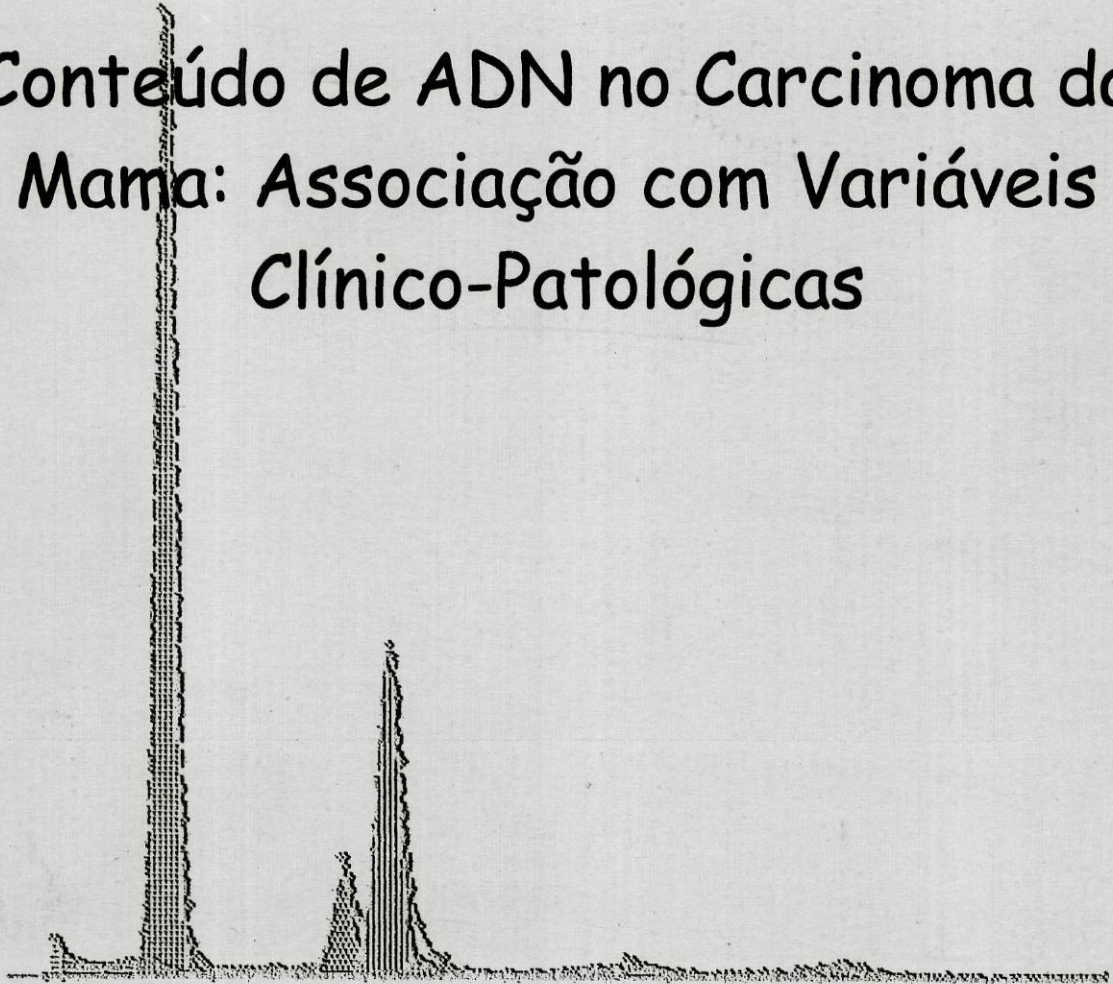


Carlos Alberto Palmeira de Sousa

Conteúdo de ADN no Carcinoma da
Mama: Associação com Variáveis
Clínico-Patológicas



Mestrado em Oncologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar
Universidade do Porto
1995/97



GENTIL



UNIVERSIDADE DO PORTO



Jefferson
Medical
College

Conteúdo de ADN no Carcinoma da Mama: Associação com Variáveis Clínico-Patológicas

CARLOS ALBERTO PALMEIRA DE SOUSA

PORTO, 1999

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
DA UNIVERSIDADE DO PORTO

À Milinha, minha esposa
e ao meu filho Tiago

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	IV
SUMMARY	VI
INTRODUÇÃO	2
1. Cancro da mama	2
2. Avaliação do conteúdo de ADN celular	4
2.1. Ciclo celular	5
2.2. Citometria de fluxo e histograma de ADN	6
2.3. Parâmetros avaliados por citometria	8
2.3.1. Ploidia de ADN	9
2.3.2. Índice de ADN	10
2.3.3. Variáveis de proliferação celular	10
2.3.3.1. Fracção de células em fase S	11
2.3.3.2. Fracção de células em fase S e G ₂ /M	12
2.3.3.3. Percentagem média de células em fase S	12
OBJECTIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Material	17
2. Variáveis clínico-patológicas	17
3. Processamento do material para a citometria de fluxo	18
4. Análise dos histogramas	19
5. Variáveis avaliadas por citometria	20
5.1. Ploidia de ADN	20
5.2. Índice de ADN	20
5.3. Proliferação celular	21
6. Análise estatística	21
RESULTADOS	23
1. Variáveis clínico-patológicas	23
2. Parâmetros analisados por citometria	23
3. Ploidia de ADN e variáveis clínico-patológicas	29
4. Índice de ADN e variáveis clínico-patológicas	32
5. Proliferação celular e variáveis clínico-patológicas	32
5.1. Diplóides de ADN	33
5.1.1. Fracção de células em fase S	33
5.1.2. Fracção de células em fase S e G ₂ /M	36
5.1.3. Percentagem média de células em fase S	36
5.2. Aneuplóides de ADN	37
5.2.1. Fracção de células em fase S	37
5.2.2. Fracção de células em fase S e G ₂ /M	37
5.2.3. Percentagem média de células em fase S	38
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	53
ANEXOS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ESTUDOS FUTUROS	76

A expressão do meu sincero agradecimento:

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, pelo incentivo e empenhamento na orientação e pela disponibilização de todos os meios necessários à realização deste trabalho, na Unidade de Oncologia Molecular do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia – Centro Regional do Porto.

Ao Prof. Doutor Guimarães dos Santos, pela realização e dinamização do Mestrado em Oncologia.

Ao Prof. Doutor Fernando Oliveira Torres, Coordenador do Mestrado em Oncologia, que com uma abordagem diferente da biopatologia, em muito contribuiu para o meu interesse nesta área de estudo.

À Dra. Regina Silva, por me ter transmitido os conhecimentos fundamentais que me permitiram iniciar o percurso na área da citometria de fluxo.

À Dra. Susana Lisboa que comigo analisou e discutiu grande parte dos casos apresentados neste trabalho.

À Prof. Doutora Isabel Barbosa, pela amizade e aconselhamento na revisão dos textos, bem como pelo apoio valioso na utilização do citómetro de fluxo.

Ao Serviço de Imuno-Hemoterapia do Instituto Português de Oncologia – Centro Regional do Porto, na pessoa do seu Director de Serviço, Dr. Francisco do Carmo Pacheco, por me facultar o acesso e utilização do citómetro de fluxo.

Às Dras. Conceição Leal, Paula Monteiro e Rosa Azevedo, não só pelo empenhamento na revisão das lâminas de histologia, como pelo interesse e apoio constantes.

À Dra. Maria José Bento, pela sua valiosa ajuda, não só ao nível da epidemiologia e estatística, mas também na revisão dos textos.

Ao Dr. Lúcio Lara Santos, pela amizade e disponibilidade dispensadas, adiando, por vezes, o seu próprio trabalho, ao proporcionar-me discussões fundamentais para a conclusão deste estudo.

Às Dras. Deolinda Pereira e Helena Rodrigues, pela preciosa ajuda e disponibilidade dispensadas na consulta dos processos clínicos.

Ao André Vasconcelos, pela sua paciência e enorme habilidade no tratamento do material iconográfico.

A todos os que trabalham no Serviço de Anatomia Patológica, particularmente aos meus colegas da Unidade de Oncologia Molecular, pela amizade e apoio permanentes.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro - Núcleo Regional do Norte, pela concessão da bolsa que me permitiu realizar este Mestrado.

Aos meus Pais, Sogros e Família, pelo carinho e apoio a muitos níveis.

À Milinha, minha esposa, e ao meu filho Tiago, devo não só um agradecimento muito especial, mas também um sincero pedido de desculpas: agradecimento pelo incentivo e carinho constantes, e as desculpas pela sobrecarga de trabalho que causei e pelos inúmeros momentos em que estive ausente.

RESUMO

O cancro da mama na mulher é o tumor maligno mais frequente e a principal causa de morte por cancro. Estudos recentes realçam a necessidade de novos factores de prognóstico, que permitam a identificação dos doentes com carcinoma da mama associados a pior prognóstico. O conteúdo de ADN é um desses factores.

O presente trabalho, procurou avaliar o significado da análise do conteúdo de ADN através da associação com diversas variáveis clínico-patológicas, algumas das quais aceites como factores de prognóstico clássicos para o cancro da mama. Pretendeu-se, ainda, das três variáveis relacionadas com a fase S incluídas neste estudo, seleccionar a mais informativa e definir os seus intervalos de variação. Os pontos "cut-off" utilizados foram os valores da média e dos percentis.

Foram estudados 214 casos de mulheres com carcinoma da mama, diagnosticadas e tratadas no Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Centro Regional do Porto, entre Julho de 1995 e Maio de 1997. O conteúdo de ADN foi avaliado por citometria de fluxo, a partir de fragmentos congelados do tumor. Os parâmetros analisados por citometria foram: a Ploidia e Índice de ADN (IA), a Fracção de células em fase S (FFS), a Fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M) e a Percentagem média de células em fase S (%Média S).

Na análise univariada os diplóides de ADN associaram-se com uma maior frequência de estadios mais baixos, menor grau histológico, menor número de mitoses e maior número de casos sem envolvimento ganglionar axilar. Relativamente a esta última variável, na análise multivariada, a ploidia de ADN não revelou significado estatístico independente. É necessário um maior número de casos e um adequado "follow-up" para se poder concluir quanto à importância deste parâmetro, quer em termos de prognóstico, quer na resposta à terapêutica.

O índice de ADN (IA) permitiu distinguir dois grupos distintos de tumores aneuplóides de ADN: os aneuplóides com baixo IA ($\leq 1,73$) relacionaram-se com

características do tumor associadas a pior prognóstico, contrariamente aos aneuplóides com IA altos (> 1,73).

Os valores das variáveis de proliferação celular estudadas (FFS, S+G₂/M e %Média S), foram significativamente menores nos diplóides, comparativamente com os aneuplóides de ADN. Por este facto, o estudo destes parâmetros de proliferação foi realizado de forma estratificada para a ploidia de ADN.

A utilização, quer de diferentes abordagens da fase S (FFS, S+G₂/M e %Média S), quer dos vários pontos "cut-off" (média ou percentis), originaram diferentes associações estatisticamente significativas. É necessário, por conseguinte, uma padronização destes critérios, baseada em estudos com um número de casos e "follow-up" adequados.

Nos tumores diplóides de ADN, a FFS (utilizando o valor médio como "cut-off") foi o parâmetro mais informativo: uma FFS elevada associou-se significativamente com um alto grau histológico, maior número de mitoses e idade superior a 59 anos. A % Média S nos aneuplóides de ADN (utilizando também o valor médio) foi a mais relevante: uma % Média S elevada associou-se com um alto grau histológico, maior número de mitoses, maior tamanho do tumor e idade inferior a 59 anos. Estes resultados sugerem um potencial valor prognóstico para estas variáveis de fase S. Este significado deverá ser confirmado em estudos futuros, com "follow-up" adequado, e em particular nos grupos de doentes onde a necessidade de critérios de alto risco é maior, como seja o grupo sem envolvimento ganglionar axilar.

Em conclusão, as associações significativas encontradas confirmam o valor prognóstico do conteúdo de ADN, avaliado por citometria de fluxo. No entanto, é necessário uma padronização das metodologias utilizadas, em especial no que se refere ao cálculo da fase S. Esta padronização é necessária para se poder avaliar com rigor a importância prognóstica do conteúdo de ADN e a sua aplicação à prática clínica.

SUMMARY

Breast cancer is the most common malignancy in women, being the major cause of death by cancer. New prognostic features are required to optimise selection of high risk breast cancer patients for adjuvant therapy. DNA content is one of these prognostic factors.

In order to understand the importance of the DNA content, the correlation with known clinical and pathological prognostic variables, was studied. Furthermore the distribution of the S-phase related variables was investigated so as to establish its variability. Average and percentiles values were used as cut-off points.

Flow cytometric analysis of the DNA content was performed in 214 fresh frozen tissue samples from women with breast carcinoma, diagnosed at the Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil - Centro Regional do Porto, between July 1995 and May 1997. The DNA ploidy, DNA Index (DI), S-phase fraction (SPF), S+G₂/M phase fraction and the Average % S-phase cells (Average % S) were evaluated and correlated with age, stage, type and tumour grade (this variable takes into account tubule formation, nuclear grade and mitotic number), lymph node status, tumour size and steroid receptor status.

The univariate analysis demonstrated that DNA diploids tumours significantly correlates with a high frequency of low stages, low histological grade, low mitotic number and negative lymph node cases. However, regarding this last parameter, multivariate analysis did not confirm such correlation. A larger series and suitable follow up will be necessary to evaluate its prognostic and therapeutical implications.

DI analysis lead to the identification of two groups of aneuploid tumours, as opposed to high DI aneuploids (>1.7) low DI aneuploids (≤ 1.7), correlated with tumour characteristics which are associated to poor prognosis.

The three different S-phase parameters analysed were found to be significantly different according to ploidy, being significantly lower in the diploids

when compared to the aneuploids cases. Such finding conducted to the analysis of these parameters for each separate group.

Distinct correlations were found for the different S-phase variables and cut-off points. Regarding the diploid tumours the SPF and average were the conditions more relevant: a high SPF significantly associated with old age (>59 yrs), high histological grade and mitotic number. For the aneuploids the Average %S and average as cut-off were more informative: a high Average %S correlated with young age (≤ 59 yrs), high histological grade, mitotic number and tumour size. These results suggest that flow cytometric S-phase quantification have a prognostic importance. This value needs to be confirmed in future follow-up studies, in special in well-defined populations, like T1N₀, where new prognostic factors are required to identify high risk patients.

In conclusion the associations found with known prognostic variables confirm the clinical utility of DNA content variables evaluated by flow cytometry. However standardised methods (special with S-phase variables) are necessary to allow comparison between the results obtained by the literature. This standardisation is needed before results of flow cytometric DNA analysis can be accepted to routine clinical management.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- O CANCRO DA MAMA

O cancro da mama é um dos principais problemas de saúde pública, constituindo o terceiro cancro mais comum a nível mundial¹. Em 1996, estima-se terem sido diagnosticados 910.000 casos novos em todo o mundo, representando 9% do número total de novos casos de cancro registados no referido ano¹. Em igual período de tempo, a mortalidade estimada para esta neoplasia foi de 390.000, correspondendo a 5,5% de todas as mortes por cancro¹. Apesar destes valores, nos Estados Unidos da América a sua incidência e mortalidade parecem terem estabilizado e, até mesmo, decrescido ligeiramente². Recentemente foi descrita igual tendência para a Suécia e Reino Unido².

Na região Norte de Portugal, e segundo dados de 1993 do Registo Oncológico RORENO³, a taxa de incidência foi de 55,9 e 0,8, por 100.000 indivíduos no sexo feminino e no sexo masculino, respectivamente. Nesse ano, o cancro da mama representou 12,4% de todas as neoplasias registadas, sendo o grupo dos carcinomas ductais invasores o tipo histológico mais comum (em 74% dos casos)³. Em termos de mortalidade, Portugal possuía em 1997 a nível mundial, a 22ª taxa mais alta para o sexo feminino (18,5 por 100,000 indivíduos) num conjunto de 48 países⁴.

No sexo feminino, é o tumor maligno mais frequente e a primeira causa de morte por cancro⁵. A sua incidência aumenta com a idade, embora de forma ligeira após a menopausa². Os factores, hoje, claramente aceites como associados a um maior risco de cancro da mama, estão relacionados com aspectos hormonais e reprodutivos. São exemplos a menarca precoce, nuliparidade, idade tardia ao primeiro parto e a menopausa natural tardia¹. A existência de história familiar de cancro da mama está igualmente associada ao aumento significativo do risco desta

neoplasia, sendo conhecidas mutações hereditárias em genes específicos, como o BRCA1, BRCA2 (“Breast cancer genes”) e ATM (“Ataxia Telangiectasia gene”)¹. Entre 5 e 10% de todas as neoplasias malignas da mama ocorrem em famílias de alto risco, estando a ser desenvolvidos programas de rastreio genético e de aconselhamento familiar mais adequados². Outros factores são, ainda, a exposição precoce à radiação ionizante¹, prolongados tratamentos de substituição de estrogéneos pós menopausa e o consumo de álcool². A coexistência de lesões de hiperplasia ductal ou lobular atípica confere ainda maior risco de cancro da mama².

Apesar dos esforços realizados, como os programas de rastreio baseados no estudo mamográfico, a redução da mortalidade deste tipo de cancro não atingiu o valor esperado⁶. Por conseguinte, há ainda muito a fazer, nomeadamente, ao nível da escolha da estratégia terapêutica a utilizar. Para a definição desta estratégia de tratamento, são utilizados factores de prognóstico que permitem a classificação dos doentes em grupos de prognóstico diferente.

Consideram-se factores de prognóstico clássicos para o cancro da mama, o envolvimento ganglionar axilar, o tamanho do tumor, o tipo e grau de diferenciação histológica e a expressão dos receptores hormonais⁷. No entanto, estudos recentes têm evidenciado que estes parâmetros clínico-patológicos não permitem, para a totalidade dos casos, uma adequada identificação dos doentes de alto risco, que poderão beneficiar de terapia adjuvante, poupando os outros doentes dos efeitos colaterais bem conhecidos⁶. Esta necessidade de critérios adicionais de alto risco, tem levado à investigação de novos indicadores de prognóstico.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância de outros factores de prognóstico para o cancro da mama, incluindo marcadores de proliferação⁸⁻¹⁰, produtos de oncogenes e genes supressores tumorais¹¹⁻¹⁵, factores de crescimento e seus receptores^{8,16,17}, e angiogénese tumoral^{18,19}.

O conteúdo de ADN das células neoplásicas, avaliado por citometria de fluxo, é um desses novos factores de prognóstico, cujos primeiros resultados foram

promissores, embora, estudos posteriores têm revelado resultados contraditórios. A maioria destes estudos tem procurado identificar, em estadios precoces, os doentes com pior prognóstico, utilizando análises uniparamétricas²⁰.

2- AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ADN CELULAR

A avaliação do conteúdo de ADN celular é uma das aplicações da citometria de fluxo. Esta análise baseia-se no princípio de que a ligação entre o ADN celular e os seus corantes específicos se faz de forma estequiométrica (i.e., a quantidade de corante é directamente proporcional à quantidade de ADN no interior da célula). Usando estes corantes específicos, a citometria de fluxo pode medir rapidamente e com rigor a fluorescência emitida pelo corante em numerosas células, resultando um histograma do conteúdo de ADN de toda a população celular analisada²¹.

O interesse do seu estudo reside no facto de uma alteração do conteúdo de ADN (aneuploidia de ADN) ser o reflexo da acumulação de alterações genéticas nas células tumorais²². Estas alterações são acompanhadas ou resultam do aumento da instabilidade genómica, possivelmente devido a mecanismos, como por exemplo, as mutações e as alterações na metilação de genes que regulam o processo de divisão celular⁶.

Estudos em vários órgãos, nomeadamente na mama, envolvendo grandes séries de casos, têm revelado uma elevada frequência de mais do que um tipo de aneuploidia de ADN, geralmente segundo um padrão bimodal, ao nível dos hiperdiplóides e dos hipotetraplóides, sugerindo a existência de várias vias de progressão da ploidia de ADN²²: por exemplo, células com um conteúdo de ADN hipo e hiperdiplóide poderão surgir por divisões não balanceadas, devido à não disjunção mitótica; o número de cromossomas pode aumentar através de tetraploidização, devido a fenómenos de endorreduplicação, falha no processo de citocinese ou por fusão celular; após esta tetraploidização, pode ocorrer ainda, uma

perda sucessiva de cromossomas, originando células com um conteúdo hiperdiplóide e hipotetraplóide^{22,23}.

