual relatou desaparecimento de metástases após ablação gonadal em algumas pacientes com câncer inoperável.

Os trabalhos iniciais de Thomson (1902) e Clarke (1905), começaram a questionar o uso empírico da ooforectomia, pois estes autores encontraram dificuldades em predizer quais as pacientes que poderiam obter melhor resposta clínica com a terapia endócrina ablativa.

Este tratamento continuou sendo aplicado empiricamente durante mais de quatro décadas, uma vez que não havia uma melhor maneira de selecionar as pacientes que responderiam ou não clinicamente à terapia endócrina ablativa ou aditiva.

A era moderna da terapia endócrina foi iniciada com o isolamento dos hormônios estrogênicos (Mac Corquedale & cols., 1936), como mais uma opção terapêutica, a terapia endócrina aditiva. Ela surgiu com o uso clínico de doses farmacológicas de estrógenos (Hadow & cols., 1944); andrógenos (Nathanson, 1952) e recentemente dos anti-estrogênicos (Cole & Jones, 1971), no tratamento do câncer avançado da mama.

Alguns tumores malignos mamários mostraram resposta clínica bem sucedida com a adrenalectomia (Huggins & Bergenstal, 1952). A hipofisectomia, como terapêutica hormonal para o carcinoma mamário começou com Luft & Olivecrona (1953) e Pearson & cols., (1956), que obtiveram respostas clínicas em estádios avançados da doença, semelhantes aos obtidos pela ooforectomia e adrenalectomia.

Apenas 30% dos tumores mamários respondem à manipulação endócrina. Entretanto, em vista do índice de resposta em pacientes não selecionadas ao tratamento endócrino ser muito baixo, a poliquimioterapia tornou-se cada vez mais popular como terapêutica primária da doença metastática. Porém, este tratamento não está livre de morbidade significativa e mortalidade ocasional (Trocoli & Baruffi, 1979).

Algumas pacientes poderiam ter uma remissão da doença prolongada através da terapia endócrina,

que é mais simples e menos tóxica. Estas pacientes, às vezes são excluídas desta terapia por falta de um método acurado para se determinar, "a priori", quais as melhores candidatas para a manipulação hormonal.

Os clínicos têm procurado meios para selecionar entre as pacientes com neoplasias, aquelas que melhor respondem e as que não respondem à terapia endócrina.

As primeiras tentativas de determinação da dependência hormonal do carcinoma mamário foram realizadas por Bulbrook & cols. (1958), que estudaram exaustivamente a excreção dos metabólitos dos hormônios esteróides adrenais e gonadais. Estes resultados apresentaram uma relação com a resposta clínica, e embora o grau de correlação não fosse suficiente para influenciar na decisão terapêutica, serviu para chamar a atenção sobre a dependência hormonal.

Durante as duas últimas décadas houve uma grande evolução no conhecimento do mecanismo de ação dos hormônios esteróides, verificando-se que os órgãos efetores (útero, vagina e mama), apresentam componentes que se ligam ao estrógeno e que foram reconhecidos pelo acúmulo e captação de hexestrol (Glascock & Hoekstra, 1959) ou estradiol triciado (Jensen & Jacobson, 1962). Este componente, o receptor (R), é uma proteína citosólica com capacidade limitada de se ligar biologicamente ao hormônio esteróide ativo com alta afinidade e especificidade de ligação ao tecido alvo.

No sistema endocrinológico as mensagens são transmitidas por substâncias químicas altamente espe

cializadas, *os hormônios*, que irão atuar em células diferenciadas com capacidade de receber e responder tais informações através dos receptores que podem estar localizados na célula ao nível da membrana, citoplasma ou núcleo (Baxter & Funder, 1979).

Depois que foram idealizadas técnicas autoradiográficas para estudar a interação estrógeno-receptor "*in vitro*", verificou-se que o estradiol encontrava-se localizado no núcleo, em combinação com a proteína receptora de origem citoplasmática (Gorski & cols., 1968; Jensen & cols., 1968). Assim, foi possível examinar em espécimes de tecidos e demonstrar especificidade de ligação do hormônio naqueles hormônio-sensíveis.

O receptor de estrógeno (ER) é uma macromolécula protéica, termolábil e ácida, com coeficientes de sedimentação 4S em alta força iônica e 8S em baixa força iônica, com peso molecular de 70.000 e 200.000 daltons respectivamente (Jensen & cols., 1971). A ligação hormônio-receptor é do tipo hidrofóbica, específica, e segue a regra da polaridade (Muller & cols., 1972). A constante de dissociação em equilíbrio para reação estrógeno-receptor está entre $0,4 - 2,0 \times 10^{-9}$ M. A alta afinidade de ligação é definida pelo anel da molécula de estradiol, e o pH está entre 7 e 9 para formação do complexo receptor-hormônio (Notides, 1978).

O receptor de progesterona (PR) nos tecidos alvos normais, incluindo a glândula mamária, é uma proteína que está dependente da ação estrogênica. Ele é composto de duas subunidades conhecidas como proteína A, reguladora transcrional e com peso molecular de 110.000

daltons e a proteína B, especificadora com peso molecular de 117.000 daltons (Schrader & Malley, 1972).

A interação do hormônio esteróide (estrógeno e progesterona) com os receptores intracelulares no citosol forma o complexo receptor-esteróide (RE) e depende da quantidade do hormônio circulante livre (Fig.1). A passagem desse hormônio para a célula sensível pode ocorrer por difusão simples ou facilitada (Peck & cols., 1973).

Os hormônios esteróides se ligam a muitas macromoléculas (albumina, globulina ligadora de testosterona e estrógeno), encontradas no sangue (TS). Elas estão geralmente presentes em grandes concentrações na corrente sanguínea e cada uma tem grande afinidade própria pelo esteróide (Murphy, 1968; Soloff & cols., 1971). Sua ligação com hormônio circulante diminui a disponibilidade de se ligar intracelularmente com a proteína receptora citoplasmática (Rc).

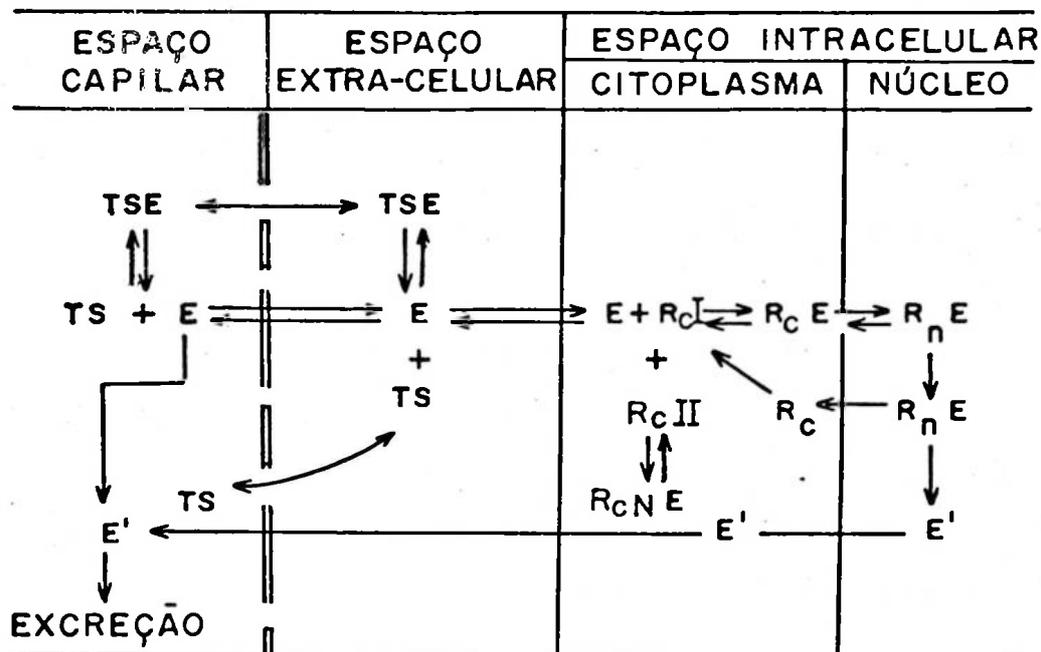
A retenção do hormônio intracelular sob condição de equilíbrio envolve dois tipos de sítios de ligação: o receptor tipo I, sítio com número limitado e que tem alta afinidade e especificidade (Rc I) e o receptor tipo II com baixa afinidade, mas com grande capacidade de ligação (Rc II) (Gorski & cols., 1968; Rochefort & Baulieu, 1969; Clark & Markaverich, 1981).

O hormônio esteróide livre após a entrada na célula alvo, se liga à proteína receptora citoplasmãtica (Rc I e II) para formar um complexo receptor-esteróide (Rc-E), e associa-se também com vários sítios de ligação não específicos (RNe) dentro do compartimento citoplasmãtico. O complexo (Rc I e II-E) desloca-se para o núcleo,

formando o complexo (RnE) nas células alvo.

No núcleo este complexo (RnE) se liga a um aceptor específico na cromatina, resultando na formação de uma nova molécula de RNA mensageiro, que depois é transferido para o citoplasma, onde a síntese da proteína específica resulta na resposta fenotípica induzida pelo hormônio.

FIGURA 1 - ESQUEMA DA LIGAÇÃO DO RECEPTOR ESTEROÍDICO



TS- TRANSPORTADORES SANGUÍNEOS E- ESTEROÍDICO R_CR_N- RECEPTOR CITOPLÁSMICO E NUCLEAR R_CN- NÃO ESPECÍFICO

O crescimento e a diferenciação da unidade ductal mamária dependem da presença dos hormônios: estrógeno, corticóide e somatotrofinas (Lyons & cols., 1958). O desenvolvimento da unidade lóbulo mamária é estimulado pela presença dos hormônios: prolactina, progesterona, estrógeno, somatotrofinas e hormônios tireoidianos (Cowie & Tindal, 1971), estimulação essa que se processa pelo meca

nismo de interação hormônio-receptor.

Quando se desenvolve a neoplasia maligna de um tecido hormônio-sensível, a célula responderá ou não ao hormônio específico, obedecendo assim a teoria da progressão tumoral segundo Foulds (1969): *célula normal hormônio-sensível* → *célula neoplásica hormônio-sensível* (hormônio-dependente, receptor positivo) e *célula neoplásica autônoma* (hormônio-independente, receptor negativo).

O tumor hormônio-dependente tem um complexo de modulação endócrina (EMC) que regula o crescimento da célula neoplásica através da interação entre os diferentes hormônios principais (estrógeno, progesterona, andrógeno e prolactina), e secundários (insulina, gonadotrofinas corticosteróides, hormônio de crescimento e prostaglandinas), e entre os receptores hormonais específicos ou inespecíficos (Robustelli & cols., 1982).

Até recentemente, não havia um critério seletivo para estabelecer a dependência hormonal do tecido neoplásico. A escolha da terapia endócrina era completamente empírica, orientada somente por alguns aspectos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos.

A confirmação da utilização clínica dos receptores estrogênicos veio através de várias publicações sucessivas: Hamburgo (Mass & cols., 1972); Amsterdam (Engelsman & cols., 1973) e Rochester (Savlov & cols., 1974). Num Workshop organizado pelo Dr. William McGuire (1975), sob os auspícios do "Breast Cancer Task Force of the National Institute Bethesda-Maryland", vários laboratórios com as mais diversas técnicas determinaram os receptores estrogênicos, e todos foram unânimes em aceitar a

sua validade na clínica oncológica para auxiliar no tratamento e prognóstico das pacientes portadoras de neoplasia maligna da glândula mamária.

A resposta clínica correlacionada com a presença do receptor estrogênico na fração citosólica do tumor, mostrou que das pacientes em cujos espécimes foram determinadas altas concentrações de receptores estrogênicos, a maioria (55%) apresentou maior sobrevida e maior índice de intervalo clínico livre da doença (McGuire, 1980) e nos tumores com quantidade baixa ou receptores ausentes, apenas 8% responderam à terapia endócrina (Fisher & cols., 1981).

A presença dos receptores para estrógeno e progesterona na célula do carcinoma mamário, é indicadora da dinâmica e ação funcional do estrógeno, e sua atividade biológica é equivalente à célula responsiva normal.

O tumor hormônio-sensível, receptor para estrógeno e progesterona positivo, indica que ele é capaz de sintetizar pelo menos um produto final da ação estrogênica (McGuire, 1975). Esta hipótese diz que a presença do receptor para progesterona na neoplasia maligna mamária é regulada pelo estrógeno, e que ele estimula as rotas metabólicas que regulam o crescimento do tumor e a síntese da proteína receptora de progesterona (Horwitz & McGuire, 1977; Koenders & cols., 1977).

Uma das maneiras de aumentar a acurácia de na previsão da resposta clínica à terapia endócrina, nas pacientes com tumores receptores estrogênicos positivos, é a determinação dos receptores para progesterona positivos, pois observou-se que o maior índice de resposta clínica

(77%) está no grupo de pacientes que contêm receptores estrogênicos e progesterona positivos (McGuire & cols., 1982).

A seleção das pacientes portadoras de carcinoma mamário à terapia endócrina, não é suficiente utilizando-se somente a positividade dos receptores para estrógeno e progesterona. Os critérios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos, entre eles a elastose, são usados concomitantemente para uma melhor triagem destas pacientes.

No carcinoma ductal infiltrante, o estroma periductal é constituído de fibroblastos, colágeno, células inflamatórias e fibras elásticas. Estas quando em grande quantidade, são conhecidas como hiperplasia da camada elástica dos ductos mamários ou *elastose*.

A elastose é formada por depósitos de substância amorfa hialina, eosinofílica e homogênea quando vista pela coloração de hematoxilina e eosina (HE), porém quando diferenciada pela coloração de Verhoeff Van Gieson, apresenta-se em negro (Lundmark, 1972).

Ela é conhecida desde 1860 por Billroth (Davis, 1973), e pode ser originada das fibrilas de elastina na parede dos ductos mamários (Jackson & Orr, 1957). Uma outra hipótese, seria a proliferação de fibroblastos com alta atividade de fosfatase que produziria uma reação estromal no tumor, e como resposta de defesa apareceria a formação de elastose (Jensen & Schiodt, 1971).

Macroscopicamente, é a elastose identificada através das estrias e manchas amareladas no tecido neoplásico (Azzopardi & Laurine, 1974).

A hiperplasia da camada elástica ocorre

em 90% das neoplasias malignas mamárias do tipo ductal cirroso e lobular invasivos, sendo menos freqüente nos tipos medular e mucóide (Azzopardi & Laurine, 1974). Ela vem sendo estudada para selecionar as pacientes de melhor resposta à terapia endócrina (Masters & cols., 1979; Glaubitz & cols., 1982), e como determinação de prognóstico (Shivas & Douglas, 1972; Wallgrem & cols., 1976; Mills & cols., 1980).

