

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL



Tese de Mestrado em Patologia

ANÁLISE DE DNA POR CITOMETRIA ESTÁTICA EM CARCINOMAS DE
MAMA. PARÂMETROS DE PLOIDIA RELACIONADOS COM FATORES
PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS, PROLIFERAÇÃO CELULAR,
RECEPTORES DE ESTRÓGENO E P53.

MÁRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA FERREIRA

Fortaleza – Ceará
1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Biblioteca de Ciências da Saúde

FC-00002624-5

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL



Tese de Mestrado em Patologia

ANÁLISE DE DNA POR CITOMETRIA ESTÁTICA EM CARCINOMAS DE
MAMA. PARÂMETROS DE PLOIDIA RELACIONADOS COM FATORES
PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS, PROLIFERAÇÃO CELULAR, RECEPTORES
DE ESTRÓGENO E p53.

MÁRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA FERREIRA

ORIENTADORES:

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Fernando Carlos Schmitt
Universidade Estadual de Botucatu – UNESP – São Paulo

Prof. Dr. Manuel Sobrinho-Simões
Inst. de Patologia e Biologia Molecular da Univ. do Porto – IPATIMUP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL



ANÁLISE DE DNA POR CITOMETRIA ESTÁTICA EM CARCINOMAS DE
MAMA. PARÂMETROS DE PLOIDIA RELACIONADOS COM FATORES
PROGNÓSTICOS CLÁSSICOS, PROLIFERAÇÃO CELULAR, RECEPTORES
DE ESTRÓGENO E P53.

MÁRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA FERREIRA

Tese de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia, tendo como examinadores os professores: Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira, Dr. Sérgio Ferreira Juaçaba e Dr. Manuel Sobrinho-Simões.

Fortaleza
Universidade Federal do Ceará
1995

A realização deste trabalho só foi possível graças ao valioso apoio do Instituto do Câncer do Ceará, da Maternidade Escola Assis Chateaubriand e do Instituto de Patologia e Biologia Molecular da Universidade do Porto – Portugal

Agradecimentos

Àos senhores membros do Instituto do Câncer do Ceará, Prof. Dr. Haroldo Juaçaba, Prof. Eilson Goes de Oliveira, Prof. Dr. Marcelo Gurgel Carlos da Silva.

Ào Diretor da Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Prof. Dr. Francisco das Chagas Oliveira.

Ào Chefe do Serviço de Mastologia da MEAC, Prof. Dr. Sérgio Juaçaba.

Àos meus orientadores, Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira, Prof. Dr. Fernando Carlos Schmitt e Prof. Dr. Manuel Sobrinho-Simões.

Ào Diretor do Instituto de Patologia e Biologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Prof. Dr. Manuel Sobrinho-Simões.

Ào Diretor do Instituto Português de Oncologia, Prof. Dr. Carlos Lopes.

Ào Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Meneses.

Àos colegas do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)

Àos técnicos do DPML-UFC e do IPATIMUP

Àos funcionários da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, especialmente, a Mônica Correia Aquino.

Ào Sr. Francisco José Moreira Lopes.

Àos meus familiares.

Ào Alberto Flávio.

Sumário

SIGLAS	8
FIGURAS E TABELAS	9
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	11
Incidência e mortalidade	11
Ciclo celular	12
Ploidia	13
Medição da ploidia	13
Ploidia no carcinoma mamário	15
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Pacientes e tumores	18
Avaliação histológica	18
Citometria estática	18
Estudo imunohistoquímico	22
ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
RESULTADOS	25
Pacientes e tumores	25
Ploidia	29
Proliferação celular	36
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	44
SUMMARY	45
ANEXO I – Classificação de Bloom-Richardson	46
ANEXO II – Reagente de Schiff	48
ANEXO III – Histogramas de Auer	50
ANEXO IV – Parâmetros Clínico-Patológicos	52
ANEXO V – Parâmetros de Ploidia	54
ANEXO VI – Histogramas de DNA	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Siglas

BSA:	Solução de Albumina Bovina
CDI(s):	Carcinomas Ductais Infiltrantes
DAB:	Diaminobenzidina
DNA:	Ácido Desoxiribonucléico
G ₀ :	Fase de repouso do ciclo celular
G ₁ :	Fase de entrada no ciclo celular
HE:	Coloração por Hematoxilina e Eosina
HCl:	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrogênio
N ₂ S ₂ O ₅ :	Metabissulfito de Sódio
M:	Fase de mitose do ciclo celular
M:	Unidade de medida molar
MIB-1:	Anticorpo monoclonal marcador de proliferação celular
μl:	1/1000 do mililitro
μm:	1/1000 do milímetro
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PBS:	Solução salina tamponada fosfatada
p53:	Proteína de 53Kd codificada pelo anti-oncogene p53 localizado no braço curto do cromossoma 17
RE:	Receptor de estrógeno
S:	Fase de síntese do ciclo celular
TBS:	Solução salina tamponada à base de Tris(Hidroximetil-aminometano)
X ² :	Medida de variância estatística
2c:	Duas vezes 23 cromossomos
4c:	Quatro vezes 23 cromossomos

Figuras e Tabelas

Fig. 1	12
Fig. 2a.....	21
Fig. 2b	21
Fig. 3	21
Fig. 4a.....	26
Fig. 4b	26
Fig. 5a.....	27
Fig. 5b	27
Fig. 6a.....	28
Fig. 6b	28
Fig. 7a.....	32
Fig. 7b	32
Fig. 8a.....	33
Fig. 8b	33
Fig. 9a.....	37
Fig. 9b	37
Fig. 10	36
Fig. 11-14	38
Tabela 1	25
Tabela 2.....	29
Tabela 3.....	30
Tabela 4.....	34
Tabela 5.....	35
Tabela 6.....	40

Resumo

Evidências substanciais sugerem que o conteúdo anormal de DNA das células tumorais correlaciona-se com a agressividade biológica e pode oferecer informações prognósticas.

Para avaliar o conteúdo de DNA nuclear foram estudados 30 casos de carcinomas ductais infiltrantes da mama feminina, pelo método da citometria estática usando o programa ACAS-3. A ploidia foi avaliada pela taxa de células excedendo 2,5c, taxa de células excedendo 5c e Histogramas de Auer e confrontada com o tamanho do tumor, grau histológico, componentes da classificação de Bloom e Richardson, receptores estrogênicos (RE) e expressão da proteína do anti-oncogene p53. Além disso, pesquisou-se a capacidade do programa ACAS-3 em medir a proliferação celular, a qual foi avaliada pela taxa de células excedendo 2,5c e taxa de células em fase S. Ambas as taxas foram comparadas com o índice mitótico e um marcador molecular de proliferação celular (MIB-1).

A aneuploidia associou-se significativamente com a gradação microscópica, com a formação tubular, o pleomorfismo nuclear, com os receptores de estrógenos e a expressão da proteína do anti-oncogene p53. Não houve associação estatisticamente significativa entre a aneuploidia, idade da paciente, tamanho do tumor, metástases axilares e índice mitótico.

Não ocorreu associação entre a taxa de células excedendo 2,5c e taxa de células em fase S com o índice mitótico e o MIB-1.

Concluiu-se que a citometria estática é uma técnica prática e viável para quantificar o DNA nuclear em casos de carcinomas mamários processados rotineiramente e que a ploidia é um importante indicador prognóstico que poderia ser associado aos parâmetros morfológicos clássicos de prognóstico em câncer de mama. Esta técnica utilizando o programa ACAS-3 não é capaz de analisar a proliferação celular.

Introdução

INCIDÊNCIA E MORTALIDADE

O câncer de mama apresenta altas taxas de incidência e mortalidade na população feminina, constituindo-se em um problema de saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) avaliando dados de registros de câncer de mama de base populacional de vários países de diferentes continentes mostrou que nas décadas de 60 e 70 houve um aumento de 10 vezes na taxa de incidência desta neoplasia ⁽⁹²⁾. A OMS estima que no período de 1975 a 2000 o número de casos de câncer de mama aumentará em 14,5% nos países desenvolvidos e 63% nos países em desenvolvimento ⁽¹¹⁹⁾.

O Brasil apresenta taxas de câncer de mama próximas às encontradas nos países em desenvolvimento ^(92, 102). A maior incidência se verifica em Porto Alegre (76,2 por 100 mil mulheres), seguida de São Paulo (65,5 por 100 mil mulheres) e depois Fortaleza (61,6 por 100 mil mulheres). É o mais freqüente tipo de câncer na população feminina de Porto Alegre e São Paulo, enquanto em Fortaleza segue-se ao do colo uterino ⁽¹⁰²⁾.

No Brasil há uma expectativa de aumento das taxas de mortalidade por câncer e isto se dará especialmente em função dos cânceres de pulmão e mama ⁽¹⁰²⁾. O câncer de mama já representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina de Porto Alegre e São Paulo e a segunda em Fortaleza e Recife ⁽⁹²⁾.

Fortaleza ⁽¹⁰²⁾ é a cidade do Nordeste Brasileiro com maior incidência de câncer de mama e sua taxa se aproxima daquelas das regiões mais desenvolvidas do país. Surge então a necessidade de um estudo mais aprofundado de nossos casos na perspectiva de uma melhor compreensão desta realidade e de propor uma melhor abordagem patológico-clínico-terapêutico que possa ter utilidade prática de rotina dentro de nosso contexto sócio-econômico.

Em um estudo prévio feito no Departamento de Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC), abrangendo o período 1970-1990, verificou-se que ocorreu um aumento do número global de casos de câncer de mama (incremento de 1,7); dos 626 casos de câncer levantados, 33% ocorreram na faixa etária de 23-44 anos; um pico foi verificado entre 45-65 anos (46,9%) e 19,8% após o 65 anos ⁽⁵³⁾.

Uma outra questão epidemiológica do momento é quanto ao acometimento do câncer de mama em faixa etária cada vez mais jovem ⁽¹¹⁹⁾. Um estudo clássico feito pelo Columbia-Presbyterian Medical Center com 6.000 casos durante 50 anos mostrou que apenas 1,2% dos cânceres de mama feminino ocorreram entre 20 a 29 anos: em contraste, em Fortaleza ⁽⁵²⁾ (696 casos em 30 anos) e Porto Alegre ⁽⁹⁴⁾ (2.984 casos em 14 anos), as taxas foram de 2,9% (2,4 vezes maior) e 3,2% (2,6 vezes maior), respectivamente.

Existe uma necessidade crescente de encontrar parâmetros em tumores malignos que possam ser preditivos do seu curso clínico ⁽⁶²⁾. No câncer de mama o fator prognóstico mais importante é o envolvimento dos gânglios linfáticos axilares ⁽⁵⁴⁾. No entanto, o tamanho do tumor ^(57, 153), o grau histológico e nuclear ⁽⁵⁶⁾ e a expressão dos receptores estrogênicos ^(31, 85), juntamente com os gânglios axilares são os fatores comumente usados na previsão do curso clínico da doença ⁽⁶³⁾.

Mais recentemente, métodos novos e mais sofisticados têm sido investigados para identificar fatores prognósticos adicionais, tais como: marcadores de proliferação celular, expressão de fatores de crescimento celular, oncogenes, proteínas de invasividade tumoral, proteínas de resposta ao stress, genes anti-metastáticos, ploidia, dentre muitos outros.

CICLO CELULAR

De acordo com o modelo do ciclo celular as células somáticas humanas duplicam sua massa de cromossomos (correspondente a 46 cromossomos) durante o ciclo celular. As células humanas em repouso estão na fase G_0/G_1 do ciclo celular, quando entram em replicação apresentam síntese de DNA e movem-se de G_0/G_1 para G_2/M . (Fig. 1) Na fase G_0/G_1 apresentam quantidades habituais de DNA ($2c = 2$ pares de cromossomos, isto é, 46 cromossomos na espécie humana) e na fase G_2/M duplicam esta quantidade ($4c$). As células entre $2c$ e $4c$ são sugestivas de estarem na fase de síntese de DNA, período chamado de fase S. A definição de ploidia se aplica à célula diplóide humana normal ($2c$ ou $4c$) e aneuploidia às que mostram quantidades anormais de DNA, diferindo para mais ou para menos do padrão normal ⁽⁴⁵⁾.

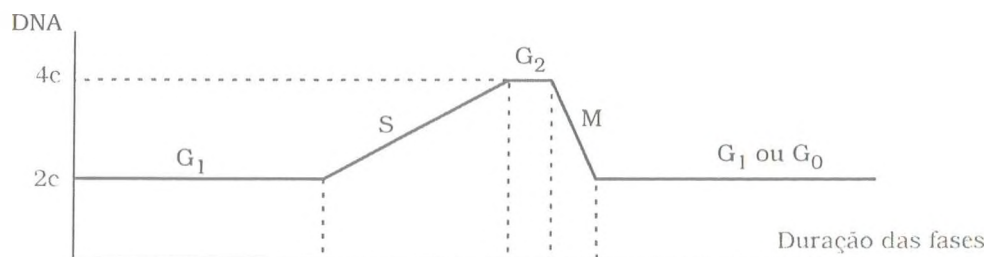


Fig. 1 - Fases do Ciclo Celular
(Retirado das anotações do prof. Regateiro - Porto-Portugal)

PLOIDIA

Substanciais evidências sugerem que o conteúdo anormal de DNA das células tumorais de diferentes tipos de tumores correlacionam-se com a agressividade biológica e pode fornecer informação prognóstica ^(2, 6, 7, 8, 23, 26, 38, 49, 51, 65, 74, 81, 86, 103, 108, 116, 136, 161). Além disso, a ploidia pode ser usada no diagnóstico cito e histológico nos casos em que é necessária informação adicional para distinguir entre lesão benigna e maligna, como por exemplo, no carcinoma de pequenas células do pulmão, cujas células são de difícil distinção de linfócitos normais. Nestes casos que apresentam dificuldades morfológicas, o padrão de distribuição da ploidia pode oferecer informação diagnóstica decisiva ⁽¹²⁾.

Muitos investigadores têm mostrado pronunciada diferença entre a quantidade de DNA do tecido normal e a dos tumores malignos, apesar de existirem tumores malignos com conteúdo de DNA semelhante ao encontrado em células normais ⁽²³⁾.

A razão porque tumores aneuplóides são mais malignos que os diplóides permanece por ser esclarecida ⁽¹²⁾. No modelo recentemente proposto por Giaretti a aneuploidia ocorre por perda da divisão celular simétrica, implicando em diferentes conteúdos de DNA para as células filhas. De acordo com este modelo de aneuploidização, ocorreriam inicialmente células aneuplóides perto do pico diplóide (hipodiplóide) com posterior tetraploidização e sequentes divisões anormais. Este modelo é apoiado pela alta percentagem de células hipodiplóides em lesões precursoras de malignidade ⁽⁶⁴⁾. Os tumores aneuplóides apresentam alto grau de instabilidade do genoma dentro da população tumoral, levando à geração de clones com capacidades biológicas heterogêneas dependentes do desequilíbrio cromossômico com provável perda de genes inibidores do crescimento e diferenciação celular (anti-oncogenes) e/ou ganho de genes indutores do crescimento celular (oncogenes) ⁽⁶⁴⁾. Portanto, a aneuploidia, sob este ponto de vista, seria um indicador de instabilidade genética e funcionaria como um pré-requisito para a rápida progressão da neoplasia ⁽¹²⁾. Observações experimentais do carcinoma escamoso brônquico, do colo uterino e do carcinoma de mama mostram que as lesões precursoras exibem significativas alterações do conteúdo de DNA nuclear ^(11, 110, 111, 132, 134).

MEDIÇÃO DA PLOIDIA

Citometria é um termo introduzido a cerca de cinquenta anos para procedimentos que detectam quantitativamente substâncias em sua localização biológica natural ⁽⁴⁵⁾. Tem sido de valor especial na elucidação dos

diferentes conteúdos celulares, como ácidos nucleicos, proteínas e diferentes organelas ⁽¹²⁾. O método requer o emprego de substâncias diferentes com a capacidade de reagir com os diversos constituintes biológicos ⁽¹²⁾. Citometria de DNA é um termo reservado para a medida de distribuição de DNA de células normais, hiperplásticas, displásticas e neoplásticas ⁽⁴⁵⁾.

O passo inicial para o desenvolvimento da citometria foi a descoberta da existência do núcleo celular em 1868 por Miescher. Em 1924 Feulgen desenvolveu o método de coloração histoquímica do DNA, utilizado até hoje. O princípio básico desta coloração é a ligação covalente e específica do reagente de Schiff ao DNA. Em 1984, Sandritter anunciou que o conteúdo de DNA haplóide, diplóide e tetraplóide do núcleo celular corresponde à razão de 1:2:4, de pares de cromossomos, respectivamente ⁽⁴⁵⁾.

O primeiro método a ser usado para a estimativa do conteúdo de DNA foi a microespectrofotometria estática pela coloração de Feulgen em *imprints* ⁽⁶⁸⁾. Nas últimas décadas a construção de tubos fotomultiplicadores, analisadores de múltiplos canais e modernos processos computadorizados levaram ao desenvolvimento da citometria de fluxo, que usa técnicas hidrodinâmicas para focar partículas em meio de suspensão passando por um *laser* ⁽⁴⁵⁾. A partir de então a citometria de fluxo foi o método mais frequentemente usado para medir o DNA. Mais recentemente, os avanços tecnológicos na análise computadorizada de imagens permitiram um grande desenvolvimento da citometria estática ^(9, 19, 27, 32, 36, 39, 42, 62, 89, 106, 152).

O princípio físico da citometria estática é baseado na lei de Lambert-Beer: “a intensidade de luz que passa através de uma substância diminui exponencialmente com a espessura, e a penetração de um raio através de uma solução, expressa como extinção (ou logaritmo negativo de transmissão) é linearmente dependente da espessura e concentração das substâncias dissolvidas.” Se o volume é conhecido, a quantidade de substância absorvendo os raios pode ser determinada. A análise é feita pela medida da transmissão de luz (ou emissão, no caso de fluorescência) por *pixel* ou *scanning point* transformando estes valores em valores representativos da densidade local do material e integrando sobre o campo ocupado pela partícula (em geral, núcleos celulares). A quantidade de DNA de uma amostra, baseado neste princípio é a somatória da densidade ótica de cada núcleo corado e representado sob a forma de histograma ⁽¹²⁹⁾. A resolução e a precisão da medida são descritas pelo coeficiente de variação (CV) do pico G_0/G_1 da amostra analisada. As células em proliferação, isto é, em síntese de DNA, (fase S ou fração de células em fase S) podem ser estimadas por modelos matemáticos.

A citometria de fluxo tem a capacidade de analisar milhares de células rapidamente com elevado poder de resolução ^(12, 129). Entretanto, analisa todas as células que estão na amostra porque o método não permite a

seleção apenas das células tumorais, a não ser que esteja associado à imunomarcção para selecionar as diferentes populações celulares. A citometria estática apesar de utilizar menor número de células e ter menor poder de resolução, permite, por sua vez, a visualização das células a serem medidas em cortes histológicas e em citologia no momento do exame, podendo dessa forma selecionar as células tumorais ^(12, 129).