Esta avaliação citométrica do padrão de distribuição do ADN em células neoplásicas, tem-se tornado uma técnica comum em oncologia clínica²⁴. Tem sido utilizada fundamentalmente como indicador de prognóstico em vários tipos de doenças neoplásicas, e de forma complementar aos estudos clínicos e histopatológicos²⁴. Apesar do seu valor de prognóstico ser reconhecido para algumas neoplasias, para outras persiste, ainda, grande controvérsia, devido aos resultados contraditórios referidos na vasta bibliografia.

Subjacente a esta controvérsia estão questões metodológicas aos vários níveis desta análise, como sejam: os enviesamentos na selecção de doentes²⁵, os diferentes esquemas de terapia utilizados²⁵, o tamanho da série em estudo²⁶, o tipo de material usado²⁵, as diferentes técnicas de processamento do material para a citometria de fluxo²⁷⁻³², a heterogeneidade tumoral^{33,34}, a representatividade de células tumorais na amostra^{35,36}, o número de núcleos a analisar³⁷ e o tipo e forma de cálculo das variáveis estudadas.

Em Outubro de 1992, cientistas Europeus e Norte Americanos, reuniram-se em Prout's Neck, Maine, para a "DNA Cytometry Consensus Conference"³⁸. Este Consenso teve como principal objectivo a definição do significado prognóstico do conteúdo de ADN em várias neoplasias, através da clarificação de algumas questões metodológicas e de controlo de qualidade. Deste Consenso, resultaram a publicação de linhas de orientação para cada uma das neoplasias incluídas nesta reunião, nomeadamente para o carcinoma da mama³⁹.

2.1- CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo pelo qual as células são copiadas, permitindo o crescimento, a reparação e a manutenção celular dos organismos. É constituído por duas fases distintas: um período de divisão celular por mitose - fase M - e um período de repouso celular aparente onde decorre a síntese de ADN - interfase²¹

(Figura 1). A maioria das células dos tecidos humanos não se encontra em síntese activa de ADN, podendo estar em fase de repouso (G_0) ou de pré-síntese (G_1)⁴⁰. As células em G_1 preparam-se para a fase seguinte, de síntese de ADN (S), através da produção das proteínas necessárias a este processo. As células em G_0/G_1 têm um conteúdo de ADN diplóide ($2N$). Na fase S, decorre a replicação gradual do ADN nuclear, variando o conteúdo de ADN destas células entre $2N$ e $4N$ ⁴⁰. Posteriormente, as células entram numa fase curta de pós-síntese (G_2), produzindo as proteínas necessárias à etapa seguinte, a fase de mitose (M). As células em G_2/M possuem um conteúdo de ADN tetraplóide ($4N$). Como resultado da fase M, as células progenitoras dividem-se dicotomicamente em células com um conteúdo de ADN diplóide ($2N$), voltando a entrar no ciclo celular em G_1 ou tornando-se quiescentes (G_0)⁴¹.

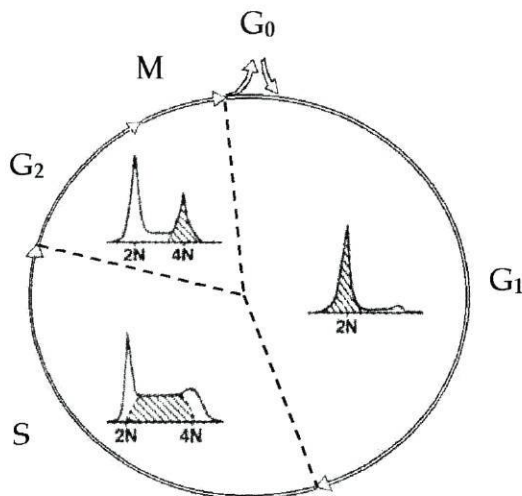


Figura 1- Representação gráfica das diferentes fases do ciclo celular e correspondente componente do histograma de ADN obtido por citometria de fluxo (adaptado de Rabinovitch PS, 1993²¹).

2.2- CITOMETRIA DE FLUXO E HISTOGRAMA DE ADN

A citometria de fluxo é uma técnica que permite através de luz laser ou UV, medir determinadas características das células em suspensão, como por exemplo, o seu conteúdo de ADN. Na figura 2 apresenta-se um esquema de um citómetro de fluxo, descrevendo-se de seguida e de forma sucinta, o seu funcionamento: os núcleos em suspensão, cujo ADN se encontra corado estequiometricamente por um corante fluorescente, são conduzidos através de um fluido laminar até à

câmara de fluxo⁶; este fluido mantém, hidrodinamicamente, os núcleos alinhados no seu centro, de forma a que estes passem um a um em frente ao feixe luminoso, levando à dispersão de luz e emissão de fluorescência⁴². A quantidade de fluorescência emitida por cada núcleo, proporcional à quantidade de ADN existente em cada um, é depois detectada e medida por um sistema de detectores fotossensíveis (os tubos fotomultiplicadores)⁶.

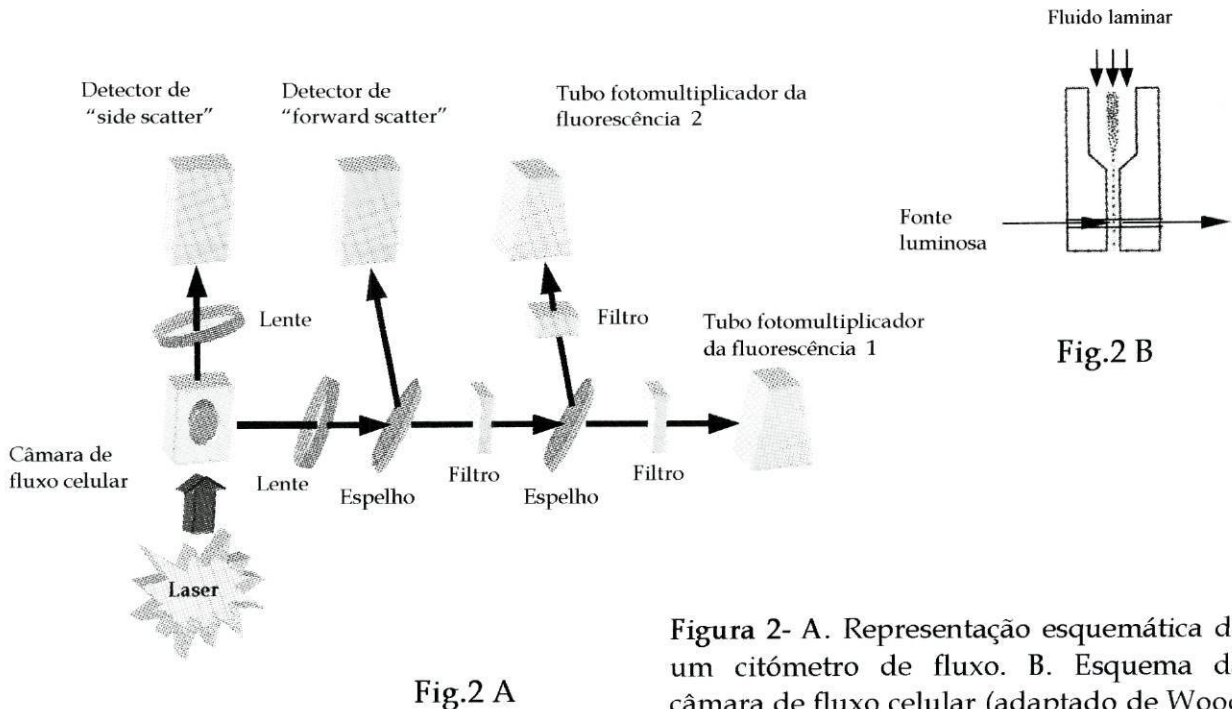


Figura 2- A. Representação esquemática de um citómetro de fluxo. B. Esquema da câmara de fluxo celular (adaptado de Wood JCS, 1993⁴²).

Esta medição é registada num histograma de frequências, chamado histograma de ADN (Figura 3), representando-se no eixo dos Y o número de núcleos medidos e no eixo dos X a quantidade de fluorescência, correspondente ao conteúdo de ADN⁶. Esta representação traduz a distribuição das células ao longo do ciclo celular, não permitindo, porém, a distinção entre as células em G_0 e G_1 , e entre as células em G_2 e M.

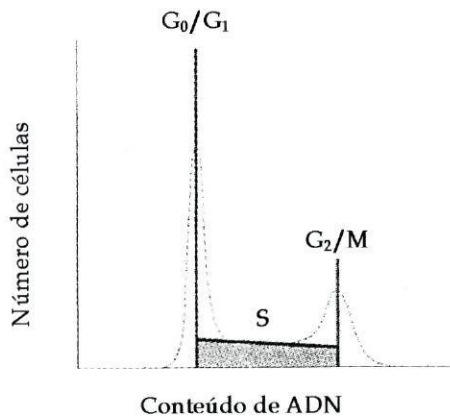


Figura 3- Representação das diferenças entre um histograma de ADN “ideal” (linhas a cheio), de um histograma obtido numa análise real (linhas a tracejado). As diferenças dependem do Coeficiente de Variação dos picos (adaptado de Rabinovitch PS, 1993²¹).

A figura 3 evidencia a diferença entre um histograma de ADN “ideal” e um histograma obtido por uma análise real. Teoricamente, a fluorescência emitida por todas as células em G_1 ou G_2 deveria ser exactamente a mesma, em virtude de todas possuírem o mesmo conteúdo de ADN, e, por conseguinte, apenas um canal do histograma deveria ser preenchido para cada uma destas fases. Na realidade, verifica-se que a fluorescência detectada produz picos gaussianos, com uma largura dependente do Coeficiente de Variação (CV) do pico²¹. Este facto verifica-se, não só devido a um conjunto de variações próprias do funcionamento do citómetro, como, também pela variabilidade biológica existente nas ligações entre o ADN e o corante²¹.

2.3- PARÂMETROS AVALIADOS POR CITOMETRIA

A partir do estudo do conteúdo de ADN por citometria de fluxo, nomeadamente da interpretação dos histogramas de ADN é possível avaliar diversos parâmetros, como por exemplo, a ploidia de ADN e variáveis relacionadas com a proliferação celular.

2.3.1- PLOIDIA DE ADN

A expressão “ploidia de ADN” é um conceito que descreve o conteúdo de ADN nuclear medido por técnicas de citometria⁴³. Esta expressão distingue-se do termo “ploidia” utilizado pela citogenética, visto que a citometria de fluxo não avalia ou não examina os cromossomas, mas o conteúdo de ADN total da célula^{21,44}. Deverá pois, e como exemplo, utilizar-se definições como “diplóide de ADN” para as células com um conteúdo de ADN normal e “aneuplóide de ADN” para as células com um conteúdo de ADN anormal⁴⁴.

Esta variável analisada por citometria tem sido apontada por alguns autores^{26,45-51} como tendo valor de prognóstico para o cancro da mama, porém, esta importância não é confirmada por outros⁵²⁻⁶³. Berger *et al.*²⁵ e Camplejohn *et al.*²⁶, apesar de demonstrarem uma associação significativa com a sobrevivência após tratamento, referem que a vantagem dos diplóides sobre os não diplóides, em termos de sobrevivência, é relativamente baixa. Em relação à associação com as diversas variáveis clínico-patológicas, os resultados publicados na literatura são, igualmente, contraditórios.

Para esta controvérsia têm contribuído, não só as fontes de erro já acima referidas, como as diferentes classificações de ploidia de ADN utilizadas. Estas classificações baseiam-se no número de linhas celulares (traduzidas no histograma como picos distintos) e nos índices de ADN. A classificação mais frequentemente utilizada na literatura faz a distinção apenas entre diplóides de ADN (um ciclo celular presente no histograma) e aneuplóides de ADN (mais do que um ciclo presente)⁶, sendo referido ser esta divisão a que possui maior importância em termos de prognóstico. No entanto, alguns estudos referem que o grupo dos hipertetraplóides de ADN poderão constituir um subgrupo de pior prognóstico dentro dos aneuplóides^{39,64}, tal como o observado por Camplejohn *et al.*²⁶ em relação aos multiplóides de ADN, apesar de não encontrar um valor significativo.

2.3.2- ÍNDICE DE ADN (IA)

O grau de alteração do conteúdo de ADN de cada linha celular, avaliado por citometria de fluxo, pode ser expresso através do Índice de ADN (IA)^{25,65}. Um tumor com um conteúdo de ADN normal, diplóide, tem por definição um IA de 1,00. De referir, que um conteúdo de ADN com um IA diferente de 1,00 não é, necessariamente anormal: as células em fase S têm conteúdos intermédios entre o diplóide e o tetraplóide (IA entre 1 e 2), as células em G₂ são tetraplóides (IA = 2), os gâmetas têm um conteúdo haplóide e algumas células no nosso corpo são tetraplóides (IA=2)²¹.

Este parâmetro está, obviamente, relacionado com a ploidia de ADN, sendo, normalmente, utilizado para definir as várias subclasses desta variável: hipodiplóide de ADN, diplóide de ADN, hiperdiplóide de ADN, tetraplóide de ADN e hipertetraplóide de ADN, etc.

Por esta razão, o seu valor de prognóstico e a sua associação com as diversas variáveis clínico-patológicas, não são usualmente descritas na literatura separadamente da variável ploidia de ADN.

2.3.3- VARIÁVEIS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em numerosos estudos a avaliação da actividade proliferativa no carcinoma da mama tem sido referida como um factor de prognóstico²⁶. As técnicas usadas incluem a avaliação do índice mitótico⁶⁶, do índice da timidina tritiada⁶⁷, de diversos métodos imunohistoquímicos como o anticorpo para o antígeno ki-67^{8,9,68} e a avaliação por citometria de fluxo de variáveis relacionadas com a fase S do ciclo celular.

A importância da fase S reside no facto de ser a etapa onde decorre a replicação do ADN⁶. Para cada um dos ciclos celulares presentes num histograma de ADN é possível calcular a percentagem de células em fase S, denominada, fracção de células em fase S (FFS). Na literatura têm sido descritas outras variáveis

relacionadas, como sejam a percentagem média de células em fase S (% Média S) e a fracção de células em fase S juntamente com as células em G_2/M ($S+G_2/M$).

2.3.3.1- Fracção de células em fase S (FFS)

A grande maioria dos estudos de citometria de fluxo no carcinoma da mama atribui à FFS um valor prognóstico importante nesta neoplasia. Camplejohn *et al.*²⁶ referem uma forte associação entre a FFS e a sobrevivência global, sobrevivência livre de doença e sobrevivência após recorrência, definindo-a como um factor de prognóstico independente, mesmo na análise multivariada.

Existem, no entanto, trabalhos que minimizam esta importância, pelo facto de existir uma percentagem considerável de casos (cerca de 25%)²⁶ onde este parâmetro é de difícil avaliação (casos multiplóides de ADN, histogramas com grande sobreposição entre os ciclos diplóide e aneuplóide, pequenos picos aneuplóides, etc.).

Muitos dos resultados contraditórios, ao nível do prognóstico e na associação com as variáveis clínico-patológicas, poderão dever-se quer às questões metodológicas já descritas, quer ainda a outros factores, como por exemplo: a avaliação da FFS de forma global ou estratificada para a ploidia de ADN (ou seja, separadamente para diplóides e aneuplóides de ADN), os vários critérios para a determinação dos pontos "cut-off", o que origina distintos intervalos de variação, e os diferentes métodos de análise dos histogramas apresentados pelos vários programas informáticos³². Relativamente a este último ponto, vários estudos têm referido a influência da utilização de determinados modelos matemáticos no cálculo da FFS. Destaque-se a activação dos modelos de correcção para restos celulares^{69,70}, da distribuição dos núcleos fragmentados⁷¹, da correcção de agregados⁷¹ e do modelo de ajustamento feito à distribuição das células em fase S (ordem 0, 1 ou 2).

Devido a todas estas possíveis fontes de variação, o Consenso de Citometria³⁸ recomenda que cada laboratório avalie e defina os intervalos de

variação desta variável a partir da sua própria série de casos, baseados nas suas condições metodológicas de processamento e análise, em vez da utilização de valores descritos na literatura.

2.3.3.2-Fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M)

O interesse desta variável, segundo alguns autores está no facto de representar a fracção total de proliferação do ciclo celular⁶.

Segundo Wiss-Desserich *et al.*⁶⁵ o cálculo deste parâmetro revelou ser mais fácil e mais reprodutível, comparado com o da FFS, visto apenas ser necessário distinguir, no histograma, os limites entre as fases G₀/G₁ e S.

Estes autores mostraram, ainda, para o carcinoma da mama, que esta variável se associava significativamente com a sobrevivência global usando uma análise univariada, ao contrário da FFS, num grupo de doentes pré-menopáusicas e sem gânglios axilares metastizados. Idêntica associação foi descrita por Muss *et al.*⁷², igualmente em mulheres com carcinoma da mama e sem gânglios axilares metastizados, não referindo qual o estado menopáusico, e por Rabinovitch *et al.*⁷³, numa análise multivariada, com doentes de todos os estadios e apenas com tratamento cirúrgico.

Tal como a FFS, este parâmetro é influenciado pelas metodologias utilizadas na análise dos histogramas, nomeadamente na activação da correcção dos agregados celulares (especialmente devido à presença de dupletos na região 4n do histograma^{38,73}.

2.3.3.3- Percentagem média de células em fase S (% Média S)

Em relação a esta variável, têm sido descritas, quer a percentagem média de todas as células em fase S (% Média S), quer apenas a percentagem média das células em fase S dos ciclos não diplóides (% Média S não diplóide).

Em estudos com o carcinoma da mama, Berger *et al.*⁷⁴ mostraram que o cálculo da %Média S era mais reprodutível intra e inter-observador e inter-laboratorial⁷⁵, relativamente à FFS de cada um dos ciclos celulares presentes no histograma.

Estes autores demonstraram ainda, que esta variável possuía um maior valor prognóstico no grupo de mulheres com metastização ganglionar axilar e no dos tumores diplóides de ADN, quer em termos de sobrevivência global, quer em sobrevivência livre de doença, adicionando maior valor prognóstico ao tamanho de tumor e ao envolvimento ganglionar na análise multivariada⁷⁶. Relativamente ao grupo dos tumores sem metastização ganglionar axilar e não diplóides de ADN, encontraram um resultado oposto, isto é, a FFS do ciclo não diplóide revelou-se de maior importância, embora apenas de forma pouco acentuada. Este último resultado é confirmado pelo encontrado por Kallioniemi *et al.*⁷⁷, os quais referem que este facto poderá, aparentemente, dever-se à completa ausência de valor prognóstico da FFS do ciclo diplóide nos tumores aneuplóides de ADN.

OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

O Consenso de Citometria³⁹, para além de reconhecer valor prognóstico na avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo para o carcinoma da mama, propõe que cada laboratório defina os seus próprios valores “cut-off” para a distribuição da fase S, de acordo com as suas condições particulares de processamento e análise. Esta sugestão resulta da falta de padronização entre as metodologias utilizadas pelos diferentes autores.

Tendo em consideração o actual conhecimento sobre esta análise e as linhas de orientação definidas pelo referido Consenso³⁹, foi realizado este estudo com os seguintes objectivos:

1. Ensaiai um método de avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo em carcinoma da mama, de acordo com a literatura e as sugestões apresentadas pelo Consenso³⁹;
2. Avaliar a importância desta análise de citometria de fluxo através da associação entre os parâmetros estudados por citometria e diversas variáveis clínico-patológicas, algumas das quais são factores de prognóstico clássicos para esta neoplasia;
3. Determinar os intervalos de variação dos parâmetros relacionados com a fase S, dividindo em três intervalos (baixo, intermédio e alto), conforme sugerido pelo Consenso³⁹;
4. Comparar os resultados obtidos pelas diferentes avaliações da percentagem de células em fase S, utilizadas neste estudo, e respectivos pontos “cut-off”.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1- MATERIAL

Entre Julho de 1995 e Maio de 1997 foi solicitado, à Unidade de Oncologia Molecular do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil – Centro Regional do Porto (IPOFG-Porto), a avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo, em 214 casos de mulheres com carcinoma da mama, diagnosticados e tratados no IPOFG-Porto. Todas estas doentes foram incluídas no presente estudo, tendo sido possível obter histogramas interpretáveis em 162 casos (76%). Os restantes 52 foram excluídos devido a terem uma percentagem de restos celulares superior a 20% ($n=15$, 28,9%)³⁸, número de células para análise inferior a 10^4 ($n=14$, 26,9%)³⁸, terapia neo-adjuvante ($n=8$, 15,4%), coeficiente de variação (CV) do pico G_0/G_1 do primeiro ciclo celular superior a 5% ($n=8$, 15,4%)^{59,73} e populações aneuplóides de ADN inferiores a 10% do total das células ($n=7$, 13,4%)^{73,78}.