Baseado nos conhecimentos atuais, o objetivo deste trabalho é avaliar a correlação entre os receptores hormonais esteroídicos *estrógeno (ER)* e *progesterona (PR)* e o grau de *elastose* em neoplasias primária malignas da mama, do tipo ductal invasor, e realizar uma análise comparativa entre estes fatores e os parâmetros clínicos e histopatológicos: *estado menstrual (menacme e menopausa)*, *diferenciação histológica*, *celularidade epitelial*, *grau de atipia nuclear* e *grau de infiltração linfocitária*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Espécimes de tecidos neoplásicos foram obtidos de 41 pacientes portadoras de carcinoma mamário, submetidas a cirurgia pelo Setor de Patologia Mamária do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de outubro de 1981 a março de 1983.

As neoplasias foram analisadas histopatologicamente no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Fragmentos de tumores foram armazenados em nitrogênio líquido (N_2) até o início da dosagem dos receptores realizada no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As características clínicas e hormonais das pacientes portadoras de carcinoma mamário ductal invasor segundo a idade, estado menstrual (menacme e menopausa), níveis plasmáticos de estradiol e progesterona, estão representadas na tabela 1.

A idade das pacientes apresentou intervalos entre 33 e 88 anos de idade e o percentual das pacientes com menos de 35 anos de idade foi de 7,32 e a incidência da patologia predominou na quarta, quinta e sexta décadas.

Os níveis plasmáticos registrados das 15

Tabela 1 - A idade, estado menstrual e níveis plasmáticos de estradiol (E₂) e progesterona (P) das pacientes portadoras de carcinoma mamário ductal invasor.

Pacientes	Idade	Estado Menstrual	Níveis plasmáticos	
			E ₂ pg/ml	P ng/ml
01	33	menacme	63,00	1,00
02	47	menacme	42,00	0,16
03	66	menopausa	30,00	0,14
04	47	menacme	76,00	0,24
05	41	menacme	89,00	1,04
06	59	menopausa	<30,00	0,19
07	55	menopausa	<30,00	0,17
08	55	menopausa	<30,00	0,14
09	51	menopausa	<30,00	0,20
10	58	menopausa	<30,00	0,22
11	54	menopausa	<30,00	0,27
12	52	menopausa	<30,00	0,30
13	50	menopausa	<30,00	0,40
14	64	menopausa	<30,00	0,24
*15	49	menacme	76,00	3,25
*16	39	menacme	110,00	22,00
17	41	menacme	89,00	0,30
18	68	menopausa	<30,00	0,10
19	70	menopausa	<30,00	0,10
*20	44	menacme	96,00	4,00
21	71	menopausa	<30,00	0,10
22	65	menopausa	<30,00	1,48
23	73	menopausa	<30,00	0,10
24	65	menopausa	<30,00	0,22
*25	46	menacme	140,00	16,00
26	61	menopausa	<30,00	0,12
27	78	menopausa	<30,00	0,10
28	48	menacme	50,00	0,80
29	53	menopausa	<30,00	0,45
30	74	menopausa	<30,00	0,10
31	62	menopausa	<30,00	0,22
32	35	menacme	45,00	0,17
33	51	menopausa	<30,00	0,41
*34	41	menacme	160,00	2,40
35	33	menacme	50,00	1,30
36	76	menopausa	<30,00	0,10
37	58	menopausa	<30,00	0,22
38	75	menopausa	<30,00	0,10
*39	44	menacme	220,00	5,10
40	56	menopausa	<30,00	0,35
41	48	menacme	46,00	0,40

* Pacientes na fase luteal.

pacientes no menacme, demonstraram que seis delas foram submetidas a cirurgia no período luteal, e nove na primeira fase do ciclo menstrual. As 26 pacientes catalogadas como menopausadas se encontravam em amenorréia secundária por mais de dois anos.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. DETERMINAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS

Para o controle de qualidade dos ensaios para receptor de estrógeno (ER) e progesterona (PR) foram utilizados úteros de ratas com 21 dias e com 3 meses respectivamente.

As ratas Wistar de 21 dias foram sacrificadas, e os cornos uterinos utilizados para o controle de qualidade positiva da dosagem do receptor para estrógeno (Giannopoulos & Gorski, 1971).

As ratas Wistar de 3 meses foram ooforectomizadas por incisão lombar, e no quinto, sexto e sétimo dias pós-operatório receberam por via intraperitoneal 10 µg de 17-β-estradiol diluídas em etanol a 30% e solução fisiológica. No oitavo dia pós-operatório foram sacrificadas por concussão cerebral e realizou-se a histerectomia, e os cornos uterinos foram utilizados para o controle de qualidade positivo da dosagem do receptor para progesterona (Milgrom & cols., 1973).

2.2.1.1. PREPARAÇÃO DO CITOSOL

Os espécimes cirúrgicos das pacientes portadoras de neoplasia maligna primária da mama e os cornos uterinos, foram retirados das caçapas que estavam no nitro

gênio líquido e colocados para o degelo em placas de Petri, sobre uma caixa de isopor contendo gelo picado com uma temperatura média de 4°C, onde procedeu-se todo o ensaio. Na figura 2 está representado um gráfico simplificado da metodologia descrita abaixo.

As amostras foram pesadas e logo depois picadas com o auxílio do bisturi e colocadas em tubos plásticos. Também se teve o cuidado de separar o máximo de tecido adiposo e coágulos do espécime. Estes fragmentos de tecido foram suspensos em tampão de homogeneização na proporção de 1:4 (peso/volume).

2.2.1.2. HOMOGENEIZAÇÃO

O tecido foi homogeneizado num Polytron PT10 ST (Brinkman Inst. USA.), utilizando-se 3 pulsos de 15 segundos na velocidade nº 4 com um intervalo de 45 segundos entre cada pulso.

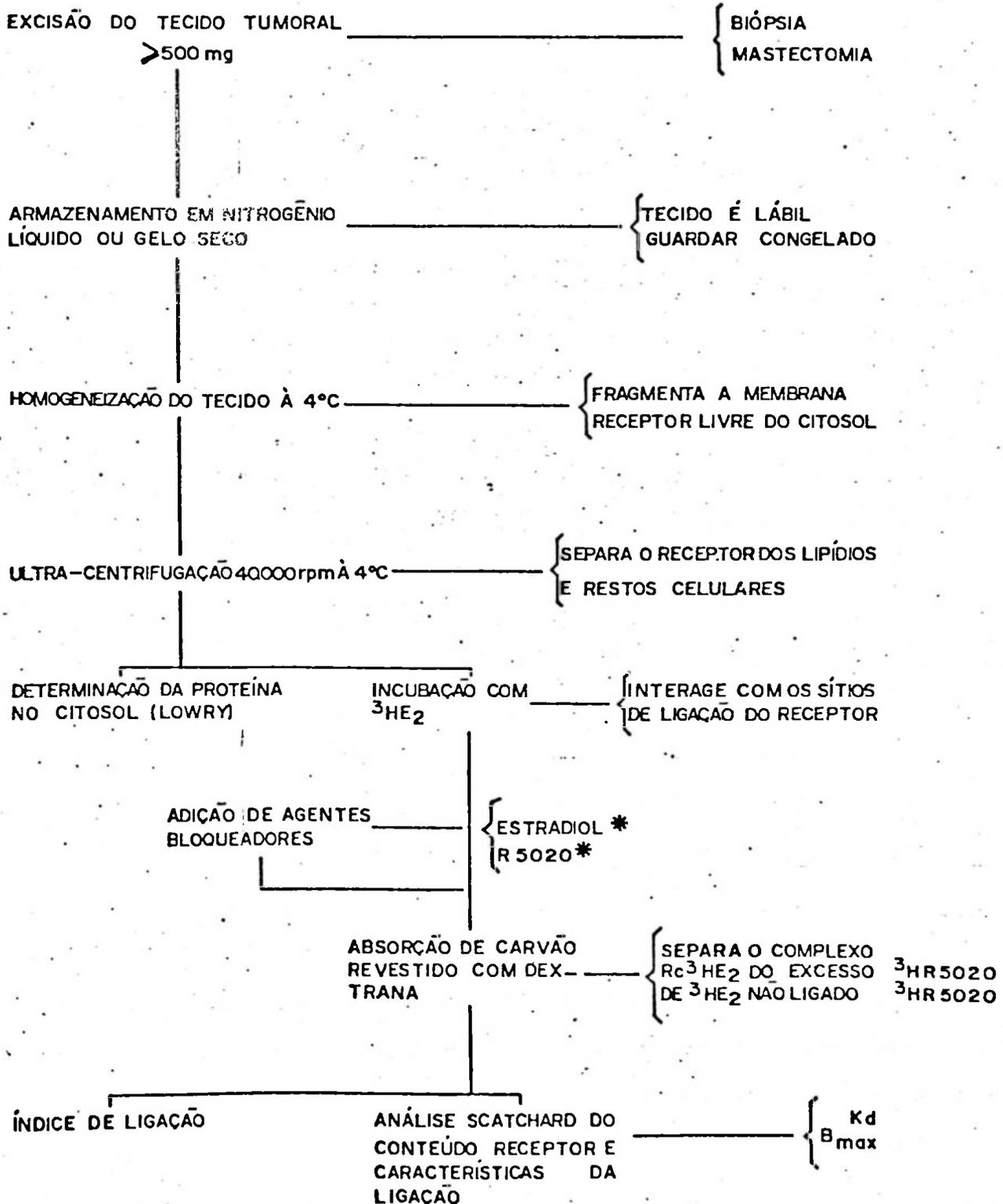
2.2.1.3. CENTRIFUGAÇÃO

O homogeneizado foi transferido para uma ultra-centrífuga refrigerada Beckman L3-50, e centrifugado a 105.000 g, rotor 50 ti (45.000 rpm) durante 45 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação obteve-se o sobrenadante (citosol). Esta fração foi aspirada cuidadosamente com uma pipeta Pasteur e separada do precipitado. No citosol foram dosados proteína e os receptores para estrógeno e progesterona.

2.2.1.4. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A determinação das proteínas no citosol foi feita segundo o método de Lowry & cols., 1951.

FIGURA 2
COMPONENTES BÁSICOS DO ENSAIO RECEPTOR-ESTEROÍDICO



Alíquotas de 25 a 50 μ l do citosol foram pipetadas em tubos de ensaio contendo água completando um volume de 500 μ l. Tubos com 500 μ l de água foram usados como "branco", e como "padrão" foram usadas alíquotas de albumina bovina na concentração de 800 μ g/ml, e adicionados 3 ml de uma solução de sulfato de cobre e bicarbonato de sódio na relação 1:49 (volume/volume) respectivamente a cada um dos tubos utilizados no ensaio.

Após agitação, os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 0,3 ml da solução Folin, e os tubos foram agitados e aquecidos por 15 minutos a 60°C, em banho-maria. Ao final deste tempo os tubos foram esfriados à temperatura ambiente.

A leitura foi feita em um espectrofotômetro Coleman, em comprimento de onda de 700 nm. As densidades ópticas encontradas foram transformadas através de uma curva padrão de albumina previamente preparada.

2.2.1.5. DETERMINAÇÃO DOS RECEPTORES ESTRÓGENO E PROGESTERONA CITOSÓLICOS PELO MÉTODO DE ADSORÇÃO EM CARVÃO-DEXTRANA.

O ensaio para receptor estrogênico (ER) pelo método de McGuire & cols., (1975), foi adaptado às nossas condições por Brentani & cols., (1981). Ele tem como base a inibição competitiva entre o hormônio triciado e o hormônio antagonista frio.

Em uma série de tubos Eppendorf, alíquotas de 75 μ l do citosol contendo 5 mg/ml de proteína dosada previamente, foram incubadas em triplicata, com quantidades crescentes de estradiol radioativo em concentrações finais de 0,5-1,0-2,5e5,0 x 10⁻⁹ M, e o ³H-estradiol foi adicionado

em 25 μ l de tampão de homogeneização para a determinação da ligação total do receptor.

Paralelamente a esta bateria, uma outra igual, porém contendo dietilestilbestrol 10^{-4} M, numa concentração final 100 vezes maior do que o estradiol marcado, foi corrida com o propósito de se determinar as ligações inespecíficas. Todas as duas baterias foram incubadas por 16 a 18 horas e mantidas à temperatura de 4°C.

2.2.1.6. CONTAGEM DE RADIOATIVIDADE

A radioatividade total foi determinada a partir de alíquotas de 5 μ l retiradas de cada um dos tubos, antes da adição do carvão-dextrana, num cintilador líquido LS-100 Beckman durante 1 minuto. Os restantes das alíquotas foram transferidas numa estante para a geladeira até a determinação da separação do hormônio livre e ligado.

A separação do estradiol ligado ao receptor e o livre, foi realizada pelo método do carvão revestido com dextrana (Koreman & cols., 1969), e procedeu-se após a incubação por 18 horas. Adicionou-se a cada tubo 100 μ l de mistura de carvão revestido com dextrana sob agitação contínua. Após 15 minutos as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm, em uma centrífuga refrigerada Sorval Rc-2B. Depois alíquotas de 75 μ l do sobrenadante foram retiradas e adicionadas a 5 ml de líquido de cintilação e levadas para contar a radioatividade.

2.2.1.7. CÁLCULOS

Após conhecer os valores contados pelo cintilador em cpm e transformados em unidades de concentra

ção (nM ou 10^{-9} M), construiu-se uma curva de saturação, lançando na abcissa os valores da concentração do hormônio em nM e na ordenada os valores da ligação específica (ligação total menos ligação inespecífica). A ligação desses pontos dá uma curva de forma parabólica retangular, e a transformação desta curva é feita pelo método de Scatchard (1949).

O gráfico de Scatchard dá uma reta de coeficiente angular negativo, pois na abcissa tem-se os valores da fração ligada que é a específica, e na ordenada os valores das frações específicas dividida pela fração livre (total menos específica).

O valor máximo da fração específica (β_0) é determinado no ponto de intersecção da reta com a abcissa. Conhecendo a ligação máxima específica, divide-se pela quantidade de proteína determinada e se expressa o resultado em fentomoles por miligrama (fM/mg) de proteína no citosol (European Organization Research Treatment Cancer, 1980); Jordan & cols., (1983).

A constante de dissociação (K_d) é determinada dividindo o valor máximo da ligação específica pelo encontrado na intersecção da reta com a ordenada.

De acordo com a resposta clínica, o ensaio foi considerado positivo quando o número máximo de sítios ligados foi maior do que 10,0 fM/mg de proteína citosólica (Allegra & cols., 1979; Brentani & cols., 1981). Exemplos de determinação de tumor com ER positivo (caso nº 24), e em útero de ratas estão contidos nas figuras 3 e 4.

O ensaio para receptor de progesterona

FIGURA 3 - DETERMINAÇÃO DE ER POSITIVO EM TUMOR (CASO N.º24).