Uma questão que se impõe é quanto à concordância das técnicas de citometria de fluxo e citometria estática frente a tipos diferentes de preparações dos espécimens. Estudos comparativos de ploidia determinada por citometria estática de fluxo têm demonstrado uma concordância entre as duas técnicas de 85 a 95% quando se usa material em citologia para determinação em citometria estática; esses valores caem para 75% quando se usam secções histológicas ^(19, 33, 62, 68, 88, 128).

A citometria de fluxo e estática são dois métodos diferentes de medida de DNA. Ambas apresentam vantagens e desvantagens inerentes à própria técnica. O uso simultâneo de ambas as técnicas pode fazer um balanço entre as dificuldades e facilidades de cada um dos métodos ^(45, 68). A combinação da citometria estática e de fluxo é altamente recomendada. Quando entretanto a possibilidade de aplicá-las mutuamente é limitada, a citometria estática com um moderno citofotômetro computadorizado é o método de escolha ^(9, 26, 38, 44, 61, 87, 103), pois tem demonstrado algumas vantagens importantes em relação à citometria de fluxo ^(26, 38, 87, 103, 127).

- menor custo financeiro
- capacidade para analisar espécimens muito pequenos
- detectar raras células aneuplóides
- classificar populações celulares de acordo com o seu tipo morfológico.

PLOIDIA NO CARCINOMA MAMÁRIO

Atkin foi o primeiro a associar hiperplóidia com redução de sobrevida em pacientes com câncer de mama ⁽⁷⁾. O interesse tornou-se ainda maior pela incessante procura de fatores prognósticos em câncer de mama invasivo com gânglios axilares negativos em que a terapêutica é variável ^(18, 24, 30, 34, 37, 55, 60, 76, 90, 91, 95, 96, 97, 114, 118, 127, 137, 146, 158, 159).

Muitos estudos têm sido publicados em anos recentes comparando a ploidia com importantes parâmetros clínicos no câncer de mama, tanto em

pacientes com gânglios axilares metastatizados, quanto em pacientes sem envolvimento ganglionar. Entretanto, existe variabilidade de resultados, provavelmente devido a diferenças de métodos e técnicas e, principalmente, quanto ao tempo de observação clínica ⁽¹²⁸⁾. O ponto de maior questão é saber se a ploidia pode fornecer informação prognóstica independente em relação à sobrevida e recorrência da doença ^(20, 41, 69, 70, 78, 84, 109, 115, 138, 144, 150). Apesar de algumas discordâncias de resultados, muitos trabalhos mostram que a ploidia é um importante fator de agressividade tumoral. Numerosas outras publicações têm demonstrado a correlação entre o conteúdo de DNA e o comportamento clínico em câncer de mama ^(8, 10, 12, 13, 16, 18, 24, 30, 34, 37, 47, 48, 60, 61, 76, 80, 90, 91, 95, 100, 113, 114, 118, 127, 135, 137, 146, 159, 160).

Estudos de carcinoma de mama têm sugerido a correlação entre o conteúdo de DNA das células neoplásicas e o tempo de sobrevida ^(10, 12, 13). Detalhada determinação citofotométrica de padrões de distribuição de DNA em câncer de mama de pacientes que sobreviveram cinco e dez anos mostraram padrões de DNA comparáveis àqueles das células diplóides ou tetraplóides normais ⁽¹³⁾. Em contraste a maioria dos cânceres de mama de pacientes que morreram dentro de dois anos após o diagnóstico, tiveram distribuição de DNA aneuplóide ⁽¹³⁾.

Um estudo de 409 cânceres de mama invasivos com acompanhamento clínico de 8 e 13 anos mostrou que o conteúdo de DNA oferece informação prognóstica adicional quando associado a outras variáveis clínicas e histopatológicas, estando correlacionado por exemplo com o grau histológico ⁽⁴⁶⁾.

Numerosos outros estudos apoiam o ponto de vista de que o valor da informação prognóstica obtida pela medida do DNA depende de outros parâmetros clínicos e histopatológicos convencionais, não sendo portanto, um fator prognóstico independente. Auer e colaboradores utilizando um sistema próprio de classificação dos histogramas obtidos por citometria estática demonstraram que determinados padrões de aneuploidia podem prever a sobrevida média das pacientes como um fator prognóstico independente ⁽¹³⁾.

Objetivos

Tendo em vista que o câncer de mama feminino apresenta altas taxas de incidência e mortalidade e que Fortaleza é a terceira capital em incidência desse tipo de câncer, além da necessidade de maiores estudos no entendimento da ploidia como fator de prognóstico, propõe-se a análise desta neoplasia sob o ponto de vista da ploidia através da citometria estática.

A ploidia será confrontada com parâmetros clínico-patológico de câncer de mama já bem estabelecido quanto ao seu valor prognóstico, a saber:

- tamanho do tumor
- grau histológico
- receptores de estrógenos (RE)
- expressão de proteína do anti-oncogene p53

Além disto, a ploidia será avaliada quanto a cada componente da classificação de Bloom e Richardson.

Ademais, será avaliado a eficácia da citometria estática em medir proliferação celular através da comparação dos resultados com outros métodos de medida de proliferação celular, tais como:

- índice mitótico
- expressão de um marcador de proliferação celular (MIB -1)

Materiais e Métodos

PACIENTES E TUMORES

Amostras de tecidos de câncer mamário dos tipos ductais infiltrantes de 30 pacientes do sexo feminino foram obtidas dos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC) no período compreendido entre 1970 a 1990, representativas das faixas etárias e com o mínimo de dados epidemiológicos, clínicos e patológicos.

O tamanho do tumor, o tipo e grau histológico e o envolvimento dos gânglios linfáticos axilares foram avaliados.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foram realizados cortes histológicos de 5 μ m de espessura a partir de blocos de parafina de material previamente fixado em formalina. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e a classificação histológica foi feita, independentemente, por dois patologistas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). A gradação microscópica obedeceu aos parâmetros de Bloom e Richardson ⁽²²⁾ (Anexo I).

CITOMETRIA ESTÁTICA

A técnica da citometria estática foi feita a partir de seções de 4 μ m de espessura de blocos de parafina dos casos de carcinomas ductais infiltrantes (Fig. 2a) e colocados em lâminas com gelatina que permaneceram na estufa a 37 °C durante uma noite. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de Feulgen da seguinte forma: ⁽¹²⁹⁾

- desparafinização e hidratação;
- fixação em formol aquoso tamponado a 4%, pH = 7, durante 15 horas na geladeira a 4 °C;
- lavagem em água destilada;
- hidrólise ácida com HCl 5 N à temperatura ambiente durante uma hora;

- lavagem em água destilada;
- transferência das lâminas para cubetas novas, secas e envolvidas com papel alumínio para evitar que o reagente de Schiff entrasse em contacto com a luz e umidade;
- coloração com reagente de Schiff (Anexo II) à temperatura ambiente em câmara escura durante 2 horas e 15 minutos;
- preparação da solução $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sigma S-1516: 3 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 570 ml de água destilada, 30 ml de HCl 1 N; agitado e misturado no vórtex);
- lavagem das lâminas em água destilada por três vezes;
- lavagem com solução $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ por três vezes durante 10 minutos cada vez;
- lavagem em água corrente durante 5 minutos;
- lavagem em água destilada;
- desidratação;
- montagem da lâmina com entellan. Depois de feita as lâminas foram armazenadas em caixa escura na geladeira a 4 °C até o momento da leitura.

Para medição do DNA foi utilizado o sistema "Ahrens Image System" (Bargnheibe-Hamburg, Germany). O sistema constitui-se de um microscópio ótico (Nikon), uma câmera de vídeo (CCD-Panasonic-500), um microcomputador (IBM) e o programa ACAS-3 (Fig. 3). A leitura foi feita com objetiva de 40X e contados 200 núcleos de células cancerosas. O processo de medição ocorreu da seguinte forma ⁽¹²⁹⁾:

- Posicionou-se o núcleo a ser medido em relação ao detector, escolhendo-se um campo microscópico onde os núcleos estivessem separados, representados em sua totalidade e não sobrepostos.
- Fixou-se a imagem deste campo na tela do computador
- Os detectores do computador mediram a intensidade de luz de cada núcleo contado.
- Os sinais luminosos foram convertidos pelo computador em formas numéricas.
- As informações foram acumuladas no computador sob a forma de pontos e transformadas em gráficos.
- Após a medição das 200 células os valores obtidos foram arma-

zenados em um arquivo de banco de dados e representados em histogramas que mostravam a quantidade de células e o parâmetro medido, no caso, o conteúdo de DNA.

O controle da coloração de Feulgen (Fig. 2b) foi feito através do uso de secção histológica de cerebelo de recém-nascido, corada simultaneamente com os casos analisados. As células da camada molecular tiveram 2c na medição de acordo com as recomendações da técnica. O controle de cada caso foi interno com a medição de 20 núcleos de linfócitos que também tiveram 2c.

Os resultados da medição de DNA feitas pelo citômetro foram interpretados pelo tipo de histograma e pela análise matemática.

Segundo Auer os histogramas podem ser divididos em 4 grupos de acordo com a sua morfologia ⁽¹³⁾ (Anexo III):

- TIPO I: caracterizado pela presença de um pico único na região diplóide ou “quase diplóide”.
- TIPO II: maior pico na região tetraplóide ou “quase tetraplóide” com possibilidade de haver outro pico na região diplóide.
- TIPO III: padrão bimodal com picos em áreas diplóide e tetraplóide.
- TIPO IV: valores amplamente distribuídos indicando pronunciada aneuploidia.

Os resultados da análise matemática foram obtidos diretamente do computador e constaram de: média, desvio padrão, coeficiente de variação, taxa de células excedendo 2,5c, taxa de células excedendo 5c, e taxa de células em fase S. As análises destas taxas foram feitas pela média de valores de cada categoria e divididas em 2 classes: alta e baixa.

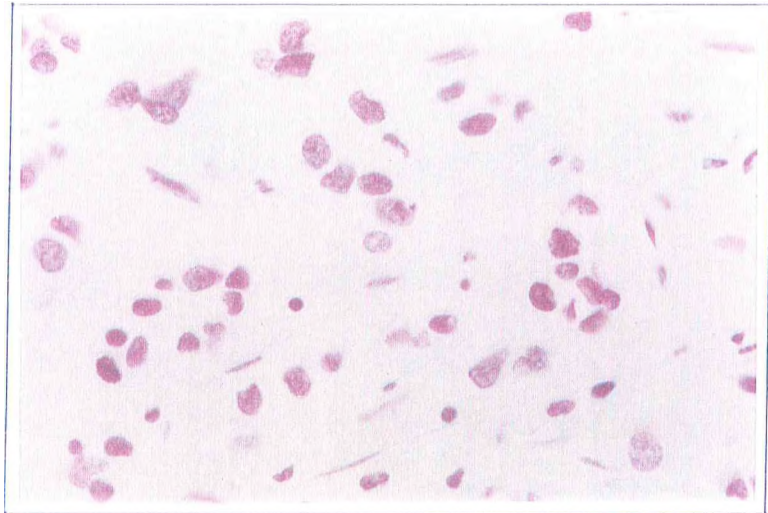


Figura 2a – Carcinoma ductal infiltrante da mama. Coloração de Feulgen. Aumento de 400x

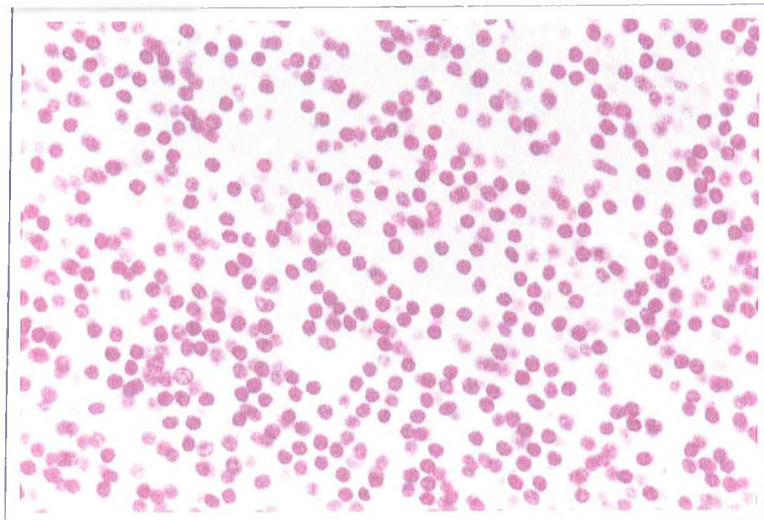


Figura 2b – Cerebelo de recém-nascido. Caso Controle da coloração de Feulgen. Aumento de 400x

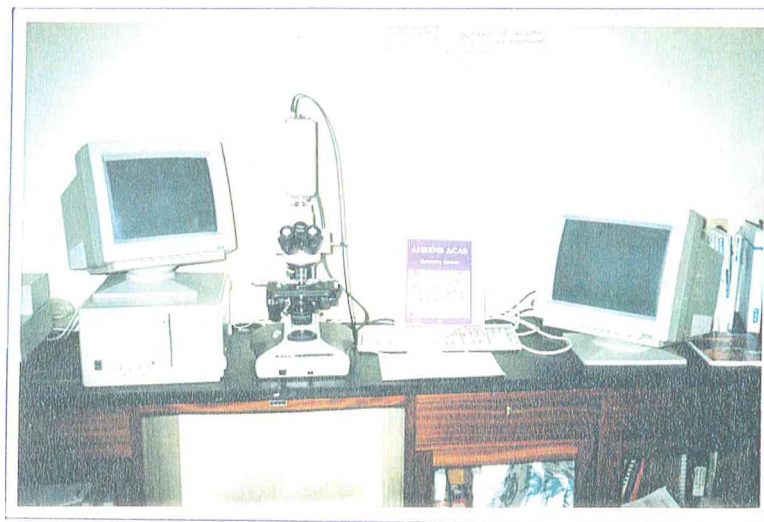


Figura 3 – Aparelho de citometria estática (Ahrens Image System)

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

A técnica da imunohistoquímica foi feita a partir de secções de 4µm de espessura obtidos em blocos de parafina e colocados em lâminas com gelatina, que permaneceram em estufa a 37 °C por uma noite. Foram pesquisados os receptores de estrógenos (RE), proteína do antioncogene p53, e um marcador de proliferação celular MIB-1. A técnica utilizada foi a da Avidina-Biotina-Peroxidase e ocorreu da seguinte forma ⁽¹²⁹⁾:

- desparafinização e hidratação;
- colocação das lâminas em cubetas de plástico com tampão citrato 10mM, pH 6.0 (2,1g de ácido cítrico. 1.000 ml de água destilada; ajustado o pH com cerca de 13 ml de NaOH 2M);
- colocação das cubetas em forno de micro-ondas na potência máxima e a cada 1 minuto e 30 segundos foi acrescentado o citrato que derramou até que se completassem 7 minutos;
- colocação das cubetas à temperatura ambiente durante 20 minutos ainda em citrato;
- lavagem em solução salina tamponada (TBS) durante 5 minutos;
- bloqueio da peroxidase endógena durante 30 minutos (100 ml de metanol e 1,5 ml de H₂O₂ a 30%) ;
- lavagem com TBS 2 vezes durante 5 minutos;
- transferência das lâminas dos casos em estudo e das lâminas controle da reação dos diferentes soros para câmara úmida. Aplicação do soro normal de coelho (X-902-DAKO) na diluição de 1:5 em TBS/BSA a 25%. Foi colocado 200 ml em cada lâmina durante 20 minutos;
- retirado o excesso de soro normal de coelho, sem lavar;
- aplicação dos soros primários, 200 µl em cada lâmina:
 - a) Para RE (M 7047-DAKO) diluição 1:200 µl em TBS/BSA a 12,5%;
 - b) Para p53 (1407-IMUNOTEC) diluição 1:200 em TBS/BSA a 12,5%;
 - c) Para MIB-1 (0506-IMUNOTEC) diluição de 1:100 em TBS/BSA a 12,5%
- colocação da câmara úmida na geladeira a 4 °C durante toda a noite;
- lavagem das lâminas com TBS 2 vezes durante 5 minutos;

- transferência das lâminas para câmara úmida, retirando-se o mais possível o TBS;
- aplicação do complexo soro de coelho anti-camundongo fixado à biotina (E-354-DAKO), diluição de 1:200 em TBS/BSA a 12,5% durante 30 minutos;
- lavagem com TBS, 2 vezes durante 5 minutos;
- transferência das lâminas para a câmara úmida e aplicação do complexo Avidina-Biotina (K-355-DAKO, para cada 5.000 ml de TBS/BSA a 12,5% usou-se 50 µl de Avidina e 50 µl de Biotina) durante 1 hora;
- lavagem com TBS, 2 vezes durante 5 minutos;
- aplicação de Diaminobenzidina (DAB) durante 7 minutos. 50 mg de DAB (D5637-SIGMA)

$$\text{Tris Hcl (pH 7,6)} \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ M de Tris, } 24 \text{ ml} \\ \text{HCl (N), } 3,8 \text{ ml} \\ \text{H}_2\text{O destilada, } 100 \text{ ml} \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{H}_2\text{O destilada, } 2,9 \text{ ml} \\ \text{H}_2\text{O}_2 \text{ a } 30\%, 0,1 \text{ ml} \end{array} \right.$$

- Lavagem em água destilada durante 5 minutos;
- Contra-coloração com hematoxilina durante 1 minuto;
- Lavagem em água corrente durante 2 minutos;
- Passagem rápida por água amoniacal;
- Desidratação das lâminas;
- Montagem das lâminas com entellan;
- Leitura das lâminas em microscópio ótico comum.

Os controles negativos da reação de imunohistoquímica foram obtidos pela omissão dos soros primários. Os controles positivos para RE e MIB-1 foram casos de carcinoma de mama positivos para RE e MIB-1, respectivamente; o controle positivo para o p53 foi um caso de carcinoma anaplástico de tireóide com mutação de p53 determinada por biologia molecular.

Os casos foram considerados positivos para RE quando mais de 10 por cento da população celular neoplásica apresentou núcleos de coloração acastanhada ⁽¹⁴²⁾. A positividade para a expressão da proteína de p53 foi considerada quando mais de 5 por cento da população celular neoplásica apresentou núcleos de coloração acastanhadas ⁽¹⁴¹⁾. Para o MIB-1 foi calculada a porcentagem de células que apresentaram núcleos acastanhados em uma população de 1.000 células neoplásicas contadas ⁽¹²⁶⁾.

Análise Estatística

Para comparar a ploidia e a taxa de proliferação celular com os demais parâmetros utilizados: tamanho do tumor, grau histológico, componentes da classificação de Bloom e Richardson, índice mitótico, gânglios axilares, expressão de RE, expressão de p53 e expressão de MIB-1, foram utilizados testes estatísticos de análise de variância (Anova) e X^2 . As correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

PACIENTES E TUMORES

IDADE

Os 30 casos de carcinomas ductais infiltrantes (CDIs) de pacientes do sexo feminino tiveram a idade variando entre 30 e 70 anos, com a média de 49,4 anos e mediana de 49,5 anos (ANEXO IV).