Os 162 casos com resultados da citometria foram revistos histologicamente por um patologista através das lâminas de H&E (hematoxilina e eosina). Todas estas doentes foram submetidas a cirurgia como tratamento primário: 88% dos casos realizaram mastectomia radical modificada e 12% cirurgia conservadora. Em 152 doentes (94%) foi realizada terapia adjuvante: radioterapia (RT) 5%, quimioterapia (QT) 2%, hormonoterapia (HT) 24%, RT + QT 32%, RT + HT 24%, RT + QT + HT 12% e QT + HT 1%.

2- VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

As variáveis clínico-patológicas estudadas foram: idade e estadió na altura do diagnóstico, tamanho do tumor, tipo e grau histológico, envolvimento ganglionar axilar, expressão dos receptores de estrogénio (RE) e progesterona (RP).

O estadió foi avaliado segundo a classificação do TNM da AJCC⁷⁹. A idade do doente foi dividida pelo valor médio encontrado nesta série.

O tipo histológico do tumor estabelecido de acordo com a classificação histológica proposta por Page *et al.*⁸⁰.

A determinação do grau histológico para os carcinomas ductais invasores (CDI), foi feita de acordo com a classificação modificada de Elston do Sistema de Bloom e Richardson⁸¹, através da avaliação do grau nuclear, formação de ductos e

número de mitoses. Este último parâmetro foi estudado em 10 campos do microscópio de grande ampliação (40x).

O tamanho do tumor e o número de gânglios metastizados foram categorizados de acordo com as classificações do AJCC⁷⁹, e determinados no estudo histopatológico das peças cirúrgicas.

Os dados relativos aos receptores de estrogénio e progesterona foram obtidos a partir dos registos do Arquivo Central deste Instituto. A sua quantificação foi realizada por métodos imunoenzimáticos (EIA-Abbott), sendo considerados positivos os casos com valores superiores a 15 fmol/mg proteína.

3- PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA A CITOMETRIA DE FLUXO

Os fragmentos frescos de cada tumor foram seleccionados e separados por um patologista, garantindo uma adequada representatividade tumoral, sendo de seguida conservados a -80°C . A descongelação e todo o processamento seguinte decorreu sobre gelo moído.

A desagregação das células consistiu num processo mecânico⁸², através da utilização de lâminas de bisturi, sobre uma placa de petri, em tampão PBS (Phosphate buffered saline, Na_2HPO_4 1,48gr/l, NaH_2PO_4 0,495gr/l, NaCl 7,2gr/l, $\text{pH}=7,4$). Cada suspensão foi colocada num tubo, deixando-se sedimentar os fragmentos maiores e recolhendo-se o sobrenadante, ao qual, posteriormente, foi adicionado PBS e colocado a centrifugar (1500 rpm/5 minutos). Após rejeição do sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em PBS e retirou-se uma amostra de cada suspensão para contagem dos respectivos núcleos em câmara de Neubauer (cada amostra foi diluída a 1:10 com uma solução de violeta de cristal a 0,1%).

Posteriormente, e para cada suspensão, foram preparados dois tubos, A e B, com 1×10^6 células tumorais em cada. Ao tubo B foi adicionado 2×10^5 linfócitos (isolados de sangue periférico e conservados, igualmente, a -80°C). Estes linfócitos foram utilizados como controlo externo da ploidia de ADN, confirmando a posição do pico G_0/G_1 do ciclo celular diplóide⁷⁸. Ambos os tubos foram incubados a 4°C , durante 30 minutos na obscuridade, com os seguintes reagentes: PI (Propidium iodide, 50 g/ml, Sigma; Tris 10 mM, MgCl_2 5 mM, $\text{pH}=7,0$), RNase (Ribonuclease A, 500 g/ml, Sigma; Tris 10 mM, MgCl_2 5 mM, $\text{pH}=7,0$) e NP40 (Nonidet P-40, 0,5%, Sigma)⁸³.

Após a incubação, e imediatamente antes da leitura no citómetro de fluxo, cada suspensão foi passada através de uma rede de "nylon" ($55 \mu^2$), colocada entre uma agulha 25G e uma seringa.

As leituras foram feitas no citómetro de fluxo Epics Profile (Coulter Electronics, Hialeah, FL), equipado com um laser de 15mW ajustado para 488 nm, sendo a fluorescência vermelha do PI detectada por um filtro de passo-longo de 610 nm. Para cada tumor, foram adquiridos um mínimo de 10^4 partículas.

4- ANÁLISE DOS HISTOGRAMAS

A análise do ciclo celular foi realizada através do programa Multicycle v. 2.50 (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Este programa, através da elaboração de curvas de ajustamento à distribuição das células no ciclo celular, permite a discriminação das fases G_0/G_1 , S e G_2/M , até um máximo de 3 ciclos celulares simultaneamente presentes num histograma⁷⁵.

As condições de análise foram, para todos os casos, as seguintes:

- aplicação da correcção do “background” com a opção de “sliced nuclei” e de “clumping”, para redução do efeito dos restos celulares⁸⁴ e agregados celulares^{71,85}, respectivamente;
- ordem de grau zero (modelo rectangular de ajustamento à distribuição celular) para a fase S⁷⁵;
- se necessário, activação da opção de fixação da razão G_2/G_1 , por forma a que esta variasse entre 1,9 e 2,0⁸⁵.

O CV do pico G_0/G_1 do ciclo celular diplóide de ADN foi calculado pelo Multicycle através da fórmula:

$$\frac{100 \times DP}{\text{valor médio do pico}}$$

sendo DP o desvio padrão⁷⁵.

Os histogramas foram classificados como diplóides de ADN quando foi observado um único pico G_0/G_1 , correspondendo um índice de ADN de 1,0; e como aneuplóides de ADN se apresentavam mais do que um pico G_0/G_1 ^{86,87}. Aceitou-se como existindo um segundo pico G_0/G_1 desde que este correspondesse a pelo menos 10% da população total, após correcção para restos e agregados celulares⁸⁵. Para ambos os histogramas, o pico G_0/G_1 diplóide foi confirmado pelo controlo externo.

Os histogramas de ADN, com uma percentagem de células em fase G_2/M superior a 15% da população total, foram reavaliados com a opção de 2 ciclos celulares, situando-se o segundo pico G_0/G_1 na região tetraplóide de ADN^{21,38}.

5- VARIÁVEIS AVALIADAS POR CITOMETRIA

Foram analisadas as seguintes variáveis de citometria: ploidia de ADN, IA e a proliferação celular através dos parâmetros FFS, $S+G_2/M$ e % Média S.

5.1- Ploidia de ADN

Esta variável foi determinada na totalidade dos 162 casos, tendo sido definidas 6 classes de ploidia de ADN, conforme se pode observar na Tabela 1^{25,75}.

Tabela 1- Classificação da ploidia de ADN em classes com base no número de ciclos e no Índice de ADN (IA).

Ploidia de ADN	Definição	
	Nº ciclos celulares	IA
Hipodiplóide	2	< 1,00
Diplóide	1	1,00
Hiperdiplóide	2	> 1,00 e < 1,90
Tetraplóide	2	≥ 1,90 e ≤ 2,10
Hipertetraplóide	2	< 2,10
Multiplóide	> 2	-

5.2- Índice de ADN (IA)

O IA foi calculado pelo programa em 154 dos casos (não foi determinado nos 8 casos multiploides de ADN), através do quociente entre o número do canal modal do pico G_0/G_1 da população em estudo e o número do canal modal do pico G_0/G_1 diplóide de ADN. Para efeitos de comparação com as variáveis clínico-patológicas, apenas se considerou o IA dos casos aneuploides de ADN, tendo-se utilizado o valor médio encontrado nesta série como ponto “cut-off”, de forma a definir os intervalos de baixo e alto IA⁸⁷.

5.3- Proliferação celular

A FFS e a S+G₂/M foram avaliadas em 144 dos casos (89%). Nos restantes 18 casos (11%) não foi possível calcular este parâmetro devido à baixa percentagem de células da população aneuplóide de ADN (<20% da população total) (n=4)^{38,85}, à sobreposição entre o ciclo diplóide e o aneuplóide de ADN (n=6) ou à presença de mais do que 1 ciclo aneuplóide de ADN (n=8).

A % Média S foi calculada pelo programa na totalidade dos casos (n=162), incluindo os histogramas multiplóides de ADN. Este parâmetro foi determinado como⁷⁶:

$$\frac{\text{número total de células em fase S}}{\text{número total de células presentes no histograma}} \times 100\%$$

Nos histogramas diplóides de ADN este valor foi idêntico ao da variável FFS; nos aneuplóides de ADN o programa indicou o valor encontrado.

Para o estudo da associação entre as variáveis de proliferação e as clínico-patológicas, cada um destes parâmetros analisados por citometria foi dividido em intervalos de variação. Para a determinação destes intervalos foram utilizados os valores da média e dos percentis de 25 e de 75 como pontos "cut-off". Com a média foram definidos dois intervalos de variação (baixo e alto) e com os percentis definiu-se três intervalos (baixo, intermédio e alto).

6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre as variáveis citométricas e clínico-patológicas foi estudada de acordo com o tipo de variável, tendo sido utilizado para as categorizadas o teste de Qui-quadrado (Pearson e Fisher), e para as contínuas os testes de t de Student ou ANOVA, e U de Mann-Whitney ou KRUSKAL-WALLIS (conforme se tratavam de variáveis paramétricas ou não paramétricas, respectivamente). Para a análise multivariada foi usada a regressão logística. Em qualquer dos testes, considerou-se como estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1- Variáveis clínico-patológicas

As frequências absolutas e relativas observadas para cada uma das variáveis clínico-patológicas em estudo, encontram-se discriminadas na Tabela 2 (em ANEXOS). Os estadios mais baixos I, II_A e II_B foram os mais frequentes e os carcinomas ductais invasores o tipo histológico predominante. Neste grupo histológico, prevaleceram os graus histológicos II e III, em concordância com a maior percentagem da classe mais elevada das variáveis ductos e grau nuclear. A maioria dos tumores desta série revelaram tamanhos entre os 2 e os 5 cm (a mediana foi de 2,5 cm, variando entre 0,7 e 8,5) e foram positivos para a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona. Relativamente ao envolvimento ganglionar axilar, quase metade dos casos apresentaram metastização ganglionar na altura do diagnóstico. Nestes casos, o número de gânglios metastizados mais frequente situou-se entre 1 e 3 (mediana igual a 3, variando entre 1 e 23). Em relação à idade, as doentes com mais de 59 anos foram ligeiramente mais numerosas (o valor médio foi de 59 ± 13 anos, variando entre 20 e 86).

2- Parâmetros avaliados por citometria

Relativamente a estes parâmetros, o Gráfico 1 apresenta o número de casos e respectivas frequências relativas, das 6 classes de ploidia de ADN consideradas neste estudo.

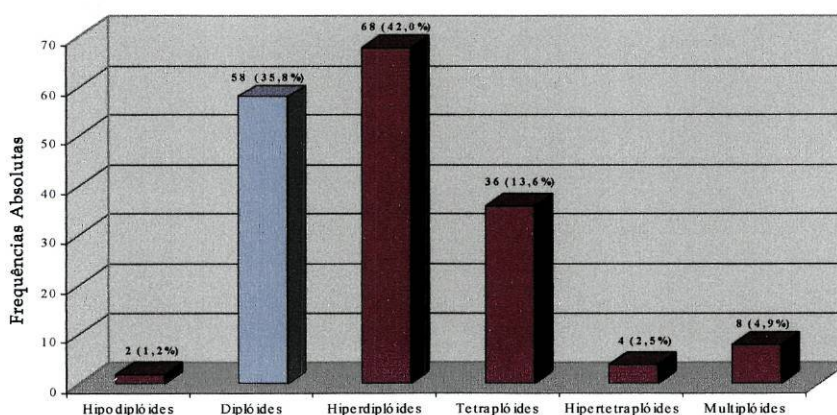


Gráfico 1- Frequências absolutas (e relativas) das classes de ploidia de ADN.

A classe mais frequente foi a dos hiperdiplóides de ADN (42%), seguida pelos diplóides de ADN (35,8%).

Comparando entre si as 5 classes aneuplóides de ADN (hipodiplóides, hiperdiplóides, tetraplóides, hipertetraplóides e multiplóides) em relação à sua associação com as variáveis clínico-patológicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Por este facto, para o presente estudo, considerou-se a ploidia de ADN dividida apenas em diplóides e aneuplóides de ADN. Desta forma, dos 162 casos, 58 (35,8%) revelaram um conteúdo de ADN diplóide e 104 (64,2%) um conteúdo de ADN aneuplóide.

No que se refere ao Índice de ADN (IA) dos casos aneuplóides de ADN, este revelou uma média de $1,7 \pm 0,33$ (variando entre 0,6 e 2,9), tendo sido utilizado este valor como “cut-off” para definir um baixo e alto IA aneuplóide. Assim, dos 96 casos aneuplóides de ADN em que foi avaliado o IA, 43 (45%) revelaram um IA baixo e 53 (55%) um IA alto. A distribuição dos valores de IA destes 96 casos é apresentada no Gráfico 2.

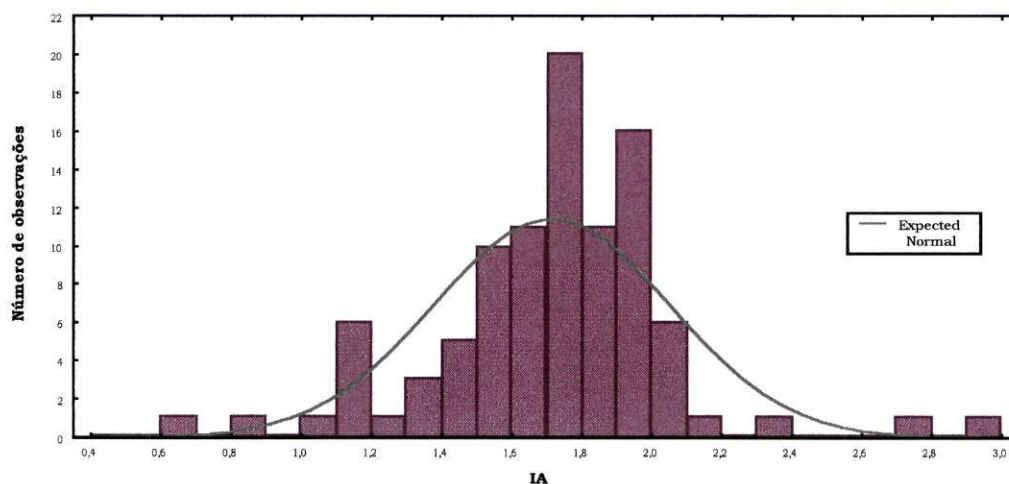


Gráfico 2- Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) dos casos aneuplóides de ADN (n=96).

Em relação às variáveis que avaliaram a proliferação celular (FFS, S+G₂/M e %Média S), são apresentadas na Tabela 3 as suas distribuições.

Tabela 3 - Distribuição das variáveis que avaliaram a proliferação celular: FFS^a, S+G₂/M^b e %Média S^c

Variáveis de proliferação	n	Mediana	Mínimo	Máximo
FFS	144	7,6	0,0	38,8
S+G ₂ /M	144	14,1	2,3	46
%Média S	162	5,7	0,0	22,8

^aFracção de células em fase S. ^bFracção de células em fase S e G₂/M. ^cPercentagem média de células em fase S.

Ao estudar o grupo dos tumores com um conteúdo de ADN aneuplóide, relacionou-se os valores de fase S, obtidos por cada uma das variáveis de proliferação, com a percentagem de células da população aneuplóide presente no histograma de ADN.

Na representação gráfica obtida, observou-se que alguns destes valores distanciaram-se claramente da distribuição encontrada, em especial para as variáveis FFS e S+G₂/M (Gráfico 3).

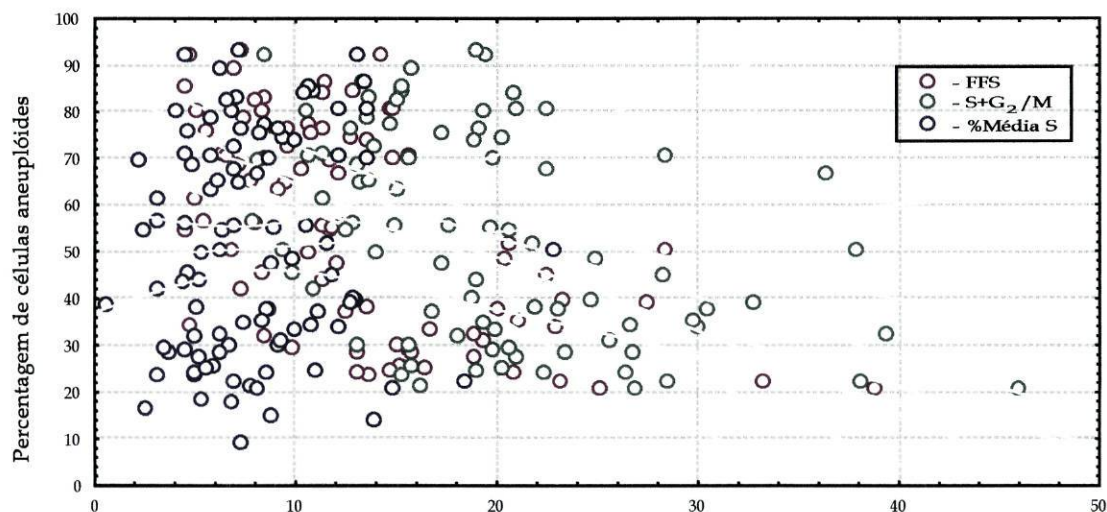


Gráfico 3- Relação entre a percentagem de células aneuplóides e os valores das variáveis: fracção de células em fase S (FFS), fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M) e percentagem média de células em fase S (%Média S).

Estes valores discrepantes registaram-se preferencialmente em tumores com percentagens da população aneuplóide até 25%.

Ao estudar a associação entre a ploidia de ADN e as variáveis de proliferação, observou-se que os diplóides de ADN se associaram com taxas de proliferação significativamente mais baixas ($p < 0,0001$), quando comparados com os aneuplóides de ADN (Gráfico 4).

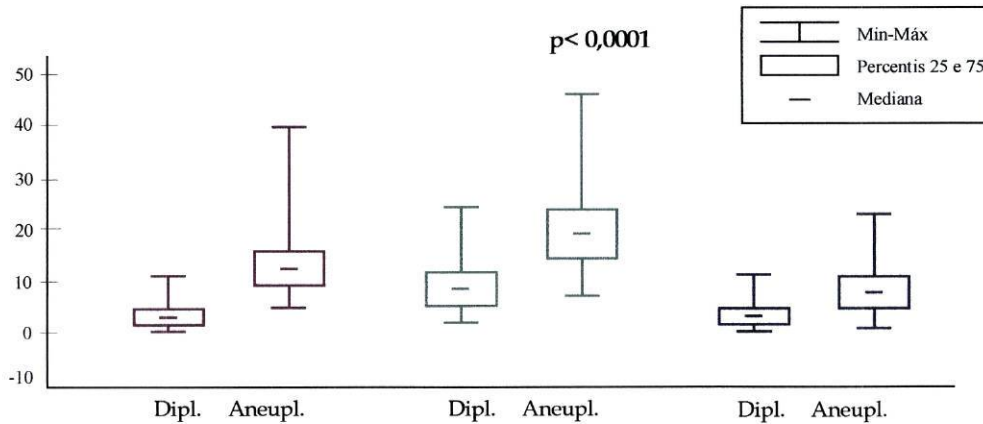


Gráfico 4- Distribuição dos valores da fracção de células em fase S (FFS), fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M) e percentagem média de células em fase S (% Média S) nos diplóides (Dipl.) e aneuplóides (Aneupl.) de ADN.

Relativamente à associação entre estas variáveis de proliferação celular e as clínico-patológicas, indicam-se na Tabela 4 as diversas associações observadas.

Tabela 4- Associações entre as variáveis de proliferação (FFS^a, S+G₂/M^b e % Média S^c) e as clínico-patológicas.

