

## EXPRESSÃO ANTIGÊNICA E DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS: UM ESTUDO COMPARATIVO.

Cynthia Bomfim PESTANA\*  
Paulo Cyrillo CARDOSO DE ALMEIDA\*\*

RIALA 6/691

PESTANA, C.B. & CARDOSO DE ALMEIDA, P.C. — Expressão antigênica e diferenciação morfológica de neoplasias mamárias: um estudo comparativo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 275-279, 1990.

**RESUMO:** Foram selecionados quatro carcinomas ductais invasivos de mama com graus de anaplasia progressivos e testados por métodos imuno-histoquímicos para marcadores de diferenciação mamária com o objetivo de verificar a correlação entre grau histológico e a presença desses marcadores. Foram utilizados anticorpos contra alfa-lactoalbumina, lactoferrina, caseína, componente secretor, antígeno epitelial de membrana e antígeno carcinoembrionário. A neoplasia mais diferenciada resultou positiva para todos os antígenos pesquisados, enquanto a neoplasia menos diferenciada resultou negativa, com exceção da alfa-lactoalbumina. As neoplasias com diferenciação intermediária apresentaram coloração focal nas áreas mais diferenciadas da lesão. Uma correlação entre a expressão dos antígenos de diferenciação celular mamária e uma boa diferenciação histológica foi verificada para a maioria dos marcadores utilizados.

**DESCRITORES:** imunoperoxidase; alfa-lactoalbumina; lactoferrina; caseína; componente secretor antígeno epitelial de membrana; antígeno carcinoembrionário.

### INTRODUÇÃO

Os métodos imuno-histoquímicos têm sido amplamente utilizados no sentido de investigar a síntese de diversos marcadores biológicos e associá-los às características específicas do tumor e ao grau de diferenciação celular. No estudo das neoplasias mamárias, esses marcadores, além de possibilitar um melhor entendimento da doença, podem ser particularmente úteis no fornecimento de informações quanto à atividade secretória e grau de diferenciação celular, assim como na avaliação prognóstica da lesão. Dentre esses marcadores encontram-se as proteínas do leite, produtos de secreção e proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite. As proteínas do leite, caseína, lactoalbumina e lactoferrina, são sintetizadas pelas células epiteliais mamárias bem diferenciadas, aumentando seus níveis durante a lactação e diminuindo a seguir e, portanto, são considerados bons marcadores da diferenciação

celular mamária, assim como o componente secretor, uma glicoproteína de secreção presente no epitélio mamário normal<sup>19</sup>. Essas proteínas foram demonstradas em carcinomas de mama e em cultura de células de carcinoma de mama, mas a relação de sua síntese e uma boa diferenciação histológica do tumor é ainda muito discutida<sup>4,10,16</sup>. Alguns anticorpos foram produzidos contra a membrana do glóbulo de gordura do leite, mas seu grau de especificidade em relação ao tecido mamário parece ser variável<sup>13</sup>.

Por outro lado, os marcadores considerados de "desdiferenciação" celular, como as proteínas oncofetais e placentárias, parecem estar relacionados a um comportamento mais agressivo do tumor, podendo trazer informações prognósticas importantes<sup>19</sup>. Algumas publicações sugerem haver uma relação entre a imuno-reatividade do antígeno carcinoembrionário (CEA) e um pior prognóstico<sup>5,9,14</sup>. A correlação entre a presença

\* Da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas/FMUSP.

desse antígeno e uma boa diferenciação histológica têm apresentados resultados conflitantes<sup>15,17</sup>. Vários estudos têm sido realizados no sentido de correlacionar os marcadores de diferenciação e o grau histológico. No entanto, a análise conjunta de vários marcadores utilizando a mesma casuística não tem sido efetuada nesses trabalhos.

Nosso objetivo no presente trabalho foi estudar a relação entre alguns marcadores biológicos tidos como específicos para mama e outros considerados marcadores de "desdiferenciação" celular e o grau de diferenciação morfológica, baseando-se na análise de quatro casos selecionados e em dados de leitura.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro casos de carcinoma ductal invasivo de mama de diferentes graus histológicos devido a suas características morfológicas peculiares.