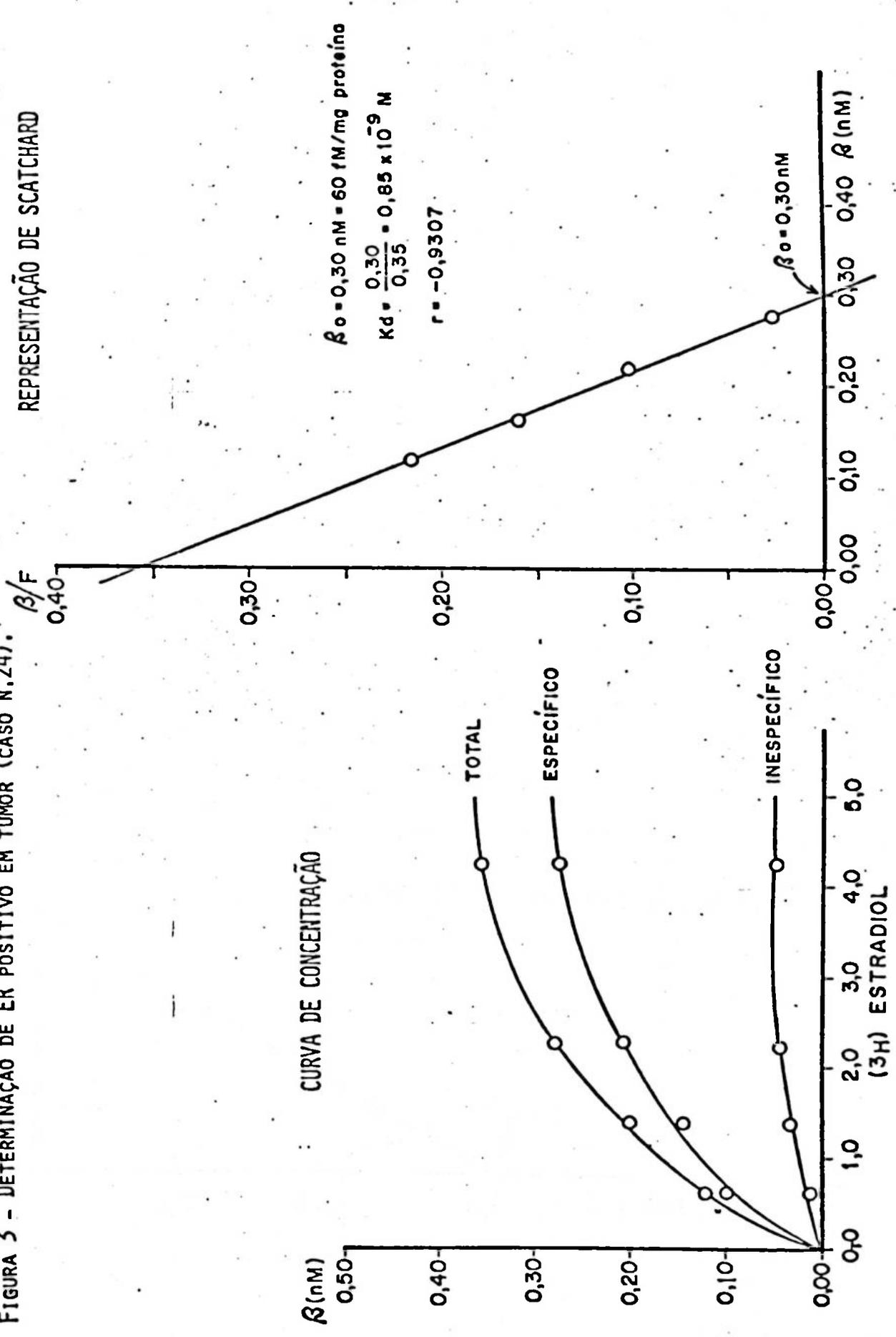
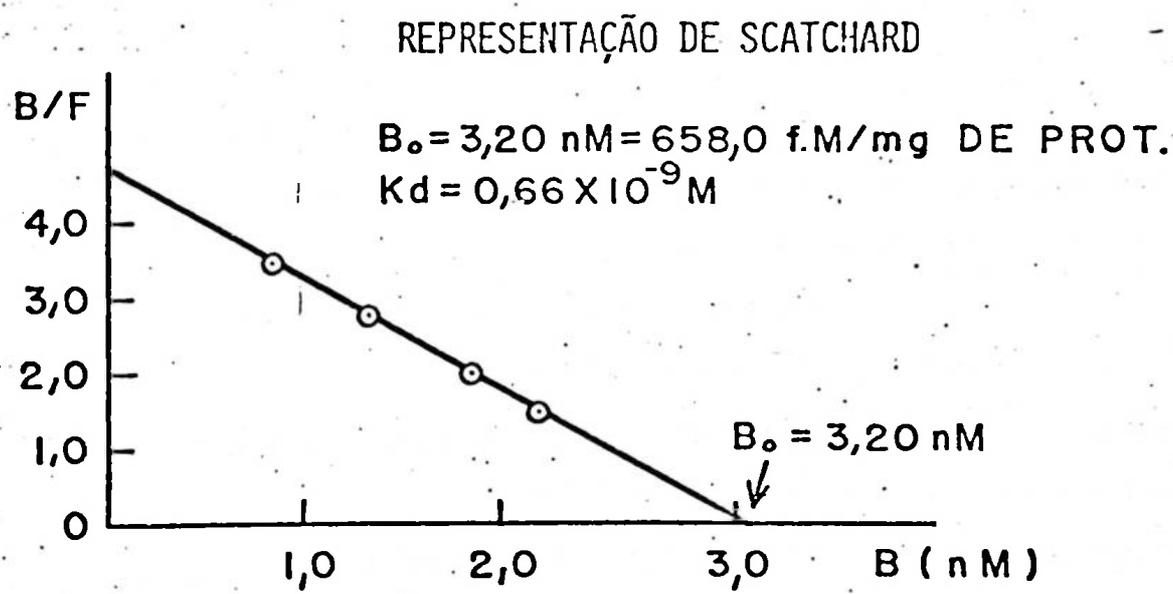
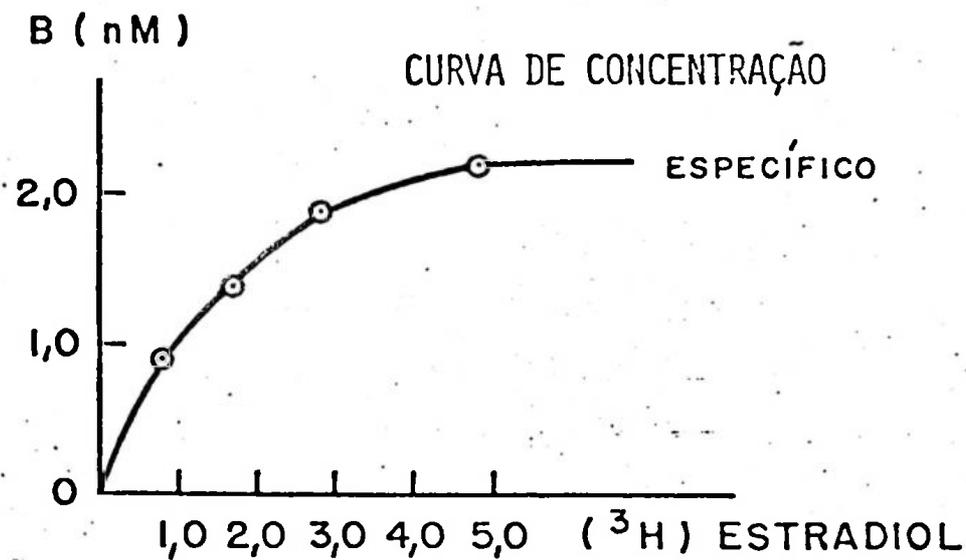


FIGURA 4 - DETERMINAÇÃO DE ER POSITIVO EM ÚTERO DE RATA.



(PR) foi feito pelo método Johnson & Nakamura (1978) e foi também adaptado às nossas condições por Brentani & cols., (1981).

A promegestona (R5020), progestágeno sintético com alta afinidade pelo receptor de progesterona (Philibert & Raynaud, 1974), foi utilizada como inibidor competitivo da reação com ^3H -R5020 marcada. Uma característica de R5020 é que ela apresenta uma afinidade relativa pelo receptor de glicocorticóide (Rousseau & cols., 1972). Por isso adicionou-se ao volume do citosol uma alíquota de cortisol 10^{-2}M diluída em álcool, de maneira que a concentração final do hormônio no volume de incubação fosse igual a 10^{-6}M , para saturar os sítios de ligação do receptor de glicocorticóide.

Alíquota de 75 μl de citosol, contendo aproximadamente 7 mg/ml de proteína, foi colocada em uma série de tubos Eppendorf e incubada em triplicata com concentrações crescentes de ^3H -R5020 (1,25-2,5-5,0 e 10,0 $\times 10^{-9}\text{M}$).

Paralelamente a este ensaio incubou-se uma outra bateria igual, contendo hormônio frio (R5020) 10^{-3}M para a determinação da ligação inespecífica, sendo a concentração final do hormônio frio no volume de incubação 100 vezes superior ao hormônio marcado.

Em seguida os tubos das duas séries com hormônios triciado e frio, foram agitados e transferidos da caixa de gelo picado para a geladeira, permanecendo em incubação por duas horas a 4°C. Após este período acrescentou-se a cada tubo, 50 μl de tampão de homogeneização contendo 60% de glicerol, a fim de aumentar a estabilidade do complexo receptor-hormônio, e foi incubado por mais duas horas.

Alíquota de 5 μ l foi retirada e colocada em 5 ml de líquido de cintilação para determinação da ra dioatividade total. Em seguida, para a separação do hormô nio livre, adicionou-se 100 μ l da suspensão de carvão com dextrana e incubou-se por 15 minutos a 4°C. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm e depois 5 μ l do sobrenadante foram contados em 5 ml de líquido de cintila ção.

A constante de dissociação (kd) e o sítio máximo da saturação (β_0) foram obtidos pelo gráfico de Scatchard.

O ensaio foi considerado positivo quando o número máximo de sítios ligados específicos foi maior do que 20,0 fM/mg de proteína citosol (Allegra & cols.; 1979). Exemplos de determinação de tumor com PR positivo (caso nº 12) e em útero de ratas, estão contidos nas figuras 5 e 6.

2.2.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

2.2.2.1. COLETA DO MATERIAL

O material foi obtido através de biópsia cirúrgica per-operatória e de mastectomias e fixado em for mol a 10%.

2.2.2.2. MÉTODO DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Parte do espécime utilizado para a deter minação dos receptores foi fixado em solução aquosa de for mol a 10% e incluído em parafina. Os cortes histológicos de 5 micras de espessura, corados em hematoxilina e eosina, fo ram submetidos a microscopia óptica para a classificação do tipo e gradação histológica, de acordo com Bloom e Richardson

FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DE PR POSITIVO EM TUMOR (CASO Nº12).