Variáveis clínico-patológicas	FFS ^a	S+G ₂ /M ^b	% Média S ^c
	p	p	p
Estadio clínico (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV)	0,05	0,19	0,52
Tipo histológico (CDI ^d , CLI ^e e outros)	0,001	0,001	<0,0001
Grau histológico (I, II e III)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ductos (1, 2 e 3)	0,28	0,22	0,71
Grau nuclear (1, 2 e 3)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Número de mitoses (1, 2 e 3)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
RE ^f (negativa e positiva)	0,09	0,041	0,20
RP ^g (negativa e positiva)	0,26	0,21	0,36
Tamanho do tumor (≤ 2, > 2 e ≤ 5, > 5 cm e multifocais)	0,05	0,017	0,005
Envolvimento ganglionar (negativo e positivo)	0,08	0,16	0,81
Gânglios metastizados (0, 1 a 3, 4 a 9 e ≥ 10)	0,09	0,32	0,52
Idade (≤ 59 e > 59)	0,88	0,73	0,87

^aFracção de células em fase S. ^bFracção de células em fase S e G₂/M. ^cPercentagem média de células em fase S. ^dCarcinomas ductais invasores. ^eCarcinomas lobulares invasores. ^fExpressão dos receptores de estrogénio. ^gExpressão dos receptores de progesterona.

Ao realizar esta análise mas de forma estratificada para a ploidia de ADN, verificou-se que apenas algumas das associações significativas se mantiveram. Para além disso, observou-se que estas associações registaram-se de forma distinta para os tumores diplóides e aneuplóides de ADN (Tabelas 5, 6 e 7). Estes resultados sugerem que a ploidia de ADN interfere com a associação entre as variáveis de proliferação e as clínico-patológicas.

Tabela 5- Associações entre a Fracção de células em fase S (FFS) e as variáveis clínico-patológicas, de forma estratificada para a ploidia de ADN.

Variáveis clínico-patológicas	Diplóides de ADN	Aneuplóides de ADN
	P	P
Estadio clínico (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV)	0,006	0,36
Tipo histológico (CDI ^a , CLI ^b e outros)	0,007	0,94
Grau histológico (I, II e III)	0,010	0,17
Ductos (1, 2 e 3)	0,81	0,96
Grau nuclear (1, 2 e 3)	0,11	0,28
Número de mitoses (1, 2 e 3)	0,001	0,33
RE ^c (negativa e positiva)	0,25	0,12
RP ^d (negativa e positiva)	0,08	0,86
Tamanho do tumor (≤ 2 , > 2 e ≤ 5 , > 5 cm e multifocais)	0,06	0,26
Envolvimento ganglionar (negativo e positivo)	0,09	0,27
Gânglios metastizados (0, 1 a 3, 4 a 9 e ≥ 10)	0,15	0,70
Idade (≤ 59 e > 59)	0,07	0,09

^aCarcinomas ductais invasores. ^bCarcinomas lobulares invasores. ^cExpressão dos receptores de estrogénio

^dExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 6- Associações entre a Fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M) e as variáveis clínico-patológicas, de forma estratificada para a ploidia de ADN.

Variáveis clínico-patológicas	Diplóides de ADN	Aneuplóides de ADN
	P	P
Estadio clínico (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV)	0,12	0,94
Tipo histológico (CDI ^a , CLI ^b e outros)	0,16	0,28
Grau histológico (I, II e III)	0,05	0,049
Ductos (1, 2 e 3)	0,67	0,46
Grau nuclear (1, 2 e 3)	0,28	0,011
Número de mitoses (1, 2 e 3)	0,020	0,08
RE ^c (negativa e positiva)	0,45	0,006
RP ^d (negativa e positiva)	0,14	0,19
Tamanho do tumor (≤ 2 , > 2 e ≤ 5 , > 5 cm e multifocais)	0,08	0,33
Envolvimento ganglionar (negativo e positivo)	0,47	0,59
Gânglios metastizados (0, 1 a 3, 4 a 9 e ≥ 10)	0,18	0,96
Idade (≤ 59 e > 59)	0,041	0,16

^aCarcinomas ductais invasores. ^bCarcinomas lobulares invasores. ^cExpressão dos receptores de estrogénio

^dExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 7- Associações entre a Percentagem média de células em fase S (%Média S) e as variáveis clínico-patológicas, de forma estratificada para a ploidia de ADN.

Variáveis clínico-patológicas	Diplóides de ADN	Aneuplóides de ADN
	P	P
Estádio clínico (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV)	0,006	0,36
Tipo histológico (CDI ^a , CLI ^b e outros)	0,007	0,11
Grau histológico (I, II e III)	0,010	0,049
Ductos (1, 2 e 3)	0,81	0,25
Grau nuclear (1, 2 e 3)	0,11	0,78
Número de mitoses (1, 2 e 3)	0,001	0,034
RE ^c (negativa e positiva)	0,25	0,42
RP ^d (negativa e positiva)	0,08	0,90
Tamanho do tumor (≤ 2 , > 2 e ≤ 5 , > 5 cm e multifocais)	0,06	0,015
Envolvimento ganglionar (negativo e positivo)	0,09	0,87
Gânglios metastizados (0, 1 a 3, 4 a 9 e ≥ 10)	0,15	0,86
Idade (≤ 59 e > 59)	0,07	0,17

^aCarcinomas ductais invasores. ^bCarcinomas lobulares invasores. ^cExpressão dos receptores de estrogénio
^dExpressão dos receptores de progesterona.

Devido à diferença tão significativa entre os diplóides e os aneuplóides de ADN, relativamente à proliferação celular e ao efeito da ploidia de ADN, decidiu-se avaliar a associação entre as variáveis citométricas relacionadas com a proliferação e as diversas variáveis clínico-patológicas em estudo, separadamente para diplóides e aneuplóides de ADN.

Ao estudar as associações entre os diferentes tipos histológicos e os vários parâmetros citométricos, observou-se que os carcinomas ductais invasores (CDI) eram significativamente mais aneuplóides de ADN (Gráfico 5):

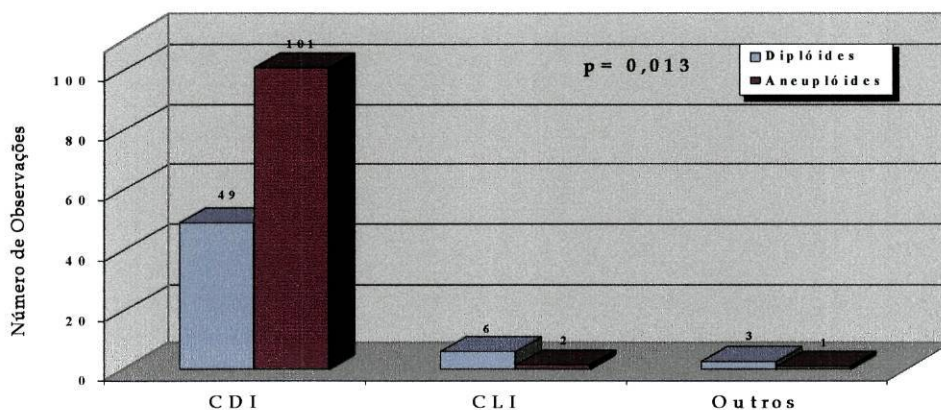


Gráfico 5- Associação entre a ploidia de ADN e os diferentes tipos histológicos: carcinomas ductais invasores (CDI), carcinomas lobulares invasores (CLI) e outros.

e possuíam valores de proliferação celular significativamente mais elevados (Tabela 8):

Tabela 8- Associações entre o tipo histológico e as variáveis de proliferação celular.

Variáveis de proliferação	Tipo histológico			P
	CDI ^d	CLI ^e	Outros	
FFS ^a	8,0	1,4	2,1	0,002
S+G ₂ /M ^b	15,0	8,1	7,3	0,002
% Média S ^c	5,9	1,7	2,1	<0,0001

^aFracção de células em fase S. ^bFracção de células em fase S e G₂/M. ^cPercentagem média de células em fase S.

^dCarcinomas ductais invasores. ^eCarcinomas lobulares invasores.

Por outro lado, os CDI, como atrás referido, constituíram nesta série o tipo histológico maioritário (93%). Assim, decidiu-se avaliar a associação entre as variáveis citométricas e as clínico-patológicas, apenas neste grupo de tumores dos CDI.

Os resultados que a seguir se apresentam referem-se, por conseguinte, exclusivamente aos 150 casos classificados como CDI.

3- Ploidia de ADN e variáveis clínico-patológicas

As associações encontradas entre a ploidia de ADN e as diversas variáveis clínico-patológicas são apresentadas na Tabela 9 (em ANEXOS). Foram observadas associações estatisticamente significativas com o grau histológico, metastização ganglionar e estadio clínico. Verificou-se que a aneuploidia de ADN se associou com um alto grau histológico (Gráfico 6):

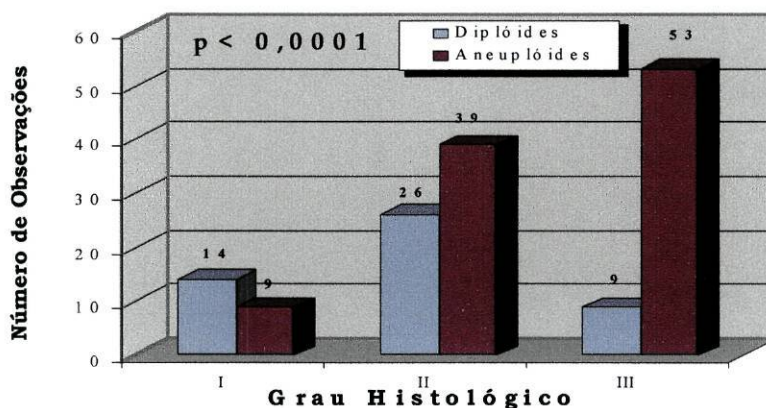


Gráfico 6- Associação entre a ploidia de ADN e o grau histológico, no grupo dos carcinomas ductais invasores.

e um maior número de casos com metastização ganglionar axilar no momento do tratamento primário (Gráfico 7 e Figura 4):

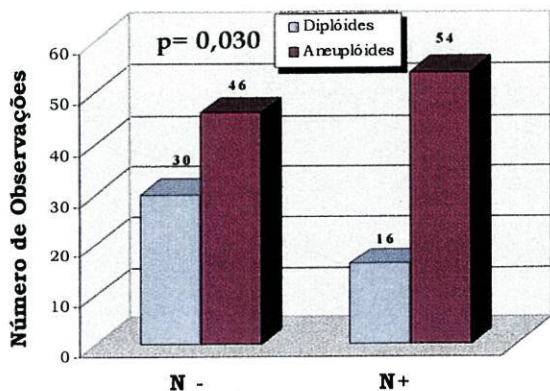


Gráfico 7- Associação entre a ploidia de ADN e a metastização ganglionar axilar negativa (N-) e positiva (N+), no grupo dos carcinomas ductais invasores.

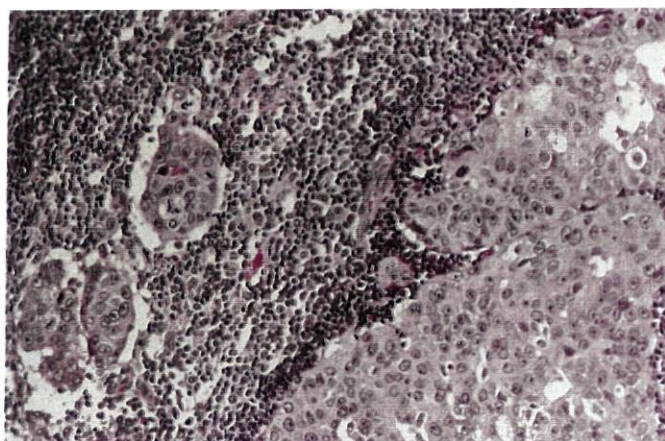
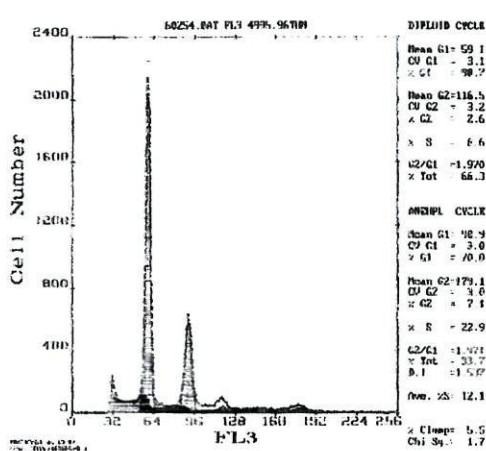


Figura 4 -Carcinoma ductal invasor grau III apresentando um conteúdo de ADN aneuploide (A), com metástase ganglionar axilar (B) (10x).

O grau nuclear (Gráfico 8) e o número de mitoses (Gráfico 9) contribuíram para a associação encontrada relativamente ao grau histológico:

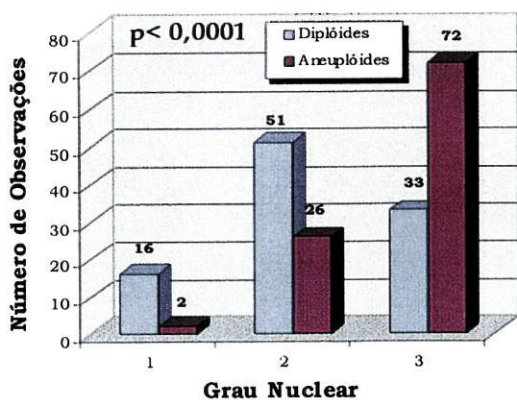


Gráfico 8- Associação entre a ploidia de ADN e o grau nuclear, no grupo dos carcinomas ductais invasores.

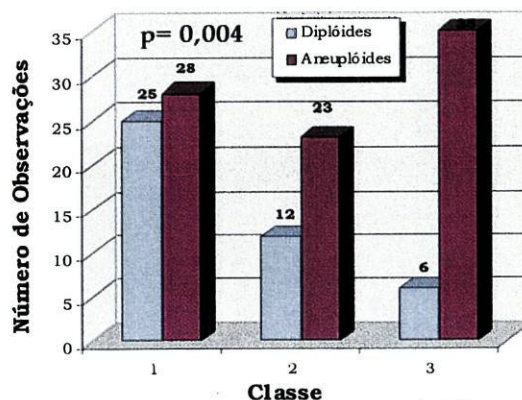


Gráfico 9- Associação entre a ploidia de ADN e o número de mitoses (classes), no grupo dos carcinomas ductais invasores.

Quanto ao estadio clínico observou-se que 80% dos diplóides de ADN correspondiam aos estadios I e II_A (Gráfico 10):

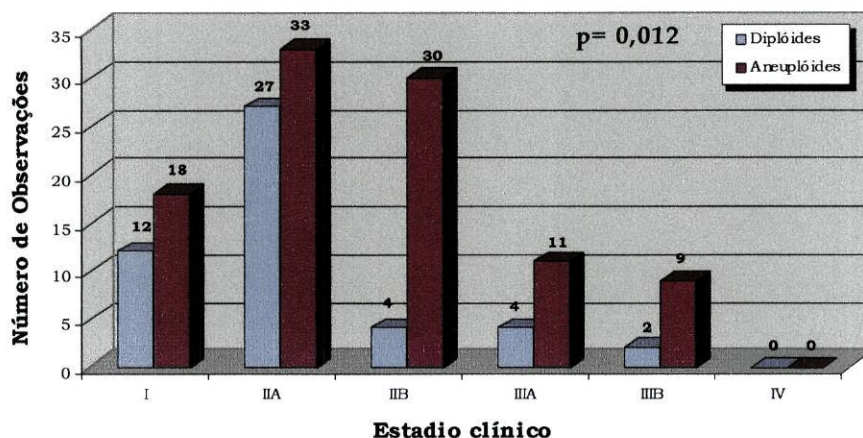


Gráfico 10- Associação entre a ploidia de ADN e o estadio clínico, no grupo dos carcinomas ductais invasores.

Ainda no que se refere ao envolvimento de gânglios axilares, para além da ploidia de ADN, também a idade e o grau histológico se associaram significativamente. Na análise multivariada a ploidia de ADN perdeu o seu valor prognóstico independente. O grau histológico, e dentro deste o grau III, foi a variável que apresentou maior risco de metastização ganglionar axilar (Tabela 10):

Tabela 10- Factores clínico-patológicos e citométricos associados à metastização ganglionar axilar, no grupo dos carcinomas ductais invasores (análise multivariada).

Variáveis	p	ODDS RATIO	Limites de confiança
Idade			
> 59		1	1,013 - 4,134
≤ 59	0,046	2,046	
Grau histológico			
I		1	
II	0,225	2,029	0,647 - 6,363
III	0,008	5,036	1,526 - 16,62
Ploidia de ADN			
Diplóide		1	
Aneuplóide	0,348	1,472	0,656 - 3,302

Razão de plausibilidade = 20,817; p < 0,001

4- Índice de ADN e variáveis clínico-patológicas

Considerando apenas os IA dos casos aneuplóides de ADN, observou-se apenas uma associação estatisticamente significativa com o número de gânglios axilares metastizados (Tabela 11, em ANEXOS): um IA elevado associou-se com uma maior frequência da classe de maior número de gânglios metastizados (Gráfico 11). No entanto, e apesar de não ser significativa a diferença, a classe de IA baixos revelou menor frequência de casos sem metastização ganglionar axilar (Gráfico 12).

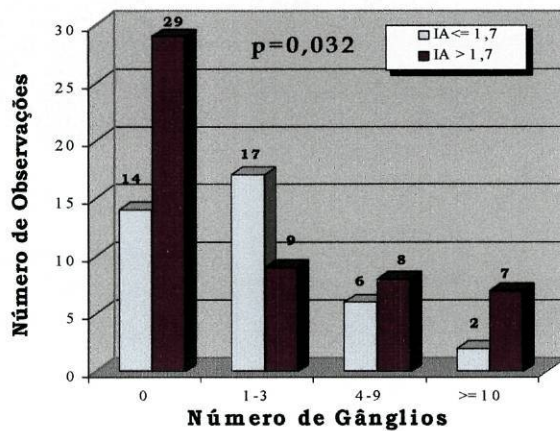


Gráfico 11- Associação entre o índice de ADN (IA) e o número de gânglios axilares metastizados, no grupo dos carcinomas ductais invasores.

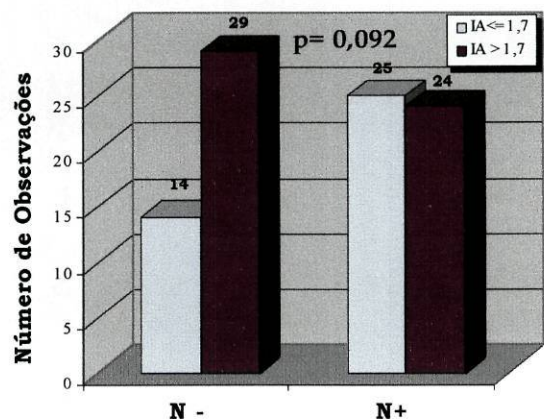


Gráfico 12- Associação entre o índice de ADN (IA) e a metastização ganglionar axilar negativa (N-) e positiva (N+), no grupo dos carcinomas ductais invasores.

Embora a associação seja igualmente não significativa, refira-se que a frequência de grau histológico III, número de mitoses alto e RE e RP negativos, foi maior nesta classe de IA baixo.

5- Proliferação celular e variáveis clínico-patológicas

Os valores "cut-off" (média e percentis) e respectivos intervalos para cada uma das variáveis de proliferação, foram determinados separadamente para os diplóides e para os aneuplóides de ADN e encontram-se indicados na Tabela 12.

Tabela 12 - Intervalos de variação e valores "cut-off" para cada uma das variáveis que avaliaram a proliferação celular.