*Caso I* — Paciente de 72 anos com tumor no estágio III infiltrando a pele e três linfonodos positivos em vinte e oito dissecados. O estudo histológico revela uma neoplasia bem diferenciada, caracterizada por elementos epiteliais atípicos dispostos em grupamentos sólidos ou estruturas tubulares, com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo bem diferenciado.

*Caso II* — Paciente de 62 anos com tumor no estágio II e apenas um dos trinta e três linfonodos examinados positivo. O estudo histológico revela uma neoplasia com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo pouco diferenciado, menos diferenciada que a anterior e caracterizada por elementos epiteliais de grande tamanho de núcleo e citoplasma abundante, tendendo a formar blocos sólidos.

*Caso III* — Paciente de 44 anos com tumor no estágio VI e dois linfonodos positivos em 45 dissecados. O estudo histológico revela uma neoplasia menos diferenciada do que as duas anteriores, caracterizada por elementos epiteliais de núcleos irregulares e citoplasma escasso, dispostos em blocos sólidos ou em cordões, com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo pouco diferenciado.

*Caso IV* — Paciente de 40 anos com tumor em estágio não determinado, cujo estudo histológico revela uma neoplasia indiferenciada, com áreas anaplásicas que podem ser confundidas com sarcoma, caracterizadas por elementos epiteliais pequenos e citoplasma escasso, com diagnóstico de carcinoma indiferenciado.

Cortes histológicos dos quatro espécimes fixados em formol e incluídos em parafina foram corados pelo método da avidina-biotina-peroxidase<sup>7</sup>, utilizando-se os seguintes anticorpos obtidos em coelho: anti-alfa-lactoalbumina, antilactoferrina, anti-antígeno carcinoembrionário (CEA), anticomponente secretor e anticaseína. O anticorpo monoclonal anti-antígeno epitelial de membrana (EMA) foi produzido em camundongo. Todos os anticorpos foram adquiridos à Dako (Santa Bárbara, CA), com exceção do anticorpo anticaseína, que nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Gianni Bussolati, da Universidade de Turim.

Resumidamente, os cortes histológicos, após desparafinização e hidratação progressiva, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% e das reações inespecíficas com soro normal de cabra ou de cavalo 2% em solução salina tamponada com fosfatos (PBS). As lâminas foram então incubadas consecutivamente com soro primário por 1 hora a 37°C, com os anticorpos biotinilados produzidos em cabra ou cavalo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 30 minutos e finalmente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector) por mais 30 minutos. Entre as incubações, as lâminas foram lavadas por dez minutos em PBS. O substrato utilizado foi a 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) 0,03% com peróxido de hidrogênio em PBS e a contra coloração com hematoxilina de Mayer. Depois de desidratadas, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá. Como controle positivo da reação, foi processado um fragmento de tecido sabidamente positivo (mama secretante) e, como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune da espécie em que este foi produzido, mantidas as demais etapas da reação.

#### RESULTADOS

Os resultados imuno-histoquímicos dos diversos marcadores nos quatro carcinomas de mama encontram-se sumarizados na tabela 1.

TABELA

*Resultados imuno-histoquímicos nos quatro carcinomas de mama estudados.*

	CASO I	CASO II	CASO III	CASO IV
αlactoalbumina	+	-	-	+
caseína	+	+	+	-
lactoferrina	+	+	+	-
componente secretor	+	+	+	-
EMA	+	+	+	-
CEA	+	+	+	-

O caso I resultou positivo para todos os marcadores estudados. As proteínas do leite, no entanto, apresentaram-se fraca ou focalmente positivas nos blocos sólidos, sendo mais fortemente positivas nas células neoplásicas formando ductos. A lactoferrina foi fortemente positiva na luz dessas estruturas. O componente secretor resultou fortemente positivo na maioria das células neoplásicas, assim como o EMA. As preparações coradas com anti-EMA mostraram, na maioria das vezes, positividade na membrana que delimita a superfície de diversas células que revestem os espaços luminares. CEA resultou positivo nas células neoplásicas que formam ductos e fraca, focalmente positivo ou negativo nas células dos grupamentos sólidos.