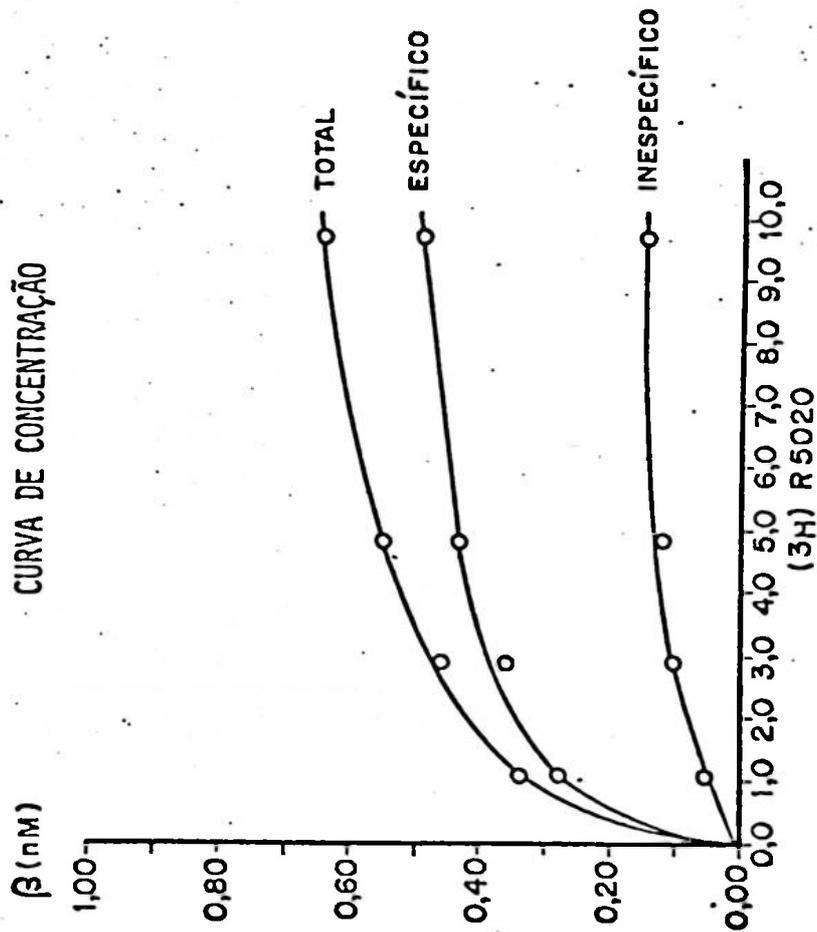
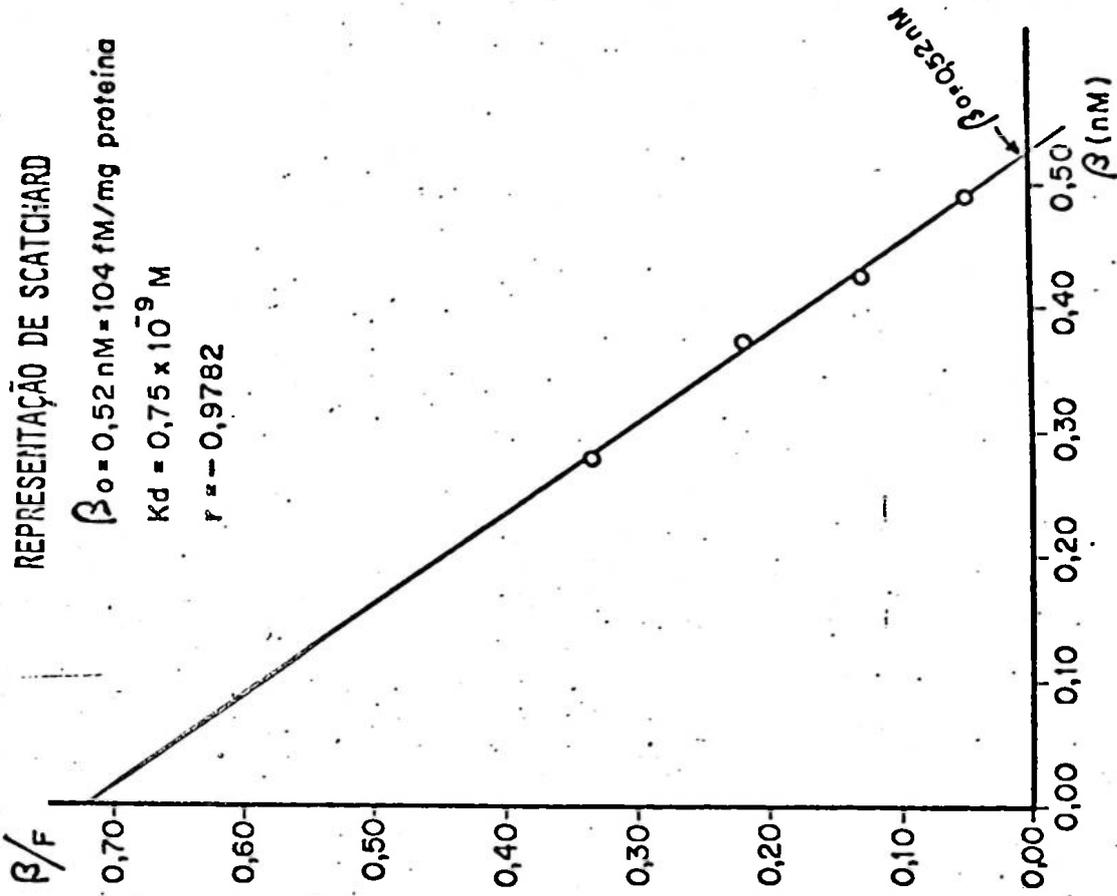
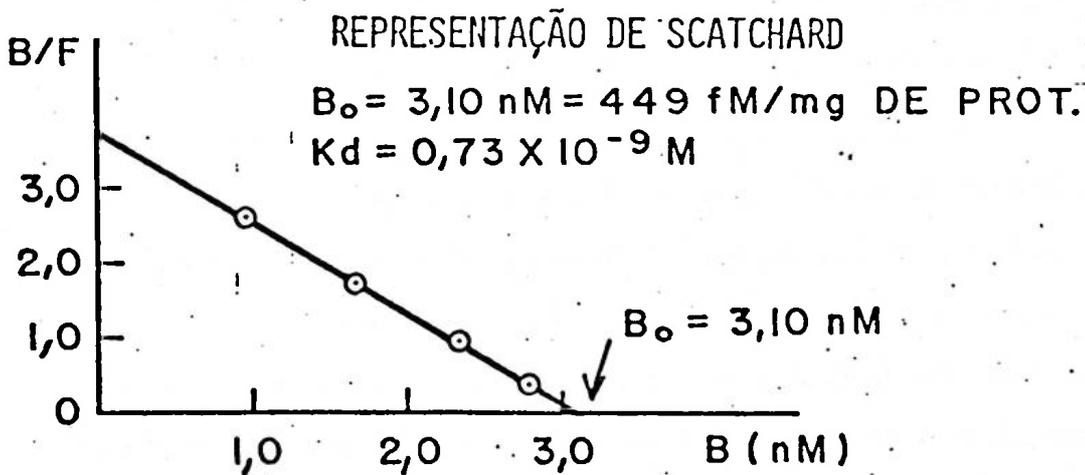
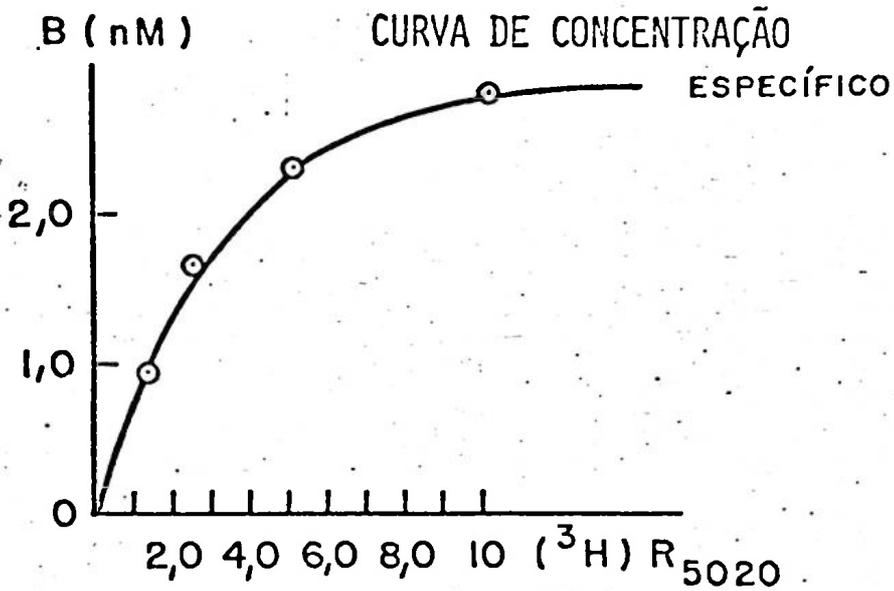


FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DE PR POSITIVO EM ÚTERO DE RATA.



(1957) que consideram as características histomorfológicas. Os casos estudados foram enquadrados em: Grau I - Tumores com padrão tubular ou adenocístico e núcleos bem diferenciados, Grau II - Tumores com padrão tubular ou adenocístico mas sem núcleos bem diferenciados e Grau III - Tumores apresentando perda do padrão tubular ou adenocístico.

As características histológicas do grau de celularidade epitelial, grau de atipia nuclear e grau de infiltrado linfocitário, foram catalogadas subjetivamente em "cruzes", o grau leve +/-; grau moderado ++/+ e o grau acentuado +++/+ (Black & cols., 1975).

2.2.2.3. MÉTODO DE COLORAÇÃO VOEHERFF VAN GIESON

Os espécimes foram corados pelo método de Voeherrff Van Gieson, que consiste numa solução de hematoxilina (alcoólica), duplamente oxidada pelo percloroeto de ferro e pelo lugol (íodo), Bancroft & Stevens (1977), de acordo com os passos seguintes:

1. Desparafinizar e hidratar os cortes;
2. Colocar na solução corante por 15 a 60 minutos, até que os cortes tomem uma cor preta uniforme;
3. Lavar em água corrente e diferenciar em solução de cloreto férrico a 10%. Controlar a diferenciação ao microscópio com aplicações breves do diferenciador, alternados com a água corrente. O corante vai sendo removido do colágeno e músculo e as fibras elásticas devem ficar pretas; os núcleos entretanto, devem permanecer corados levemente. Se as fibras elásticas acidentalmente ficarem muito descoloradas, os cortes devem ser imediatamente retornados à solução corante;

4. Lavar bem em água corrente;
5. Tratar os cortes com álcool a 95%, por 5 minutos para remover o iodo;
6. Lavar por 5 minutos em água corrente;
7. Contrastar com solução de Van Gieson por 5 minutos;
8. Desidratar, clarear e montar.

Após a utilização deste método observa-se que as fibras elásticas são coradas em preto e os núcleos em marrom.

A leitura do material foi feita em microscopia óptica de acordo com a quantidade de elastose periductal apresentada no corte histológico (Lundmark, 1972), e classificada em: Grau 0 - ausência de elastose, Grau 1 - pouca ou moderada quantidade e Grau 2 - abundante quantidade. As figuras 7 e 8, são exemplos representativos do grau de elastose 1 e 2 respectivamente.

2.2.3. DOSAGEM DE ESTRADIOL E PROGESTERONA PLASMÁTICOS.

As medidas dos hormônios endógenos plasmáticos estradiol e progesterona foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Tocoginecológica - Setor de Endocrinologia do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

As dosagens foram realizadas por radioimunoensaio utilizando-se a técnica do duplo anticorpo, através de "Kits" de estradiol e progesterona, fornecidos por Diagnostic Products Corporation, Califórnia, USA.

As medidas de radioatividade foram feitas em cintilador de cristal para emissões gama de contagem automática (Phillips, modelo PW 4580). Em cada ensaio foi

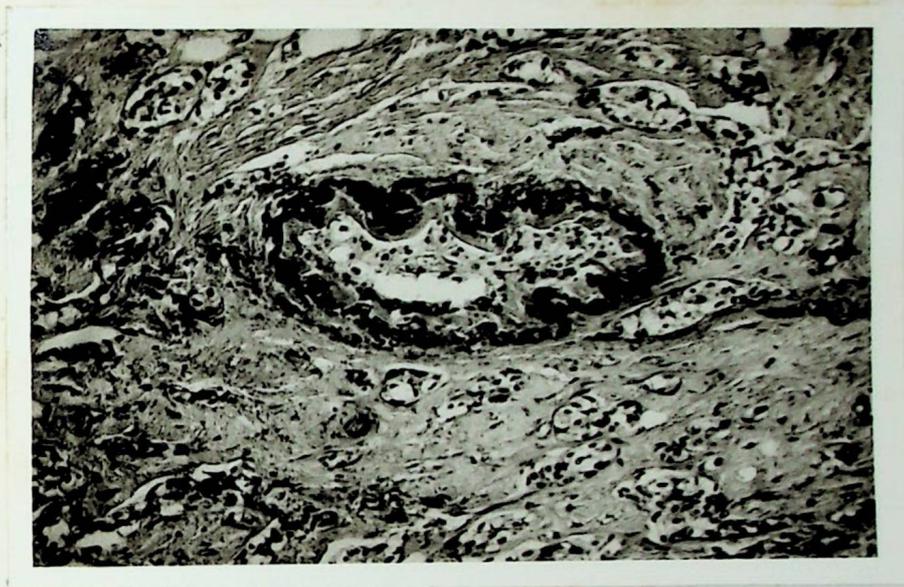


Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma mamário duc
tal invasor.

Caso nº 3

Corte 5 μ

Coloração Verhoeff Van Gieson

Aumento 250 x

Grau de elastose periductal - 1

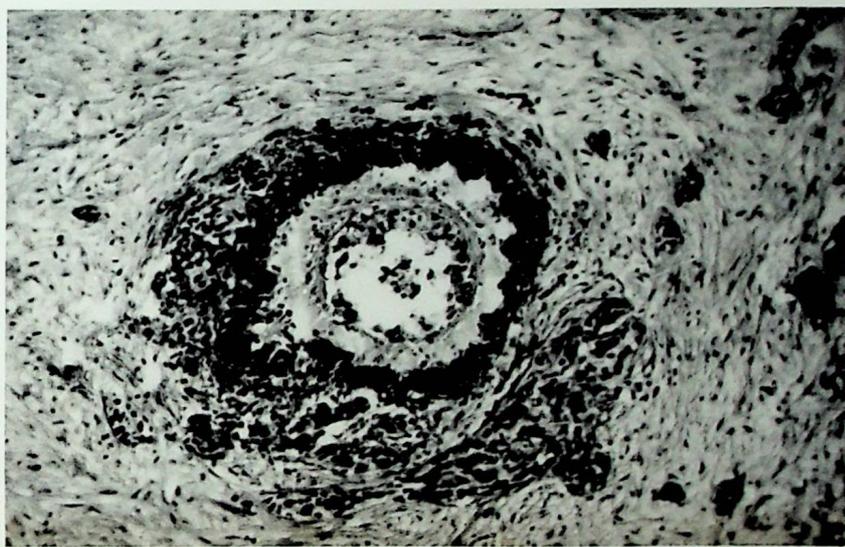


Figura 8 - Fotomicrografia de carcinoma mamário duc
tal invasor.

Caso nº 1

Corte 5 μ

Coloração Verhoeff Van Gieson

Aumento 250 x

Grau de elastose periductal - 2

feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de Es
tradiol Total Humano (30-100-300-900-1800 e 3600 pg/ml) e
Progesterona Total Humana (0,1-0,5-2,0-10,0-20,0 e 40,0 ng/
ml), e os resultados foram expressos em pg/ml e ng/ml de
plasma respectivamente. Todos os tubos, incluindo controles,
padrões e plasmas conhecidos, foram dosados em duplicata e
cada resultado expresso como a média aritmética das dupli
catas.

3-RESULTADOS

Os resultados do estudo nos tumores de 41 pacientes com carcinoma ductal invasor quanto ao grau de elastose periductal e a determinação dos receptores hormonais para estrógeno (ER) e progesterona (PR) estão contidos na tabela 2, onde se observa que a elastose foi positiva (graus 1 e 2) em 32 tumores (78,05%) assim distribuídos: 23 tumores (56,10%) no grau 1, e 9 (21,95%) no grau 2. A ausência de elastose (grau 0) foi determinada em 9 tumores.

A positividade de ER foi de 75,61% (31 casos) e de PR foi de 41,46% (17 casos) nos tumores estudados. Também observam-se 17 casos no agrupamento ER e PR positivos (41,46%); 10 casos no agrupamento ER e PR negativos (24,39%) e 14 casos no grupo ER positivo e PR negativo (34,15%). Não foram registrados tumores com PR positivo e ER negativo.

A proporção de positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) e seus respectivos níveis de concentração média e desvio padrão segundo o estado menstrual está apresentada na tabela 3, onde se evidenciam maiores níveis de concentração nos tumores de pacientes menopausadas. Nas 26 pacientes menopausadas (63,41%) a incidência de tumores ER positivos foi de 67,74% e para PR positivos 58,82%, apresentando níveis de concentrações de $68,01 \pm 34,57$ fM/mg proteína para ER e $131,42 \pm 48,23$ fM/mg de proteína para PR.

Os 15 tumores (36,59%) das pacientes no menacme apresentaram ER positivos (32,26%) e PR positivos

Tabela 2 - 0 grau de elastose e as determinações dos receptores para estrôgeno (ER) e progesterona (PR) das pacientes portadoras de carcinoma ductal invasor.

Pacientes	Grau de elastose	ER	PR
01	2	28,74	61,33
02	1	<10,00	<20,00
03	1	32,74	79,56
04	1	16,44	46,75
05	0	<10,00	<20,00
06	0	52,00	<20,00
07	0	16,14	64,12
08	1	40,26	87,14
09	1	<10,00	<20,00
10	2	40,60	91,23
11	2	55,80	<20,00
12	0	69,23	104,34
13	0	18,80	<20,00
14	0	82,73	<20,00
15	1	<10,00	<20,00
16	1	10,85	<20,00
17	0	<10,00	<20,00
18	2	58,80	<20,00
19	1	37,92	<20,00
20	1	<10,00	<20,00
21	1	36,00	<20,00
22	1	<10,00	<20,00
23	0	60,70	104,70
24	0	64,96	168,20
25	2	11,70	<20,00
26	1	43,53	<20,00
27	1	<10,00	<20,00
28	1	13,40	<20,00
29	1	88,30	192,65
30	1	<10,00	<20,00
31	2	79,88	125,03
32	1	36,47	95,23
33	1	96,30	<20,00
34	2	25,17	73,17
35	1	20,71	76,40
36	2	153,14	193,72
37	1	138,26	161,96
38	1	37,12	<20,00
39	1	22,38	<20,00
40	2	120,90	204,14
41	1	<10,00	<20,00

ER - negativo < 10 μ m/mg proteína de citosol.