TAMANHO DO TUMOR

O tamanho do tumor variou entre 1,2 cm a 14 cm, com a média de 5,2 cm e mediana de 4,2 cm (ANEXO IV).

GÂNGLIOS AXILARES

Os gânglios axilares foram positivos em 15 casos e negativos nos outros 15 casos de CDIs (ANEXO IV).

TIPOS E GRAUS HISTOLÓGICOS

A distribuição dos CDIs de acordo com o grau e componentes da classificação de Bloom e Richardson está sumarizada na Tabela 1. A maior parte dos carcinomas foi de histologia agressiva (53,3%, grau III), (Figs. 4a, 4b) sendo o restante entre o grau II (26,6%) (Figs. 5a, 5b) e grau I (20%). (Figuras 6a, 6b)

TABELA 1 – Distribuição de carcinomas ductais infiltrantes de acordo com o grau e componentes da classificação de Bloom e Richardson.

Parâmetro		Nº de Casos (%)
Formação tubular	1	4 (13,3)
	2	5 (16,6)
	3	21 (70,0)
Plemorfismo nuclear	1	1 (3,30)
	2	11 (36,6)
	3	18 (60,0)
Índice mitótico	1	9 (30,0)
	2	15 (50,0)
	3	6 (20,0)
Grau histológico	I	6 (20,0)
	II	8 (26,6)
	III	16 (53,3)

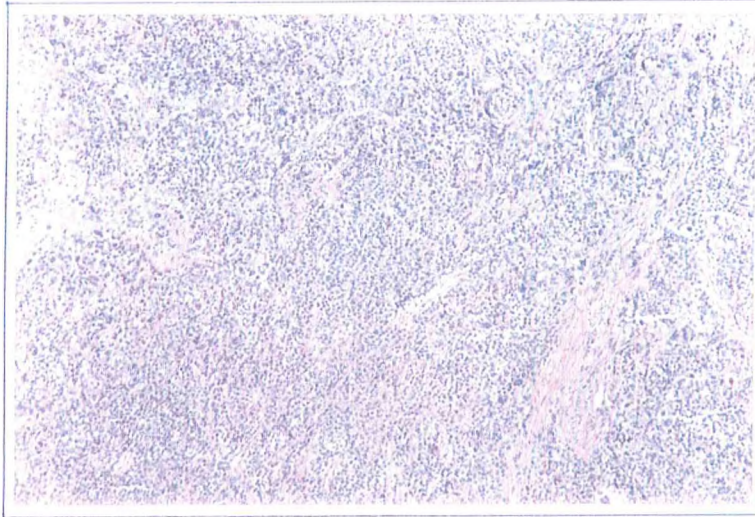


Figura 4a – Carcinoma ductal infiltrante da mama. Grau III da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 250x

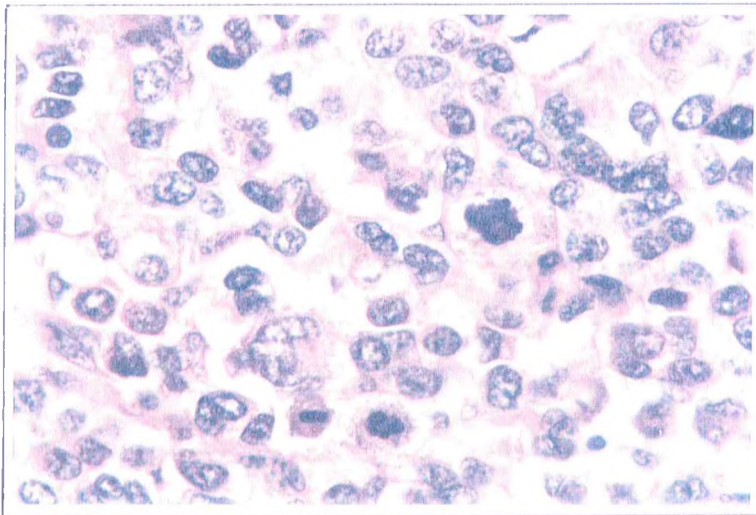


Figura 4b – Carcinoma ductal infiltrante da mama. Grau III da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 400x

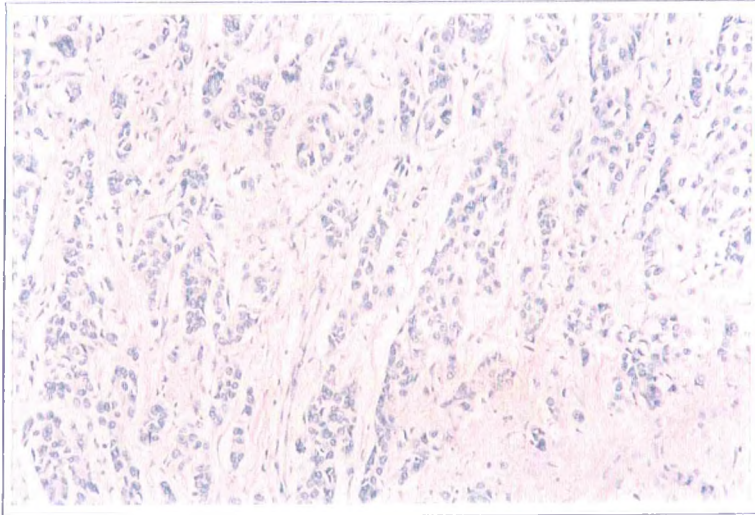


Figura 5a – Carcinoma ductal infiltrante da mama, Grau II da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 250x

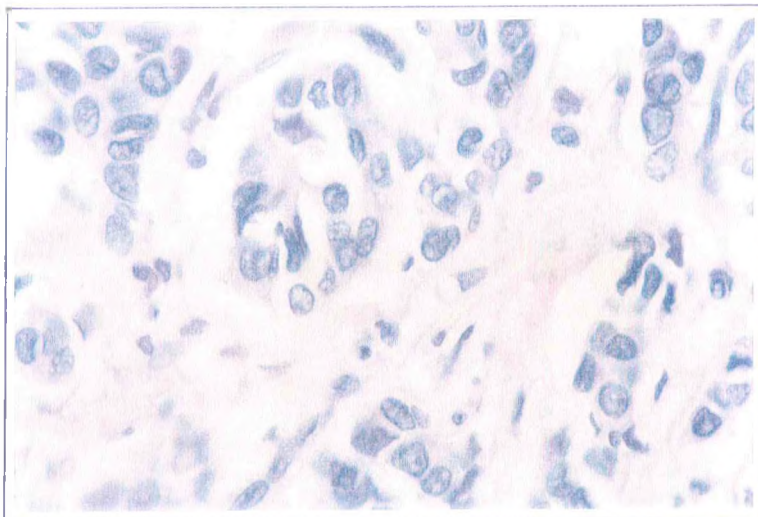


Figura 5b – Carcinoma ductal infiltrante da mama, Grau II da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 400x

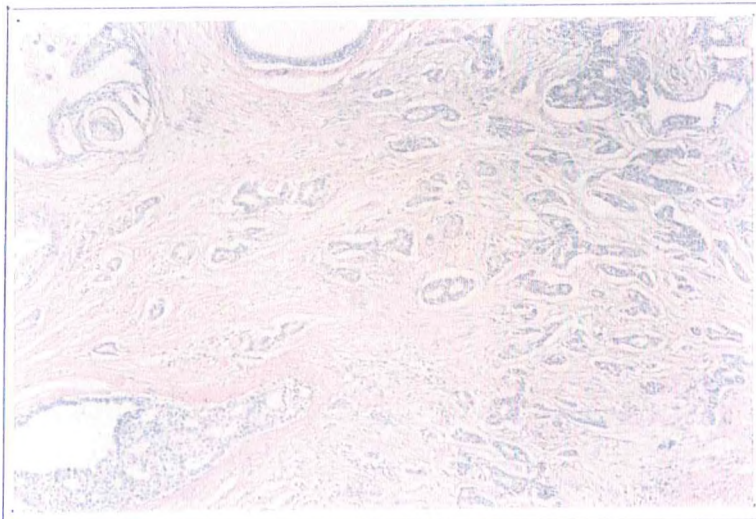


Figura 6a – Carcinoma ductal infiltrante da mama. Grau I da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 250x

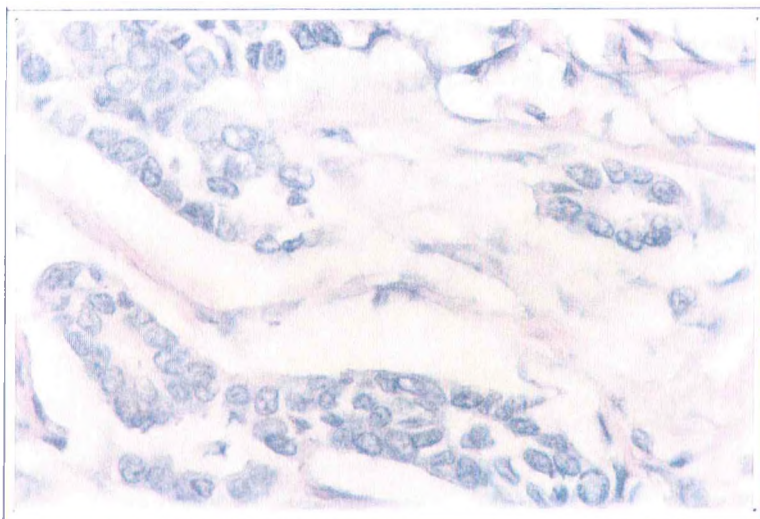


Figura 6b – Carcinoma ductal infiltrante da mama. Grau I da classificação de Bloom-Richardson. Coloração por H&E. Aumento de 400x

Citometria Estática

PLOIDIA

A ploidia foi avaliada pela taxa de células excedendo 2,5c, taxa de células excedendo 5c e pelos histogramas de Auer ⁽¹³⁾ fornecidos pelo programa em estudo ACAS-3.

O coeficiente de variação da população celular neoplásica variou de 9,2 a 12,7, com a média de 10,7. O coeficiente de variação da população controle (linfócitos) variou de 4,3 a 14,3, com a média de 8,7. A taxa de células excedendo 2,5c variou de 65 a 99% (média de 85,7%). A taxa de células excedendo 5c variou de 1 a 48% (média de 15,3%) (ANEXO V) .

Para efeito de avaliação os casos foram divididos em grupos de baixo 2,5c e alto 2,5c: em grupos baixo 5c e alto 5c. O “cut-off” foi determinado pelo cálculo da média de cada categoria de taxas. Dezenove dos casos do CDIs (63,3%) foram classificados de alto 2,5c e onze (36%) de baixo 2,5c. Onze dos casos dos CDIs (53,3%) foram classificados como baixo 5c dezoito (46,6%) como alto 5c. As correlações destas taxas com os parâmetros estudados podem ser vistas nas tabelas 2 e 3, como se segue.

TABELA 2 – Distribuição dos carcinomas ductais infiltrantes quanto à taxa de células excedendo 2,5c

Parâmetro		Nº de casos (%)		p
		Baixa: 2,5c (n= 11)	Alta: 2,5c (n=19)	
Tamanho do tumor (cm)		4,1 (36,6)	5,92 (63,3)	0,19
Grau histológico	I	5,0 (16,6)	1,0 (3,3)	0,001
	II	3,0 (10,0)	5,0 (16,6)	
	III	3,0 (10,0)	1,0 (3,3)	
Formação tubular	1	3,0 (10,0)	1,0 (3,3)	0,009
	2	4,0 (13,3)	1,0 (3,3)	
	3	4,0 (13,3)	17,0 (56,6)	
Pleomorfismo nuclear	1	1,0 (3,3)	0,0 (0,0)	0,01
	2	7,0 (23,3)	4,0 (13,3)	
	3	3,0 (10,0)	15,0 (50,0)	
Índice mitótico	1	5,0 (16,6)	4,0 (13,3)	0,35
	2	4,0 (13,3)	11 (36,6)	
	3	2,0 (6,6)	4,0 (13,3)	
Gânglios axilares	+	7,0 (23,3)	7,0 (23,3)	0,25
	-	4,0 (3,3)	11,0 (36,6)	
Receptores estrogênicos	+	6,0 (20,0)	2,0 (6,6)	0,08
	-	5,0 (16,6)	17,0 (56,6)	
Expressão de p53	+	0,0 (0,0)	6,0 (20,0)	0,03
	-	11,0 (36,6)	13,0 (43,3)	

TABELA 3 – Distribuição dos carcinomas ductais infiltrantes quanto à taxa de células excedendo 5c.

Parâmetro		Nº de casos (%)		p
		Baixa: 5c (n=11)	Alta: 5c (n=19)	
Tamanho do tumor (cm)		4,5 (53,3)	6,0 (46,6)	0,24
Grau histológico	I	6,0 (20,0)	0,0 (0,0)	0,01
	II	5,0 (16,6)	3,0 (10,0)	
	III	5,0 (16,6)	11,0 (36,6)	
Formação tubular	1	4,0 (13,7)	0,0 (0,0)	0,04
	2	4,0 (13,7)	1,0 (3,4)	
	3	8,0 (27,5)	13 (41,3)	
Pleomorfismo nuclear	1	1,0 (3,3)	0,0 (0,0)	0,02
	2	9,0 (30,0)	2,0 (6,6)	
	3	6,0 (20,0)	12,0 (40,0)	
Índice mitótico	1	6,0 (20,0)	2,0 (6,6)	0,35
	2	7,0 (23,3)	8,0 (26,6)	
	3	3,0 (10,0)	4,0 (13,3)	
Gânglios axilares	+	10,0 (33,3)	5,0 (16,6)	0,14
	-	6,0 (20,0)	9,0 (30,0)	
Receptores estrogênicos	+	8,0 (26,6)	0,0 (0,0)	0,02
	-	8,0 (26,6)	14,0 (46,6)	
Expressão de p53	+	0,0 (0,0)	6,0 (20,0)	0,003
	-	16,0 (53,3)	8,0 (26,6)	

TAMANHO DO TUMOR

Não houve correlação entre tamanho do tumor e ploidia avaliado pelas taxas de células excedendo 2,5c e 5c.

GRAU HISTOLÓGICO

Observou-se correlação entre a graduação histológica e ploidia avaliada pelas taxas de células excedendo 2,5c e 5c. Esta correlação foi particularmente devida à associação significativa entre a ploidia com a formação tubular e o pleomorfismo nuclear, desde que, não se encontrou correlação com o terceiro componente da classificação de Bloom e Richardson, ou seja, o índice mitótico.

GÂNGLIOS AXILARES

O envolvimento metatático dos gânglios axilares não se correlacionou com as taxas de células excedendo 2,5c e 5c.

RECEPTORES ESTROGÊNICOS

A positividade para os receptores estrogênicos ocorreu em 26,6% dos casos de CDIs. Foram considerados casos positivos aqueles em que mais de 10% da população celular neoplásica apresentou núcleo de coloração acastanhado conforme já foi mencionado em Materiais e Métodos ⁽¹⁴²⁾. (FIGURAS 7a, 7b)

A negatividade para receptores estrogênicos correlacionou-se com altas taxas de células excedendo 2,5c e 5c.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO GENE DO p53

Vinte por cento (20%) dos casos de CDIs tiveram positividade para o p53. Foram considerados positivos os casos de CDIs em que mais de 5% dos núcleos das células neoplásicas apresentaram coloração acastanhada, como mencionado em Materiais e Métodos ⁽¹⁴¹⁾. (FIGURAS 8a, 8b)

A aumentada expressão da proteína do anti-oncogene p53 correlacionou-se com altas taxas de células excedendo 2,5c e 5c.

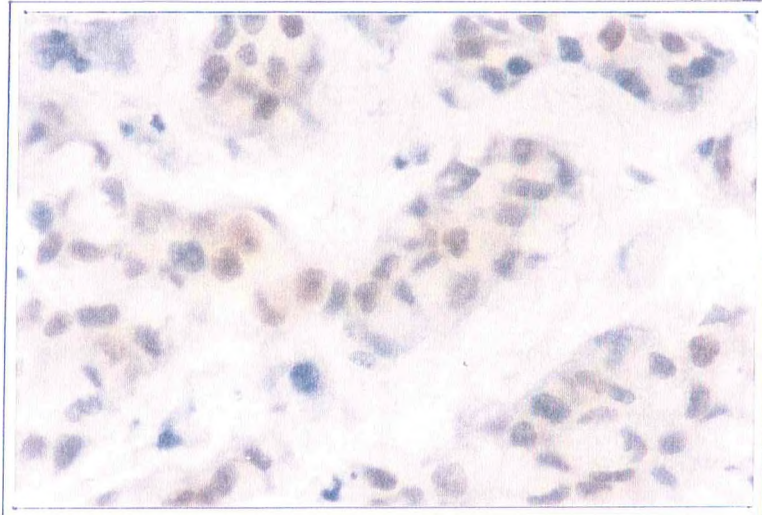


Figura 7a – Positividade para receptores de estrógeno em carcinoma ductal infiltrante da mama. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

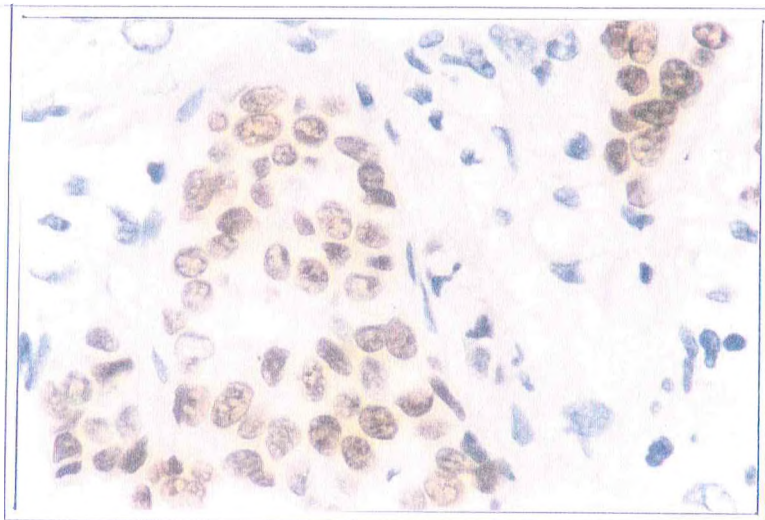


Figura 7b – Positividade para receptores de estrógeno em carcinoma ductal infiltrante da mama. Caso controle. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

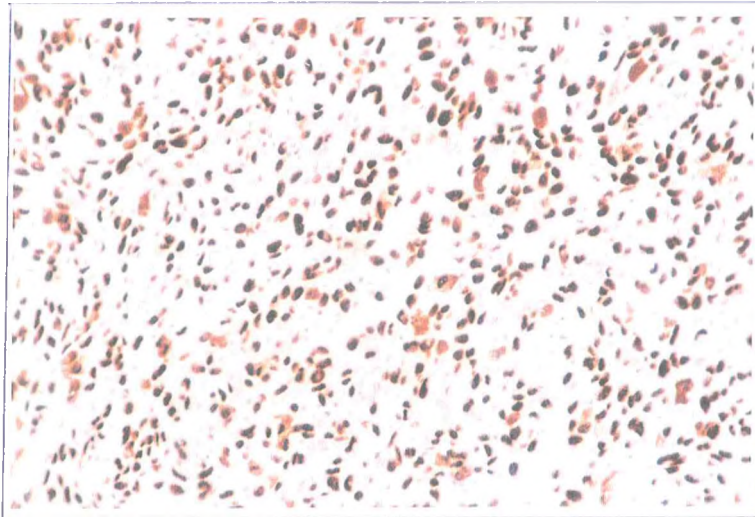


Figura 8a – Positividade para a expressão da proteína do anti-oncogene P53 em carcinoma ductal infiltrante da mama. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

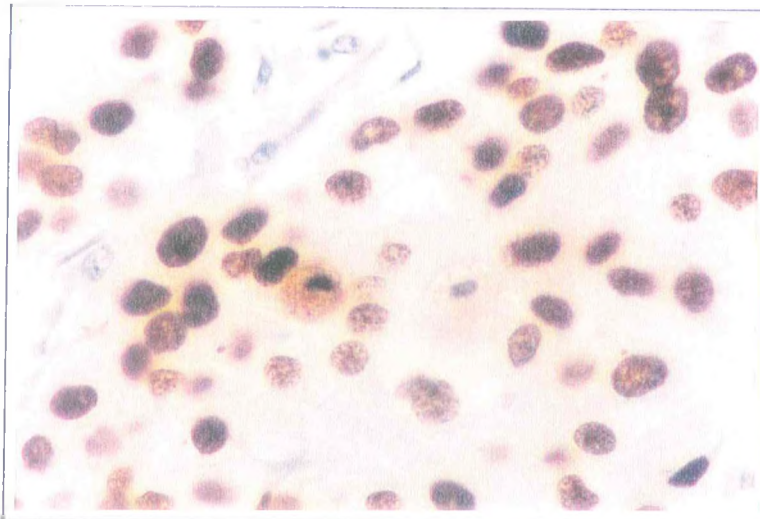


Figura 8b – Positividade para a expressão da proteína do anti-oncogene P53 em carcinoma da tireóide – caso controle. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

Histogramas de Auer

A distribuição dos parâmetros em estudo com o tipo de histograma segundo a classificação de Auer⁽¹³⁾ está resumida na Tabela 4. A maioria dos CDIs apresentou histograma do tipo III (70%), sendo o restante dos casos divididos entre tipo I (16,6%) e tipo IV (13,3%). Nenhum dos casos teve histograma tipo II (ANEXO VII).