No caso II, lactoferrina e caseína apresentaram positivas nas células neoplásicas que formam ductos esparsos em meio a neoplasia, enquanto alfa-lactoalbumina resultou negativa. O componente secretor foi focalmente positivo nas áreas de blocos sólidos e EMA resultou positivo na maior parte das células dessas áreas. Anti-CEA corou poucas células em meio a neoplasia.

No caso III, lactoferrina e caseína resultaram fortemente positivos nas células que formam pequenos ductos e cordões em meio a neoplasia. Alfa-lactoalbumina resultou negativa. EMA e o componente secretor coraram fortemente as células neoplásicas da luz das estruturas tubulares e a maior parte das células formando blocos ou cordões. Algumas estruturas neoplásicas foram negativas. A coloração intensa das células tanto normais, quanto neoplásicas na luz dos túbulos, é também observada com a utilização de anti-CEA.

O caso IV apresentou-se negativo para lactoferrina, caseína, componente secretor, EMA e CEA. Alfa-lactoalbumina resultou positiva na área menos anaplásica do tumor.

## DISCUSSÃO

Estudos no sentido de determinar uma correlação entre antígenos de diferenciação mamária e diferenciação morfológica (grau histológico) por métodos imuno-histoquímicos têm apresentado resultados controversos entre os diversos autores. A presença de alfa-lactoalbumina parece não ter correlação com uma boa diferenciação histológica. WALKER<sup>16</sup>, analisando 100 carcinomas de mama, encontrou 50% dos carcinomas bem diferenciados produtores de alfa-lactoalbumina, mas apenas 35% dos poucos diferenciados foram positivos. Esses resultados são confirmados por CLAYTON et alii<sup>3</sup>. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, uma vez que o caso IV (carcinoma indiferenciado) resultou positivo e os casos II e III, que são pouco

diferenciados, resultaram negativos. No entanto, WALKER<sup>16</sup> não observou correlação entre as áreas de coloração e estrutura do tumor e, no nosso estudo, as células dispostas em estruturas ductais, portanto mais diferenciadas, apresentam positividade muito mais intensa do que outras estruturas, não só para alfa-lactoalbumina (caso I) como para outros marcadores (casos I, II e III).

Os resultados utilizando lactoferrina como marcador são mais variados. HURLIMANN et alii<sup>8</sup>, examinando a síntese de lactoferrina em 43 carcinomas por imunofluorescência e utilizando culturas de tecido, encontraram uma correlação positiva entre a síntese e a diferenciação dos tumores. Por outro lado, WALKER<sup>18</sup>, utilizando o método da imunoperoxidase, não observou essa correlação nos 55 carcinomas analisados. CHARPIN et alii<sup>2</sup> observaram positividade mais freqüente em carcinomas ductais de baixo grau histológico, mas o número de casos não permitiu estabelecer uma diferença significativa. Em nosso estudo, apenas o tumor indiferenciado não apresentou nenhuma positividade para a lactoferrina, o que concorda com dois dos três estudos citados.

A relação entre a síntese de caseína e a diferenciação morfológica dos carcinomas é muito discutida. Dois estudos<sup>1,12</sup> observaram positividade para caseína em todos os carcinomas grau I, ou bem diferenciados, enquanto os pouco diferenciados, grau III, apresentaram-se raramente positivos. Outros resultados, porém, foram relatados. FORTT et alii<sup>4</sup>, numa amostragem maior encontraram positividade freqüente em carcinomas pouco diferenciados. WOODS et alii<sup>10</sup>, analisando soro de pacientes com câncer de mama, não encontraram correlação entre a presença de caseína e diferenciação tumoral. Os resultados obtidos por diferentes autores na década passada com relação a caseína devem, no entanto, ser analisados com extremo cuidado, uma vez que, em 1982, ORMEROD et alii<sup>11</sup>, comparando anti-soros anti-caseína e anti-EMA, demonstraram que muitos dos determinantes detectados pelos dois anti-soros eram idênticos, e que as preparações de anticaseína estavam freqüentemente associadas a pequenas quantidades de EMA. O anti-soro utilizado nesse estudo foi absorvido com EMA e ainda assim, três dos quatro carcinomas apresentaram algumas células positivas localizadas principalmente nas estruturas ductais dos tumores, sugerindo, desse modo, a presença de caseína em áreas mais diferenciadas e ausência em carcinomas indiferenciados.