Variáveis	Ploidia de ADN	"cut-off"	Intervalos de variação		
			Baixo	Intermédio	Alto
FFS ^a	Diplóides	Média	≤ 3,6	-	> 3,6
		Percentis ^d	≤ 2,2	> 2,2 - 4,7	> 4,7
	Aneuplóides	Média	≤ 12,1	-	> 12,1
		Percentis ^d	≤ 8,4	> 8,4 - 16,3	> 16,3
S+G ₂ /M ^b	Diplóides	Média	≤ 9,8	-	> 9,8
		Percentis ^d	≤ 6,6	> 6,6 - 11,8	> 11,8
	Aneuplóides	Média	≤ 19,7	-	> 19,7
		Percentis ^d	≤ 14	> 14 - 22,8	> 22,8
%Média S ^c	Diplóides	Média	≤ 3,6	-	> 3,6
		Percentis ^d	≤ 2,2	> 2,2 - 4,7	> 4,7
	Aneuplóides	Média	≤ 8,0	-	> 8,0
		Percentis ^d	≤ 5,3	> 5,3 - 10,3	> 10,3

^aFracção de células em fase S. ^bFracção de células em fase S e G₂/M. ^cPercentagem média de células em fase S. ^dPercentis de 25 e 75.

Os resultados encontrados relativamente à associação entre cada uma das variáveis de proliferação e as clínico-patológicas, são discriminados de seguida, separadamente para diplóides e aneuplóides de ADN.

5.1- Diplóides de ADN

5.1.1- Fracção de células em fase S (FFS)

Em relação a esta variável, e nesta classe de ploidia de ADN, registou-se uma associação estatisticamente significativa relativamente ao grau histológico (Tabela 13, em ANEXOS), com qualquer dos pontos "cut-off" considerados: a classe de FFS alta revelou uma maior frequência de casos com alto grau (Gráficos 13 e 14).

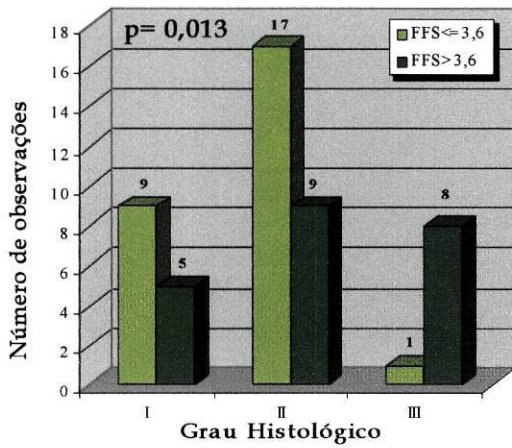


Gráfico 13- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pela média, e o grau histológico, no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

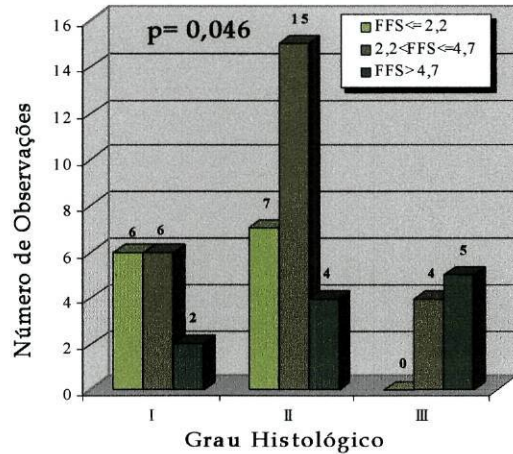


Gráfico 14- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pelos percentis, e o grau histológico, no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

O componente do grau histológico responsável por esta associação foi o número de mitoses (Gráficos 15 e 16 e Figura 5).

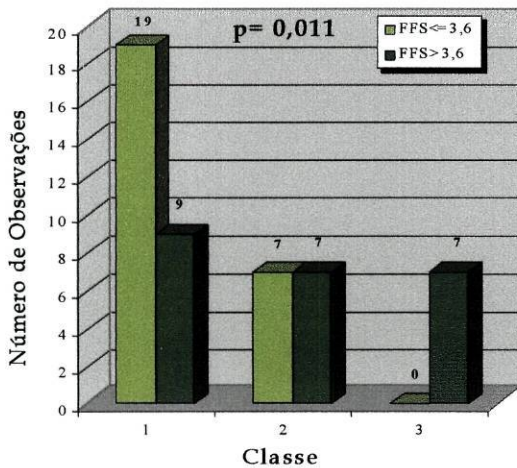


Gráfico 15- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pela média, e o número de mitoses (classes), no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

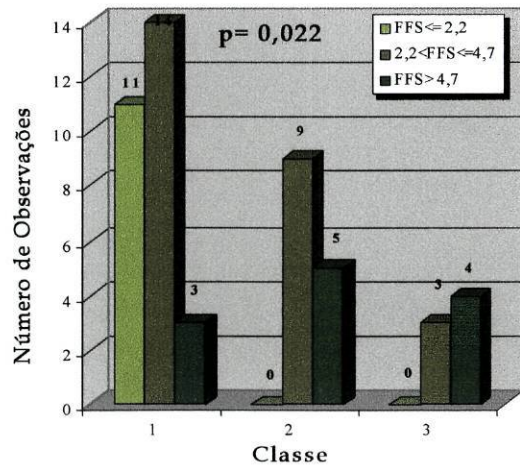
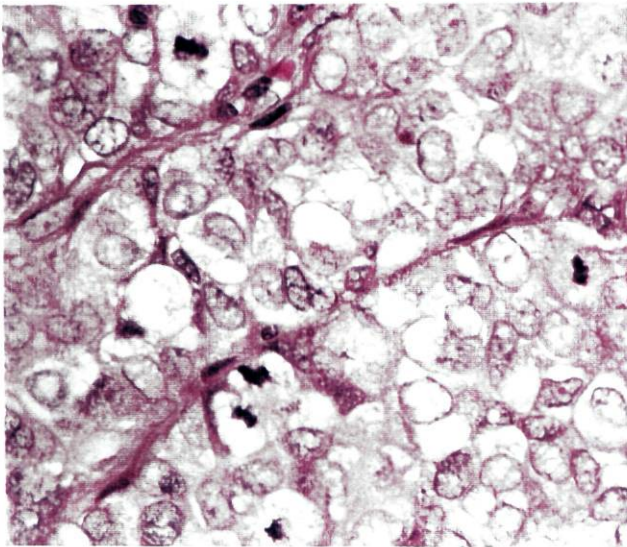
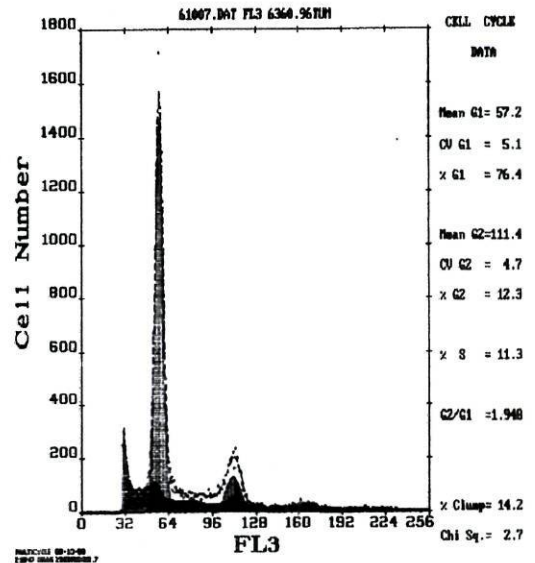


Gráfico 16- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pelos percentis, e o número de mitoses (classes), no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.



A



B

Figura 5- Carcinoma ductal invasor grau III (A, 40x) apresentando um conteúdo de ADN diplóide (B) com uma alta percentagem de células em fase S (FFS = 11,3).

Para além desta associação, e utilizando a média como ponto “cut-off”, verificou-se que a frequência das doentes mais idosas era significativamente maior na classe mais proliferativa (Gráfico 17), quando comparada com a de menor proliferação:

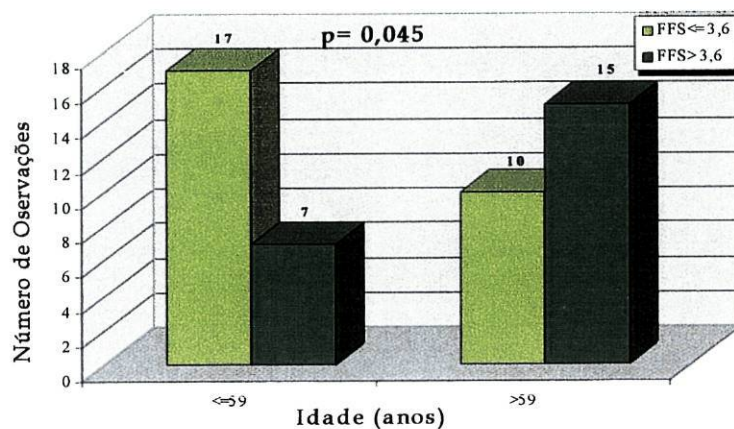


Gráfico 17- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pela média, e o idade (anos), no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

5.1.2- Fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M)

No que se refere a esta variável, apenas se registou uma associação significativa, dividindo pelos percentis, e relativamente ao número de mitoses (Tabela 14, em ANEXOS): uma S+G₂/M baixa associou-se com um menor número de mitoses (Gráfico 18):

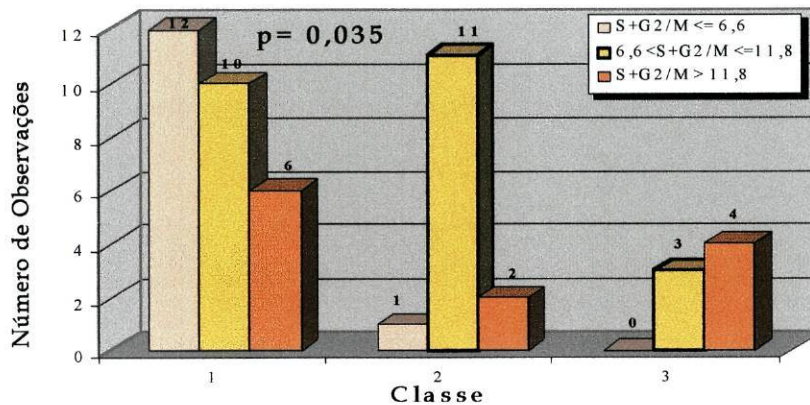


Gráfico 18- Associação entre a fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M), dividida pelos percentis, e o número de mitoses (classes), no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

5.1.3- Percentagem média de células em fase S (% Média S)

Como foi atrás referido (Material e Métodos) esta variável é igual à FFS neste grupo dos diplóides de ADN. Por esta razão, os resultados obtidos foram idênticos aos observados para a FFS, quer para a média, quer para os percentis (Tabela 13, em ANEXOS): a classe de proliferação mais elevada revelou uma maior frequência de casos com alto grau, sendo o número de mitoses o componente responsável por esta associação.

5.2- Aneuplóides de ADN

5.2.1- Fracção de células em fase S (FFS)

Nesta classe de ploidia de ADN apenas se observou uma associação estatisticamente significativa (Tabela 15, em ANEXOS), em relação à idade e utilizando os percentis como pontos “cut-off”: observou-se que a frequência de doentes mais jovens era significativamente maior na classe mais proliferativa (Gráfico 19):

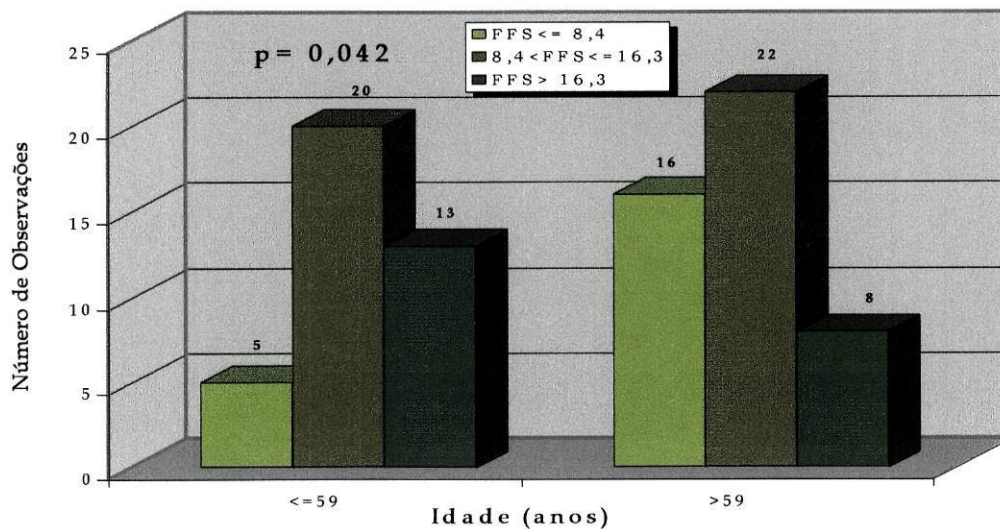


Gráfico 19- Associação entre a fracção de células em fase S (FFS), dividida pelos percentis, e a idade (anos), no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

5.2.2- Fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M)

Em relação à média verificou-se uma única associação significativa, e em relação à idade (Tabela 16, em ANEXOS): observou-se que os tumores mais proliferativos se associaram a uma maior frequência da classe de mulheres mais jovens (Gráfico 20).

Utilizando os percentis como divisão, registou-se igualmente uma única associação significativa, e relativamente aos RE: a classe de proliferação mais elevada associou-se com uma maior frequência de casos RE negativos, comparativamente com as restantes classes (Gráfico 21):

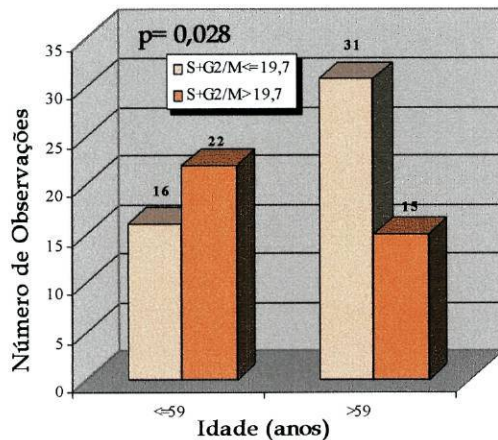


Gráfico 20- Associação entre a fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M), dividida pela média, e a idade (anos), no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

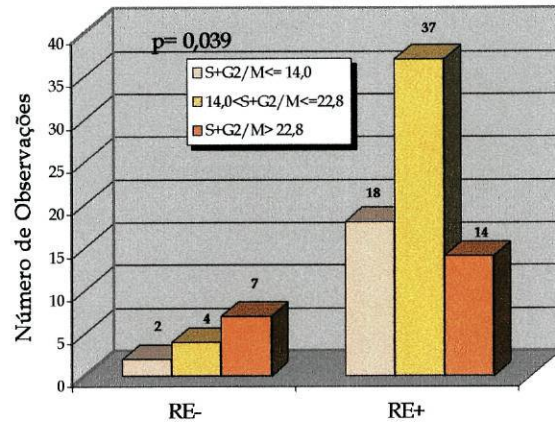


Gráfico 21- Associação entre a fracção de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M), dividida pelos percentis, e a expressão negativa (RE-) e positiva (RE+) dos receptores de estrogénio, no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

5.2.3- Percentagem média de células em fase S (%Média S)

Apenas se registaram associações estatisticamente significativas utilizando a média como valor “cut-off” (Tabela 17, em ANEXOS), e relativamente ao grau histológico, tamanho do tumor e idade do doente: verificou-se uma maior frequência de casos com alto grau, maior tamanho de tumor e mulheres mais jovens na classe de %Média S elevada (Gráficos 22, 23 e 24, respectivamente). O componente do grau histológico responsável por esta associação foi o número de mitoses (Gráfico 25).

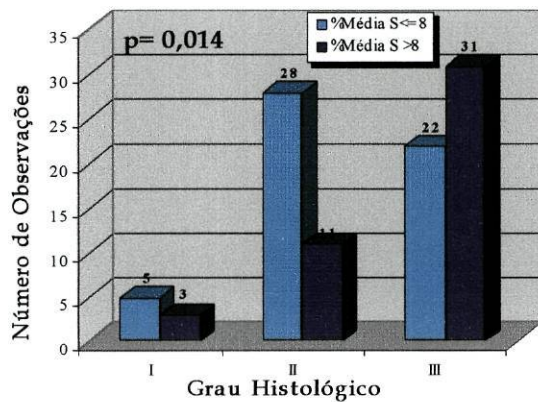


Gráfico 22- Associação entre a percentagem média de células em fase S (%média S), dividida pela média, e o grau histológico, no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

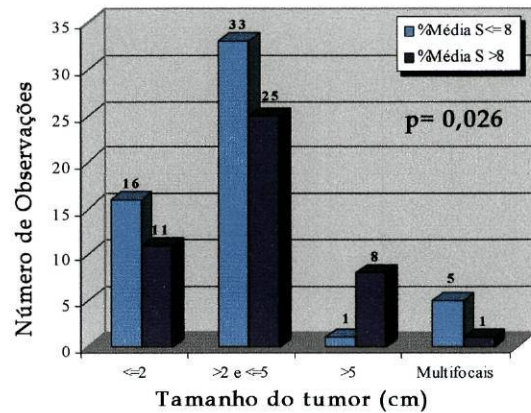


Gráfico 23- Associação entre a percentagem média de células em fase S (%média S), dividida pela média, e o tamanho do tumor (cm), no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

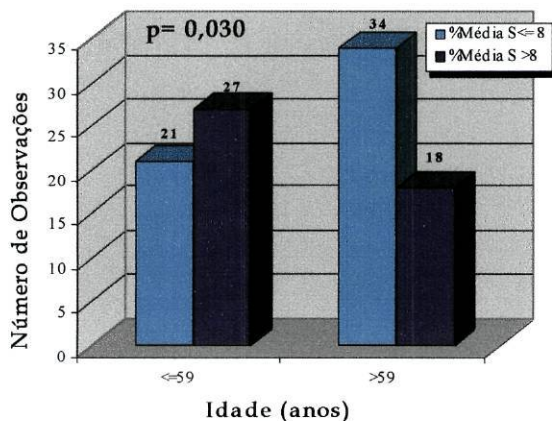


Gráfico 24- Associação entre a percentagem média de células em fase S (%média S), dividida pela média, e a idade (anos), no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

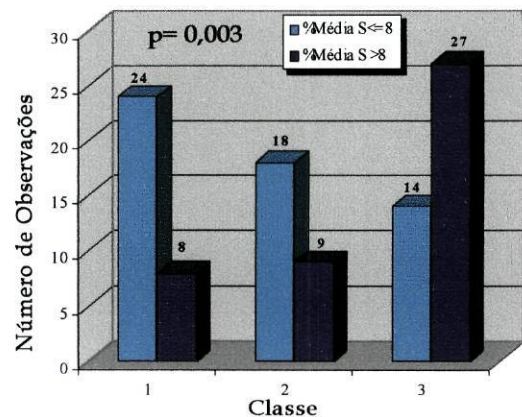


Gráfico 25- Associação entre a percentagem média de células em fase S (%média S), dividida pela média, e o número de mitoses (classes), no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

Na Tabela 18 apresentam-se, de forma global, as associações significativas encontradas para cada uma das variáveis de proliferação, segundo cada um dos pontos “cut-off” utilizados e de forma estratificada para a ploidia de ADN.

Tabela 18- Associações estatisticamente significativas entre as variáveis de proliferação celular e as clínico-patológicas.

	Diplóides		Aneuplóides	
	Média	Percentis	Média	Percentis
FFS ¹	Grau histológico	Grau histológico	-----	Idade
	Número de mitoses	Número de mitoses		
	Idade			
S+G ₂ /M ²	-----	Número de mitoses	Idade	RE ⁴
%Média S ³	Grau histológico	Grau histológico	Grau histológico	-----
	Número de mitoses	Número de mitoses	Número de mitoses	
	Idade		Tamanho Idade	

¹Fracção de células em fase S; ²Fracção de células em fase S e G₂/M; ³Percentagem Média de células em fase S;

⁴Expressão dos receptores de estrogénio.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O Consenso de Citometria³⁸ alerta para a necessidade de serem criados protocolos padronizados aos diversos níveis da análise do conteúdo de ADN por citometria de fluxo, de forma a se obterem resultados reprodutíveis intra e interlaboratorialmente, permitindo, assim, estabelecer comparações entre os numerosos artigos referidos na literatura.

Em relação à fase S sugere, ainda, que cada laboratório defina os seus intervalos de variação, baseando-se nesses tais protocolos padronizados. O presente estudo foi realizado de acordo com estas linhas de orientação.

Os resultados obtidos pelos vários estudos, relativamente ao significado da avaliação do conteúdo de ADN, têm sido contraditórios, não só para o carcinoma da mama, como para outras neoplasias. Esta controvérsia resulta das variações existentes nas metodologias usadas pelos diferentes autores, desde a selecção dos doentes, passando pelo processamento do material, até ao tipo e forma de cálculo das variáveis estudadas.