TABELA 4 – Distribuição dos carcinomas ductais infiltrantes quanto aos Histogramas de Auer

Parâmetro		Nº de casos (%)			p
		I (n=5)	III (n=21)	IV (n=4)	
Tamanho do tumor (cm)		3,7 (12,4)	6,1 (20,5)	2,4 (8,16)	0,1
Grau histológico	I	4,0 (13,3)	2,0 (6,6)	0,0 (0,0)	0,02
	II	1,0 (3,3)	7,0 (23,3)	0,0 (0,0)	
	III	0,0 (0,0)	12,0 (40,0)	4,0 (13,3)	
Formação tubular	1	2,0 (6,6)	2,0 (6,6)	0,0 (0,0)	0,05
	2	3,0 (10,0)	2,0 (6,6)	0,0 (0,0)	
	3	0,0 (0,0)	17,0 (56,6)	4,0 (13,3)	
Pleomorfismo nuclear	1	1,0 (3,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,09
	2	4,0 (13,3)	7,0 (23,3)	0,0 (0,0)	
	3	0,0 (0,0)	14,0 (46,6)	4,0 (13,3)	
Índice mitótico	1	3,0 (10,0)	6,0 (20,0)	0,0 (0,0)	0,33
	2	2,0 (6,6)	10 (33,3)	3,0 (10,0)	
	3	0,0 (0,0)	5,0 (16,6)	1,0 (3,3)	
Gânglios axilares	+	2,0 (6,6)	13,0 (43,3)	0,0 (0,0)	0,06
	-	3,0 (10,0)	8,0 (26,6)	4,0 (13,3)	
Receptores estrongênicos	+	5,0 (16,6)	3,0 (10)	0,0 (0,0)	0,0002
	-	0,0 (0,0)	18,0 (60,0)	4,0 (13,3)	
Expressão de p53	+	0,0 (0,0)	4,0 (13,3)	2,0 (6,6)	0,17
	-	5,0 (16,6)	17,0 (56,6)	2,0 (6,6)	

As correlações com os diferentes parâmetros foram as seguintes:

TAMANHO DO TUMOR

Não houve correlação entre o tamanho do tumor e a ploidia pela análise dos Histogramas de Auer.

GRAU HISTOLÓGICO

Observou-se correlação entre a graduação histológica e a ploidia avaliada pelos Histogramas de Auer. Esta correlação foi particularmente devida à associação com formação tubular e o pleomorfismo nuclear uma vez que na análise matemática, não se encontrou correlação entre o índice mitótico e a ploidia.

GÂNGLIOS AXILARES

O envolvimento dos gânglios axilares não se correlacionou com a ploidia segundo os Histogramas de Auer.

RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Verificou-se uma significativa associação entre os receptores de estrógenos e os Histogramas de Auer, sendo a negatividade dos receptores mais frequente nos histogramas aneuplóides.

EXPRESSION DA PROTEÍNA DO ANTI-ONCOGENE P53

A expressão desta proteína relacionada com os Histogramas de Auer não mostrou correlação.

Quando os parâmetros descritos acima foram comparados com dois grandes grupos de histogramas: diplóide (tipo I de Auer) e aneuplóide (tipos III e IV de Auer), foi muito mais significativa a associação com o grau histológico, com a formação tubular, com a negatividade dos receptores estrogênicos e evidenciou-se a associação com o pleomorfismo nuclear. Continuou não havendo correlação com o envolvimento dos gânglios axilares com a expressão da proteína do anti-oncogene p53 e o tamanho do tumor. Estes dados podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5 - Distribuição dos carcinomas ductais infiltrantes quanto aos Histogramas diplóides e aneuplóides

Parâmetro	Nº de casos (%)		
	Hist. Diplóide (I) n=5	Hist. Aneuplóide (III, IV) n=25	p
Tamanho do tumor (cm)	3,2 (10)	5,5 (90,0)	0,23
Grau histológico	I	4,0 (13,3)	2,0 (6,6)
	II	1,0 (3,0)	7,0 (23,3)
	III	0,0 (0,0)	16,0 (53,3)
Formação tubular	1	2,0 (6,6)	2,0 (6,6)
	2	3,0 (10,0)	0,0 (0,0)
	3	0,0 (0,0)	23,0 (76,6)
Pleomorfismo nuclear	1	1,0 (3,3)	0,0 (0,0)
	2	4,0 (13,3)	7,0 (28,0)
	3	0,0 (0,0)	18 (72,0)
Índice mitótico	1	3,0 (10,0)	6,0 (20,0)
	2	2,0 (6,6)	13,0 (43,3)
	3	0,0 (0,0)	6,0 (20,0)
Gânglios axilares	+	2,0 (6,6)	13,0 (43,3)
	-	3,0 (10,0)	12 (40,0)
Receptores estrogênicos	+	5,0 (16,6)	3,0 (10,0)
	-	0,0 (0,0)	22,0 (73,3)
Expressão de p53	+	0,0 (0,0)	6,0 (20,0)
	-	5,0 (16,6)	19,0 (63,3)

Fig 12

PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada pela taxa de células excedendo 2,5c e taxa de células em fase S, de acordo com os dados fornecidos pelo programa em estudo (ACAS-3).

Para avaliar estas taxas procedeu-se ao cálculo da média para encontrar o "cut-off". A taxa de células excedendo 2,5c variou de 60% a 99% (média de 85,7%). A taxa de células em fase S variou de 9,4% a 79,3% (média de 49,7%). A quantidade de casos com alto 2,5c foi de 19 (63,6%) e baixo 2,5c foi de 11 (36%); ocorreram 17 casos (56,6%) com alta fração de células em fase S e 13 casos (43,3%) com baixa fração de fase S. (ANEXO V)

Para tentar mostrar a relação destas duas taxas com a proliferação celular, ambos foram confrontadas com o índice mitótico e com um marcador de proliferação celular (MIB-1).

A positividade para o MIB-1 verificou-se em 30% dos CDIs. Foram considerados casos positivos quando os núcleos das células apresentavam coloração acastanhada e foi determinada a porcentagem de células positivas numa população de 1.000 células neoplásticas contadas ⁽¹²⁶⁾ (FIGURAS 9a. 9b).

Apesar de apenas 9 dos 30 CDIs terem sido positivos para o MIB-1, a associação deste marcador com o índice mitótico mostrou o valor de p igual a 0,05, de acordo com o relatado pela literatura ^(126.158) e de nossa experiência pessoal em outros estudos ⁽¹³¹⁾ (Fig. 10 – Foram retirados 2 pontos em virtude dos mesmos ficarem fora da faixa da tendência central).

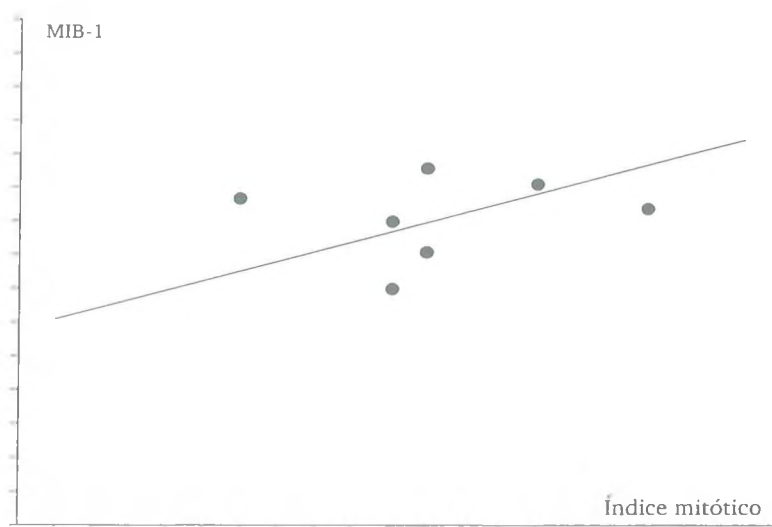


Fig. 10

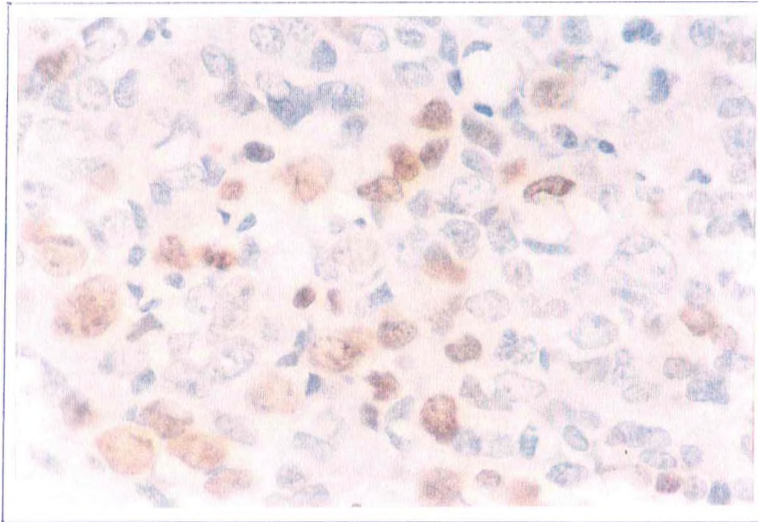


Figura 9a – Positividade para o marcador de proliferação celular MIB-1 em carcinoma ductal infiltrante da mama. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

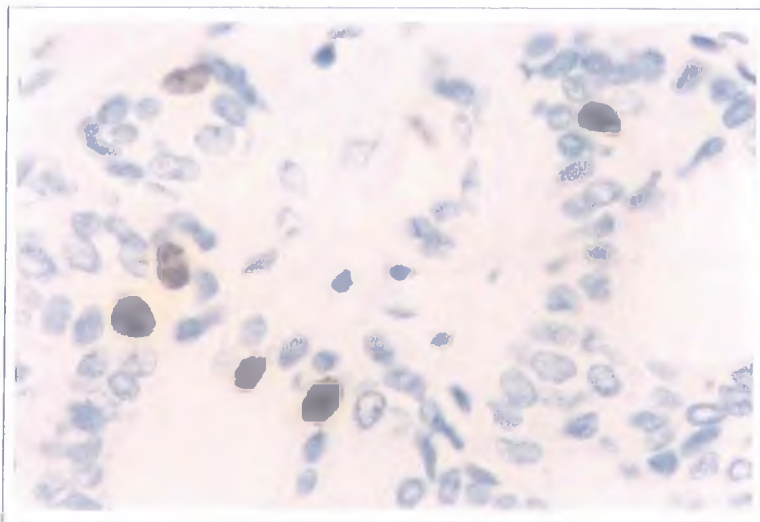


Figura 9b – Positividade para o marcador de proliferação celular MIB-1 em carcinoma ductal infiltrante da mama – caso controle. Técnica da imunoperoxidase. Aumento de 400x

As correlações entre a taxa de células excedendo 2,5c e a taxa de células em fase S com o índice mitótico e o MIB-1, podem ser vistas nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

Não ocorreu associação entre a taxa de células excedendo 2,5c e o índice mitótico, ($p=0,48$) nem com o MIB-1 ($p=0,98$). A fração de células em fase S também não se correlacionou com o índice mitótico ($p=0,63$), nem com o MIB-1.

A fração de células em fase S associada ao índice mitótico teve o valor de $p=0,63$. Quando esta mesma taxa foi associada ao marcador de proliferação celular (MIB-1), o valor de p passou a 0,21.

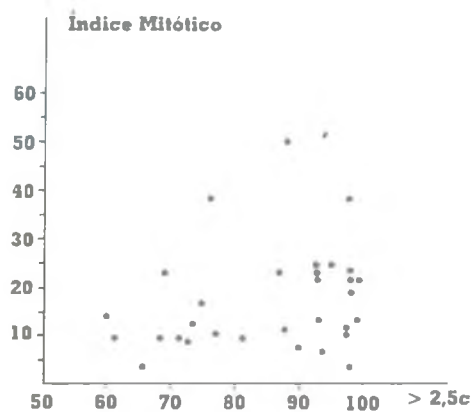


Fig. 11

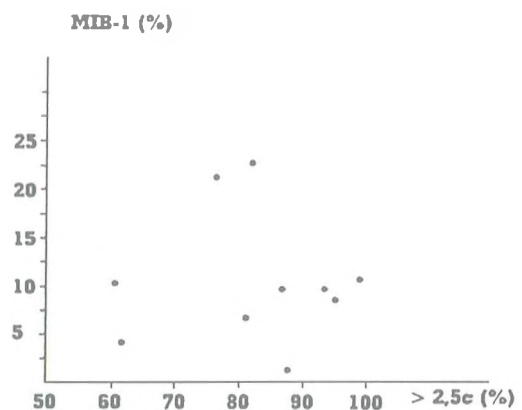


Fig. 12

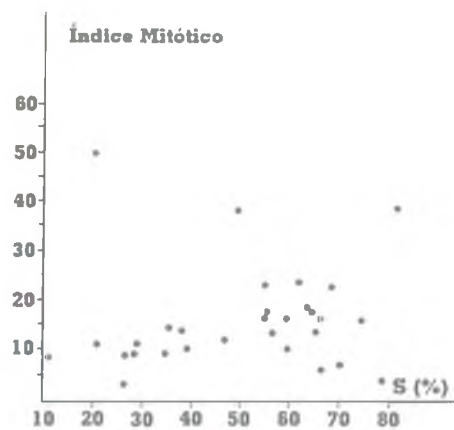


Fig. 13

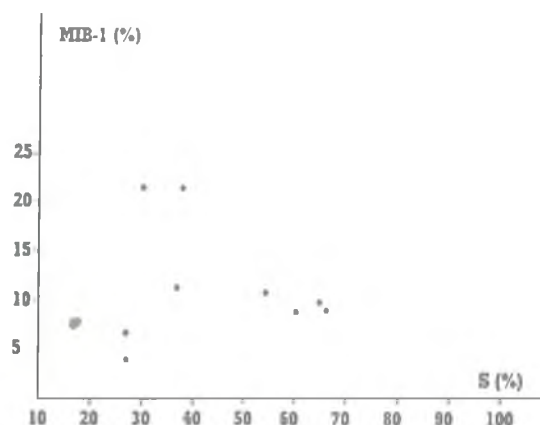


Fig. 14

Discussão

Numerosos trabalhos indicam que o conteúdo de DNA de carcinoma mamário está relacionado com a sobrevida e pode ser usado como indicador prognóstico ^(10, 12, 13, 36, 80). Muitos outros estudos apoiam o ponto de vista de que o valor da informação prognóstica obtida pela medida do DNA depende de outros parâmetros clínicos e histopatológicos, não sendo portanto um fator prognóstico independente ^(10, 13, 16, 18, 24, 30, 34, 37, 47, 48, 60, 61, 76, 80, 90, 91, 95, 100, 113, 114, 118, 127, 135, 137, 146, 159, 160). Entretanto, Auer e colaboradores demonstraram por citometria estática que a ploidia pode prever a sobrevida como um fator prognóstico independente ^(10, 12, 13).

Os parâmetros microscópicos como o grau histológico, o pleomorfismo nuclear e a formação tubular são aspectos que têm sido demonstrados repetidamente como importantes prognosticadores para as pacientes com carcinoma ductal infiltrante ^(10, 13, 16, 18, 24, 30, 34, 37, 47, 48, 60, 61, 76, 80, 90, 91, 95, 100, 113, 114, 118, 127, 135, 137, 146, 159, 160). A avaliação desses parâmetros dá, indiretamente, alguma indicação da ploidia da neoplasia, já que esses fatores se correlacionam com o conteúdo de DNA.

As diferenças de resultados em algumas publicações a respeito de citometria de DNA demonstra a necessidade de mais estudos nesta área com grupos maiores de pacientes, longo tempo de observação clínica e, especialmente na escolha do parâmetro de aneuploidia a ser analisado para que possam ser confirmadas as correlações estatísticas encontradas ⁽⁹¹⁾. Longin *et al.*, mostraram diferenças de resultados quando usaram quatro parâmetros de avaliação de ploidia ⁽⁹¹⁾.