HURLIMANN et alii<sup>8</sup> concluíram não haver correlação entre a positividade do componente secretor e boa diferenciação histológica. Essa relação, no entanto, foi observada em outro estu-

do<sup>3</sup>, no qual a incidência de positividade dos tumores bem diferenciados não foi alta (58%), mas apenas um pequeno número de carcinoma pouco diferenciado corou-se. Novamente nossos resultados sugerem haver uma relação entre esses parâmetros, uma vez que apenas o carcinoma indiferenciado não apresentou positividade.

Os anticorpos contra as proteínas da membrana do glóbulo do leite reconhecem uma proteína que é expressa pela maioria das células mesoteliais e epiteliais e está presente em muitos carcinomas, mesmo quando indiferenciados ou anaplásicos<sup>18</sup>. Um desses anticorpos parece ter maior especificidade pelo epitélio mamário normal e neoplásico<sup>13</sup>, mas não foi utilizado nesse estudo. A negatividade do caso IV (carcinoma indiferenciado) não confirma essas observações e sugere haver correlação entre a positividade de EMA e uma diferenciação glandular do tumor.

Nossas observações em relação à positividade de CEA concordam com WALKER<sup>17</sup>, que encontrou uma correlação entre a presença desse antígeno e uma boa diferenciação histológica num estudo de 100 carcinomas de mama. Isso não foi confirmado num estudo posterior com 35 pacientes<sup>15</sup>. Dos quatro tumores analisados, ape-

nas o tumor bem diferenciado (caso I) apresentou coloração para a maioria das células. Os tumores menos diferenciados (casos II e III) apresentaram poucas células coradas e o tumor indiferenciado (caso IV) foi totalmente negativo, sugerindo haver uma perda progressiva desse antígeno à medida que a lesão torna-se menos diferenciada.

As principais variações entre os diversos estudos de marcadores de diferenciação parecem ser devidas aos diferentes anticorpos primários utilizados<sup>19</sup>. Outros fatores como fixação, uso de enzimas proteolíticas e diferentes métodos imuno-histoquímicos podem também influenciar os resultados finais.

Concluindo, os achados imuno-histoquímicos desse estudo sugerem haver uma correlação entre os aspectos morfológicos da diferenciação tumoral (grau histológico) e a expressão pelas células neoplásicas de antígenos próprios da diferenciação das células do epitélio mamário. Esses resultados concordam com parte significativa dos dados encontrados na literatura e deverão ser corroborados em um maior número de casos, buscando-se, também, uma associação com formas clínicas evolutivas.

PESTANA, C.B. & CARDOSO-de-ALMEIDA, P.C. — Antigenic characters and morphologic differences of the mammary neoplasms: a comparative study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 275-279, 1990.

**ABSTRACTS:** Four cases of human breast carcinomas were selected and tested for the presence of breast epithelial cell differentiation. Antisera to alpha-lactalbumin, lactoferrin, casein, secretory component, epithelial membrane antigen and carcinoembryonic antigen were employed. The well differentiated tumor was positive for all markers tested while the less differentiated one was negative except for alpha-lactalbumin. The intermediate tumors presented focal staining in the more differentiated areas. A relationship was found between the presence of markers of breast differentiation and good histological differentiation of tumors. No particular correlation was noted when alpha-lactalbumin was employed.