PR - negativo < 20 μ m/mg proteína de citosol.

Tabela 3 - Proporção de positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) e suas concentrações médias e desvio padrão segundo o estado menstrual.

Estado menstrual	Receptor					
	ER		PR		nº	*concentração
nº	%	*concentração	%			
Menacme (15)	10	32,26	20,46 ± 8,08	7	41,18	70,57 ± 18,04
Menopausa (26)	21	67,74	68,01 ± 34,57	10	58,82	131,42 ± 48,23
TOTAL	31	100,00		17	100,00	

() nº de casos.

* Fentomoles/mg de proteína citosol.

(41,18%), com os níveis de concentrações de $20,46 \pm 8,08$ fM/mg de proteína para ER e de $70,57 \pm 18,04$ fM/mg de proteína para PR.

A distribuição de freqüência do agrupamento dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR), segundo o estado menstrual está apresentada na tabela 4, onde a distribuição da positividade do agrupamento ER e PR positivos em 17 casos foi maior nas menopausadas (70,59%). Também verifica-se que no agrupamento ER positivos e PR negativos, em 14 casos, foi maior a incidência nos tumores das pacientes menopausadas (71,43%) do que no menacme, enquanto que no agrupamento ER e PR negativos, em 10 casos, a negatividade foi maior nos tumores de pacientes no menacme (60,00%).

As características histológicas (*grau de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário*) dos carcinomas ductais invasores estão contidas na tabela 5.

A distribuição de freqüência da positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de diferenciação histológica (*tabela 6*), mostra que há uma preferência para positividade dos receptores esteróídicos ser em maior proporção nos tumores mais diferenciados, grau I (19,35%) e II (70,97%) do que naqueles pouco diferenciados, grau III (9,68%).

Na tabela 7 é demonstrado que não há uma correlação entre a incidência na positividade do grau de elastose e a diferenciação histológica, embora nos tumores bem diferenciados (*grau I*) não fosse determinada a elastose (*grau 0*), e nos tumores pouco diferenciados (*grau III*),

Tabela 4 - Distribuição de frequência do agrupamento de receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) segundo o estado menstrual.

Estado menstrual	Agrupamento de receptores					
	ER ⁺ PR ⁺		ER ⁺ PR ⁻		ER ⁻ PR ⁻	
	nº	%	nº	%	nº	%
Menacme (15)	5	29,41	4	28,57	6	60,00
Menopausa (26)	12	70,59	10	71,43	4	40,00
TOTAL	17	100,00	14	100,00	10	100,00

() nº de casos.

Tabela 5 - 0 grau de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário de pacientes portadoras de carcinoma mamário ductal invasor.

Pacientes	Diferenciação histológica	Celularidade epitelial	Atipia nuclear	Infiltrado linfocitário
01	II	++	+	++
02	II	+++	+	+++
03	III	+	+	+
04	II	+	+	+
05	I	++	++	+++
06	II	+	+	++
07	II	++	+	+
08	II	++	++	++
09	I	+	+	+
10	II	++	+	+
11	II	+	+	+
12	II	++	+	+
13	II	+++	+	++
14	II	+++	++	+++
15	III	++	++	++
16	II	++	+	+
17	III	+++	+++	+++
18	II	+	+	+
19	III	++	++	+
20	III	+	+	+
21	III	++	++	+
22	III	+++	+++	+
23	II	+++	++	++
24	II	+++	++	++
25	II	++	+	+
26	III	+++	++	++
27	III	+++	+++	++
28	II	+++	++	++
29	II	+++	++	+
30	III	++	+++	+
31	I	+	+	++
32	I	++	+	+
33	II	++	++	+
34	II	+++	+	+
35	II	++	+	+
36	I	++	+	+
37	I	++	+	+
38	II	+	++	+
39	II	++	++	+
40	I	+	+	+
41	III	+	+++	+

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

I bem, ++ moderado, III pouco diferenciado.

Tabela 6 - Distribuição de frequência da positividade dos receptores para estrôgeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de diferenciação histológica.

Grau de diferenciação histológica	Receptor			
	ER		PR	
	nº	%	nº	%
I (6)	6	19,35	6	35,29
II (22)	22	70,97	11	64,71
III (13)	3	9,68	0	0,00
TOTAL	31	100,00	17	100,00

() nº de casos.

I bem, II moderado, III pouco diferenciado.

Tabela 7 - Distribuição de frequência do grau de elastose segundo o grau de diferenciação histológica.

Grau de diferenciação histológica	Grau de elastose					
	0		1		2	
	nº	%	nº	%	nº	%
I (6)	0	0,00	3	13,04	3	33,33
II (22)	6	66,67	10	43,48	6	66,66
III (13)	3	33,33	10	43,48	0	0,00
TOTAL	9	100,00	23	100,00	9	100,00

() nº de casos.

I bem, II moderado, III pouco diferenciado.

o grau II de elastose estivesse ausente.

A distribuição de freqüência da positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de celularidade epitelial, sugere que houve uma correlação entre a positividade de ER e PR e o grau de celularidade epitelial, pois a freqüência foi maior nos graus leve e moderado (tabela 8).

Na tabela 9 a presença de elastose (graus 1 e 2) relacionada com a celularidade mostra que quando ela foi graus leve e moderado, maior foi a positividade de elastose, e quando a celularidade foi acentuada, maior o número de tumores com elastose grau 0.

A distribuição de freqüência da positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de atipia nuclear na tabela 10, demonstra que quando a atipia nuclear foi grau leve (ER 58,06% e PR 64,71%), e moderado (ER 38,71% e PR 29,41%), maior foi a freqüência de positividade de ER e PR do que quando a atipia nuclear foi grau acentuado (ER 3,23% e PR 5,88%).

A tabela 11 mostra que houve tendência para que a positividade da elastose (graus 1 e 2) ocorresse em maior freqüência nos graus de atipia nuclear leve e moderado.

A distribuição de freqüência da positividade dos receptores para estrógeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de infiltrado linfocitário encontra-se na tabela 12, onde se demonstra que houve maior distribuição da positividade dos receptores hormonais esteroídicos ER e PR nos tumores com menor grau de infiltrado linfocitário.

Tabela 8 - Distribuição de freqüência da positividade dos receptores para estrôgeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de celularidade epitelial.

Grau de celularidade epitelial	Receptor			
	ER		PR	
	nº	%	nº	%
+	6	19,35	3	17,65
(9)				
++	17	54,84	10	58,82
(20)				
+++	8	25,81	4	23,53
(12)				
TOTAL	31	100,00	17	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

Tabela 9 - Distribuição de frequência do grau de elastose segundo o grau de celularidade epitelial.

Grau de celularidade epitelial	Grau de elastose					
	0		1		2	
	nº	%	nº	%	nº	%
+	1	11,11	5	21,74	3	33,33
(9)						
++	3	33,33	12	52,17	5	55,56
(20)						
+++	5	55,56	6	26,09	1	11,11
(12)						
TOTAL	9	100,00	23	100,00	9	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

Tabela 10 - Distribuição de frequência da positividade dos receptores para estrôgeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de atipia nuclear.

Grau de atipia nuclear	Receptor			
	ER		PR	
	nº	%	nº	%
+ (22)	18	58,07	11	64,71
++ (14)	12	38,71	5	29,41
+++ (5)	1	3,22	1	5,88
TOTAL	31	100,00	17	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuada.

Tabela 11 - Distribuição de frequência do grau de elastose segundo o grau de atipia nuclear.

Grau de atipia nuclear	Grau de elastose					
	0		1		2	
	nº	%	nº	%	nº	%
+ (22)	4	44,44	10	43,48	8	88,89
++ (14)	4	44,44	9	39,13	1	11,11
+++ (5)	1	11,12	4	17,39	0	0,00
TOTAL	9	100,00	23	100,00	9	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

Tabela 12 - Distribuição de frequência da positividade dos receptores para estrôgeno (ER) e progesterona (PR) segundo o grau de infiltrado linfocitário.

Grau de infiltrado linfocitário	Receptor			
	ER		PR	
	nº	%	nº	%
+	21	67,74	12	70,59
(26)				
++	9	29,03	5	29,41
(11)				
+++	1	3,22	0	0,00
(4)				
TOTAL	31	100,00	17	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

Os tumores ER positivos apresentaram a seguinte distribuição: no grau leve 67,74%, no grau moderado 29,03% e no grau acentuado 3,23%. A mesma tendência foi verificada com tumores PR positivos que apresentaram a seguinte distribuição: nos graus leve 70,59%, no grau moderado 29,41% e no grau acentuado nenhum caso foi registrado.

A tabela 13, evidencia que nos casos de elastose grau 0, não existe relação com grau de infiltrado linfocitário. Nos tumores com elastose grau 1 foi observada a seguinte distribuição quanto ao grau de infiltrado linfocitário; leve 73,91%; moderado 21,74% e acentuado 4,35% e quando a elastose foi classificada em grau 2, leve 77,78%; moderado 22,22% e acentuado 0,00%, evidenciando assim que há uma tendência para maior positividade da elastose nos graus de infiltrado linfocitário leve e moderado.

A correlação entre a determinação dos receptores hormonais para estrógeno (ER) e progesterona (PR) quanto à positividade e à negatividade com o grau de elastose está contida na tabela 14, onde se observa que há 9 casos de elastose grau 0 assim distribuídos: 7 tumores foram ER positivos (22,58%) e somente 2 casos foram ER negativos (20,00%). Assim, no grupo elastose negativa e ER negativo, esta combinação ocorreu em 22,22% e quando os tumores foram elastose negativa e ER positivo esta proporção alcançou 78,78%.

Por outro lado quando a elastose foi positiva (graus 1 e 2) em 32 casos, 24 destes tumores também foram receptores estrogênicos positivo, concordando as duas metodologias em 75% e discordando em 25%.

Tabela 13 - Distribuição de freqüência do grau de elastose segundo o grau de infiltrado linfocitário.

Grau de infiltrado linfocitário	Grau de elastose					
	0		1		2	
	nº	%	nº	%	nº	%
+	2	22,23	17	73,91	7	77,78
(26)						
++	4	44,44	5	21,74	2	22,22
(11)						
+++	3	33,33	1	4,35	0	0,00
(4)						
TOTAL	9	100,00	23	100,00	9	100,00

() nº de casos.

+ leve, ++ moderado, +++ acentuado.

Tabela 14 - Correlação entre a positividade e a negatividade dos receptores para estrógeno (ER), progesterona (PR) e o grau de elastose.

Grau de elastose	Receptor							
	ER ⁺		ER ⁻		PR ⁺		PR ⁻	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0	7	22,58	2	20,00	4	23,53	5	20,83
(9)								
1	15	48,39	8	80,00	8	47,06	15	62,50
(23)								
2	9	29,03	0	0,00	5	29,41	4	16,67
(9)								
TOTAL	31	100,00	10	100,00	17	100,00	24	100,00

() nº de casos.

Todavia, todos os 9 tumores catalogados como grau 2 de elastose foram também receptores estrogênicos positivo 100%, concluindo que tumores sem elastose têm uma menor probabilidade de ser receptores estrogênicos positivo do que tumores com o grau acentuado de elastose.

Os resultados com receptores de progesterona positivo e elastose positiva, evidenciaram concordância entre os dois métodos em 50% dos casos.

4-DISCUSSÃO

A positividade dos receptores citoplasmáticos para estrógeno (ER) e progesterona (PR), vem sendo usada como fator de prognóstico em pacientes nos estádios iniciais da doença, pois estas pacientes portadoras de tumores receptores ER e PR positivos, apresentam maior intervalo clínico livre da doença e maior sobrevida do que as pacientes cujos tumores são ER e PR negativos (Knight & cols., 1977; Hahnel & cols., 1979 e Pichon & cols., 1980). Este fator favorável das pacientes com tumores ER e PR positivos, sugere que as células neoplásicas ainda possuem certo controle hormonal da sua proliferação.

Também a positividade é utilizada como indicador para terapia nos estádios avançados, pois seleciona as melhores pacientes para tratamento endócrino e aquelas que obedecerão a outras condutas terapêuticas adjuvantes (Holdaway & cols., 1980).

No material estudado de 41 pacientes portadoras de neoplasia maligna primária da mama, tipo ductal invasor, a frequência de ER e PR positivos, foi de 76,61% e 41,46% respectivamente. Estes resultados estão concordes com a literatura mundial, pois a positividade em pacientes não selecionadas em vários grupos, variou em proporções de 40% a 80% para ER, e de 22% a 50% para PR (Allegra & cols., 1979; Brentani & cols., 1981). Quando determinado especificamente em carcinoma ductal invasor, Antoniades & cols., 1979 apresentaram a incidência de ER positivo em 88,9%.

As razões para a grande variabilidade encontrada nas determinações de receptores positivos, estão

na dependência de parâmetros tais como: idade, estado menstrual, fase do ciclo menstrual e características histopatológicas de malignidade.

No material estudado há uma tendência para que a frequência de ER positivo e seu nível de concentração, seja maior nas mulheres com mais de 50 anos de idade do que nas jovens. A positividade de ER e PR correlacionada com a idade mostra uma leve associação, pois os tumores de mulheres idosas, apresentaram maiores índices de positividade em nível de concentração. No entanto, aparentemente a variação da positividade e o nível de concentração estão mais correlacionados com o estado menstrual (menopausadas) do que com a idade. Trabalhos recentes demonstraram uma associação significativa entre frequência de ER positivo com idade das pacientes principalmente após a menopausa (Elwood & cols., 1980; McCarty & cols., 1983). Não há uma explicação satisfatória para este fenômeno, mas pode ser resultado de uma função ovariana diminuída e alterações no balanço estrógeno-progesterona. Outros autores verificaram que a frequência de ER positivo é dependente do estado menstrual (Martin & cols., 1978; Lesser & cols., 1981).

Os tumores de pacientes menopausadas apresentaram maior nível de concentração da dosagem dos receptores esteroídicos do que as pacientes no menacme. Os resultados de 20,46 fM/mg de proteína no citosol de pacientes no menacme e de 68,01 fM/mg de proteína nos tumores de pacientes menopausadas, foram semelhantes aos obtidos nos diversos grupos em 1978 com os seguintes valores para as pacientes no menacme e menopausa respectivamente: McGuire

30,30 e 108,10 fM/mg proteína de ER; Saez & cols., 32,00 e 174,00 fM/mg proteína de ER e Jonat & Mass 33,10 e 69,60 fM/mg de proteína de ER.

A diversificação dos níveis de concentração e a positividade de ER e PR entre as pacientes no me nacme e menopausa, podem ser explicados através dos níveis hormonais.