Para além destas fontes de erro, a comparação de resultados é, muitas vezes, difícil e falível, devido ao facto de alguns estudos não descreverem de forma completa as metodologias utilizadas. Por este facto, foram descritos neste trabalho, todos os aspectos metodológicos usados, desde a selecção dos doentes até ao tipo e forma de cálculo das variáveis utilizadas.

Uma outra causa de discordância entre os diferentes artigos, é a interpretação dos histogramas de ADN. Berger *et al.*⁷⁶ analisaram esta questão de forma pormenorizada para o carcinoma da mama, propondo um protocolo de análise com reproducibilidade intra e interlaboratorial e definindo o seu valor em termos de prognóstico.

O estudo que aqui se apresenta, utilizou um protocolo de análise idêntico ao de Berger *et al.*, considerando a importância para o cálculo final das variáveis avaliadas por citometria (especialmente da percentagem de células em fase S), dos vários aspectos desta análise dos histogramas, nomeadamente: o critério para

escolha do número de ciclos celulares presentes, a correcção logarítmica do efeito dos restos celulares, a aplicação do modelo de eliminação de agregados celulares e escolha do modelo de ajustamento à distribuição das células em fase S (ordem 0, 1 ou 2).

O conteúdo de ADN das células tumorais, avaliado por citometria de fluxo, tem sido utilizado, fundamentalmente, como um indicador de prognóstico, de forma complementar aos factores clínicos e histopatológicos. Este interesse reside no facto de uma alteração do conteúdo de ADN, reflectir a acumulação de alterações genéticas ao nível das células neoplásicas, o que representa a existência de instabilidade genética²².

Neste trabalho não foi possível associar directamente as variáveis estudadas por citometria com o prognóstico, devido à inexistência de “follow-up” suficiente para a patologia em estudo. Por este facto, estudou-se apenas a relação destes parâmetros com diversas características fenotípicas do tumor, algumas delas aceites como factores de prognóstico clássicos para o carcinoma da mama.

Não foram encontradas diferenças, quanto às associações com as diversas variáveis clínico-patológicas, entre as várias classes aneuplóides de ADN, tendo-se optado pela divisão em “diplóides de ADN vs aneuplóides de ADN”. Este resultado está de acordo, quer com o descrito pela maioria dos artigos publicados, que referem um maior valor de prognóstico para esta classificação²⁵, quer com as linhas de orientação assentes no Consenso³⁹. Alguns trabalhos referem, porém, que os hipertetraplóides de ADN poderão representar um subgrupo com prognóstico mais desfavorável^{39,64}. No entanto, dado a sua baixa frequência são necessárias séries muito elevadas para uma adequada avaliação. Talvez por esta razão, não foi possível confirmar no presente estudo a associação com fenótipos tumorais mais agressivos, quer deste grupo dos hipertetraplóides, quer do grupo dos multiplóides de ADN, conforme observado por Camplejohn *et al.*²⁶. A proporção de casos aneuplóides de ADN observados nesta série, entre 53 e 73%, está de acordo com os valores normalmente referidos na bibliografia²⁶.

No que se refere à associação da ploidia de ADN com as diversas variáveis clínico-patológicas, o presente trabalho confirma a generalidade dos resultados referidos na literatura.

Nenhum dos artigos revistos estudou a associação com o estadio clínico. Neste estudo, foi encontrada uma associação significativa com esta variável, observando-se que 80% dos diplóides de ADN corresponderam aos estadios I e II_A (contra 50% dos aneuplóides de ADN), provavelmente devido à associação entre a ploidia e o parâmetro N do estadio.

Tal como a maioria dos artigos este estudo não encontrou uma associação significativa entre a idade e a ploidia de ADN^{45,52,60,61,72,87-90}. Os trabalhos que a referem, indicam que os doentes mais idosos possuem mais frequentemente tumores aneuplóides de ADN, comparativamente com os doentes mais jovens^{51,91,92}.

Em relação ao tipo histológico, os carcinomas ductais e os medulares parecem associar-se mais à aneuploidia de ADN^{87,91,93-95}. Na série em estudo não se registou nenhum caso medular, mas os carcinomas ductais foram claramente mais aneuplóides que os restantes tipos histológicos.

Relativamente ao grau histológico, dos artigos revistos apenas alguns estudaram esta relação, descrevendo, a maioria, uma associação entre a aneuploidia de ADN e os tumores de alto grau histológico^{63,96}. O presente estudo registou uma forte associação entre estas variáveis, contribuindo para este resultado quer o grau nuclear, quer o número de mitoses. Em relação a este último parâmetro todos os artigos revistos observaram uma associação entre a aneuploidia de ADN e um aumento da actividade mitótica^{87,91,97}.

Não foi possível confirmar a associação significativa entre a aneuploidia e a negatividade dos receptores de estrogénio e progesterona, demonstrada nos trabalhos com mais de 300 casos⁶. Este facto realça a necessidade de se trabalhar com séries maiores.

Apenas alguns artigos referem que os tumores de maior tamanho são mais frequentemente aneuplóides de ADN, comparativamente com os de menor tamanho^{45,60,91}. O presente estudo, tal como a maioria dos trabalhos publicados^{51,61,72,87,89,90,93} não encontrou esta associação estatisticamente significativa entre a ploidia de ADN e o tamanho do tumor.

Quanto ao envolvimento ganglionar axilar, apenas alguns estudos encontram uma associação significativa com a ploidia de ADN^{51,89,91,98}, facto também confirmado por este trabalho. Observou-se uma menor frequência de casos com metastização ganglionar axilar no grupo dos tumores diplóides de ADN.

Em conclusão, a ploidia de ADN associou-se com marcadores de malignidade (grau nuclear), proliferação (número de mitoses) e indicadores de potencial metastático (envolvimento ganglionar axilar). Porém, e relativamente a este último parâmetro, a ploidia de ADN perdeu significado estatístico independente na análise multivariada, quando avaliada conjuntamente com o grau histológico. Vários trabalhos com carcinoma da mama referiram que a ploidia de ADN não possui valor prognóstico independente devido à sua associação com outros factores de prognóstico bem estabelecidos⁴. A generalidade da literatura aceita que os diplóides apresentam um prognóstico mais favorável do que os aneuplóides de ADN, no entanto, esta vantagem parece ser relativamente pequena³⁹. Talvez, por isso, o seu valor preditivo seja unicamente detectado em estudos com séries elevadas²⁶.

Todavia, dado a heterogeneidade existente entre as metodologias utilizadas pelos vários artigos, parece-nos válido aguardar por um número de casos maior e um adequado "follow-up" destas doentes, para poder concluir quanto à importância deste parâmetro, quer em termos de prognóstico, quer na resposta aos vários esquemas terapêuticos utilizados no carcinoma da mama.

No que se refere ao Índice de ADN, a maioria dos artigos que o avalia considera quer o IA dos diplóides, quer o IA dos aneuplóides de ADN. Por este

facto, registam associações com as variáveis clínico-patológicas sobreponíveis às obtidas pela ploidia de ADN. Estes dados, reflectem bem a ligação existente entre estes dois parâmetros obtidos por citometria, ploidia e IA.

O presente estudo considerou apenas os IA aneuplóides, tendo encontrado uma associação com o número de gânglios axilares metastizados. Berger *et al.*⁸⁷, analisando, igualmente, apenas os IA aneuplóides (com o valor "cut-off" de 1,8), não observaram esta associação, indicando, porém, outras, como as existentes entre um IA baixo e uma alta actividade mitótica, elevada área nuclear média e expressão negativa de receptores de estrogénio e progesterona. Em relação ao envolvimento ganglionar axilar, tal como verificado por Berger *et al.*, o presente trabalho registou uma tendência para os IA baixos ($\leq 1,7$) revelarem uma maior frequência de casos com metastização ganglionar axilar, comparativamente aos IA altos. Romero *et al.*⁸⁶ referem, também, um efeito negativo na sobrevivência total resultante da associação entre valores de IA baixos (1,1 a 1,3) e metastização ganglionar ou um estadio clínico avançado (III_B).

A associação entre os tumores aneuplóides com IA baixos e algumas características do tumor associadas a pior prognóstico, parece contrariar o referido pelo Consenso sobre o carcinoma da mama³⁹, que atribui uma melhor sobrevivência a este tipo de aneuplóides de ADN. Estes tumores correspondem a neoplasias com um menor grau de alteração do conteúdo de ADN. Este facto poderá conferir maior viabilidade a estas células tumorais²³ e, possivelmente, maior probabilidade de invasão e metastização, comparativamente com outras células que possuem um elevado número de alterações e de cromossomas. Será interessante observar, no futuro, se este grupo de aneuplóides corresponderá a tumores mais resistentes à terapia ou que apresentem menor período livre de doença.

Relativamente à proliferação celular, e nomeadamente à FFS, a maioria dos estudos publicados avaliou esta variável de forma não estratificada para a ploidia de ADN. Dettmar *et al.*⁹⁹ justificam esta forma de analisar referindo que a ploidia

de ADN, por si só, não possui impacto no prognóstico. Apenas alguns artigos o fizeram separadamente para os diplóides e para os aneuplóides de ADN, sugerindo que a FFS variava consideravelmente com a ploidia do tumor e definiram valores "cut-off" para cada uma destas classes de ploidia de ADN^{59,78,86,100}.

Neste trabalho, a proliferação celular foi analisada de forma estratificada para a ploidia de ADN. Esta forma de avaliação deveu-se ao facto de, por um lado se ter observado que os valores de proliferação (avaliada por qualquer uma das variáveis relacionadas com a fase S) eram significativamente diferentes entre diplóides e aneuplóides de ADN, e, por outro, à modificação originada pela ploidia de ADN relativamente à associação entre as variáveis de proliferação e as clínico-patológicas. Este efeito¹⁰¹ originou a ocorrência de associações significativas diferentes entre diplóides e aneuplóides de ADN.

Em relação à associação entre estas variáveis de proliferação (FFS, S+G₂/M e %Média S) e as diversas variáveis clínico-patológicas, de forma estratificada para a ploidia de ADN, não foram encontradas referências nos artigos revistos, pelo facto, como atrás referido, de serem poucos os estudos que fizeram esta análise separadamente para diplóides e aneuplóides de ADN.

A análise dos resultados obtidos por este trabalho, confirma o facto da utilização, quer de diferentes abordagens da fase S, quer dos vários pontos "cut-off" (média e percentis), conduzir a diferentes associações estatisticamente significativas. Como foi atrás realçado, esta diversidade de critérios é, de facto, uma das causas para as discrepâncias existentes entre os numerosos trabalhos publicados.

No que se refere ao grupo dos diplóides de ADN as variáveis FFS ou %Média S (estes dois parâmetros são idênticos nesta classe de ploidia de ADN) foram mais informativas, em especial através da divisão pelo valor médio, comparativamente com a S+G₂/M.

A associação entre a FFS ou %Média S e o grau histológico, factor de prognóstico clássico para o cancro da mama, sugere que esta análise poderá ter

valor prognóstico neste grupo dos diplóides de ADN. A importância prognóstica da FFS nesta classe da ploidia de ADN, foi confirmada por Romero *et al.*⁸⁶. Estes autores, utilizando os percentis como divisão, encontraram uma associação significativa independente entre uma FFS alta nos tumores diplóides e um menor período livre de doença e menor sobrevivência total. Ainda segundo Romero *et al.*, a determinação da FFS nos diplóides de ADN poderia, então, auxiliar na identificação de subgrupos de alto risco, no meio de um grupo de doentes inicialmente associados a bom prognóstico com base em parâmetros unicamente clínicos. A detecção de tumores diplóides com FFS (ou %Média S) alta, ou seja, com níveis de proliferação elevados, poderia, ainda, contribuir para a selecção de um grupo de doentes mais sensíveis a um esquema terapêutico com drogas essencialmente citostáticas.

No que se refere à associação com a idade, verificou-se que a frequência de mulheres com idade mais alta era superior na classe mais proliferativa. Neste grupo de doentes diplóides e com idade superior a 59 anos, é possível distinguir um subgrupo que, apesar de alguns factores de bom prognóstico (sem gânglios axilares metastizados, receptores de estrogénio e progesterona positivos e graus histológicos baixos), possuem uma FFS (ou %Média S) elevada. Este facto poderá vir a alterar o seu prognóstico, sendo necessário aguardar por um “follow-up” adequado, de forma a verificar se, por exemplo, estas doentes revelam um menor período livre de doença.

Em relação aos aneuplóides de ADN a variável %Média S e a divisão pelo valor médio foram, igualmente nesta classe de ploidia de ADN, as mais informativas. A associação entre a %Média S e o número de mitoses sugere que a forma de avaliar a proliferação global destes tumores aneuplóides de ADN, será considerar as fases S de ambos os ciclos celulares presentes: diplóide e aneuplóide de ADN. Ao fazer a contagem do número de mitoses, contabiliza-se todas as figuras mitóticas observadas, independentemente das células tumorais avaliadas serem diplóides ou aneuplóides de ADN.

Em termos de prognóstico, a associação da %Média S com o grau histológico e o tamanho do tumor, dois importantes factores de prognóstico para o cancro da mama, sugere um potencial valor prognóstico para esta variável de proliferação. Este interesse deverá ser confirmado com “follow-up” adequado, visto existirem estudos que o contrariam: Berger *et al.*⁷⁶ atribuíram maior importância no prognóstico para a FFS do ciclo aneuplóide, comparativamente à %Média S, e Kallioniemi *et al.*⁷⁷, sugeriram que a fase S do ciclo diplóide não deverá ter impacto no prognóstico destes tumores aneuplóides de ADN, retirando importância à variável %Média S.

A quase ausência de associações estatisticamente significativas da fase S do ciclo aneuplóide (avaliada neste estudo pelas variáveis FFS e S+G₂/M), poderá dever-se a questões metodológicas relacionadas com a avaliação da fracção proliferativa destes tumores aneuplóides de ADN.

Uma destas questões, é a percentagem mínima de células aneuplóides que deverá estar presente no histograma, para ser validado o respectivo valor de fase S. Kallioniemi *et al.*⁷⁷ após um estudo preliminar sugeriram o valor mínimo de 15%, acrescentando a necessidade deste dado ser confirmado antes da sua adopção para a rotina clínica. O presente estudo utilizou o valor de 20% em virtude do programa informático, usado para a análise do ciclo celular, interrogar o valor da fase S quando a percentagem de células aneuplóides era inferior a este valor. No entanto, ao relacionar esta percentagem e os valores da fase S, para cada uma das variáveis de proliferação estudadas, observou-se que os valores mais discrepantes correspondiam a histogramas com uma percentagem de células aneuplóides até 25%. Utilizando este limite mínimo registou-se uma alteração nas associações entre as variáveis de proliferação e as clínico-patológicas, observando-se uma associação significativa com um importante factor de prognóstico para o carcinoma da mama, a metastização ganglionar axilar: uma FFS ou S+G₂/M altas associaram-se com uma maior frequência de casos com metastização ganglionar. Apesar de, neste estudo, não ser possível excluir a hipótese destes casos discrepantes tratarem-se, efectivamente, de tumores altamente proliferativos, julgou-se importante realçar a influência desta questão no cálculo da fase S. Estes dados sugerem a necessidade

de se avaliar rigorosamente este "cut-off", em estudos futuros com séries mais alargadas.

Este efeito talvez possa ser controlado com a avaliação de um maior número de núcleos. Berger *et al.*³⁷ referiram ser necessário, para obter um valor reprodutível de fase S, adquirir um mínimo de 20.000 e 40.000 núcleos, respectivamente para os diplóides e para os aneuplóides de ADN, no caso de material a fresco, e respectivamente 40.000 e 50.000 para material embebido em parafina.

A representatividade do tumor no fragmento analisado é outro dos factores que afecta o cálculo da fase S, quer para os histogramas diplóides de ADN, quer para os aneuplóides de ADN. Qualquer suspensão celular obtida a partir de um fragmento tumoral, possui, em proporções variadas, células não tumorais. Esta proporção não é facilmente avaliada através de uma análise por citometria de fluxo uni-paramétrica (ADN), sendo necessário, por exemplo, no caso do carcinoma da mama, recorrer a uma dupla marcação citoqueratinas/ADN. Os vários estudos realizados com esta técnica encontraram vantagens e desvantagens, comparativamente com a marcação apenas do ADN. Se, por um lado, permite uma melhor detecção de pequenas linhas celulares aneuplóides de ADN ou próximas do pico diplóide¹⁰²⁻¹⁰⁵, e parece aumentar o valor prognóstico da percentagem de células em fase S¹⁰⁵, embora não haja, ainda, consenso sobre esta última questão¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, por outro lado, é, ainda, uma técnica dispendiosa e demorada, nem sempre proporcionando resultados satisfatórios, especialmente com material embebido em parafina^{36,104,105,108}.

Em conclusão, das três abordagens da fase S estudadas, a fase S do ciclo diplóide nos tumores diplóides de ADN (medida pela FFS ou %Média S) e a ponderação entre as fases S dos dois ciclos diplóide e aneuplóide nos tumores aneuplóides de ADN (avaliada pela %Média S), foram os parâmetros que revelaram maior número de associações com as variáveis clínico-patológicas estudadas. Apesar destes resultados, apenas com um estudo envolvendo uma série maior e um adequado "follow-up" dos doentes, se poderá avaliar correctamente o

valor prognóstico de cada uma das variáveis, e a sua potencial utilização na estratégia terapêutica.

No que se refere aos pontos "cut-off", média ou percentis, o primeiro critério proporcionou um maior número de associações significativas, em qualquer uma das classes de ploidia de ADN. Este facto poderá dever-se apenas à maior divisão da amostra pelos percentis, originando um menor número de casos por intervalo e, conseqüentemente, perda de significado estatístico. É necessário aguardar por um número superior de casos para validar convenientemente o método a seguir, em especial o dos percentis pelo facto de permitir três intervalos de variação: baixo, intermédio e alto. Segundo o Consenso de Citometria³⁸ esta divisão em três intervalos poderia evitar que casos "borderline" fossem classificados erradamente.

Os resultados obtidos e os observados nos artigos revistos realçam a necessidade urgente de serem definidos critérios padronizados a todos os níveis da avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo, desde a selecção dos doentes, passando pelo processamento do material, tipo e forma de cálculo das variáveis a estudar, até à análise dos histogramas de ADN. Esta padronização de toda a metodologia a utilizar é essencial se se pretende resultados reprodutíveis ao longo do tempo e entre os vários laboratórios. Só assim é possível avaliar correctamente a importância dos resultados obtidos pela avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo, e a sua utilização na prática clínica.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Relativamente à associação entre as várias classes de ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas estudadas, os diversos tipos de tumores aneuplóides não revelaram diferenças entre si.
- Na análise univariada os diplóides de ADN associaram-se com uma maior frequência de estadios mais baixos, menor grau histológico, menor número de mitoses e maior número de casos sem envolvimento ganglionar axilar. Relativamente a esta última variável, na análise multivariada, a ploidia de ADN não revelou significado estatístico independente.
- O índice de ADN (IA) permitiu distinguir dois grupos de tumores aneuplóides de ADN: os aneuplóides com baixo IA ($\leq 1,7$) relacionaram-se com características do tumor associadas a pior prognóstico, contrariamente aos aneuplóides com IA altos ($> 1,73$).
- Os resultados obtidos indicam que o estudo das variáveis relacionadas com a fase S, deverá ser realizado separadamente para diplóides e aneuplóides de ADN.
- As diferentes associações estatisticamente significativas obtidas pelas várias abordagens da fase S (FFS, S+G₂/M e %Média S) e os vários pontos "cut-off" utilizados (média ou percentis), dificultam a comparação entre os resultados publicados na literatura.
- Nos tumores diplóides de ADN, a FFS (utilizando o valor médio como "cut-off") foi o parâmetro mais informativo: uma FFS elevada associou-se

significativamente com um alto grau histológico, maior número de mitoses e idade superior a 59 anos. A %Média S nos aneuplóides de ADN (utilizando também o valor médio) foi a mais relevante: uma %Média S elevada associou-se com um alto grau histológico, maior número de mitoses, maior tamanho do tumor e idade inferior a 59 anos. Estes resultados sugerem um potencial valor prognóstico para estas variáveis de fase S. Este significado deverá ser confirmado em estudos futuros, com “follow-up” adequado, e em grupos bem definidos de doentes, por exemplo, sem envolvimento ganglionar axilar (N₀).