**DESCRIPTORS:** immunoperoxidase; alpha-lactalbumin; lactoferrin; casein secretory component; epithelial membrane; antigen and carcinoembryonic.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUSSOLATI, G.; PICH, A. & ALFANI, V. — Immunofluorescence detection of casein in human mammary dysplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch (A)*, 365: 15-21, 1975.
2. CHARPIN, C.; LACHARD, A. & PORREAU-SCHNEIDER, N. — Localization of lactoferrin and nonspecific cross-reacting antigen in human breast carcinomas. *Cancer*, 55: 2612-2617, 1985.
3. CLAYTON, F.; ORDONEZ, N.G.; HANSEN, G.M. & HANSEN, H. — Immunoperoxidase localization of lactalbumin in malignant breast neoplasms. *Arch. Path. Lab. Med.* 106: 268-270, 1982.
4. FORTT, R.W.; GIBBS, A.R.; WILLIAMS, D.; HANSEN, J. & WILLIAMS, L. — The identification of casein in human breast cancer. *Histopathology* 3: 395-406, 1979.
5. HEGG, R.; PESTANA, C.B.; ZECCHI DE SOUZA, A. & CARDOSO DE ALMEIDA, P.C. — Tissue carcinoembryonic antigen in early breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 15: 213-216, 1990.
6. HEYDERMAN, F.; STEELE, K. & ORMEROD, M.G. — A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissue. *J. clin. Path.* 32: 35-39, 1979.
7. HSU, S.M.; RAINE, L. & FANGER, H. — Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.
8. HURLIMANN, J.; LICHAA, M. & OZZELLO, L. — In vitro synthesis of immunoglobulins and other proteins by dysplastic and neoplastic human mammary tissues. *Cancer Res.* 36: 1284-1292, 1976.
9. KUHADJA, F.J.; OFFUTT, L.E. & MENDELSON, G. — The distribution of carcinoembryonic antigen in breast carcinoma. *Cancer*, 52: 1257-1264, 1978.
10. MASON, D.Y. & TAYLOR, C.R. — Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissue. *J. clin. Path.*, 31: 316-327, 1978.
11. ORMEROD, M.G.; BUSSOLATI, G.; SLOANE, J.P.; STEELE, K. & GUGLIOTTA, P. — Similarities of antisera to casein and epithelial membrane antigen. *Virchows Arch. (A)*, 397: 327-333, 1982.
12. PICH, A.; BUSSOLATI, G. & CARBONARA, A. — Immunocytochemical detection of casein and casein-like proteins in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 940-944, 1976.
13. RUSSO, J. & RUSSO, I.M. — Immunocytochemical markers in breast cancer. In: De LELLIS R. eds. *Advances in Immunohistochemistry*. New York, Raven, 1988. 431-475.
14. SHOUSA, S.; LYSSIOITIS, T., GODFREY, V.M. & SCHEVER, P.J. — Carcinoembryonic antigen in breast cancer tissue: a useful prognostic indicator. *Brit. Med. J.* 1: 777-779, 1978.
15. VAN DER LINDEN, J.C.; BAAK, J.P.; LINDEMAN, J.; SMEULDERS, A.W.M. & MEYER, C.J.L. — Carcinoembryonic antigen expression and peanut agglutinin binding in clinical, histopathological, biochemical and morphometric features. *Histopathology*, 9: 1051-1059, 1985.
16. WALKER, R.A. — The demonstration of alpha-lactalbumin in human breast carcinomas. *J. Path.*, 129: 37-42, 1979.
17. WALKER, R.A. — Demonstration of carcinoembryonic antigen in human breast carcinomas by the immunoperoxidase technique. *J. clin. Path.*, 33: 356-360, 1980.
18. WALKER, R.A. — Differentiation of human breast carcinomas: an immunohistological study of appropriate and inappropriate protein production. *J. Path.*, 137: 109-117, 1982.
19. WALKER, R.A. — Immunohistochemistry of biological markers of breast carcinoma. In: De LELLIS R. *Advances in immunohistochemistry*. New York, Masson Pub., 1984, p. 223-241.
20. WOODS, R.L.; SEARLE, R.; WILSON, R.; BHAGSHAW, K. D. & COOPER, E.H. — Serum kappa-casein in breast cancer. *Eur. J. Cancer.*, 13: 1113-1117, 1970.

Recebido para publicação em 19 de março de 1990.