Na última conferência de consenso ⁽⁶⁹⁾ de citometria de DNA em câncer de mama (1993) ficou estabelecido pela revisão da literatura que a citometria de DNA é de utilidade na previsão do curso clínico de pacientes com câncer de mama invasivo cirurgicamente ressecável. O índice de DNA é falho na previsão de prognóstico independente em análise multivariada de fatores prognósticos clássicos. A fase S determinada pela citometria de fluxo está fortemente associada ao risco aumentado de recorrência e mortalidade em pacientes com gânglios axilares com ou sem metástase. Mesmo assim é necessário que cada laboratório de investigação clínica estabeleça uma técnica padrão de medida da fase S.

Quanto à citometria estática a reunião de consenso levantou o problema da existência de poucos trabalhos nesta área, todos oriundos de uma única fonte ^(45, 46, 48). Entretanto, ficou estabelecido que era uma técnica promissora, potencialmente útil na determinação de células com alto conteúdo de DNA, na utilização em pequenas amostras e na determinação de sub-populações aneuploides. A partir de então, muitos outros trabalhos têm sido apresentados

nesta área, não apenas comparando a citometria estática com a citometria de fluxo (39, 42, 62, 68, 88, 89, 106, 127), mas também, correlacionando com fatores prognósticos no câncer de mama (10, 12, 13, 14, 27, 91, 128, 131, 132, 139, 146, 160).

No presente estudo de medida de DNA por citometria estática usando o programa ACAS-3 os resultados apoiam que este método é eficaz, simples e fácil para a quantificação da ploidia.

De acordo com outros trabalhos a ploidia é um importante fator de prognóstico (10, 13, 16, 18, 24, 30, 34, 37, 47, 48, 60, 61, 76, 80, 90, 91, 95, 100, 113, 114, 118, 127, 135, 137, 146, 159, 160). As correlações por nós encontradas com aqueles parâmetros que convencionalmente são aceitos como estabelecidos para a previsão prognóstica foram estatisticamente significativas (vide tabelas 2, 3, 4 e 5).

Os resultados de estudos que comparam a ploidia com vários parâmetros clínico-patológicos para o prognóstico do câncer de mama estão na tabela 6.

TABELA 6 – Ploidia em Carcinomas Ductais Infiltrantes, medido por citometria de fluxo e citometria estática: relação com parâmetros clínicos, patológicos e moleculares

Parâmetro	Estudos*	Referências
Idade	4/18 (22%)	14, 37, 43, 63, 66, 79, 84, 87, 90, 109, 118, <u>125</u> , 138, 143, 144, 145, 150, 157
Tam. do tumor	10/28 (38%)	14, 41, 44, 48 , 50, 59, 63, 66, 71, 77, 79, <u>89</u> , 90, 91 , 98, 101, 109, 118, 121, 138, 139, 143, 144, 145, 149, 153, 157, <u>160</u>
Gânglios axilares ¹	4/23 (17%)	14, <u>34</u> , 35, 41, 43, 44, 48, 50, 63, 70, 77, 79, 87, 91, 98, 118, 121, <u>125</u> , 143, 144, 145, 153, 157
Grau histológico ¹	30/33 (91%)	10 , 14 , 15, 21, 29, <u>39</u> , 41, <u>42</u> , 48 , 50, 59, 63, 71, 76, 77, 79, 87, 89, 90, 91, 97, 98, 101, 107, 109, 118, 122, 139, 143, 146, 149, 157, <u>160</u>
Compt. class. de Bloom e Richardson ¹	2/2 (100%)	61, 78,
Receptores de estrógenos ²	14/32 (44%)	1, 5, 21, 29, <u>34</u> , 35, 37, 41, 43, 50, 59, 63, 71, 72, 74, 77, 79, 87, <u>89</u> , 91 , 98, 101, 109, 118, 122, 138, 139 , 143, 144, 145, 146 , 149
Expressão de p53 ¹	2/2 (100%)	3, 134
Expressão de MIB-1 ¹	2/2 (100%)	126, 131

* (Nº de estudos com significância estatística)/(nº total de estudos); ¹ Associação positiva entre o parâmetro e a aneuploidia; ² associação negativa entre o parâmetro e a aneuploidia; nas referências, os números em negrito: citometria estática; números sublinhados: citometria estática e de fluxo; outros números: apenas citometria de fluxo.

Como está reportado em numerosos trabalhos, não existem correlações estatisticamente significativas entre a ploidia com a idade da paciente, o

tamanho do tumor e com metástases axilares, conforme está disposto na Tabela 6. O evento da metástase axilar pode ser visto como função do crescimento tumoral refletido pelas dimensões do tumor ⁽⁶⁷⁾. Durante a progressão tumoral são gerados clones com capacidades biológicas heterogêneas originando grupos de células com maior poder invasivo e de disseminação ⁽⁶⁴⁾. A capacidade metastática das células tumorais parece requerer múltiplas alterações genéticas e atualmente tem-se demonstrado alterações de oncogênes, tais como, c-H-ras, c-Erb-2, do anti-oncogene p53, do gene frenador de metástase (Mn23). A mutação do anti-oncogene p53 pode desempenhar um papel fundamental na progressão do câncer de mama e manutenção de clones mais agressivos ^(141, 148). Tem sido visto também que carcinomas mamários com amplificação do oncogene c-Erb-2 dissemina-se rapidamente e especialmente para o fígado ⁽¹³⁰⁾. A produção aumentada de enzimas proteolíticas (catepsina, colagenase IV, fator ativador de plasminogênio) tem sido implicada no processo de metastatização. No entanto, até o momento, não existe uma definição precisa do papel de cada uma dessas alterações na cascata metastática ⁽¹³⁰⁾. Tem sido também relatado que a neovascularização em carcinomas de mama pode ser um fator independente na previsão de metástase à distância ⁽¹³⁰⁾.

A correlação da ploidia com o grau histológico deve ser entendida como um reflexo da instabilidade genômica e perda da diferenciação celular. Publicações que usaram a graduação de Bloom e Richardson notaram correlações estatísticas significantes entre o grau histológico e o conteúdo de DNA, conforme está disposto na Tabela 6.

Somente dois estudos, usando citometria de fluxo, compararam a ploidia com cada componente da classificação de Bloom e Richardson ^(61, 78). Frierson ⁽⁶¹⁾ encontrou correlação entre a ploidia e o pleomorfismo nuclear e a taxa mitótica, mas não com a formação tubular. O estudo de Joensuu *et al* ⁽⁷⁸⁾ obteve os mesmos resultados de Frierson, mas quando associou os graus 1 e 2 da formação tubular encontrou significativa correlação entre a ploidia e a formação tubular.

O presente trabalho em que a ploidia foi analisada por citometria estática, através da taxa de células excedendo 2,5c, da taxa de células excedendo 5c e histogramas de Auer, encontrou associação estatística significativa com o pleomorfismo nuclear e a formação tubular. Não se verificou correlação com o índice mitótico.

A presença de células aneuplóides refletidas principalmente pela taxa de células excedendo 5c, talvez sirva como um indicador de alto grau de potencial maligno, e possa representar um marcador de instabilidade genética refletindo a perda da diferenciação celular manifestada pela ausência de formação tubular e atipias celulares. Dorman *et al* ⁽⁴⁰⁾ mostraram que a percentagem de células excedendo 5c pode ser usada para separar tumores benignos e malignos de músculo liso. Rodenburg *et al*. ⁽¹²³⁾ em carcinomas de ovário e Hemstreet *et al*. ⁽⁷³⁾ em carcinoma de bexiga têm mostrado que a proporção de células excedendo 5c tem sido melhor tradutor de prognóstico do que somente dividir

os tumores entre diplóides e aneuplóides ⁽⁷³⁾. Sanna *et al.* ⁽¹²⁷⁾ salientaram que a determinação de células excendo 5c pode ser um fator prognóstico adicional em câncer de mama com gânglios axilares negativos.

É bem conhecido que os tumores histologicamente menos agressivos apresentam positividade para receptores hormonais, apontando para algum grau de diferenciação celular ^(58, 72, 93, 105, 117, 140, 147). Dessa forma, a diploidia se correlaciona com a expressão de receptores de estrógeno e/ou de progesterona, sendo os tumores aneuplóides, geralmente negativos, para os receptores hormonais. A correlação estatística entre a ploidia e os receptores hormonais demonstrada em muitos trabalhos, conforme se pode ver na Tabela 6, foi também confirmada no presente estudo (vide Tabelas 2, 3, 4 e 5).

A aumentada expressão de proteínas do anti-oncogene p53 está correlacionada com a aneuploidia ^(3, 134). Sendo o p53 um gene regulador do crescimento celular, atuando como um freinador da proliferação celular, é de se esperar que tumores aneuplóides que parecem ter uma instabilidade genômica aumentada apresentem capacidade para mutações do anti-oncogene p53. Na verdade, a mutação do anti-oncogene p53 é uma das alterações genéticas mais comuns em cânceres humanos e já foi demonstrada por técnicas de Southern-blot, Northern-blot e imunohistoquímica ^(28, 112, 120, 124, 155). Diversos trabalhos relacionam a expressão do p53 a fatores prognósticos clássicos no carcinoma mamário. A correlação mais frequentemente estabelecida é entre o tamanho do tumor, grau histológico, gânglios axilares e negatividade para receptores estrogênicos ^(3, 4, 17, 141, 148, 156). De acordo com a literatura os dados obtidos neste trabalho também revelaram associação entre a aumentada expressão da proteína do anti-oncogene p53 e a aneuploidia (Tabelas 2 e 3).

Proliferação celular

A proliferação celular em câncer de mama, tradicionalmente tem sido pesquisada pelo índice mitótico, pelas técnicas da timidina tritiada, bromodeoxiuridina, por citometria de fluxo, por imunohistoquímica (Ki-67, PCNA, MIB-1) ou por análise matemática de histograma gerado por citometria de fluxo ^(60, 131, 133).

Neste trabalho pesquisou-se o valor da citometria estática usando-se o programa ACAS-3 na determinação da proliferação celular dos CDIs, avaliando-se a taxa de células excendendo 2,5c e a taxa de células em fase S. Os resultados não apoiam o uso deste programa para determinação da proliferação celular, uma vez que, não existiram correlações estatísticas destas taxas com dois importantes marcadores de proliferação celular, quais sejam: o índice mitótico e o MIB-1 ^(82, 83, 126, 131, 158).

Ficou comprovado, de acordo com a literatura, que existe significante correlação estatística entre o índice mitótico e o MIB-1. Na verdade, o MIB-1 é

um dos melhores marcadores de proliferação celular no câncer de mama em tecido fixado em formalina e incluído em parafina ^(82, 83, 126, 131, 133, 158). A importância do MIB-1 na determinação da proliferação celular deve-se ao fato que este anticorpo monoclonal liga-se a um antígeno nuclear expresso durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, não sendo detectado nas células em repouso ^(82, 83, 158).

Também ficou comprovado aqui que o índice mitótico é uma técnica fácil e simples de medida de proliferação celular que deve ser rotineiramente executada.

Apesar de não se ter obtido correlação estatística entre as taxa de células excedendo 2,5c e taxa de células em fase S com importantes marcadores de proliferação celular, tais como índice mitótico e MIB-1 com a técnica da citometria estática usando o programa ACAS-3, já foi demonstrado que a técnica de análise de imagem pode ser usada na determinação da proliferação celular. Dawson *et al* ⁽⁴²⁾ usando um outro sistema (CAS 100 – System-Cell Analysis System) mostraram ser este um método alternativo de medida de proliferação celular quando associado a marcadores de proliferação celular (PCNA e Ki-67). Colocaram em evidência que a quantificação por imagem da marcação com Ki-67 pode ser mais precisa como fator prognóstico que a fase S por citometria de fluxo.

A citometria estática é, portanto, uma técnica prática, confiável e menos dispendiosa de quantificar o DNA. A ploidia é um importante indicador prognóstico que poderia ser associado aos parâmetros morfológicos habituais a fim de oferecer uma melhor conduta clínica-terapêutica. A medida das células excedendo 5c obtidas pelo programa ACAS-3 envolve um procedimento matemático resultando em uma análise mais objetiva da ploidia, eliminando desse modo a subjetividade de interpretação dos histogramas. Não está estabelecido que a presença de células excedendo 5c seja somente um marcador de alto potencial maligno, ou ainda que seja um fator biológico específico na progressão do câncer de mama. Os trabalhos existentes sobre a proporção de células excedendo 5c ^(40, 73, 91, 123, 127, 139) mostram que a análise deste parâmetro oferece informações prognósticas complementares à medida convencional de ploidia.

Conclusões

Os achados e as considerações feitas neste trabalho, permitem as seguintes conclusões:

- 1) A citometria estática demonstrou ser uma técnica viável de medida de DNA.
- 2) A aneuploidia mostrou associação com a graduação histológica, com a formação tubular, com o pleomorfismo nuclear, negatividade para receptores estrogênicos e expressão da proteína do anti-oncogene p53.
- 3) Não se observou correlação estatisticamente significativa entre a aneuploidia e a idade, tamanho do tumor, metástases axilares e índice mitótico.
- 4) Não se observou associação estatisticamente significativa entre a taxa de células excedendo 2,5c e a taxa de células em fase S com o índice mitótico e o MIB-1.
- 5) Os resultados obtidos permitiram concluir, finalmente, que a ploidia é um importante indicador de prognóstico que poderá ser associado com fatores de prognósticos clássicos de câncer de mama.

Summary

Substantial evidences suggest that the abnormal amount of DNA of neoplastic cells keeps a relationship with biological aggressiveness and can provide prognostic information.

A study was made to value the nuclear content of DNA in 30 cases of invasive duct carcinoma of female breast by the method of static cytometry using the ACAS-3 program. Ploidy was assessed by the quantity of cells exceeding 2.5c, 5c and Auer histograms. It was confronted with tumor size, histological grading, components of Bloom and Richardson classification, estrogen receptors and expression of p53 oncogene protein. There was no association between aneuploidy, age, mitotic index, tumor size and axillary metastases.

Furthermore, the capacity of the ACAS-3 program in measuring cellular proliferation was investigated, by evaluating the amount of cells exceeding 2.5c and that of cells in S-phase of the cell cycle. Both rates were compared with the mitotic index and with a marker of cell proliferation (MIB-1).

Ploidy maintained a significant association with microscopic grading, tubular formation, nuclear pleomorphism, as well as estrogen receptors and p53 protein expression.

No association was detected between rate of cells exceeding 2.5c or S-phase cells with mitotic count and MIB-1.

It is concluded that static cytometry is a practical technique and reliable to quantify nuclear DNA and that ploidy is an important prognostic indicator that can be associated with classic morphological parameters of prognosis in breast cancer with the scope of offering a better clinic-therapeutical approach. This technique using the ACAS-3 software was unable to recognize the tumor cellular proliferation.

ANEXO I

CLASSIFICAÇÃO DE BLOOM E RICHARDSON

Classificação de Bloom e Richardson ⁽²²⁾

Utilizam-se os seguintes critérios microscópicos:

- formação tubular,
- pleomorfismo nuclear,
- índice mitótico.

Um sistema numérico é aplicado a estes critérios e a somatória classifica os casos em grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pobrementemente diferenciado).

QUADRO 1 – Graduação microscópica de Bloom e Richardson

Componentes	Critérios	Pontos	Critérios	Pontos	Critérios	Pontos
Formação tubular	> 50% do tumor	1	10-50% do tumor	2	< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	discreto	1	moderado	2	elevado	3
Índice mitótico	<10 (10 cga)*	1	11-20 (10 cga)*	2	> 21 (10 cga)*	3
<i>Grau I: 3-5 pontos</i>			<i>Grau II: 6-7 pontos</i>		<i>Grau III: 8-9 pontos</i>	

* Campo de grande aumento

ANEXO II
REAGENTE DE SCHIFF

Reagente de Schiff⁽¹²⁹⁾

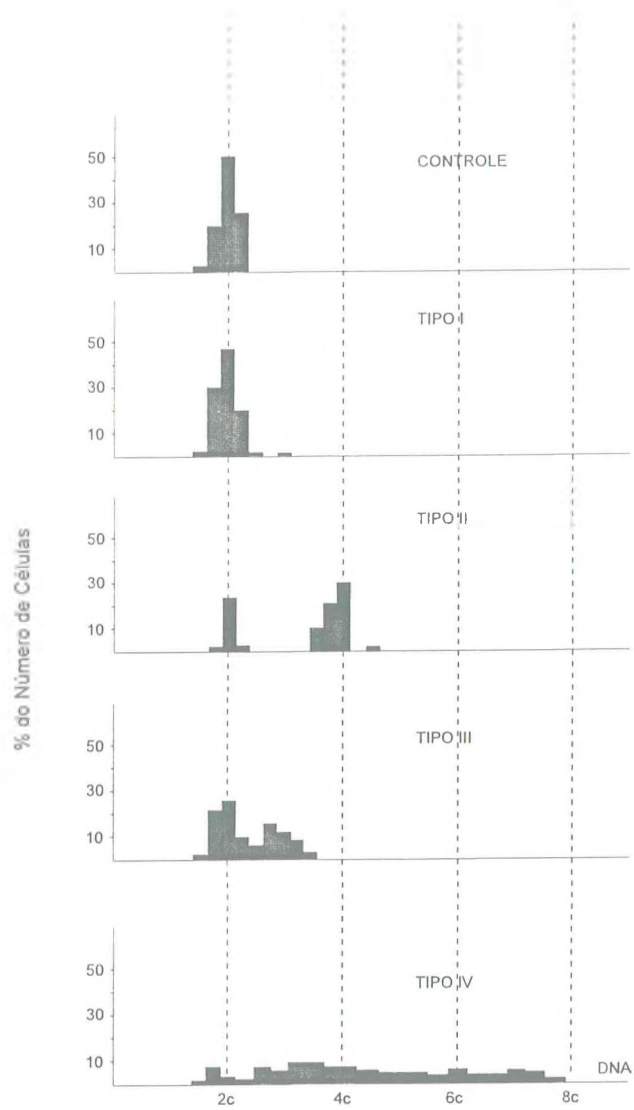
O Reagente de Schiff liga-se a grupos aldeídos específicos das moléculas de DNA previamente expostas por hidrólise ácida. O RNA e proteínas não reagem com o Schiff. A preparação do Reagente de Schiff envolve as seguintes etapas:

- dissolver 5 g de pararosanilina (= Fucsina básica, Aldrich-Cat n° 85734-3) em 150 ml de HCl 1N (200 ml de HCl 5N em 800 ml de H₂O destilada; o HCl 5N é preparado a partir de HCl fumegante 37%, dissolvendo-se 414 ml em 1 litro de H₂O destilada);
- juntar uma solução de 850 ml de H₂O destilada e 5 g de K₂S₂O₅ (metabissulfito de potássio, Sigma-P2525) feita em outro frasco. Obtem-se uma solução vermelha devido à acidez;
- agitar no vórtex durante 1 hora;
- envolver o frasco em papel alumínio e manter a solução no escuro e a temperatura ambiente durante toda a noite
- juntar 3 g de carbono ativo (Merck-2186.0250);
- agitar durante 2 minutos;
- filtrar a solução: funil com papel de filtro até se obter uma solução transparente. Tanto o funil quanto o recipiente que irá receber a solução deverão estar envolvidos por papel alumínio. Se a solução não ficar transparente, repetir a filtração;
- deixar na geladeira (4 °C) durante pelo menos 1 hora antes de usar. A solução pode ser armazenada durante vários meses a esta temperatura, devendo-se sempre evitar a luz e umidade.