- Questões relacionadas com a representatividade tumoral, nomeadamente das células tumorais aneuplóides, poderão explicar a falta de associações significativas obtidas pela avaliação da fase S, exclusivamente, do ciclo aneuplóide. A aquisição e avaliação de um maior número de células nos casos com menor representatividade tumoral, poderá contribuir para ultrapassar este problema.
- As associações estatisticamente significativas encontradas confirmam o valor prognóstico do conteúdo de ADN avaliado por citometria de fluxo. No entanto, é necessário uma padronização das metodologias utilizadas, em particular no que se refere ao cálculo da fase S. Só assim será possível avaliar com rigor o significado prognóstico do conteúdo de ADN e permitir a sua implementação na prática clínica.

ANEXOS

Tabela 2 - Variáveis clínico-patológicas.

VARIÁVEIS	n	%
Estadio clínico (n=162)		
I	34	21
IIA	61	38
IIB	38	23
IIIA	18	11
IIIB	11	7
IV	0	0
Tipo histológico (n=162)		
Ductais	150	93
Lobulares	8	5
Tipos especiais ^a	4	2
Grau histológico (n=150)		
I	23	15
II	64	43
III	63	42
Ductos (n=150)		
1	7	5
2	37	25
3	106	70
Grau nuclear (n=150)		
1	11	7
2	49	33
3	90	60
Número de mitoses (n=150)		
1	61	41
2	41	27
3	48	32
Tamanho do tumor (n=162)		
≤ 2 cm	50	31
2-5 cm	85	52
> 5 cm	13	8
Multifocais	14	9
Envolvimento ganglionar (n=158)		
Negativo	82	52
Positivo	76	48
Gânglios metastizados (n=158)		
0	82	52
1 - 3	39	25
4 - 9	22	14
≥ 10	15	9
Expressão dos receptores de estrogênio (n=157)		
Negativa	21	13
Positiva	136	87
Expressão dos receptores de progesterona (n=157)		
Negativa	35	22
Positiva	122	78
Idade (anos)		
≤ 59	79	49
> 59	83	51

^a1 Carcinoma mucinoso, 1 tubular, 1 papilar e 1 metatípico.

Tabela 9 - Associações entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas no grupo dos carcinomas ductais invasores.

Variáveis	n	Diplóides de ADN (%)	n	Aneuplóides de ADN (%)	p
Estadio clínico					
I	12	25	18	18	0,012
IIA	27	55	33	32	
IIB	4	8	30	30	
IIIA	4	8	11	11	
IIIB	2	4	9	9	
IV	0	0	0	0	
Grau histológico					
I	14	29	9	9	<0,0001
II	26	53	39	39	
III	9	18	53	52	
Ductos					
1	5	9	2	2	0,21
2	11	23	26	26	
3	33	68	73	72	
Grau nuclear					
1	8	16	2	2	<0,0001
2	25	51	26	26	
3	16	33	73	72	
Número de mitoses					
1	28	58	32	32	0,004
2	14	28	27	27	
3	7	14	42	41	
RE^a					
Negativa	4	9	16	16	0,21
Positiva	43	91	83	84	
RP^b					
Negativa	6	13	27	27	0,05
Positiva	41	87	72	73	
Tamanho do tumor (cm)					
≤ 2	19	39	27	27	0,20
> 2 e ≤ 5	22	45	58	57	
> 5	2	4	9	9	
Multifocais	6	12	7	7	
Envolvimento ganglionar					
Negativo	30	65	46	46	0,030
Positivo	16	35	54	54	
Gânglios metastizados (nº)					
0	30	65	46	46	0,06
1 - 3	12	26	27	27	
4 - 9	3	7	15	15	
≥ 10	1	2	12	12	
Idade (anos)					
≤ 59	24	49	48	48	0,87
> 59	25	51	53	52	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 11 - Associações entre o Índice de ADN (IA) e as variáveis clínico-patológicas no grupo dos carcinomas ductais invasores.

Variáveis	IA ≤ 1,7		IA > 1,7		p
	n	(%)	n	(%)	
Estadio clínico					
I	6	15	11	21	0,342
IIA	14	35	16	30	
IIB	13	33	14	26	
IIIA	6	15	5	10	
IIIB	1	2	7	13	
IV	0	0	0	0	
Grau histológico					
I	2	5	7	13	0,343
II	14	35	20	38	
III	24	60	26	49	
Ductos					
1	1	3	1	2	0,987
2	9	22	12	23	
3	30	75	40	75	
Grau nuclear					
1	1	3	1	2	0,065
2	6	14	20	37	
3	33	83	32	61	
Número de mitoses					
1	8	19	22	42	0,101
2	12	31	12	23	
3	20	50	19	35	
RE^a					
Negativa	7	18	7	13	0,572
Positiva	32	82	45	87	
RP^b					
Negativa	12	31	12	23	0,475
Positiva	27	69	40	77	
Tamanho do tumor (cm)					
≤ 2	11	27	14	26	0,886
> 2 e ≤ 5	23	58	29	54	
> 5	4	10	5	10	
Multifocais	2	5	5	10	
Envolvimento ganglionar					
Negativo	14	36	29	55	0,092
Positivo	25	64	24	45	
Gânglios metastizados (n^o)					
0	14	36	29	55	0,032
1 - 3	17	44	9	17	
4 - 9	6	15	8	15	
≥ 10	2	5	7	13	
Idade (anos)					
≤ 59	22	55	23	43	0,30
> 59	18	45	30	57	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 13 - Associações entre a Fracção de células em fase S (FFS) (dividida pela média e pelos percentis de 25 e 75) e as variáveis clínico-patológicas, no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

Variáveis	Média		p	Percentis			p
	FFS≤3,6 n (%)	FFS>3,6 n (%)		FFS≤2,2 n (%)	2,2<FFS≤4,7 n (%)	FFS>4,7 n (%)	
Estadio clínico							
I	8 (30)	4 (18)	0,42	5 (39)	6 (24)	1 (9)	0,50
IIA	14 (52)	13 (59)		5 (39)	14 (56)	8 (73)	
IIB	3 (11)	1 (5)		1 (7)	3 (12)	0 (0)	
IIIA	2 (7)	2 (9)		2 (15)	1 (4)	1 (9)	
IIIB	0 (0)	2 (9)		0 (0)	1 (4)	1 (9)	
IV	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Grau histológico							
I	9 (33)	5 (23)	0,013	6 (46)	6 (24)	2 (18)	0,046
II	17 (63)	9 (41)		7 (54)	15 (60)	4 (36)	
III	1 (4)	8 (36)		0 (0)	4 (16)	5 (46)	
Ductos							
1	4 (15)	1 (4)	0,26	3 (25)	1 (4)	1 (9)	0,47
2	8 (30)	3 (14)		3 (25)	7 (27)	1 (9)	
3	15 (55)	18 (82)		6 (50)	18 (69)	9 (82)	
Grau nuclear							
1	5 (19)	3 (14)	0,62	4 (33)	3 (12)	1 (9)	0,45
2	15 (55)	10 (45)		5 (42)	16 (62)	4 (36)	
3	7 (26)	9 (41)		3 (25)	7 (26)	6 (55)	
Número de mitoses							
1	19 (73)	9 (40)	0,011	11 (100)	14 (54)	3 (25)	0,022
2	7 (27)	7 (30)		0 (0)	9 (35)	5 (42)	
3	0 (0)	7 (30)		0 (0)	3 (11)	4 (33)	
RE^a							
Negativa	3 (12)	1 (5)	0,61	3 (25)	1 (4)	0 (0)	0,06
Positiva	22 (88)	21 (95)		9 (75)	23 (96)	11 (100)	
RP^b							
Negativa	5 (20)	1 (5)	0,19	3 (25)	3 (13)	0 (0)	0,20
Positiva	20 (80)	21 (95)		9 (75)	21 (87)	11 (100)	
Tamanho do tumor (cm)							
≤ 2	12 (44)	7 (32)	0,24	7 (54)	10 (40)	2 (18)	0,15
> 2 e ≤ 5	9 (33)	13 (58)		3 (23)	10 (40)	9 (82)	
> 5	1 (4)	1 (10)		1 (8)	1 (4)	0 (0)	
Multifocais	5 (19)	1 (10)		2 (15)	4 (16)	0 (0)	
Envolvimento ganglionar							
Negativo	16 (64)	14 (67)	0,85	6 (55)	15 (63)	9 (82)	0,37
Positivo	9 (36)	7 (33)		5 (45)	9 (37)	2 (18)	
Gânglios metastizados (n°)							
0	16 (64)	14 (67)	0,69	6 (55)	15 (63)	9 (82)	0,71
1 - 3	7 (28)	5 (24)		4 (36)	7 (29)	1 (9)	
4 - 9	2 (8)	1 (4)		1 (9)	1 (4)	1 (9)	
≥ 10	0 (0)	1 (5)		0 (0)	1 (4)	0 (0)	
Idade (anos)							
≤ 59	17 (63)	7 (32)	0,045	9 (69)	11 (44)	4 (36)	0,21
> 59	10 (37)	15 (68)		4 (31)	14 (56)	7 (64)	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 14- Associações entre a Fração de células em fase S e G₂/M (S+G₂/M) (dividida pela média e pelos percentis de 25 e 75) e as variáveis clínico-patológicas, no grupo dos carcinomas ductais invasores e diplóides de ADN.

Variáveis	Média		p	Percentis			p
	S+G ₂ /M ≤9,8 n (%)	S+G ₂ /M >9,8 n (%)		S+G ₂ /M ≤6,6 n (%)	6,6 < S+G ₂ /M ≤11,8 n (%)	S+G ₂ /M >11,8 n (%)	
Estadio clínico							
I	8 (27)	4 (21)	0,42	5 (38)	6 (25)	1 (8)	0,87
IIA	17 (57)	10 (52)		6 (46)	13 (54)	8 (68)	
IIB	3 (10)	1 (5)		1 (8)	2 (8)	1 (8)	
IIIA	2 (6)	2 (11)		1 (8)	2 (8)	1 (8)	
IIIB	0 (0)	2 (11)		0 (0)	1 (5)	1 (8)	
IV	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Grau histológico							
I	10 (33)	4 (21)	0,65	7 (54)	6 (25)	1 (8)	0,07
II	15 (50)	11 (58)		6 (46)	12 (50)	8 (67)	
III	5 (17)	4 (21)		0 (0)	6 (25)	3 (25)	
Ductos							
1	4 (13)	1 (59)	0,82	1 (7)	3 (12)	1 (9)	0,50
2	7 (23)	4 (21)		6 (43)	3 (12)	2 (18)	
3	19 (63)	14 (74)		7 (50)	18 (76)	8 (73)	
Grau nuclear							
1	5 (17)	3 (16)	0,91	2 (15)	6 (25)	0 (0)	0,44
2	16 (53)	9 (47)		8 (62)	11 (46)	6 (50)	
3	9 (30)	7 (37)		3 (23)	7 (29)	6 (50)	
Número de mitoses							
1	18 (62)	10 (50)	0,34	12 (92)	10 (42)	6 (50)	0,035
2	9 (31)	5 (25)		1 (8)	11 (46)	2 (17)	
3	2 (79)	5 (25)		0 (0)	3 (12)	4 (33)	
RE^a							
Negativa	3 (10)	1 (6)	1,00	1 (8)	3 (13)	0 (0)	0,42
Positiva	26 (90)	17 (94)		11 (92)	20 (87)	12 (100)	
RP^b							
Negativa	5 (17)	1 (6)	0,38	1 (8)	5 (22)	0 (0)	0,16
Positiva	24 (83)	17 (94)		11 (92)	18 (78)	12 (100)	
Tamanho do tumor (cm)							
≤ 2	13 (43)	6 (32)	0,09	7 (54)	9 (38)	3 (25)	0,19
> 2 e ≤ 5	10 (33)	12 (63)		4 (30)	9 (38)	9 (75)	
> 5	1 (4)	1 (5)		1 (8)	1 (4)	0 (0)	
Multifocais	6 (20)	0 (0)		1 (8)	5 (20)	0 (0)	
Envolvimento ganglionar							
Negativo	17 (63)	13 (68)	0,76	8 (73)	14 (61)	8 (67)	0,79
Positivo	10 (37)	6 (32)		3 (27)	9 (39)	4 (33)	
Gânglios metastizados (n°)							
0	17 (63)	13 (68)	0,36	8 (73)	14 (61)	8 (67)	0,84
1 - 3	6 (22)	6 (32)		2 (18)	6 (26)	4 (33)	
4 - 9	3 (11)	0 (0)		1 (9)	2 (9)	0 (0)	
≥ 10	1 (4)	0 (0)		0 (0)	1 (4)	0 (0)	
Idade (anos)							
≤ 59	18 (60)	6 (31)	0,08	9 (69)	12 (50)	3 (25)	0,09
> 59	12 (40)	13 (69)		4 (31)	12 (50)	9 (75)	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 15- Associações entre a Fracção de células em fase S (FFS) (dividida pela média e pelos percentis de 25 e 75) e as variáveis clínico-patológicas, no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneplóides de ADN.

Variáveis	Média		p	Percentis			p
	FFS≤12,1 n (%)	FFS>12,1 n (%)		FFS≤8,4 n (%)	8,4<FFS≤16,3 n (%)	FFS>16,3 n (%)	
Estadio clínico							
I	9 (18)	7 (20)	0,30	5 (24)	5 (12)	6 (29)	0,49
IIA	20 (40)	7 (20)		9 (42)	13 (31)	5 (24)	
IIB	14 (28)	10 (30)		5 (24)	15 (36)	4 (19)	
IIIA	4 (8)	6 (18)		1 (5)	5 (12)	4 (19)	
IIIB	3 (6)	4 (12)		1 (5)	4 (9)	2 (9)	
IV	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Grau histológico							
I	6 (12)	2 (6)	0,64	2 (10)	4 (10)	2 (9)	0,34
II	17 (34)	12 (35)		11 (52)	13 (31)	5 (24)	
III	27 (54)	20 (59)		8 (38)	25 (59)	14 (67)	
Ductos							
1	2 (4)	0 (0)	0,34	0 (0)	2 (5)	0 (0)	0,45
2	8 (17)	9 (24)		2 (10)	9 (23)	6 (26)	
3	37 (79)	28 (76)		19 (90)	29 (72)	17 (74)	
Grau nuclear							
1	2 (4)	0 (0)	0,39	1 (5)	1 (3)	0 (0)	0,70
2	14 (30)	9 (24)		7 (33)	12 (29)	4 (18)	
3	31 (66)	28 (76)		13 (62)	28 (68)	18 (82)	
Número de mitoses							
1	16 (33)	10 (28)	0,65	9 (42)	11 (28)	6 (26)	0,62
2	10 (21)	12 (33)		6 (29)	10 (25)	6 (26)	
3	22 (46)	14 (39)		6 (29)	19 (47)	11 (48)	
RE^a							
Negativa	5 (10)	8 (24)	0,13	3 (15)	5 (12)	5 (24)	0,49
Positiva	43 (90)	26 (76)		17 (85)	36 (88)	16 (76)	
RP^b							
Negativa	13 (27)	9 (26)	0,95	6 (30)	10 (24)	6 (29)	0,88
Positiva	35 (73)	25 (74)		14 (70)	31 (76)	15 (71)	
Tamanho do tumor (cm)							
≤ 2	15 (30)	9 (26)	0,20	8 (38)	8 (19)	8 (38)	0,37
> 2 e ≤ 5	30 (60)	18 (53)		12 (57)	27 (64)	9 (43)	
> 5	2 (4)	6 (18)		0 (0)	5 (12)	3 (14)	
Multifocais	3 (6)	1 (3)		1 (5)	2 (5)	1 (5)	
Envolvimento ganglionar							
Negativo	25 (51)	14 (41)	0,50	12 (60)	18 (43)	9 (43)	0,41
Positivo	24 (49)	20 (59)		8 (40)	24 (57)	12 (57)	
Gânglios metastizados (n°)							
0	25 (51)	14 (41)	0,65	12 (60)	18 (43)	9 (43)	0,72
1 - 3	14 (29)	9 (26)		6 (30)	11 (26)	6 (29)	
4 - 9	6 (12)	7 (21)		1 (5)	8 (19)	4 (19)	
≥ 10	4 (8)	4 (12)		1 (5)	5 (12)	2 (9)	
Idade (anos)							
≤ 59	19 (38)	19 (56)	0,12	5 (24)	20 (48)	13 (62)	0,042
> 59	31 (62)	15 (44)		16 (76)	22 (52)	8 (38)	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 16- Associações entre a Fracção de células em fase S e G₂/M (S+ G₂/M) (dividida pela média e pelos percentis de 25 e 75) e as variáveis clínico-patológicas, no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

Variáveis	Média		p	Percentis			p
	S+ G ₂ /M ≤19,7 n (%)	S+ G ₂ /M >19,7 n (%)		S+G ₂ /M ≤14 n (%)	14 < S+G ₂ /M ≤22,8 n (%)	S+G ₂ /M >22,8 n (%)	
Estadio clínico							
I	10 (21)	6 (16)	0,73	4 (19)	9 (21)	3 (14)	0,97
IIA	15 (32)	12 (33)		8 (38)	13 (21)	6 (29)	
IIB	13 (28)	11 (30)		6 (29)	12 (28)	6 (29)	
IIIA	4 (8)	6 (16)		2 (9)	4 (10)	4 (19)	
IIIB	5 (11)	2 (5)		1 (5)	4 (10)	2 (9)	
IV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (10)	0 (0)		
Grau histológico							
I	6 (13)	2 (5)	0,28	3 (14)	5 (12)	0 (0)	0,10
II	18 (38)	11 (30)		8 (38)	17 (40)	4 (19)	
III	23 (49)	24 (65)		10 (48)	20 (48)	17 (81)	
Ductos							
1	2 (5)	0 (0)	0,36	0 (0)	2 (5)	0 (0)	0,07
2	8 (19)	9 (21)		3 (16)	12 (31)	2 (5)	
3	32 (76)	33 (79)		16 (84)	25 (64)	24 (95)	
Grau nuclear							
1	2 (5)	0 (0)	0,09	1 (5)	1 (2)	0 (0)	0,13
2	15 (36)	8 (19)		8 (40)	13 (32)	2 (9)	
3	25 (59)	34 (81)		11 (55)	27 (66)	21 (91)	
Número de mitoses							
1	18 (43)	8 (19)	0,08	8 (40)	16 (40)	2 (8)	0,11
2	10 (24)	12 (29)		6 (30)	9 (23)	7 (29)	
3	14 (33)	22 (52)		6 (30)	15 (37)	15 (63)	
RE^a							
Negativa	4 (9)	9 (24)	0,07	2 (10)	4 (10)	7 (33)	0,039
Positiva	41 (91)	28 (76)		18 (90)	37 (90)	14 (67)	
RP^b							
Negativa	11 (24)	11 (30)	0,07	5 (25)	9 (22)	8 (38)	0,39
Positiva	34 (76)	26 (70)		15 (75)	32 (78)	13 (62)	
Tamanho do tumor (cm)							
≤ 2	16 (34)	8 (22)	0,66	9 (43)	10 (24)	5 (24)	0,27
> 2 e ≤ 5	25 (53)	23 (62)		11 (52)	25 (59)	12 (57)	
> 5	4 (9)	4 (11)		0 (0)	4 (10)	4 (19)	
Multifocais	2 (4)	2 (5)		1 (5)	3 (7)	0 (0)	
Envolvimento ganglionar							
Negativo	25 (54)	14 (38)	0,19	9 (45)	23 (55)	7 (33)	0,27
Positivo	21 (46)	23 (62)		11 (55)	19 (45)	14 (67)	
Gânglios metastizados (n°)							
0	25 (54)	14 (38)	0,43	9 (45)	23 (55)	7 (33)	0,30
1 - 3	12 (26)	11 (30)		8 (40)	8 (19)	7 (33)	
4 - 9	6 (13)	7 (19)		2 (10)	8 (19)	3 (14)	
≥ 10	3 (7)	5 (13)		1 (5)	3 (7)	4 (19)	
Idade (anos)							
≤ 59	16 (34)	22 (59)	0,028	7 (33)	18 (43)	13 (62)	0,16
> 59	31 (66)	15 (41)		14 (67)	24 (57)	8 (38)	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

Tabela 17- Associações entre a Percentagem média de células em fase S (%Média S) (dividida pela média e pelos percentis de 25 e 75) e as variáveis clínico-patológicas, no grupo dos carcinomas ductais invasores e aneuplóides de ADN.