As pacientes no me nacme têm alto nível de hormônio estrogênico endógeno (plasmático) que seria responsável por uma translocação dos receptores citosólicos para o núcleo (Sakai & Saez, 1976). Nestas pacientes, altos níveis de estradiol citosólico também foram encontrados por Thorsen & cols., (1982), demonstrando uma menor quantidade de receptores de estradiol desocupados.

Também para explicar alguns níveis baixos de receptores (ER e PR), bem como alguns resultados falso negativos, é possível que haja interferência na indução dos receptores causada pelos altos níveis plasmáticos de progesterona. O trabalho de Saez & cols., (1978) postulou que a concentração plasmática da progesterona controla a síntese de ER e PR, pois na fase pré-luteal os níveis de concentração de ER e PR são maiores do que na fase luteal, onde há maior nível de progesterona plasmática circulante.

Na fase proliferativa do ciclo menstrual foram encontrados altos níveis de concentração de ER em citosóis de neoplasia maligna mamária em comparação aos valores obtidos na fase luteal (Heise & Gorlich, 1982).

De fato, na amostra estudada os tumores das pacientes operadas na fase luteal apresentaram níveis baixos de concentração ou ausência de ER e todos os resul

tados de PR foram negativos.

O elevado nível de concentração de PR obtido nas pacientes menopausadas cuja função ovariana está inibida, mas com níveis t^onicos de andr^ogenos adrenais e ovarianos são convertidos perifericamente em estr^ogeno com concentra^oes mⁱnimas, mas suficientes para induzir os receptores de ER e PR (Saez & cols., 1978).

De acordo com Fisher & cols., (1975) neoplasias malignas mam^arias em pacientes menopausadas apresentam características clⁱnicas e histopatol^ogicas distintas das pacientes jovens no menacme. Os tumores em pacientes no menacme s^o mais agressivos no seu comportamento biol^ogico e de pior progn^ostico, por apresentarem alta replicac^oo celular e esta desdiferencia^o acarreta uma diminuⁱo^o ou perda do ER, tornando o tumor na maioria das vezes ER negativo, evidenciando a perda do controle hormonal da c^elula tumoral e tornando-a aut^onoma em seu crescimento (Meyer & cols., 1977).

A diferencia^o histol^ogica do tumor prim^ario tem sido importante para ser usado como progn^ostico, pois pacientes com tumores bem diferenciados tendem a ter sobrevida mais prolongada do que aquelas com neoplasia pouco diferenciada (Freedman & cols., 1979). No presente estudo a diferencia^o quando correlacionada com a positividade dos receptores de estr^ogeno (ER) e progesterona (PR), mostra que h^a uma tend^encia para que nos tumores bem diferenciados haja uma maior incid^encia de positividade de receptores do que nos pouco diferenciados. Estes resultados est^o concordes com os publicados por Maynard & cols., (1978); McCarty & cols., (1980) e Brentani & cols., (1983).

Inúmeros trabalhos revelam que há um aumento na incidência de ER negativo nos tumores pouco diferenciados, quando comparados com os bem diferenciados (*Rosen & cols.*, 1976; *Nicholson & cols.*, 1981).

Na amostra estudada, a diferenciação histológica e os níveis de concentração dos receptores não mostraram correlação, e trabalhos na literatura estão concordes (*Heuson & cols.*, 1975; *Thoresen & cols.*, 1981).

Estudos sobre a celularidade epitelial mostram uma tendência para uma associação direta de positividade em tumores mamários e celularidade epitelial (*Antoniades & Spector*, 1979). Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, embora *Rasmussem & cols.*, (1981) não tenham encontrado correlação.

No entanto, é sabido que numa mesma população de células tumorais, há uma heterogeneidade de clones receptores positivos e negativos (*Calabresi & cols.*, 1979), mostrando assim que a celularidade epitelial não interfere na positividade dos receptores.

O grau de atipia nuclear é um importante parâmetro na previsão da sobrevida das pacientes com câncer de mama (*Black & cols.*, 1956). Nos tumores estudados evidenciou-se que a positividade de ER tende a diminuir quando a neoplasia apresenta acentuada atipia nuclear, e o mesmo acontece com PR positivo. O presente resultado está de acordo com um único estudo recentemente publicado (*Syrjälänen*, 1982), correlacionando o grau de atipia nuclear e os receptores esteróidicos (ER e PR).

As biópsias de tumores com grau de infiltrado linfocitário leve, apresentaram maior proporção de

positividade para ER e PR do que os graus moderado e acenuado, sugerindo uma relação inversa com a positividade dos receptores esteroídicos. Esses dados são semelhantes aos de *Rosen & cols.*, (1975) e *Chabon & cols.*, (1983).

Todas as características histopatológicas estudadas com a presença de ER e PR, também foram direta ou indiretamente relacionadas com a diferenciação tumoral, indicando que a presença dos receptores hormonais esteroídicos nas neoplasias malignas mamárias representam outro indice deste processo. O pequeno número da amostragem nas várias categorias é insignificante para uma avaliação absoluta.

A correlação entre a presença de ER e a evidência morfológica da diferenciação tumoral complementa estudos morfológicos (*Fisher & cols.*, 1981) e cinéticos (*Meyer & cols.*, 1977), que encontraram uma boa correlação entre vários aspectos morfológicos desfavoráveis como alto índice de timidina e uma distribuição hiperplóide de DNA (*Olzewski & cols.*, 1981) e a ausência de ER, demonstrando alto poder de proliferação dos tumores ER negativo.

Os tumores com elastose positiva (graus 1 e 2) são em sua maioria (aproximadamente 77%) ER positivo e na ausência de elastose (grau 0), somente 23% dos tumores foram ER e PR positivos. Estes resultados em relação a ER estão perfeitamente de acordo com o trabalho de *Masters & cols.*, (1976).

A presença de elastose e PR mostrou uma correlação quando ER e PR foram simultaneamente comparados à elastose; 76,48% dos tumores ER e PR positivos estavam no agrupamento de elastose graus 1 e 2.

No entanto, aproximadamente 80% dos tumores ER e PR negativos apresentaram elastose graus 1 e 2, o que demonstra falta de correlação entre a metodologia da determinação de receptores hormonais e a dosagem histoquímica de elastose, o que torna inviável uma tentativa de substituição de uma metodologia por outra. *Reys & cols., (1982)*. Também não observaram correlação entre a presença e a concentração de ER com a presença ou ausência de elastose.

Durante a elaboração deste trabalho, as presenças de elastose e receptores estrogênicos (ER) foram sugeridas como fatores prognósticos independentes (*Humeniuk & cols., 1983*). Esta publicação está perfeitamente de acordo com os resultados apresentados. Entretanto, *Masters & cols., (1978)* e *Mills & cols., (1980)* relataram que quando estes fatores estão associados, as pacientes poderiam apresentar melhor resposta clínica à terapêutica da doença.

Neste estudo ocorreu uma maior incidência de elastose graus 1 e 2 nos tumores com baixo grau de atipia nuclear e infiltrado linfocitário, e todas estas características indicam no tumor sua natureza de grau bem diferenciado.

5-CONCLUSÕES

1- As pacientes menopausadas apresentaram maior incidência e nível de concentração de receptores de estrógeno e progesterona.

2- A maior distribuição de receptores (ER e PR) positivos se encontraram nos graus leve e moderado de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário.

3- A incidência de elastose positiva foi maior nos tumores com graus leve e moderado de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário.

4- Total concordância ocorreu entre o grau II de elastose periductal e a positividade dos receptores estrogênicos.

5- A determinação dos receptores de estrógeno e progesterona não pode ser substituída pela elastose.

6-SUMÁRIO

No presente estudo foram analisados numa série de 41 tumores de pacientes portadoras de carcinoma mamário tipo ductal invasor, a positividade dos receptores hormonais esteroídicos *estrôgeno (ER) e progesterona (PR)* e o grau de *elastose*. Estes fatores foram correlacionados com o *estado menstrual, diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário*.

A correlação de positividade de ER e PR e a presença de elastose (*graus 1 e 2*) ocorreu em 75% dos casos. Nos casos de elastose (*grau 0*) não houve correlação, pois 80% dos casos eram PR *positivo*. Todavia, considerando-se o grau 2 de elastose, há uma total correlação com ER *positivo* e na metade dos casos com PR *positivo*.

No presente estudo observou-se uma maior incidência de elastose positiva em tumores catalogados com *baixo grau de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário*.

A incidência e nível de concentração de ER foram maiores nas pacientes *menopausadas*. Não ocorreu variação quanto ao PR conforme o estado menstrual, mas ocorreu quanto ao nível de concentração.

A maior distribuição de ER e PR *positivos* se encontravam nos graus *leve e moderado de diferenciação histológica, celularidade epitelial, atipia nuclear e infiltrado linfocitário*.

7-SUMMARY

Positivity of steroid receptors (*estrogen and progesterone*) and *elastose* level were investigated in a series of 41 tumors of patients with breast carcinoma of the invasive ductal type. These factors were correlated with *menstrual status, histologic differentiation, epithelial cellularity, nuclear atyp, and lymphocyte infiltration.*

Correlation between ER and PR positivity and the presence of elastose (*levels 1 and 2*) occurred in 75% of cases. In the elastose (*level 0*) cases there was no correlation, since 80% of cases were ER-*positive*. However, when level 2 of elastose is considered, there was total correlation with *positive ER* and for half of the case with *positive PR.*

In the present study we observed greater occurrence of positive elastose in tumors with a low level of histologic differentiation, epithelial cellularity, nuclear atyp, and lymphocyte infiltration.

The incidence and concentration of estrogen receptors (ER) were higher among post-menopausal women. No variation in progesterone receptors (PR) by menstrual status was observed.

The highest distribution of positive ER and PR was detected in tumors having *slight and moderate* levels of histologic differentiation, epithelial cellularity, nuclear atyp, and lymphocyte infiltration.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEGRA, L.C., LIPPMAN, M.E. THOMPSON, E.B. & cols. The distribution, frequency, and quantitative analysis of estrogen, progesterone, androgens and glucocorticoid receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, 39:1447-1454, 1979.
- ANTONIADES, K. & SPECTOR, H. Correlation of estrogen receptor levels with histopathology and cytomorphology in human mammary cancer. *Am.J.Clin.Pathol.*, 71:497-503, 1979.
- AZZOPARDI, J.G. & LAURINI, R.N. Elastosis in breast cancer. *Cancer*, 31:174-183, 1974.
- BANCROFT, J.D. & STEVENS, A. Elastic fibers. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*. eds. New York, Churchill Livingstone, 1977. pp.96-97.
- BAXTER, J.D. & FUNDER, J.W. Hormone receptors. *The New Engl. Medicine*, 301:1149-1161, 1979.
- BEATSON, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*, ii:104, 1896.
- BLACK, M.M., BARCLAY, T.H.C. & HANKEY, B.F. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer*, 36:2048-2050, 1975.
- BLACK, M.M., SPEER, F.D. & OPLER, S.R. Structural representations of tumor host relationship in mammary carcinoma: biologic and prognostic significance. *Am.J.Clin. Pathol.*, 26:250-252, 1956.

BLOOM, H.J.G. & RICHARDSON, W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer. *The Br.J.Cancer*, 11:359-377, 1957.

BRENTANI, M.M., GOES, J.C.S. & LEMOS, L.B. Association between hormone receptors and morphological features in breast carcinomas. *Cancer Detec.Prev.*, 1983 (in press).

BRENTANI, M.M., NAGAI, M.A., FUJIYAMA, C.T. & GOES, J.C.S. Steroid receptors in a group of brazilian breast cancer patients. *J.Surg.Oncol.*, 18:431-439, 1981.

BRIDGES, K.G., KESHIGEGIAN, A.A. & cols. Influence of surgical technique on estrogen and progesterone receptor determination in breast cancer. *Cancer*, 51:2317-2320, 1983.

BULBROOK, R.D., GREENWOOD, F.C. & HADFIELD, G.J. Oophorectomy in breast cancer, an attempt to correlate clinical results with estrogen production. *Brit.Med.J.*, 2:7-11, 1958.

CALABRESI, P., DEXTER, D.L. & HEPPNER, L.T. Clinical and pharmacological implications of cancer cell differentiation and heterogeneity. *Biochem.Pharmacol.*, 28:1933-1941, 1979.

CHABON, A.B., GOLDBERG, J.D. & VENET, L. Carcinoma of the breast: interrelationship among histopathologic features estrogen receptor activity, and age of the patient. *Human Pathol.*, 14:368-372, 1983.

CLARK, J.H. & MARKAVERICH, B.M. Relationship between type I and II estradiol binding sites and estrogen induced responses. *J.Steroid Biochem.*, 15:49-54, 1981.

CLARKE, B.W. An analysis of 99 cases of inoperable carcinoma of the breast treated by oophorectomy, *Lancet*, 1: 227-228, 1905.

COLE, M.P., JONES, C.T.A., TODD, I.D.H. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. *Brit.J.Cancer*, 25: 270-275, 1971.

COOPER, A.P. Lectures on the principles and practice of surgery. *St.Thomas Hospital London, England*, Werthey, 1829. p.637.

COWIE, A.T. & TINDAL, J.S. *The physiology of lactation*. eds. Baltimore, Willians & Wilkins, 1971. p.151.

DAVIS, J.D. Hyperelastosis, obliteration and fibrous plaques in major ducts of the human breast. *Pathol.*, 110: 13-26, 1973.

ELWOOD, J.M. & GOODPHIN, W. Oestrogen receptors in breast tumors: association with age, menopausal status and epidemiological and clinical features in 735 patients. *Br.J.Cancer*, 42:635-644, 1980.

ENGELSMAN, E., PERSIJN, J.P., KORSTEN, C.B. & CLETON, F.J. Oestrogen receptor in human breast cancer tissue and response to endocrine therapy. *Brit.Med.J.*, 2:750-752, 1973.

EUROPEAN ORGANIZATION RESEARCH TREATMENT CANCER. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. workshop, held in 16-17 march, 1979, in Netherlands Cancer Institute. *Europ.J.Cancer*, 16:1513-1515, 1980.

FISHER, E.R., GREGORIO, R.M. & FISHER, B. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from the findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol nº 4). *Cancer*, 36:1-85, 1975.

FISHER, E.R., OSBORNE, K.C., McGUIRE, W.L. & cols. Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1:37-41, 1981.

FOULDS, L. *Neoplastic Development*. ed. New York, Academic Press, 1969.

FREEDMAN, L.S., EDWARDS, D.W., McCONNEL, E.M. & DOWNHAM, D.Y. Histologic grade and other prognostic factors in relation to surgical of patients with breast cancer. *Br.J.Cancer*, 40:44-45, 1979.

GIANNOPOULOS, G. & GORSKI, J. Estrogen receptors. Quantitative studies on transfer of estradiol from cytoplasmic to nuclear binding sites. *J.Biol.Chem.*, 246:2524-2525, 1971.