ANEXO III

HISTOGRAMAS DE AUER

Histogramas de Auer



Tipos de Histogramas de DNA, segundo Auer e colaboradores (13)

ANEXO IV

PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E
MOLECULARES DOS CASOS ESTUDADOS

PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES DOS CASOS ESTUDADOS

Casos	Idade (anos)	Tumor (cm)	Gânglios axilares	Grau	I. Mit. 10cga-40x	RE	p53	MIB-1 (%)
1	30	4,5	M2/6	GIII	14	-	-	
2	33	5,0	M0/7	GI	9	+	-	9,0
3	34	4,0	M0/1	GIII	16	-	-	10,6
4	35	14,0	M1/5	GII	6	-	-	9,8
5	35	12,0	M0/1	GIII	16	-	+	
6	36	10,0	M8/8	GIII	38	-	-	
7	38	5,0	M1/7	GIII	18	-	+	
8	38	2,0	M0/1	GIII	50	-	+	22,5
9	39	4,0	M2/9	GI	10	+	-	21,3
10	39	3,0	M0/4	GII	10	-	-	8,1
11	41	7,0	M0/6	GIII	23	-	-	
12	42	4,5	M0/3	GIII	11	-	+	
13	43	3,4	M2/2	GI	9	+	-	
14	43	7,0	M1/2	GII	13	-	-	
15	49	3,5	M0/9	GIII	16	-	+	
16	50	11,0	M9/9	GII	16	-	-	
17	50	7,5	M0/7	GIII	23	-	-	
18	52	1,2	M7/8	GI	7	+	-	
19	55	14,0	M4/8	GII	11	-	-	
20	59	3,3	M0/7	GI	9	+	-	7,0
21	60	2,0	M3/5	GIII	12	-	-	
22	60	4,3	M0/4	GII	14	+	-	10,2
23	61	6,0	M5/7	GIII	23	-	-	
24	61	1,8	M0/8	GIII	17	-	-	9,5
25	65	1,5	M1/3	GII	8	-	-	
26	65	2,5	M0/6	GIII	17	-	-	
27	66	5,0	M0/8	GII	4	+	-	
28	70	4,0	M2/7	GIII	13	-	+	
29	70	2,0	M0/6	GI	3	+	-	
30	73	3,0	M1/1	GIII	38	-	-	
Médias	49,4	5,2			15,8			

(*) Campo de grande aumento

ANEXO V

PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA PLOIDIA E DA
PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA
ESTÁTICA COM O PROGRAMA ACAS-3

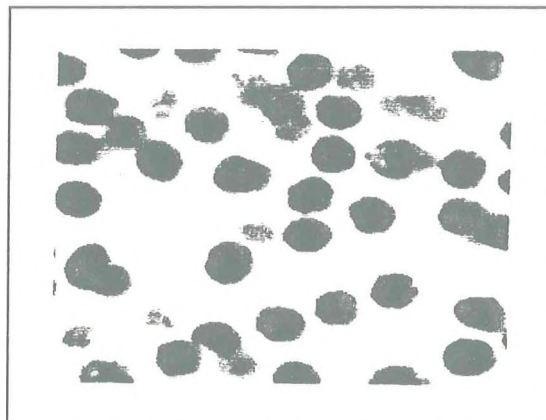
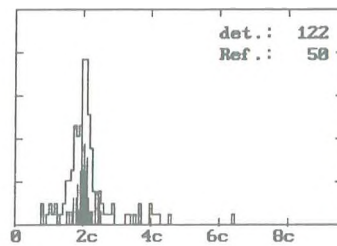
**PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA PLOIDIA E DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR POR CITOMETRIA ESTÁTICA COM O PROGRAMA ACAS-3**

Casos	Histogramas	> 2,5c (%)	>5c (%)	Fase S	Coef. Var. Linfócitos	Coef. Var. Tumor
1	III	98	14	35	11	11
2	I	61	2	26	4,3	9,9
3	III	99	33	53,7	8,5	9,9
4	III	94	22	65,7	8,1	9,2
5	III	93	19	58,6	8,1	11,4
6	III	97	20	49	9,5	10,3
7	III	98	23	63,4	9,3	10,3
8	IV	88	19	19,8	7,8	11,4
9	I	77	2	38,9	8,9	9,3
10	III	97	17	59,5	7	11,1
11	III	95	27	69,7	13,5	9,5
12	III	98	22	20,6	14,3	10,9
13	I	68	1	34,1	8,8	10,1
14	III	99	48	55,6	7,5	11,1
15	IV	98	44	67,4	9,7	11,2
16	III	75	7	73,5	9	10,8
17	III	92	31	53,4	12,7	11,7
18	III	90	11	70,4	6,4	10,3
19	III	88	6	28,8	7,1	11,1
20	III	81	8	27,6	7,8	10,8
21	III	73	2	45,6	6,7	10,8
22	I	70	1	37,6	7,6	12,5
23	III	69	6	61,1	10,9	11,8
24	IV	86	20	63,8	7,8	9,8
25	III	73	3	9,4	9	10,7
26	IV	93	10	54,3	7,2	10,7
27	III	96	13	79,3	9,4	10,6
28	III	93	20	65,3	9,3	12,4
29	I	66	1	25,7	7,1	11,3
30	III	76	7	79,1	8,7	11,3
Médias	—	85,7	15,3	49,7	8,7	10,7

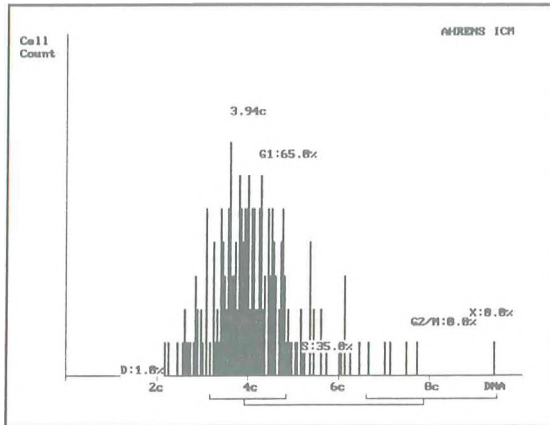
ANEXO VI

HISTOGRAMAS DE DNA POR CITOMETRIA
ESTÁTICA DOS CDIs ESTUDADOS

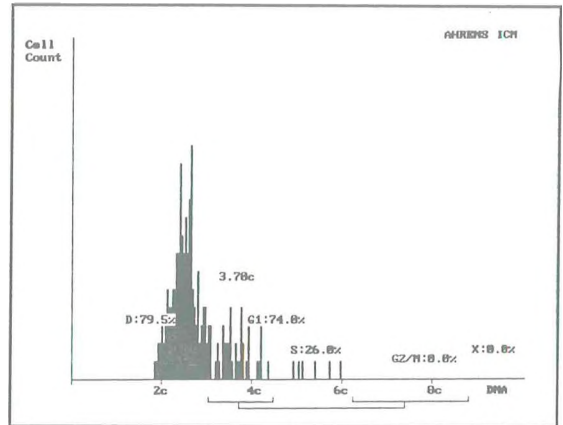
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
Citometria Estática de DNA de Cerebelo – Controle da Reação



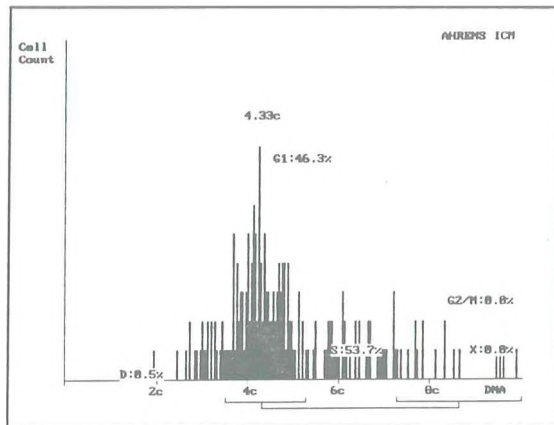
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
 Citometria Estática de DNA de Carcinomas Ductais Infiltrantes da Mama



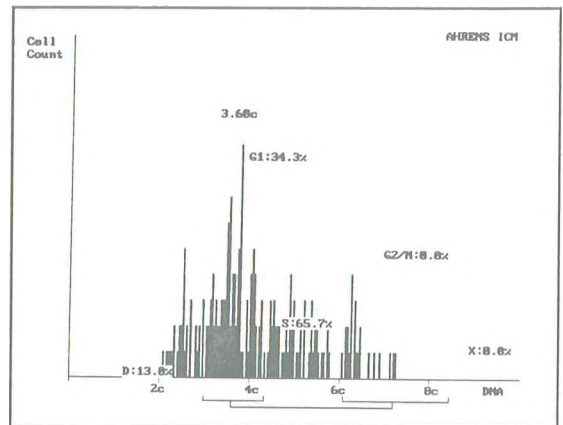
Caso 1



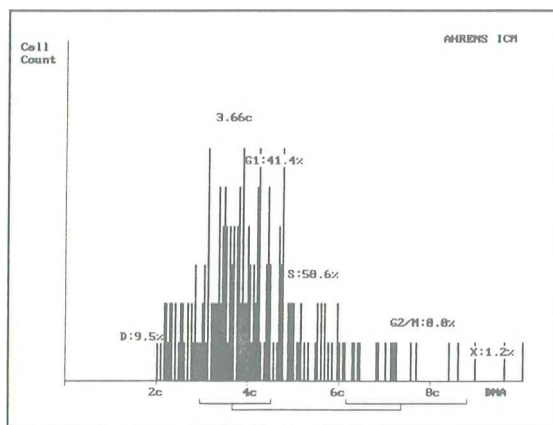
Caso 2



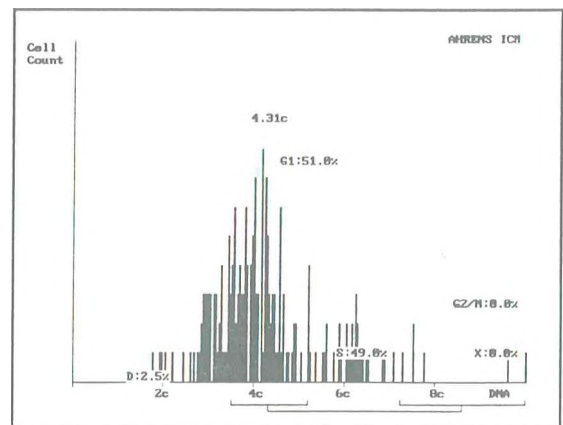
Caso 3



Caso 4

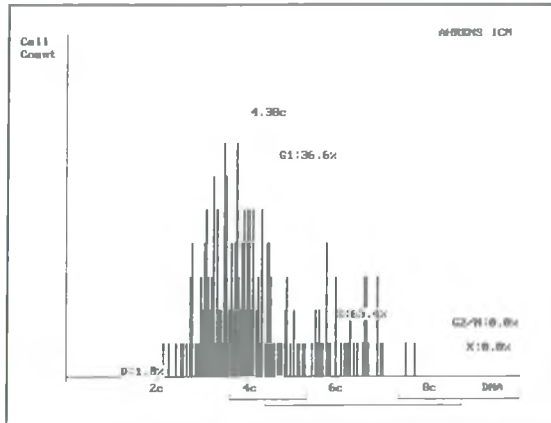


Caso 5

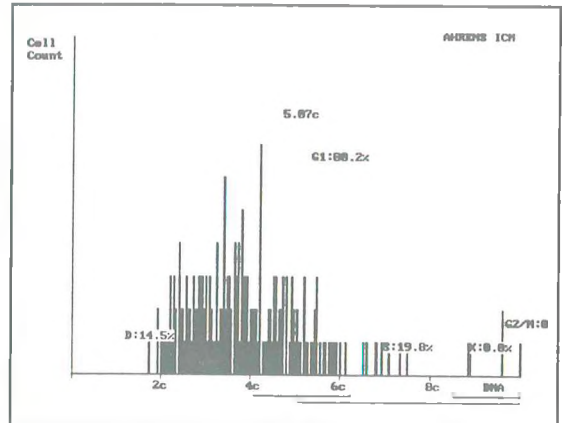


Caso 6

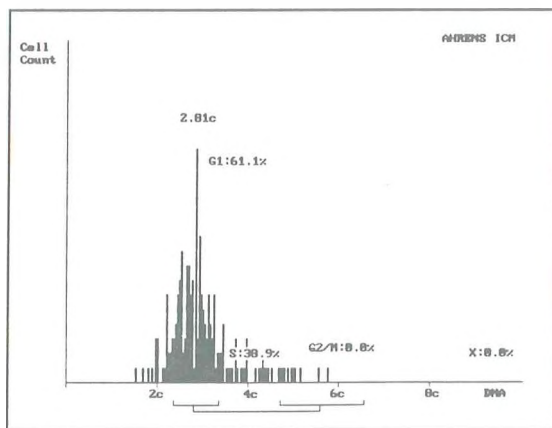
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
 Citometria Estática de DNA de Carcinomas Ductais Infiltrantes da Mama



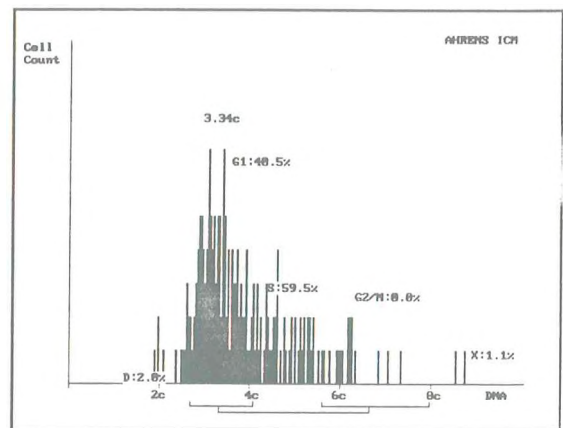
Caso 7



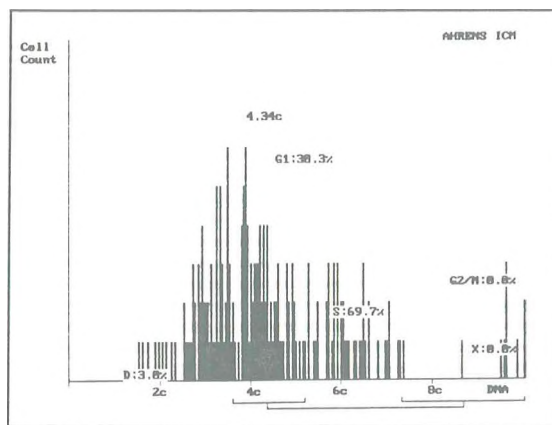
Caso 8



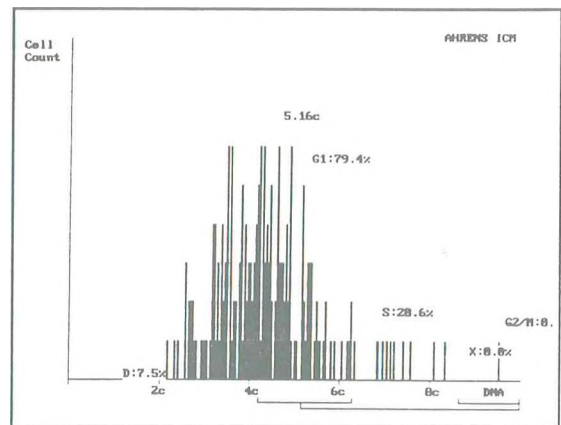
Caso 9



Caso 10

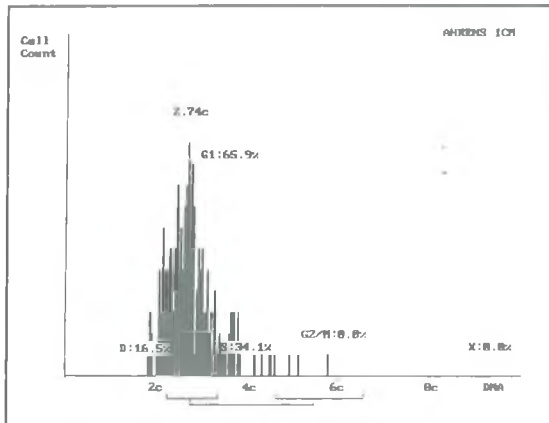


Caso 11

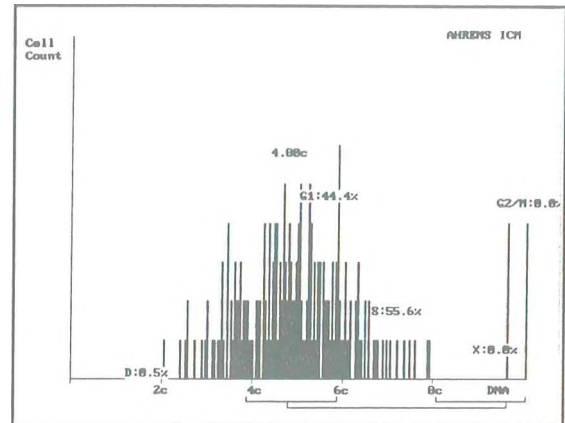


Caso 12

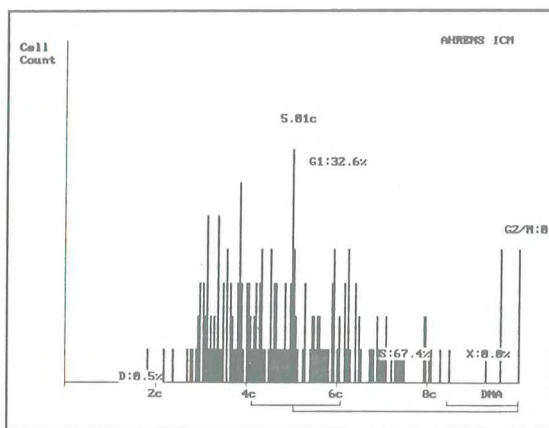
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
 Citometria Estática de DNA de Carcinomas Ductais Infiltrantes da Mama