Variáveis	Média		p	Percentis			p
	%Média S ≤8 n (%)	%Média S >8 n (%)		%Média S ≤5,3 n (%)	5,3 < %Média S ≤10,3 n (%)	%Média S >10,3 n (%)	
Estadio clínico							
I	11 (20)	7 (16)	0,19	5 (19)	9 (18)	4 (16)	0,74
IIA	16 (29)	16 (35)		6 (23)	17 (35)	9 (36)	
IIB	18 (33)	12 (27)		10 (38)	15 (31)	5 (20)	
IIIA	3 (5)	8 (18)		2 (8)	4 (8)	5 (20)	
IIIB	7 (13)	2 (4)		3 (12)	4 (8)	2 (8)	
IV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Grau histológico							
I	5 (19)	3 (7)	0,014	3 (12)	2 (4)	3 (12)	0,29
II	28 (51)	11 (24)		12 (46)	21 (43)	6 (24)	
III	22 (40)	31 (69)		11 (42)	26 (53)	16 (64)	
Ductos							
1	0 (0)	2 (5)	0,13	0 (0)	0 (0)	2 (8)	0,15
2	18 (32)	8 (18)		6 (24)	15 (30)	5 (20)	
3	38 (68)	34 (77)		19 (76)	35 (70)	18 (72)	
Grau nuclear							
1	1 (2)	1 (2)	0,40	1 (4)	0 (0)	1 (4)	0,47
2	18 (31)	8 (19)		8 (33)	11 (22)	7 (28)	
3	38 (67)	34 (79)		15 (63)	40 (78)	17 (68)	
Número de mitoses							
1	24 (43)	8 (18)	0,003	9 (38)	17 (34)	6 (23)	0,33
2	18 (32)	9 (21)		8 (33)	14 (28)	5 (19)	
3	14 (25)	27 (61)		7 (29)	19 (38)	15 (58)	
RE^a							
Negativa	7 (13)	47 (20)	0,41	3 (12)	7 (15)	6 (24)	0,47
Positiva	9 (87)	35 (80)		22 (88)	4 (85)	19 (76)	
RP^b							
Negativa	13 (24)	14 (32)	0,50	5 (20)	16 (33)	6 (24)	0,43
Positiva	41 (76)	30 (68)		20 (80)	32 (67)	19 (76)	
Tamanho do tumor (cm)							
≤ 2	16 (29)	11 (24)	0,026	7 (27)	14 (29)	6 (24)	0,24
> 2 e ≤ 5	33 (60)	25 (56)		14 (54)	29 (59)	15 (60)	
> 5	1 (2)	8 (18)		1 (4)	4 (8)	4 (16)	
Multifocais	5 (9)	1 (2)		4 (15)	2 (4)	0 (0)	
Envolvimento ganglionar							
Negativo	24 (44)	21 (47)	0,84	11 (42)	23 (48)	11 (44)	0,89
Positivo	30 (56)	24 (53)		15 (58)	25 (52)	14 (56)	
Gânglios metastizados (n°)							
0	24 (44)	21 (47)	0,87	11 (42)	23 (48)	11 (44)	0,87
1 - 3	16 (30)	11 (24)		9 (35)	13 (28)	5 (20)	
4 - 9	7 (13)	8 (18)		4 (15)	6 (12)	5 (20)	
≥ 10	7 (13)	5 (11)		2 (8)	6 (12)	4 (16)	
Idade (anos)							
≤ 59	21 (38)	27 (60)	0,030	11 (42)	23 (47)	14 (56)	0,61
> 59	34 (62)	18 (40)		15 (58)	26 (53)	11 (44)	

^aExpressão dos receptores de estrogénio ^bExpressão dos receptores de progesterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Cancer Research Fund., American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition and the prevention of cancer; a global perspective. 1997; 1-670.
2. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339; 974-984.
3. Registo Oncológico da Região Norte (RORENO). Instituto Português de Oncologia 1993; 1-72.
4. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA (A Cancer Journal for Clinicians)* 1997; 47; 1-27.
5. Rosai J. Breast. In *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby. Year Book, Inc. 1996; 1565-1660.
6. Bergers E. Flow cytometry in breast cancer; methodological and clinical aspects (dissertation). Amsterdam: Vrije Universiteit, 1997.
7. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991; 15; 334-349.
8. Sahin AA, Ro J, Ro JY, *et al.* Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 1991; 68; 549-557.
9. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993; 71; 3926-3931.
10. Frierson Jr HF. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas; comparison with clinical and pathological variable. *Mod. Pathol.* 1993; 6; 290-294.
11. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244; 707-712.
12. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, *et al.* Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51; 556-567.

13. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 84; 1109-1117.
14. Allred DC, Clark GM, Elledge R, *et al.* Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85; 200-206.
15. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res.* 1994; 54; 380-385.
16. Klijn JGM, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WLJ, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994; 29; 73-83.
17. Toi M, Osaki A, Yamada H, Toge T. Epidermal growth factor receptor expression as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1991; 27; 977-980.
18. Harris AL, Horak E. Growth factors and angiogenesis in breast cancer. Recent results. *Cancer Res.* 1993; 127; 35-41.
19. van Hoef MEHM, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1993; 29A; 1141-1145.
20. Hedley DW. Breast cancer. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV, eds. *Clinical Flow Cytometry. Principles and Application.* Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993; 247-261.
21. Rabinovitch PS. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV, eds. *Clinical Flow Cytometry. Principles and Application.* Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993; 117-143.
22. Cornelisse CJ, Devilee P, Smit VTHBM. DNA content as a genetic marker of cancer cells. In Bauer KD, Duque RE, Shankey TV, eds. *Clinical Flow Cytometry. Principles and Application.* Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993; 117-143.
23. Shackney SE, Smith CA, Miller BW, *et al.* Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res.* 1989; 49; 3344-3354.
24. Falkmer UG. Methodological aspects on DNA tumors of the breast, the endometrium, the brain, and the salivary glands. In Karolinska Institute and Hospital S, Sweden. ed. 1989; 1-171.

25. Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, *et al.* Prognostic value of DNA ploidy using flow cytometry in 1301 breast cancer patients: results of the prospective Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Mod. Pathol.* 1997; 10; 762-768.
26. Campeljohann RS, Ash CM, Gillett CE, *et al.* The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br. J. Cancer* 1995; 71; 140-145.
27. Coon SC, Paxton H, Lucy L, *et al.* Interlaboratory variation in DNA flow cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1994; 118; 681-685.
28. Coon J, Deitch AD, Vere White RW de, *et al.* Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. *Cancer* 1988; 61; 126-130.
29. Danesi DT, Spano M, Altavista P. Quality control study of the Italian group of cytometry on flow cytometry cellular DNA content measurements. *Cytometry* 1993; 14; 576-583.
30. Fossa SD, Berner A, Waehre H, *et al.* DNA ploidy in cell nuclei from paraffin-embedded material: comparison of results from two laboratories. *Cytometry* 1992; 13; 395-403.
31. Wheelless LL, Coon JS, Cox C, *et al.* Precision of DNA flow cytometry in inter-institutional analysis. *Cytometry* 1991; 12; 405-412.
32. Silvestrini R. Quality control for evaluation of the S-phase fraction by flow cytometry: a multicentric study. The SICCAB Group for quality control of cell kinetic determinations. *Cytometry* 1994; 18; 11-16.
33. Bonsing BA, Beerman H, Kuipers Dijkshoorn N, Fleuren GJ, Cornelisse CJ. High levels of DNA index heterogeneity in advanced breast carcinomas. Evidence for DNA ploidy differences between lymphatic and hematogenous metastases. *Cancer* 1993; 71; 382-391.
34. Kute TE, Gregory B, Galleshaw J, *et al.* How reproducible are flow cytometry data from paraffin-embedded blocks? *Cytometry* 1988; 9; 494-498.
35. Ferrero M, Spyrtos F, Le Doussal V, Desplaces A, Rouesse J. Flow cytometric analysis of DNA content and keratins by using CK7, CK8, CK18, CK19, and KL1 monoclonal antibodies in benign and malignant human breast tumors. *Cytometry* 1990; 11; 716-724.
36. Zarbo RJ, Visscher DW, Crissman JD. Two-color multiparametric methods for flow cytometric DNA analysis of carcinomas using staining for cytokeratin and leukocyte-common antigen. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1989; 11; 391-402.

48. Eskelinen MJ, Pafarinen P, Collan Y, *et al.* Relationship between DNA ploidy and survival in patients with primary breast cancer. *Br. J. Surg.* 1989; 76; 830-843.
49. Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ. DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990; 66; 331-340.
50. Johnson H, Jr., Masood S, Belluco C, *et al.* Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Arch. Surg.* 1992; 127; 1386-1391.
51. Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, *et al.* Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer* 1987; 56; 637-642.
52. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2N0 breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; 93; 471-479.
53. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, *et al.* Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322; 1045-1053.
54. Pfisterer J, Kommos F, Sauerbrei W, *et al.* DNA flow cytometry in node-positive breast cancer. Prognostic value and correlation with morphologic and clinical factors. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1995; 17; 406-412.
55. Merkel DE, Winchester DJ, Goldschmidt RA, August CZ, Wruck DM, Rademaker AW. DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node-negative breast cancer. *Cancer* 1993; 72; 1926-1932.
56. Aasmundstad TA, Haugen OA. DNA ploidy in intraductal breast carcinomas. *Eur. J. Cancer* 1990; 26; 956-959.
57. Baildam AD, Zaloudik J, Howell A, *et al.* DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 1987; 55; 553-559.
58. Bosari S, Lee AKC, Tahan SR, *et al.* DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 1992; 70; 1943-1950.
59. Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988; 61; 420-427.
60. Fisher B, Gunduz N, Costantino J, *et al.* DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABP B-04. *Cancer* 1991; 68; 1465-1475.

61. Kute TE, Muss HB, Cooper MR, *et al.* The use of flow cytometry for the prognosis of stage II adjuvant treated breast cancer patients. *Cancer* 1990; 66; 1810-1816.
62. Kute TE, Quadri Y, Muss H, *et al.* Flow cytometry in node positive breast cancer: Cancer and leukemia group B protocol 8869. *Cytometry (Comm. Clin. Cytometry)* 1995; 22; 297-306.
63. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, *et al.* DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 1990; 61; 671-674.
64. Pinto AE, Andre S, Nogueira M, Mendonca E, Soares J. Flow cytometric DNA hypertetraploidy is associated with unfavourable prognostic features in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 1997; 50; 591-595.
65. Wyss Desserich MT, Caduff Joos R, Wyss P, *et al.* Premenopausal node-negative breast cancer: may adjuvant chemotherapy be indicated by the analysis of nuclear DNA dynamics? *Breast Cancer Res. Treat.* 1997; 42; 253-263.
66. Eskelinen M, Lipponen P, Papinaho S, *et al.* DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. *Int. J. Cancer* 1992; 51; 555-561.
67. Silvestrini R, Daidone MG, Del Bino G, *et al.* Prognostic significance of proliferative activity and ploidy in node-negative breast cancers. *Ann. Oncol.* 1993; 4; 213-219.
68. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, *et al.* Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br. J. Cancer* 1989; 59; 943-947.
69. Ewers SB, Longstrom E, Baldetorp B, Killander D. Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984; 5; 408-419.
70. Haag D, Feichter G, Goertler K, Kaufmann M. Influence of systematic errors on the evaluation of the S-phase portions from DNA distributions of solid tumors as shown for 328 breast carcinomas. *Cytometry* 1987; 8; 377-385.
71. Bergers E, van Diest PJ, Baak JPA. Comparison of five cell cycle analysis models applied to 1414 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast cancer. *Cytometry* 1997; 30; 54-60.

-
72. Muss HB, Kute TE, Case LD, *et al.* The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989; 64; 1894-1900.
 73. Rabinovitch PS. Basic guidelines for DNA content and cell cycle analysis. In Rabinovitch PS, ed. *Multicycle: A program for DNA content and cell cycle analysis*. Tucson: The Shy Flowers of K-OS UnLtd, Inc. 1991; 3.1-3.33.
 74. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Reproducibility of semi-automated cell cycle analysis of flow cytometric DNA-histograms of fresh breast cancer material. *Anal. Cell Pathol.* 1995; 8; 1-13.
 75. Bergers E, Montironi R, van Diest PJ, Prete E, Baak JPA. Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometric DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases. *Hum. Pathol.* 1996; 27; 553-560.
 76. Bergers E, Baak PJA, van Diest PJ, *et al.* Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1,301 breast cancer patients: results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project (MMMCP). *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1997; 74; 260-269.
 77. Kallioniemi OP, Visakorpi T, Holli K, Isola JJ, Rabinovitch PS. Automated peak detection and cell cycle analysis of flow cytometric DNA histograms. *Cytometry* 1994; 16; 250-255.
 78. Clark GM, Mathieu M, Owens MA, *et al.* Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10; 428-432.
 79. American Joint Committee on Cancer. Breast. In *AJCC - Cancer Staging Manual*. Philadelphia, New York: Lippincott - Raven, 1997; 171-180.
 80. Page DL, Anderson TJ, Sakamoto G. Infiltrating carcinoma: major histological types. In Page DL, Anderson TJ, eds. *Diagnostic histopathology of the breast*. London: WB Saunders, 1987; 193-235.
 81. Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ, eds. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987; 300-311.
 82. Camplejohn RS. The measurement of DNA content, alone or combined with other markers. In Macey MG, ed. *Flow cytometry. Clinical applications*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994; 215-236.
 83. Deitch AD, Law H, White RD. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *J Histochem. Cytochem.* 1982; 30; 967-972.
-

84. Kallioniemi OP, Visakorpi T, Holli K, Heikkinen A, Isola J, Koivula T. Improved prognostic impact of S-phase values from paraffin-embedded breast and prostate carcinomas after correcting for nuclear slicing. *Cytometry* 1991; 12; 413-421.
85. Rabinovitch PS. DNA content and cell cycle analysis software. In *MultiCycle AV, advanced version. Manual*. San Diego, CA: Phoenix Flow Systems, 1994; 3.27-3.28.
86. Romero H, Schneider J, Burgos J, Bilbao J, Rodriguez-Escudero FJ. S-phase fraction identifies high-risk subgroups among DNA-diploid breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996; 38; 265-275.
87. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material. Correlations between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. MMMCP Collaborative Group. Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project Collaborative Group. *Cancer* 1996; 77; 2258-2266.
88. Stuart-Harris R, Hedley DW, Taylor IW, Levene AL, Smith IE. Tumour ploidy, response and survival in patients receiving endocrine therapy for advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* 1985; 51; 573-576.
89. Stal O, Wingren S, Carstensen J, *et al.* Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variable in primary breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1989; 25; 301-309.
90. Kute TE, Muss HB, Hopkins M, Marshall R, Case D, Kammire L. Relationship of flow cytometry results to clinical and steroid receptor status in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1985; 6; 113-121.
91. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer - a study with long-term follow-up. *Br. J. Cancer* 1989; 60; 693-700.
92. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, *et al.* Flow cytometry in primary breast cancer: improving the prognostic value of the fraction of cells in the S-phase by optimal categorisation of cut-off levels. *Br. J. Cancer* 1990; 62; 786-790.
93. Cufer T, Lamovec J, Bracko M, Lindtner J, Us Krasovec M. Prognostic value of DNA ploidy in breast cancer stage I-II. *Neoplasma* 1997; 44; 127-132.
94. Christov K, Milev A, Todorov V. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. *Cancer* 1989; 64; 673-679.

95. Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB, Sickle-Santanello B, DeCenzo J, Young D. Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer* 1990; 65; 1577-1582.
96. Thorud E, Fossa SD, Vaage S, *et al.* Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer* 1986; 57; 808-811.
97. Frierson HF. Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. *Hum. Pathol.* 1993; 24; 24-29.
98. Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Kerndrup GB, Hansen B, Andersen JA. DNA aneuploidy in early breast cancer. *Br. J. Cancer* 1995; 72; 832-839.
99. Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, *et al.* Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* 1997; 75; 1525-1533.
100. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, *et al.* Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320; 627-633.
101. Hennekens CH, Buring JE. Epidemiology in Medicine. In Boston/Toronto: Little, Brown and Company, 1987; 1-383.
102. Kimmig R, Spelsberg H, Kapsner T, Untch M, Hepp H. Flow cytometric DNA analysis of breast cancer by two colour method using cytokeratin labeling for identification of tumour cells. *Anal. Cell Pathol.* 1994; 7; 205-215.
103. van der Linden JC, Herman CJ, Boenders JGC, van der Sandt MM, Lindeman J. Flow cytometric DNA content of fresh tumor specimens using keratin-antibody as second stain for two-parameter analysis. *Cytometry* 1992; 13; 163-168.
104. Wingren S, Stal O, Nordenskjold B. Flow cytometric analysis of S-phase fraction in breast carcinomas using gating on cells containing cytokeratin. *Br. J. Cancer* 1994; 69; 546-549.
105. Wingren S, Stal O, Sullivan S, Brisfors A, Nordenskjold B. S-phase fraction after gating on epithelial cells predicts recurrence in node-negative breast cancer. *Int. J. Cancer* 1994; 59; 7-10.
106. Wingren S, Stal O, Carstensen J, Sun XF, Nordenskjold B. S-phase determination of immunoselected cytokeratin-containing breast cancer cells improves the prediction of recurrence. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994; 29; 179-187.

107. Visscher DW, Wykes S, Zarbo RJ, Crissman JD. Multiparametric evaluation of flow cytometric synthesis phase fraction determination in dual-labelled breast carcinomas. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1991; 13; 246-252.
108. Frei JV, Martinez VJ. DNA flow cytometry of fresh and paraffin embedded tissue using cytokeratin staining. *Mod. Pathol.* 1993; 6; 599-605.

ESTUDOS FUTUROS

ESTUDOS FUTUROS

Os resultados obtidos pelo presente trabalho, sugerem a realização de diversos estudos, nomeadamente:

- Prosseguir a avaliação do conteúdo de ADN em novos casos de carcinoma da mama, de forma a aumentar a série em estudo. Este aumento do número de casos, após “follow-up” adequado, permitirá avaliar correctamente o valor prognóstico do conteúdo de ADN, em termos de sobrevivência global e livre de doença, de forma estratificada, por exemplo, para o estadio ou envolvimento ganglionar axilar. Esta análise possibilitará uma melhor identificação de cada um dos subgrupos de doentes associados a diferente prognóstico, auxiliando na escolha da estratégia terapêutica a utilizar. Os casos sem envolvimento ganglionar axilar (N_0) constituem um dos subgrupos onde é maior a necessidade de critérios adicionais que identifiquem os doentes associados a alto risco. Outros grupos com interesse são os tumores diplóides de ADN com valores de fase S elevados e os aneuplóides de ADN com Índices de ADN baixos e valores de fase S altos.
- Estudar de forma complementar aos parâmetros analisados por citometria, a expressão de oncogenes, genes supressores tumorais, factores de crescimento e indicadores de proliferação, referidos como potenciais factores de prognóstico para o carcinoma da mama: são exemplos o HER2/neu (c-erbB-2), as ciclinas D1 e E, o p53, o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), a Bromodeoxiuridina (BrdU) e o Ki67. Esta análise multiparamétrica possibilitará uma base científica mais completa para a avaliação do prognóstico e para a optimização da terapia a utilizar em cada doente.
- Determinar a influência, no cálculo da fase S, do valor mínimo de células aneuplóides que deverá estar presente no histograma. Deverão ser

experimentadas formas de superar as possíveis limitações dos programas de análise através, por exemplo, da avaliação de um maior número de células.

- Ensaiar o estudo do conteúdo de ADN recorrendo a técnicas de dupla marcação citoqueratinas/ADN. A influência desta metodologia deverá ser avaliada quer ao nível do valor prognóstico da fase S, em especial nos tumores diplóides de ADN, quer na detecção de pequenas populações aneuplóides. Relativamente a esta questão relacionada com a representatividade tumoral, poderão ser experimentados, paralelamente, os sistemas de separação e selecção magnética de células epiteliais.

- Validar os resultados do estudo do conteúdo de ADN por citometria de imagem, quer ao nível de citologias obtidas por biópsia aspirativa, quer em cortes histológicos, através dos resultados encontrados na avaliação por citometria de fluxo.

- Realizar estudos como o presente trabalho, com doentes desta Instituição e utilizando métodos padronizados, ao nível de outras neoplasias, em especial naquelas em que o conteúdo de ADN tem sido referido como potencial factor prognóstico.