GLASCOCK, R.F. & HOEKSTRA, W.G. Selective accumulation of tritium labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheeps. *Biochem.J.*, 72: 673-682, 1959.

GLAUBITZ, L.C., BOWEN, J.H., MOSSLER, J.A. & cols. Correlation of elastosis with sex steroid receptors and clinical outcome in human breast cancer. *Lab.Inv.*, 46: A 30, 1982.

GORSKI, J., TOFT, D., SHYMALA, G. & cols. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Rec.Prog.Hormone Res.*, 24:25-80, 1968.

HADDOW, A., WATKINSON, J.M. & PATTERSON, E. Influence of synthetic oestrogens upon advanced malignant disease. *Br.Med.J.*, 2:393-398, 1944.

HÄHNEL, R., WOODINGS, T. & VIVIAN, A.B. Prognostic value of estrogen receptor in primary breast cancer. *Cancer*, 44:671-675, 1979.

HEISE, E.S. & GÖRLICH, M. Estradiol receptor in human breast cancer throughout the menstrual cycle. *Oncol.*, 39:340-344, 1982.

HEUSON, J.C., LeCLERCQ, G., LONGEVAL, E. & cols. Estrogen receptors: prognostic significance in breast cancer. In: *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*. McGuire, W.L., Carbone, P.P. & Vollmer, E.P. eds. New York, Raven Press, 1975. pp.57-72.

HOLDAWAY, I.M., MONTGAY, K.G., HARVEY, V.J. & cols. Clinical application of receptor measurements in breast cancer. *Br.J.Cancer*, 41:136-139, 1980.

HORWITZ, K.B. & MCGUIRE, W.L. Progesterone and progesterone receptors in experimental breast cancer. *Can.Res.*, 37:1733-1738, 1977.

HUGGINS, C. & BERGENSTAL, D.M. Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. *Cancer Res.*, 12:134-141, 1952.

HUMENIUK, V., FORREST, A.P.M., HAWKINS, R.A. & PRESCITT, R. Elastosis and primary breast cancer. *Cancer*, 52:1448-1452, 1983.

JACKSON, J.G. & ORR, J.W. The ducts of carcinomatous breasts, with particular reference to connective tissue changes. *J.Pathol.Bacteriol.*, 74:265-273, 1957.

JENSEN, E.V. & JACOBSON, H.I. Basic guide to the mechanism of estrogen action. *Rec.Prog.Hormone Res.*, 18:387-394, 1962.

JENSEN, E.V., NUMATA, M., BRECHER, P.I. & DeSOMBRE, E.R. Hormone-receptor interaction as a guide to biochemical mechanism. *Biochem.Soc.Symp.*, 32:133-159, 1971.

JENSEN, E.V., SUZUKI, T., KAWASHIMA, T. & cols. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 59:632-638, 1968.

JENSEN, H. & SCHIÖDT, T. Stromal response in breast carcinoma and fibroadenomatosis, estimated by the aid of the alkaline phosphatase activity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 79:A 321-329, 1971.

JOHNSON, R.B. & NAKAMURA, R.M. Simplified Scatchard plot assay for progesterone receptor in breast cancer: comparison with single point and multipoint assay. *Clin. Chem.*, 24-1170-1176, 1978.

JONAT, W. & MASS, H. Some comments on the necessity of receptor determination in human breast adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone level. *Cancer Res.*, 38:4305-4306, 1978.

JORDAN, V.C., ZAVA, D.T., EPPENBURGER, U. & cols. Reliability of steroid hormone receptor assays: an international study. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, 19:357-363, 1983.

KNIGHT, W.A., LIVINSTON, R.B., GREGORY, E.J. & McGUIRE, W. L. Estrogen receptor an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res.*, 37:4669:4671, 1977.

- KOENDERS, A.J.M., GEURTS-MOESPORT, A., ZOLINGER, S.J. & BENRAAD, Th.J. Progesterone and estradiol receptors in DMBA induced mammary tumors before and after ovariectomy and after subsequent estradiol administration. In: *Progesterone Receptors in Normal and Neoplastic Tissues*. McGuire, W.L., Raynaud, J.P., & Baulieu, E.E. eds. New York, Raven Press, 1977. pp.71-84,
- KOREMAN, S.G., OERRIN, L.E. & McCALLUM, T.P. A radio ligand binding assay system for estradiol measurement in human plasma. *J.Clin.Endocrinol.*, 29:879-883, 1969.
- LESSER, M.L., ROSEN, P.P., SENIE, R.T. & cols. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlation with epidemiology and pathology. *Cancer*, 48:299-309, 1981.
- LOWRY, O.H., ROSEBOROUGH, N.J., FARR, A.L. & cols. Protein measurement with the Folin Phenil reagent. *J.Biol.Chem.*, 193:265-275, 1951.
- LUFT, R. & OLIVECRONA, H. Experiences with hyposectomy in man. *J.Neurosurg.*, 10:301-316, 1953.
- LUNDMARK, C. Breast cancer and elastosis. *Cancer*, 30: 1195-1201, 1972.
- LYONS, W.R., KI, C.H. & JOHNSON, R.E. The hormonal control of mammary growth and lactation. *Rec.Prog.Hormone Res.*, 14:219-220, 1958.
- MACCORQUODALE, D.W., THAYER, S.A. & DOISEY, E.A. Isolation of principal estrogenic substance of liquor folliculi. *J.Biol.Chem.*, 115:435-448, 1936.

MARTIN, P.M., JACQUELINE, J., ROLLAND, P.H. & cols. Tumeurs mammaires humaines: Correlations entre les recepteurs hormonaux steroïdiques et l'anatomie pathologique. *Bull. Cancer*, 65:385-388, 1978.

MASS, H., ENGEL, B., HOHMEISTER, H. & cols. Estrogen receptors in human breast cancer tissue. *Amer.J. Obstet. Gynecol.*, 113:377-382, 1972.

MASTERS, J.R., HAWKINS, R.A., SANGSTER, K. & cols. Oestrogen receptors, cellularity, elastosis, menstrual status in human breast cancer. *Eur.J.Cancer*, 14:303-307, 1978.

MASTERS, J.R., SANGSTER, K., HAWKINS, R.A. & SHIVAS, A.A. Elastosis and oestrogen receptors in human breast cancer. *Br.J.Cancer*, 33:342-343, 1976.

MAYNARD, P.V., DAVIES, C.J., BLAMEY, R.W. & cols. Relationship between oestrogen receptor content and histological grade in human primary breast tumors. *Br.J.Cancer*, 38:745-748, 1978.

MCCARTY, K.Jr., BARTON, T.K., FETTER, B.F. & cols. Correlation of estrogen and progesterone receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma. *Cancer*, 46:2851-2858, 1980.

MCCARTY, K.S., SILVA, J.S., COX, E.B. & cols. Relationship of age and menopausal status to estrogen receptor content in primary carcinoma of the breast. *Ann.Surg.*, 197:123-127, 1983.

MCGUIRE, W.L. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, 38:4289-4291, 1978.

- McGUIRE, W.L. Steroid receptors and clinical breast cancer. In: *Perspectives in Steroid Receptor Research*. Bresciani, F. ed. New York, Raven Press, 1980. pp.293-297.
- McGUIRE, W.L., CARBONE, P.P., SEARS, M.E. & ESCHER, G.C. An overview. In: *Estrogen Receptors in Humans Breast Cancer*. McGuire, W.L., Carbone, P.P., Wollmer, E.P. eds. New York, Raven Press, 1975. pp.1-8.
- McGUIRE, W.L., OSBORNE, K.S., CLARK, G.M. & KNIGHT, W.A. Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. *Am.J.Physiol.*, 243:99-102, 1982.
- MEYER, J.S., RAO, B.R. & STEVENS, S.C. Low incidence of estrogen receptor in breast carcinomas with rapid rates of cellular replication. *Cancer*, 50:2290-2292, 1977.
- MILGRON, E., THI, L., ATGER, M. & BAULIEU, E.E. Mechanism regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor in the uterus. *J.Biol.Chem.*, 248: 6366-6374, 1973.
- MILLS, R.R. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. *Cancer*, 46: 2869-2871, 1980.
- MULLER, G.C., VANDERHARR, B., KONN, U.H. & MAHIEN, M.L. Estrogen action: an inroad to cell biology. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 28:147, 1972.
- MURPHY, B.E.P. & CAN, J. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Can.J.Biochem.*, 46:229, 1968.
- NATHANSON, I.T. Clinical investigative experience with steroid hormones in breast cancer. *Cancer*, 5:754-762, 1952.

- NICHOLSON, R.J., GRIFFITHS, K., BLAMEY, R.W. & cols. Estrogen receptors and breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 38:143-146, 1981.
- NOTIDES, A.C. Conformational forms of the estrogen receptor. In: *Receptors and Hormone Action.* O'Malley, B.W. and Birnbaumer, L. eds. New York, Academic Press, vol. II, 1978. pp.33-61.
- OLZEWSKI, W., DARZINKIEWICZ, Z., ROSEN, P.P. & cols. Flow cytometry of breast carcinoma: relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer*, 48: 980-984, 1981.
- PEARSON, O.H., RAY, B.S., HARROLD, C.C. & cols. Hyposectomy in treatment of advanced cancer. *JAMA*, 161:17-21, 1956.
- PECK, Jr.E.J., BURGNER, J. & CLARK, J.H. Estropholic binding sites of the uterus: relation to uptake and retention of estradiol in vitro. *Biochem.*, 12:4596-4597, 1973.
- PHILIBERT, D. & RAYNAUD, J.P. Progesterone binding in the immature rabbit and guinea pig. *Endocrinol.*, 94:627-632, 1974.
- PICHON, M.F., PALLUD, C., BRUNET, M. & MILGROM, E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res.*, 40: 3357-3360, 1980.
- RASMUSSEM, B.B., ROSE, C., THORPE, S.M & cols. Histopathological characteristics and oestrogen receptor content in primary breast carcinoma. *Virchows Archiv.A.Pathol. Anatomie*, 390:347-351, 1981.

REYES, G.M., BAZILE, D.B., TOSCH, T. & cols. Periductal elastic tissue of breast cancer: quantitative histologic study. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 106-610-614, 1982.

ROBUSTELLI, C.G., PELLEGRINI, A. & GAUZINA, F. Current concepts on the rationale for endocrine treatment of hormone sensitive tumors. In: *Chemotherapy and Hormonal Treatment of Advanced Breast Cancer*. eds. Milano, Farmitalia Carlo Erba S.P.A., 1982. pp.23-52.

ROCHFORD, H. & BALIEU, E.E. New in vitro studies of estradiol binding in castrated rat uterus. *Endocrinol.*, 84: 108-110, 1969.

ROSEN, P.P., MENENDEZ BOTET, C.J., NISSELBAUM, J.S. & cols. Pathological review of breast lesions analysed for estrogen receptor protein. *Cancer Res.*, 35:3187-3194, 1975.

ROSEN, P.P., MENENDEZ BOTET, C.J., NISSELBAUM, J.S. & cols. Estrogen receptor protein in lesions of the male breast: a preliminary report. *Cancer*, 37:1866-1868, 1976.

ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D. & TOMKINS, G.M. Glucocorticoid receptors relations between steroid and biological effects. *J.Mol.Biol.*, 67:99-115, 1972.

SAEZ, S., MARTIN, P.M. & CHOUVET, C.D. Estradiol and progesterone receptor levels in human breast adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone level. *Cancer Res.*, 38:3468-3473, 1978.

SAKAI, F. & SAEZ, S. Existence of receptors bound to endogenous estradiol in breast cancers of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids*, 27:99-110, 1976.

SAVLOV, E.D., WITTLIFF, J.L., HILF, R. & HALL, T.C. Correlations between certain biochemical properties of breast cancer and response to therapy: a preliminary report. *Cancer*, 33:303-309, 1974.

SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann.NY.Acad.Sci.*, 51:660, 1949.

SCHINZINGER, A. Über carcinoma mammae. *Ver.Ges. Chir.*, 18:28, 1889.

SCHRADER, W.T. & O'MALLEY, B.W. Progesterone binding components of chick oviduct: characterization of purified subunits. *J.Biol.Chem.*, 247:51-59, 1972.

SHIVAS, A.A. & DOUGLAS, J.C. The prognostic significance of elastosis in breast carcinoma. *J.Coll.Surg. Edinb.*, 17:315-320, 1972.

SOLOFF, M.S., CREANGE, J.E. & POTTS, G.O. Unique estrogen binding properties of rat pregnancy plasma. *Endocrinol.*, 88:427, 1971.

SYRJÄNEN, K.J. & KOSMA, VELI-MATTI. Hormone receptors levels related to histological parameters of tumor-host relationship in female breast carcinoma. *J.Surg.Oncol.*, 21:49-53, 1982.

THOMSON, A. Analysis of cases in which oophorectomy was performed for inoperable carcinoma of the breast. *Br. Med.J.*, iv: 1538-1541, 1902.

THORSEN, T., TANGEN, M. & STOA, K.F. Concentration of endogenous oestradiol as related oestradiol receptor sites in breast tumor cytosol. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, 18:333-337, 1982.

THORESEN, S., TANGEN, M., STOA, K.F. & HARTVEIT, F. Oestrogen receptor values and histological grade in human breast cancer. *Histopathol.*, 5:527-562, 1981.

TROCOLI, V., BARUFFI, I., AUGUSTO, N. & LIMA FILHO, E.C. Complicações decorrentes da poliquimioterapia profilática e paliativa na terapêutica do carcinoma da mama. *J.Bras.Ginec.*, 87:159-164, 1979.

WALLGREN, A., SILFVERSWÄRD, C. & EKLUND, G. Prognostic factors in mammary carcinoma. *Acta Radiol.*, 15:1-16, 1976.

9-APÊNDICE

Material para a determinação dos receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR).

Esteróides radioativos e não radioativos

- a- 17- β (6,7-³H) estradiol 138 Ci/mM.
- b- R5020 (17,21-dimetil-19-nor-pregna-4,9-dieno-3,20 diona (Promogestona) 85 Ci/mM.
- c- R5020.

Todos foram obtidos da New England Nuclear, Albany Street, Boston, Massachusetts, USA.

Tanto o estradiol como o R5020, foram estocados a 2-4°C em tolueno-etanol (9:1). Após evaporação do solvente, sob corrente de ar, os esteróides marcados foram dissolvidos em etanol absoluto e mantidos entre -20°C em uma concentração de 6×10^{-6} M.

- d- 17- β -estradiol.
- e- Cortisol.
- d- DES (Dietilestilbestrol).
- f- DHT (5- α -dihidrotestosterona).

Estes compostos foram adquiridos da Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo.USA.