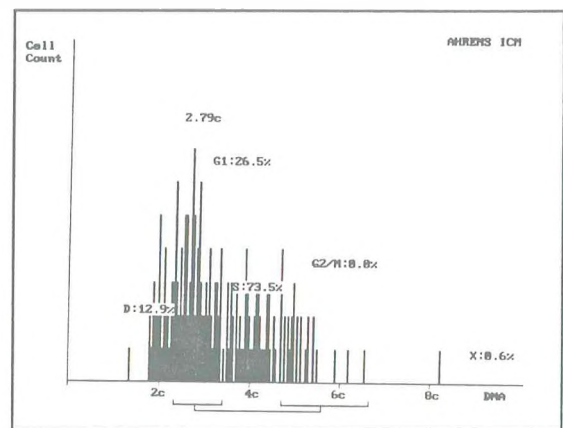
Caso 13



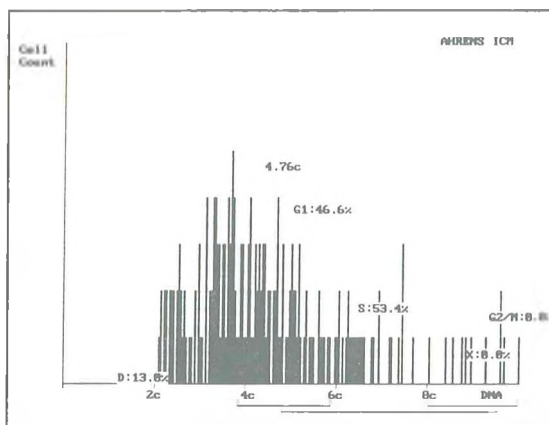
Caso 14



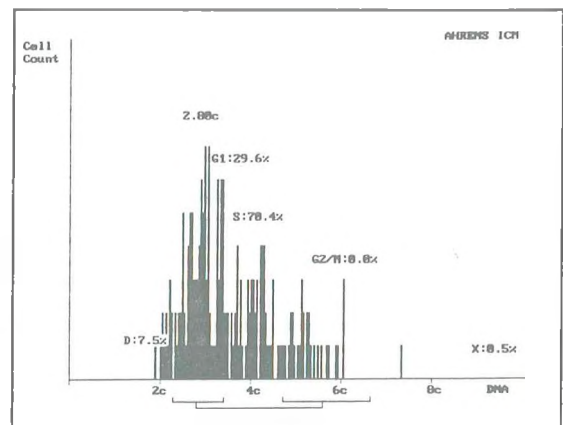
Caso 15



Caso 16

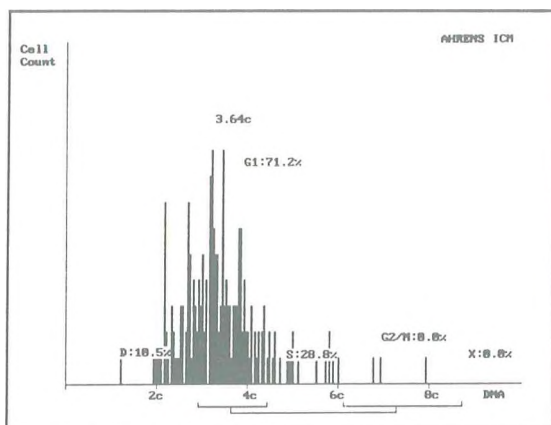


Caso 17

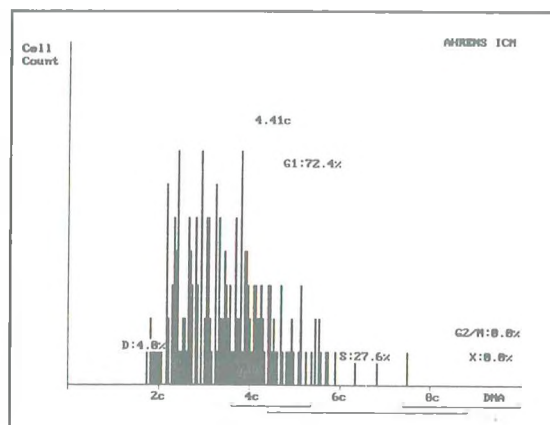


Caso 18

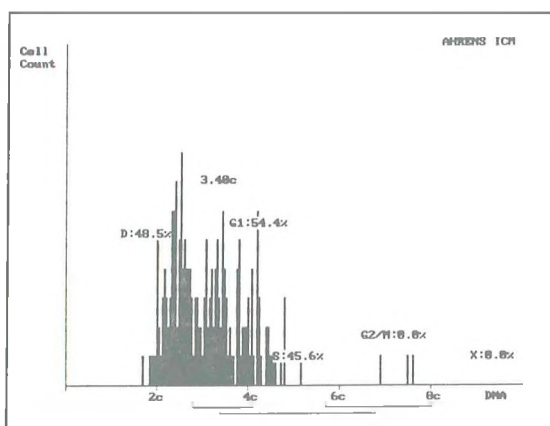
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
 Citometria Estática de DNA de Carcinomas Ductais Infiltrantes da Mama



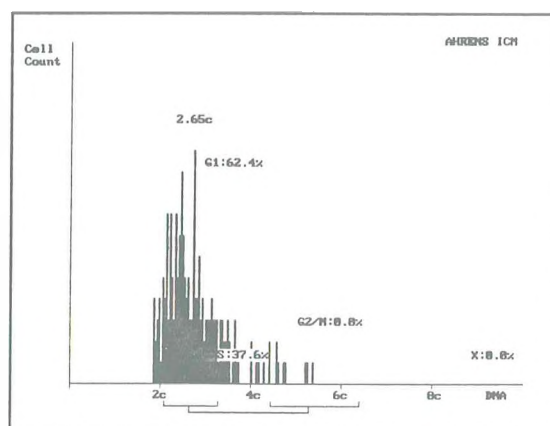
Caso 19



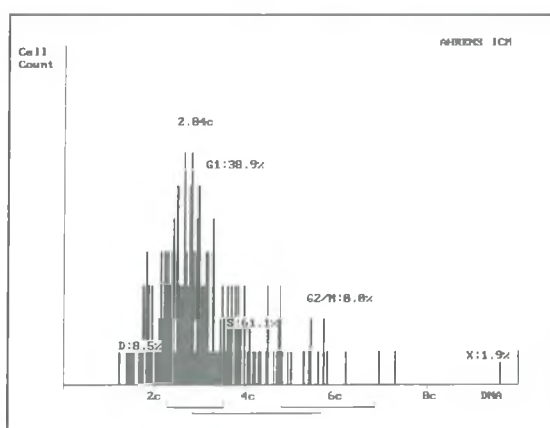
Caso 20



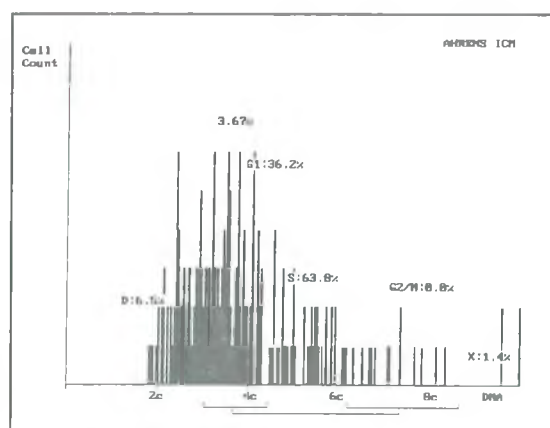
Caso 21



Caso 22

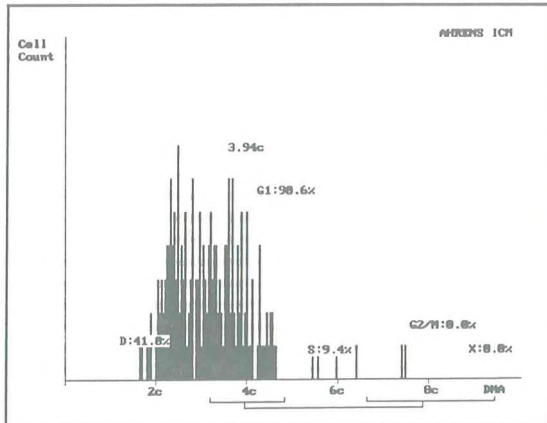


Caso 23

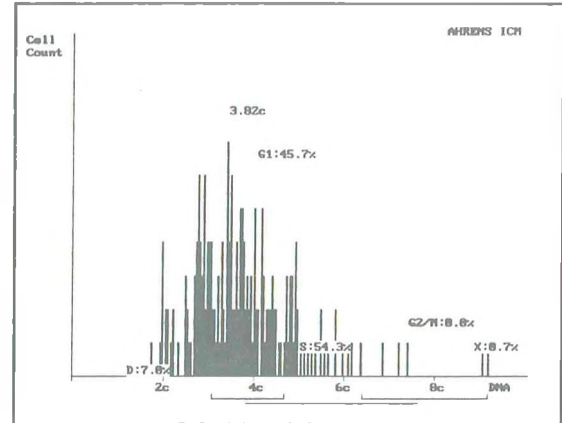


Caso 24

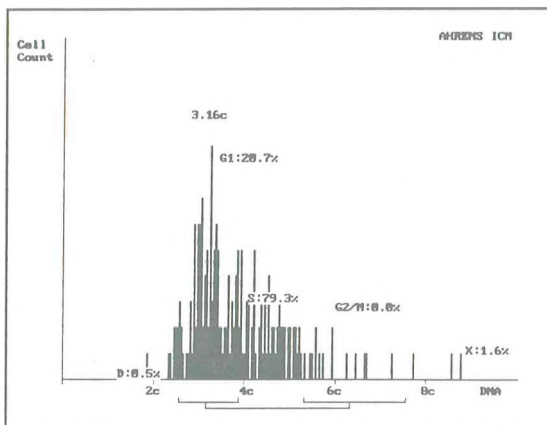
Laboratório de Anatomia Patológica – Hosp. S. João – Porto – Portugal
 Citometria Estática de DNA de Carcinomas Ductais Infiltrantes da Mama



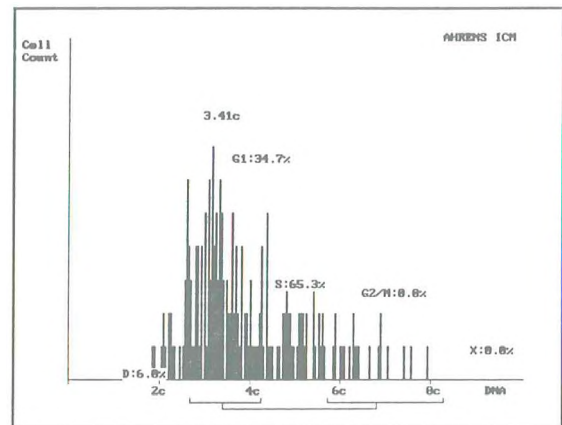
Caso 25



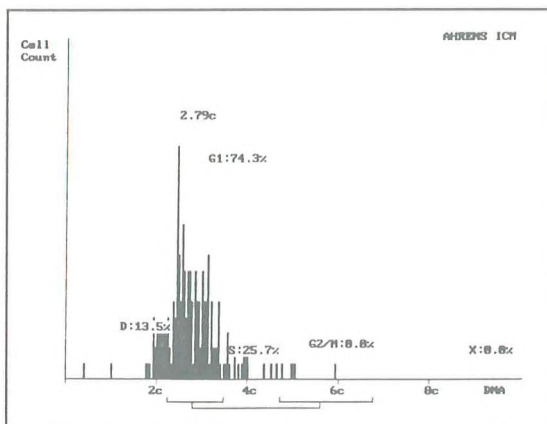
Caso 26



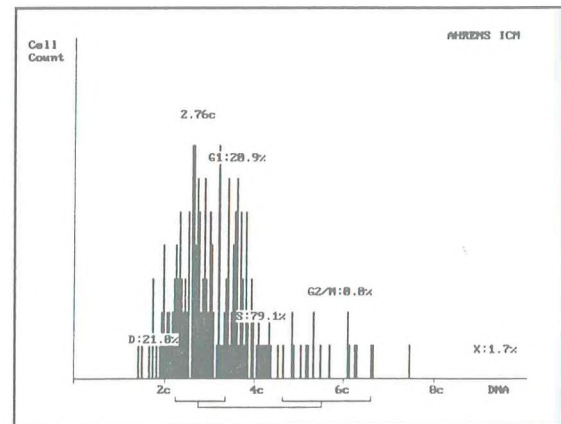
Caso 27



Caso 28



Caso 29



Caso 30

Referências Bibliográficas

- 1 - ABANDOWITZ, H.M., OW, K.T., HARDY, D., KEIGHTLEY, L., et al. Relationship between flow cytometric parameters, steroid receptors and menopausal status in breast cancers. *Oncology*, v. 44, p. 24-29, 1987.
- 2 - ABDEL-SALAM, M., MAYALL, B.H., HANSEN, L.S., CHAW, K.L., GREENSPAN J. Nuclear DNA analysis of oral hiperplasia and dysplasia using image cytometry. *J. Oral Pathol.*, v. 5, p. 431-435, 1986.
- 3 - ALHED, O. C., CLARCK, G.M., ELLEDGE, R., et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferate rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J.Natl. Cancer Inst.*, 8513:200-206, 1993.
- 4 - ANDERSEN, T.I., HOLM, R., NESLAND, J. M., et al. Prognostic significance of Tp53 alterations in breast carcinoma. *Br. J. Cancer*, v. 65, p. 549-554, 1993.
- 5 - ANDERSON, E., ESKILDSEN, J., CHEN, A., et al. S-phase fraction (SPF), debris subtraction, and correlations to ploidy and hormone receptor in primary breast carcinoma. *Cytometry (suppl)*, v. 2, p. 34, 1988.
- 6 - ASKENSTEN, U.G., VON ROSEN, A.K., NELSSON, R.S., AUER G. Intratumoral variations in DNA distribution patterns in mammary adenocarcinomas. *Cytometry*, v. 10, p. 326-333, 1989.
- 7 - ATKIN, N.B. Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. *Br. Med. J.*, v. 86, p. 271-272, 1972.
- 8 - _____, KAY, R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors based on 1465 cases. *Br. J. Cancer*, v. 40, p. 210-221, 1979.
- 9 - AUER, G., ASKENSTEN, U., ERHARDT, K., et al. Comparison between slide and flow cytophotometric DNA measurements in breast tumors. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 9, p. 138-142, 1987.
- 10 - _____, G., ERIKSSON, E., AZAVEDO, E., et al. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in human. *Cancer Res.*, v. 44, p. 394-396, 1984.
- 11 - _____, Ono, J., Nasiell, M. et al. Resersibility of bronchial cell atypia. *Cancer Res.*, v. 42, p. 4241-4248, 1982.
- 12 - _____, ASKENSTEN, U., ARHENS, O. Cytophotometry. *Human Pathol.*, v. 20, n. 6, p. 518-527, 1989.
- 13 - _____, CASPERSSON, T.O., WALLGREN, A.S. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal. Quant. Cytology*, v. 2, n. 13, p. 161-165, 1980.

- 14 - AZEVEDO, E., FALLENIOUS, A., SVANE, G., AUER, G. Nuclear DNA content. Histological grade and clinical course in patients with non-palpable mammographically detected breast adenocarcinomas. *Am. J. Clin. Oncol.*, v. 13, n. 1, p. 23-27, 1990.
- 15 - BAILDAM, A.D., ZALOUDI, 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*, v. 55, p. 553-559, 1993.
- 16 - BALSLEV, I., CHRISTENSEN, I.J., RASMUSSEN, B.B., et al. Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node negative breast cancer. *Int. J. Cancer*, v. 56, p. 16-25, 1994.
- 17 - BARNES, D.M., DUBLIN, E.A., FISHER, C.J., et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. an important new independent indicator of prognosis? *Human Pathol.*, v. 24, n. 5, p. 469-476, 1993.
- 18 - BATSAKIS, J., SNEIGE, N., EL-NAGGAR K. Flow cytometry DNA content and S-phase fraction analysis of breast cancer. *Cancer (Suppl.)*, v. 71, n. 6, p. 2151-2156, 1993.
- 19 - BAUER, T.W., TUBBS, R.R., EDINGER, M.G., et al. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 93, p. 322-326, 1990.
- 20 - BEERMAN, H., KLUIN, P.M., HERMANS, J., et al. Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, v. 45, p. 34-9, 1990.
- 21 - BICHEL, P., POULSEN, H.S., ANDERSEN, J. Estrogen receptor content and ploidy of human mammary carcinoma. *Cancer*, v. 50, p. 1771-1774, 1982.
- 22 - BLOOM, H.J.G., RICHARDSON, W.W. Histological grading and prognostic in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer*, v. 9, p. 359-377, 1957.
- 23 - BOHN, N. SANDRITZER, W. DNA in human tumors: a cytophotometrics study. *Curr. Top. Pathol.*, v. 60, p. 152-219, 1975.
- 24 - BÖCKING, A., CHATELAIN, R., BIESTERFELD, S., et al. DNA grading of malignancy in breast cancer. Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Anal. Quant. Cytol.*, v. 11, n. 2, p. 73-80, 1989.
- 25 - BRUMINI, R. *Cancer no Brasil. Dados Histopatológicos. 1976-80.* Rio de Janeiro: Dataprev, 1982. 443p.
- 26 - BRYNE, M. Prognostic value of various molecular and celular features in oral squamous cell carcinoma: a review. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 20, p. 413-420, 1991.