Reagentes

- a- DTT (Ditiotreitol).
- b- TRIS (Hidroximetil, metilamina).
- c- EDTA (Etilenediamina ácido tetra-acético).
- d- EGTA (Etilenoglicol-bis (β - aminoetil éter) NNN'-ácido tetra-acético).
- e- PPO (2,5 difeniloxazol).

f- POPOP (1,4-bis(2-(5-feniloxazolil-benzeno)).

g- BSA (Soro albumina bovina).

h- Sulfato de cobre.

i- Monotioglicerol.

j- Dextran T70.

Reagentes obtidos da Sigma Chemical Company.

k- Álcool etílico.

l- Ácido clorídrico.

m- Glicerol.

n- Tolueno.

o- Folin (Ciocalteus phenolreagenz).

p- TCA (Ácido tricloriacético).

q- Ácido Sulfúrico concentrado.

r- Difenilamina.

s- Cloreto de potássio e de sódio.

t- Carbonato de sódio anidro.

Reagentes adquiridos da Merck.

u- Carvão Norit A, foi obtido da Matheson, Coleman and Bell Norwood, Ohio, USA.

v- Fosfato de sódio e potássio foram adquiridos da Tennant Química S.A.

x- Triton X-100 da Rohn and Haas.

Todos os demais reagentes eram pró-análise. A água utilizada no preparo das soluções era desionizada e bidestilada em aparelhagem de vidro.

Soluções

a- Tampão de homogeneização.

10 mM de TRIS/HCl pH 9,0.

1,5 mM de EDTA

10% de glicerol

2 mM de DTT

pH 7,4

b- Tampão TRIS/HCl.

10 mM de TRIS/HCl pH 8,5

0,6 M de KCl

1 mM de Monotioglicerol

10% de Glicerol

c- Carvão-Dextrana.

1,25g de Norit A

0,125g de Dextran T 70

50 ml do tampão de homogeneização

pH 7,4

d- Solução sulfato de cobre.

0,5g sulfato de cobre

1,0g tartarato de sódio e potássio

para volume final de 100 ml.

e- Solução carbonato de sódio.

4g hidróxido de sódio

20g bicarbonato de sódio anidro para

volume final de 1000 ml.

f- Solução padrão de soro albumina bovi

na.

800 µg de BSA

1,0 ml água bidestilada

g- Solução cintiladora (aquasol).

2 litros de tolueno

1 litro de triton X-100

12g de PPO

0,6g de POPOP

Mistura de estradiol - 10 ml.

a- Sem inibidor

400 µl de EGTA
12,5 µl de DHT $10^{-3}M$
5967,5 µl de tampão
20 µl de etanol

b- Com inibidor

400 µl de EGTA
12,5 µl de DHT $10^{-3}M$
20 µl de DES $10^{-3}M$
5967,5 µl de tampão

Mistura de progesterona - 6 ml

a- Sem inibidor

2400 µl de EGTA
8 µl de cortisol $10^{-3}M$
3556 µl de tampão
36 µl de etanol

b- Com inibidor

2400 µl de EGTA
8 µl de cortisol $10^{-3}M$
36 µl de R5020 $10^{-3}M$
3556 µl de tampão

Aparelhagem

- a- Balança analítica Mettler, modelo H 51.
- b- Polytron modelo PT 10ST Brinkman.
- c- Espectrofotômetro Beckman, modelo T.M.

Acta III.

- d- Ultracentrífuga refrigerada Beckman, modelo L5-50 (rotor 50 Ti).

e- Centrífuga Sorval, modelo RX2-B (rotor SS-34).

f- Cintilador líquido, modelo LS-100 com eficiência de contagem para ^3H , 40%.

g- Pipetas automáticas Gilson Pipetman, tipo 20, 200, 500 e 1000 μl .

h- Agitador (tipo vortex) Super Mixer Line.

Cálculos

a- Total cpm e Total nM.

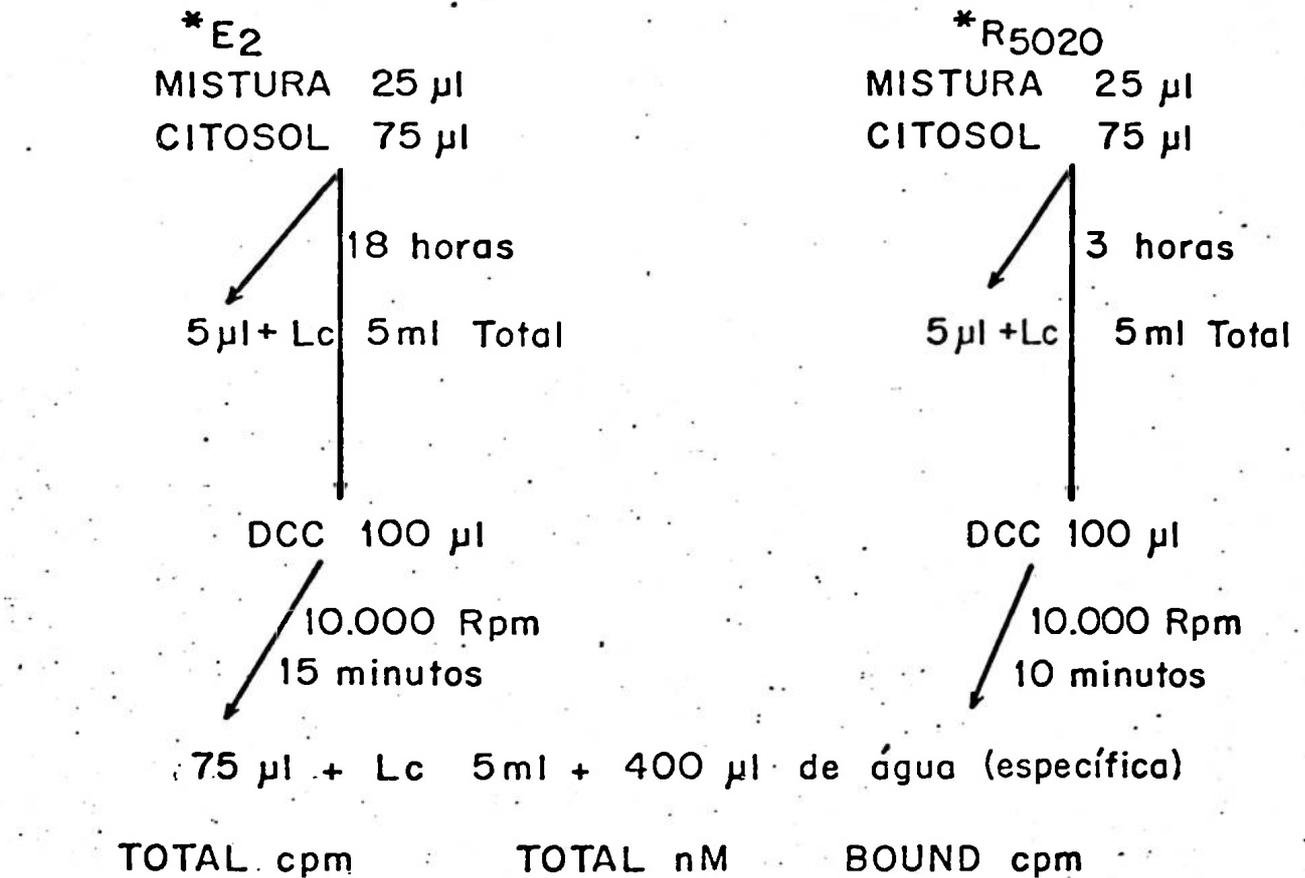
b- Bound cpm e Bound nM (Bound cpm/Fator Bound).

c- Delta (Bound sem inibidor - Bound com inibidor) nM.

d- Free (Total - Bound) nM.

e- Bound/Free.

FIGURA 9 - MÉTODO PARA DOSAR RECEPTOR



$$\Delta \text{ BOUND (CI/SI)} = \frac{\text{BOUND nM} \times \text{Fator} + \text{Bound}}{1000}$$

$$\text{FREE (Total nM} - \beta \text{nM)}$$

$$\text{BOUND/FREE}$$

$$\beta_0 = \frac{\beta_0 \text{ nM}}{\text{proteína}} \times 1.000 = \text{fM/mg de proteína citosol}$$

*E 5

*P 7

Material para a determinação de elastose
pelo método Voetherff Van Gieson.

Fixador

- a- 100 ml de formalina 37-40%
- b- 900 ml de água destilada

Clarificador

- a- Xilol

Desidratação

- a- Álcool absoluto 100%

Hematoxilina de Harris

- a- 5g de hematoxilina
- b- 50 ml de álcool absoluto 100%
- c- 100g de alúmen de potássio
- d- 1000 ml de água destilada
- e- 2,5g de óxido de mercúrio (vermelho)

Solução de hematoxilina

- a- 5g de hematoxilina
- b- 100 ml de álcool absoluto 100%

Solução de lugol

- a- 2g de iodo
- b- 4g de iodeto de potássio
- c- 100 ml de água destilada

Solução de cloreto férrico 10%

- a- 10g de cloreto férrico
- b- 100 ml de água destilada

Solução de Van Gieson

- a- 5 ml de fucsina ácida, solução aquosa a 1%.
- b- 95 ml de ácido pícrico, solução aquosa saturada.

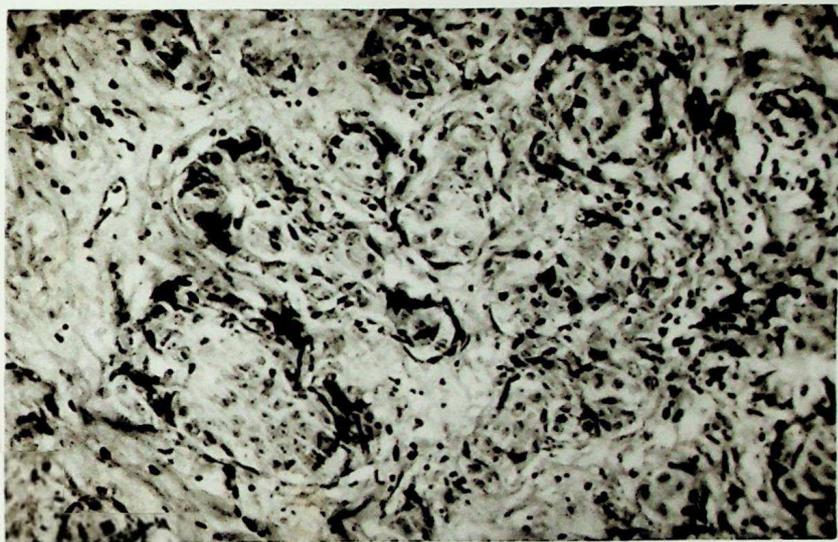


Figura 10 - Fotomicrografia de carcinoma mamário ductal invasor.

Caso nº 5

Corte 5 μ

Coloração Hematoxilina e Eosina

Aumento 250 x



Figura 11 - Fotomicrografia de carcinoma mamário duc
tal invasor.

Caso n° 10

Corte 5 μ

Coloração Hematoxilina e Eosina

Aumento 250 x

Grau de elastose periductal - 2

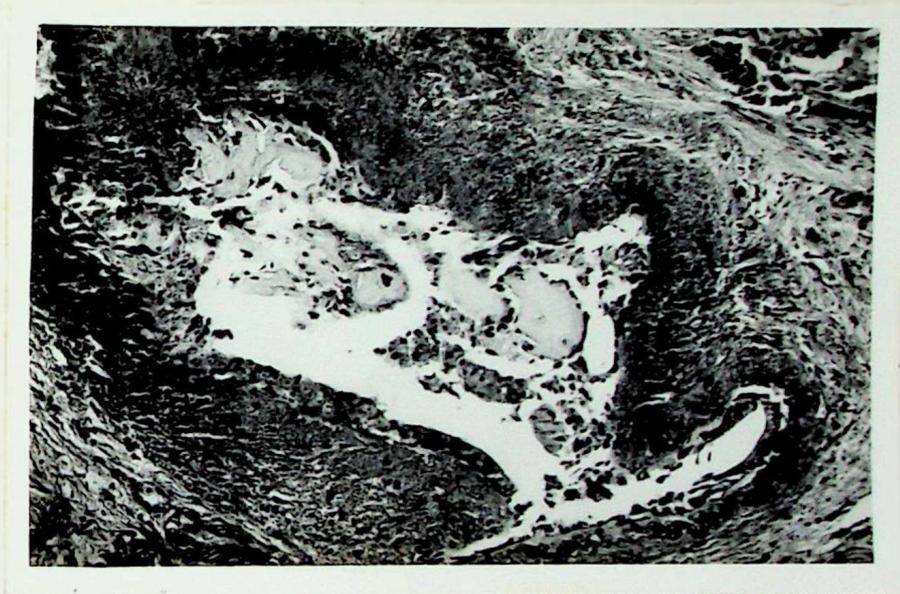


Figura 12 - Fotomicrografia de carcinoma mamário ductal invasor.

Caso n° 31

Corte 5 μ

Coloração Hematoxilina e Eosina

Aumento 250 x

Grau de elastose periductal - 2

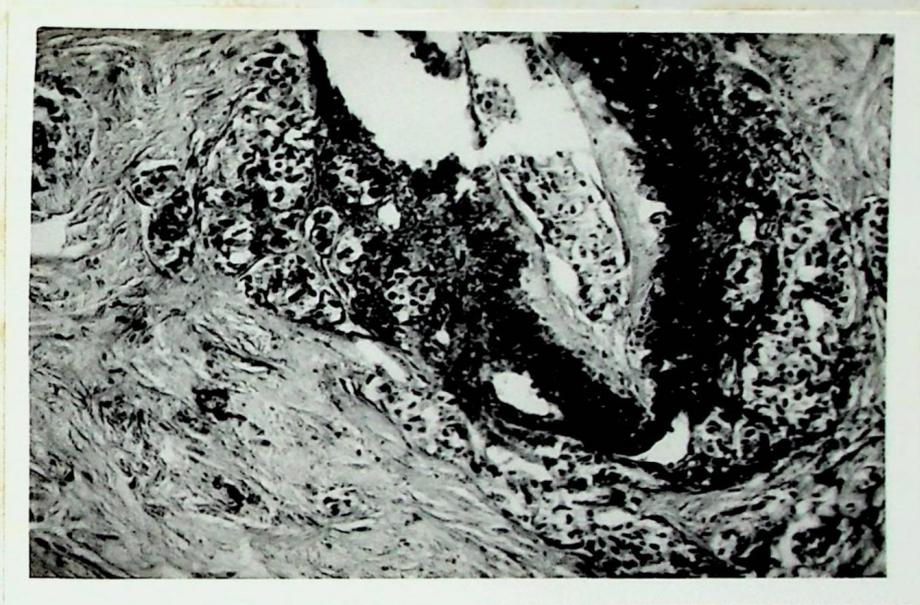


Figura 13 - Fotomicrografia de carcinoma mamário ductal invasor.

Caso nº 18

Corte 5 μ

Coloração Verhoeff Van Gieson

Aumento 250 x

Grau de elastose periductal - 2