- 27 - BURGER, G., AUBELE, M., JÜTTING, U., AUER, G. Interactive cytometry. Change or Evil or Bias. *Path.Res.*, v. 188, p. 391-395, 1992.
- 28 - CATTORETTI, G., RILKE, F., ANDREOLA, S., et al. p53 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, v. 41, p. 178-181, 1988.
- 29 - CHISTOV, K., MILEV, A., TODOROV, U. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. *Cancer*, v. 64, p. 673-679, 1989.
- 30 - CLARCK, G.M., DRESSLER, L.G., OWENS, M.A., et al. Prediction of relapse and survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 627-633, 1984.
- 31 - _____, MCGUIRRE, W.L., HUBAY, C.A. et al. Progesterone receptor as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 309, p. 1343-7, 1983.
- 32 - CLAUD, R.D., WEINSTEIN, R.S., HOWUDY, A., et al. Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Modern Pathol.*, v. 2, p. 463-468, 1989.
- 33 - COPE, C., ROWE, D., DELBRIDGE I., et al. Comparison of image analysis and flow cytometric determination of cellular DNA content. *J. Clin.Pathol.*, v. 44, p. 147-151, 1991,
- 34 - CORNELISSE, C.J., DEKONING, H.R., MOOLENAAR, A.J., et al. Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement. *Anal. Quant. Citol.*, v. 6, p. 9-18, 1984.
- 35 - _____, VAN DE VELDE, C.J.H., CASPER, R.J.C. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry*, v. 8, p. 225-234, 1987.
- 36 - _____, VAN DRIEL-KULKER, A.M. DNA image cytometry on machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow cytometry and scanning cytophotometry. *Cytometry*, v. 6, p. 471-477, 1985.
- 37 - COULSON, P.B., THORNTHWAITE, J.T., WOOLLEY, T.W., et al. Prognostic indicators including DNA histograms type, receptor content and staining related to human breast cancer patients survival. *Cancer. Res.*, v. 47, p. 4729-4735, 1987.
- 38 - CRUZ, I., DAVID, L. FELINO, A., SOBRINHO- SIMOES, M. DNA analysis of odontogenic cystic lesion of the jaws. *Patología*, v. 26, p. 297-303, 1993.
- 39 - DAVEY, D.D., BANKS, E., JENNINGS, D., et al. Comparison of nuclear grade and DNA cytometry in breast carcinoma aspirates to histologic grade in excised cancers. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 99, n. 6, p. 708-713, 1999.
- 40 - DORMAN, A., GRAHAM, D., CURRAN, B., et al. Ploidy of smooth muscle tumours: Retrospective image analysis study of formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.*, v. 43, p. 465-468, 1990,

- 41 - DOWLE, C.S., OWAINATI, A., ROBINS, A., et al. Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br. J. Surg.*, v. 74, p. 133-136, 1987.
- 42 - DOWSON, A.E. NORTON, JR., WEINBERT, C.S. Comparative assessment of proliferation and content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n. 5, p. 1115-1120, 1990.
- 43 - DRESSLER, L.G., SEAMER, L.C., OWENS, M.A., et al. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimen. *Cancer*, v. 61, p. 420-427, 1988.
- 44 - EWERS, S.B., LANGSTROM, E., BALDETORP, B. KILLANDER, D. Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinico pathological correlations. *Cytometry*, v. 5, p. 408-419, 1984.
- 45 - FALKMER, U.G. Methodological aspects on DNA cytometry . Thesis. Dept. of Pathology, karolinska Hospital, Stockholm, 1989.
- 46 - FALLENIUS, A: DNA content and Prognosis in breast cancer. Thesis, Karolinska hospital, Stockholm. 1986.
- 47 - _____, AUER G., CARTENSEN, J. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer*, v. 62, p. 331-41, 1988.
- 48 - _____, FRANZÉN, S., AUER, G. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphological factors: a retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer*, v. 62, p. 221-301, 1988.
- 49 - FAUSEL, R.E., BURLEIGH, W., KAMINSKY, D.B. DNA quantification in colon rectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 12, p. 21-27, 1990.
- 50 - FEICHTER, G.E., MUELLER, A., KAUMANN, M., et al. Correlation of DNA flow cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. *Int. J. Cancer*, v. 41, p. 823-828, 1988.
- 51 - FELMAN, P., FRENCH, M., SOUCHIER, C. et al. Comparison between image and flow DNA cytometry in non-Hodgkins lymphomas. *Pathol. Res. Pract.*, v. 185, p. 708-714, 1989.
- 52 - FERREIRA, M., FERREIRA, F.V.A., JUAÇABA, S.F. Estudo do câncer de mama no Ceará. Epidemiologia, Anatomopatologia, Importância prognóstica e terapêutica de fatores biológicos com ênfase à biologia molecular. Dados preliminares. In: Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, XII Encontro de Pós-Graduação, I., 1993, Fortaleza. Anais... Fortaleza: UFC/Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 1993, p. 239.
- 53 - _____, JUAÇABA, S.F., BEZERRA, A.E.M. *et al.* Frequência e características das neoplasias malignas da mama feminina no Departamento de

Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. In: Outubro Médico, 8., 1992, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Centro Médico Cearense, 1992. p. 190.

- 54 - FISHER, B., BAUER, M., WICKERHAM, D.E. et al. Relation of number of positive axillary nodes to prognosis of patients with primary breast cancer. *Cancer*, v. 542, p. 1551-1557, 1983.
- 55 - _____, GUNDUZ, N., CONSTANTINO, J., et al. DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of Ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABPB-04. *Cancer*, v. 68, p. 1465-1475, 1991.
- 56 - _____, REDMOND, C., FISHER, E.R. et al. Relative worth of estrogen or progesteron receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis node negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J. Clin. Oncol.*, v. 6, p. 1076-1087, 1988.
- 57 - _____, SLACK, N.M., BROSS, I.D.J. et al. Cancer and the breast: size of the neoplasm and prognosis. *Cancer*, v. 24, p. 1071-1080, 1969.
- 58 - FISHER, E.R., REDMOND, C.K., LIU, H., et al. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer*, v. 45, n. 2, p. 349-353, 1980.
- 59 - FOSSA, S.D., THORUD, E., SHOAB, M.C., et al. DNA flow cytometry in primary breast carcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, (A) v. 92, p. 475-480, 1984.
- 60 - FRIERSON, H. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 15, n. 4, p. 358-367, 1991.
- 61 - _____. Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. *Hum. Pathol.*, v. 24, n. 1, p. 24-29, 1993.
- 62 - GHALI, S.O., LIAU, S., LEPLITZ, C., PRUDENTE, R. A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh frozen breast carcinoma by image analysis versus flow cytometry. *Cancer*, v. 70, n. 11, p. 2668-2672, 1992.
- 63 - GNANT, M.F.X., BLIJHAM, G.H., REINER, A. et al. Aneuploidy fraction but not DNA index is important for the prognosis of patients with stage I and II breast cancer. 10 year results. *Annals of Oncol.*, v. 4, p. 643-650, 1993.
- 64 - GIARETTI, W. A model of DNA aneuploidization and Evolution in colorectal cancer. *Laboratory Investigation* v. 71, n. 6, p. 904-910, 1994.
- 65 - GREENE, D.R., TAYLOR S.R., WHEELER, T.M., SCARDINO, P.T. DNA ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer: a preliminary report. *Cancer. Res.*, v. 51, p. 4084-4089, 1991

- 66 - HAAG, D., GOERTTLER, K., TSCHAHARGANE, C. The proliferative index (PI) of human breast cancer as obtained by flow cytometry. *Pathol. Res. Pract.*, v. 178, p. 315-322, 1984.
- 67 - Haagensen, C.D. *Doenças da mama*. 3. ed. São Paulo: Roca, 1989. p. 674.
- 68 - HARVEY, J.M., STERRETT, G.F., BERRYMAN, I.L., HOPLEY, J.M. Nuclear DNA content of human breast carcinoma: a comparison of results obtained by microspectrophotometry and flow cytometry of paraffin embedded tissue. *Pathology*, v. 25, p. 261-267, 1993.
- 69 - HEDLEY, D.W., CLARCK, G.M., CORNELISSE, C.J., et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry*, v. 14, p. 482-485, 1993.
- 70 - _____, Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five years. *Cytometry*, v. 10, p. 229-41, 1989.
- 71 - _____, RUGG, C.A., GELBER, R.D. Association of DNA index and S-phase fraction with prognostic of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.*, v. 47, p. 4729-4735, 1987.
- 72 - HELIN, H.J., HELLE, M.J., KALLIONIEMI, O-P, ISOLA, J.J.. Immunohistochemical determinations of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlations with histopathology and DNA flow cytometry. *Cancer*, v. 63, p. 1761-1767, 1989
- 73 - HEMSTREET, G.P., ROLLINS, S., JONES, P., et al. Identification of a high risk subgroup of grade I transitional cell carcinoma using image analysis based deoxyribonucleic acid ploidy analysis of tumor tissue. *J. Mol.* v. 146, p. 1525-1529, 1991.
- 74 - HORSFALL, D.J., TILLEY, W.D., ORELL, S.R., et al. Relationship between ploidy and steroid hormone receptor in primary invasive breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 53, p. 23-28, 1986.
- 75 - HOSTETTER, A.L., HRAFNKELSSON, J., WINGREN, S. et al. A comparative study of DNA cytometry methods for benign and malignant thyroid tissue. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 89, p. 760-763, 1988.
- 76 - ISOLA, J.J., HELIN, H.J., HELLE, M.J., KALLIONIEMI, O-P. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparisons of Ki-67 immunohistochemical study. DNA flow cytometric analysis and mitotic count. *Cancer*, v. 65, p. 1180-1184, 1990.
- 77 - JAKOBSEN, A., POULSEN, H.S., MADSSON, E.L., et al. Ploidy level of human breast carcinoma relation to histopathologic features and hormone receptor content. *Acta. Radiol. Oncol. Rad. Ther Phys. Biol.*, v. 23, p. 103-107, 1984.

- 78 - JOENSUU, H., TOIKKANEN, S., KLEMI, P.J. DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*, v. 66, p. 331-340, 1990.
- 79 - KALLIONIEMI, O-P., BLANCO, G., ALAVAIIKKO, M., et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA-histograms in breast cancer. *Cancer*, v. 62, p. 2183-2190, 1988.
- 80 - _____, _____, _____ *et al.* Tumor DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 56, p. 637-642, 1987
- 81 - KAPUSTA, L., ZBIERANOWSKI, I., DEMIANIUK, C., MURRAY, D. The role of DNA flow and image cytometry in the evaluation of body cavity fluids. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 13, p. 187-192, 1991.
- 82 - KEY, G., BECKER, H.G., BARON, B. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pairs repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab. Invest.*, v. 68, n. 6, p. 629-634, 1993.
- 83 - KEY, G., PETERSEN, J.L., BECKER, M.H.G. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax reaction. *J. Clin. Pathol.*, v. 46, p. 1080-1084, 1993.
- 84 - KEYHANI-ROFAGHA, S., O'TOOLE, R.V., FARRAR, W.B. Is DNA ploidy an independent prognostic indication in infiltrative node negative breast adenocarcinoma? *Cancer*, v. 65, p. 1577-1584, 1990.
- 85 - KNIGHT, W.A., LIVINGSTON, R.B., GREGORY, E. J. et al. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res.*, v. 37, p. 4669-71, 1977.
- 86 - KREICBERGERS, A., CEWRIEN, G., TRIBUKAIT, B. et al. Comparative single cell and flow DNA analysis of bone sarcoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 3, p. 121-127, 1981.
- 87 - KUTE, T.E., MUSS, H.B., HOPKINS, M. et al. Relationship of flow cytometry results to clinical and steroid receptor status in human breast cancer. *Breast cancer. Res. Treat.*, v. 6, p. 113-121, 1985.
- 88 - LAJOIE, G. ZBIERANOWSKI, I., DEMIANIUK, C., et al. A comparative study of DNA quantitation in breast carcinoma with image cytometric analysis and *in vitro* fine-needle aspiration with flow cytometric analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 100, p. 456-462, 1993.
- 89 - LEE, A.K.C., WILEY, B., DUGAN, J.M., et al. Quantitative DNA analysis and proliferation in breast carcinomas. A comparison between image analysis and flow cytometry. *Path. Res. Pract.*, v. 188, p. 428-432, 1992.

- 90 - LEWIS, W.E., Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node negative breast cancer patients. *Cancer*, v. 65, p. 2315-2320, 1990.
- 91 - LONGIN, A., FONTANIÈRE, B., PINZANI, V., et al. An image cytometric DNA analysis in breast neoplasms. Parameters of DNA aneuploidia and their relationship with conventional prognostic factors. *Path. Reser. Pratic.*, v. 188, p. 466-472, 1992.
- 92 - LOPES, E.R., ABREU DE E., GADELHA, M.I.P. Detecção do Câncer de mama: atualização e recomendações. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 39, n. 1, p. 21-26, 1993.
- 93 - LUCA, L.A., SCHMITT, F.C., TRAIMAN, P., et al. Consideração sobre o Câncer Localmente Avançado de Mama (CLAM) acrescida de identificação dos receptores de estrógenos usando anticorpos monoclonais. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 39, n. 1, p. 17-32, 1993.
- 94 - LUZZATTO, R., GRAUDENZ, M.G., DIAS, C.L., et al. Cancer de mama: análise de 3016 casos de patologia cirúrgica (1968/1982). *R. AMRIGS, Porto Alegre*, v. 31, n. 2, p. 106-108, 1987.
- 95 - LYKKESFELDT, A.E., BALSLEV, I., CHRISTENSEN, I.J., et al. DNA ploidy and S-phase fraction in primary breast carcinomas in relation to prognostic factors and survival for premenopausal patients of high risk for recurrent disease. *Acta Oncol.*, v. 27, p. 749-756, 1988.
- 96 - MANSOUR, E.G., GRAY, R., SHATHALA, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 485-490, 1989.
- 97 - MASTERS, J.R.W., CAMPLEJOHN, R.S., MILLIS, R.R., RUBENS, R.D. Histological grade, elastosis, DNA ploidy, and the response to chemotherapy of breast cancer. *Br. J. cancer*, v. 55, p. 455-457, 1987.
- 98 - McDIVITT, R.W., STONE, K.R., CRAIG, R.B., et al. A proposed classification of breast cancer based on kinetic information derived from comparison of risk factors in 168 primary operable breast cancers. *Cancer*, v. 57, p. 269-276, 1986.
- 99 - MCGUIRE, W.C., CLARCK, C.M. Prognostic and treatment decision in axillary node negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 326, p. 1756-1761, 1992.
- 100 - _____, Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surv.*, v. 15, p. 527-529, 1986.
- 101 - MECKENSTOCK, G., BOJAR, H., HORT, W. Differentiated DNA analysis in relation to steroid receptor status, grading and staging in human breast cancer. *Anticancer Res.*, v. 7, p. 749-34, 1987.

- 102 - MENDONÇA, G.A E S. Câncer no Brasil: um risco crescente Rev. Bras. Cancerol., v. 38, n. 14, p. 167-176, 1992.
- 103 - MERKEL, D.E., MCGUIRRE, W.L. Poidy proliferative activity and prognostic DNA flow cytometry of solid tumor. Cancer, v. 65, p. 1194-1205, 1990.
- 104 - MESKER, W.E., EYSACKER, S.M.J., OUWERKEST VANVELZEN, M.C.M., et al. Discrepancies in ploidy determination due to specimen sampling errors. Analytical. Cellular Pathol., v. 1, n. 2, p. 87-95, 1989.
- 105 - MOHAMMED, R.H., LAKATUA, J., HAUS, E., YASSURINEH, WZ. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with histologic subtype and degree of differentiation. Cancer, v. 58, n. 5, p. 1076-1078, 1980.
- 106 - MONTIRONI, R. DIAMANTI, C., SANTINELLI, A., et al. Computed cycle and DNA histogram analysis in image cytometry in breast. Cancer. J. Clin. Pathol., v. 46, p. 795-800, 1993.
- 107 - MORAN, R.E., BLACK, M.M., ALPERT, L., STRAUS, M.J. Correlation of cell-cycle Kinetics, human receptors, histopathology and nodal status in human breast cancer. Cancer, v. 54, p. 1586-1590, 1984.
- 108 - MUNCK-WEKERLAND, E., KUYLEUSTIEMA, R., LINDHOLM, J., AUER, G. Image cytometry DNA analysis of dysplastic squamous epithelial lesions in the larynx. Anticancer Res., v. 11, p. 597-600, 1991.
- 109 - MUSS, H.B., KUTE, T.E., CASE, D., et al. The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast-cancer. Cancer, v. 64, p. 1894-1900, 1989.
- 110 - NASIELL, K., NASLUND, I, AUER, G. Cytomorphologic and cytochemical analysis in the differential diagnosis of cervical epithelial lesion. Anal. Quant. Cytol., v. 3, p. 196-199, 1984.
- 111 - NASLUND, I., RUBIO, C., AUER, G. Nuclear DNA changes during pathogenesis of squamous cervical carcinoma in 3,4 benzopyrene treated mice. Anal. Quant. Cytol., Histol., v. 9, p. 411-415, 1987.
- 112 - NIGRO, J.M. BAKER, S.J., PREISINGER, A.C., et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumors types. Nature, v. 342, p. 705-708, 1989.
- 113 - NOGUCHI, M., OHTA, N., THOMAS, M., et al. A retrospective study on the clinical and biological prediction of axillary with node metastasis in breast cancer J.P. Surg., v. 23, p. 573-579, 1993.
- 114 - NORDEN, T., LINDGREN, A. BERGFTRÖM, R., HOLMBERG, L. Defining a high mortality risk group among women with primary breast cancer B. J. Cancer, v. 69, p. 520-524, 1994.

- 115 - O' REILLY, S.M., CAMPLEJOHN, R.S., BARNES, D.M., et al. Node negative breast cancer: Prognostic Subgroups, defined by tumor size and flow cytometry. *J. Clin. Oncol.*, v. 8, p. 2040-2046, 1990.
- 116 - OUD, P.S., PAHLPLATZ, M.M.M., BECK, J.L.M. Image and flow DNA cytometry of small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, v. 64, p. 1304,1309, 1989.
- 117 - OSBORNE, C.K., YOCHMOWITZ, M.G., KNIGHT, W.A., MCGUIRRE, W.L. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, v. 46, p. 2884-2889, 1980.
- 118 - OTTESTAD, L., PETTERSEN, E.O., NESLAND, J.M., et al. Flow cytometric DNA analysis as prognostic factor in human breast carcinoma. *Path Res. Pract.*, v. 189, p. 405-410, 1993.
- 119 - PINOTTI, J.A., BARROS, A.L.S.D., HEGG, R. et al. Programa de Controle do Câncer de mama em países em desenvolvimento. *Série Avanços em Oncologia*, v. 2, p. 13-21, 1992.
- 120 - PORTER, P.L., COWN, A.M., KRAMP, S.G., et al. Widespread p53 over expression in human malignant tumors. *Am. J. Pathol.*, v. 140, p. 145-153, 1992.
- 121 - REMVIKOS, Y. MAGDELENAT, H., ZAJDELA, A. DNA flow cytometry applied to fine needle sampling of human breast cancer. *Cancer*, v. 61, n. 8, p. 1629-1633, 1988.
- 122 - ROBER, M.N., BARLOGIE, B., LATREILLE, J., et al. Ploidy, proliferative activity and estrogen receptors content in human breast cancer. *Cytometry*, v. 3, p. 36-41, 1982.
- 123 - RODENBURG, C.J., PLOEM-ZAAIJER, J.J., CORNELISSE, L.J., et al. Use of DNA image cytometry in addition to flow cytometry for the study of patients with advanced ovarian cancer. *Cancer Res.*, v. 47, p. 3938-3941, 1987.
- 124 - RODRIGUES, N.R., ROWAN, A., SMITH, M.E. et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 87, p. 7555-7559, 1990
- 125 - ROOS, G., ARNERLOV, C., ENIDIN, S. Retrospective DNA analysis of T3/T4 breast carcinoma using cytometry and flow cytometry. A comparative study with prognostic evaluation. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 10, p. 189-194, 1988.
- 126 - SAHIN, A.A., JUNGSIL, R.O., JAE, Y., et al. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. *Cancer*, v. 8, n. 3, p. 549-557, 1993
- 127 - SANNA, S., KALLIONIEMI, O., HELIN, H.J., ISOLA, J.J. Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node negative breast cancer as determined by image cytometry from tissue section. *Human Pathology*, v. 24, n. 12, p. 1348-1353, 1993.

- 128 - SAPI, Z., HENDRICKS, J.B., PHARIS, P.G., WILKINSON, E.J. Tissue section image analysis of breast neoplasms. Evidence of false aneuploidy. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 99, p. 714-720, 1993.
- 129 - SCHMITT, F.C., *Citometria Estática de DNA. Graduate interdisciplinary courses on Biology.* v. 2, p. 1-11, 1994.
- 130 - _____, *Eventos Moleculares na Progressão Metastática do Câncer de Mama. O Patologista* v. 34, p. 16-17, 1994.
- 131 - _____, FERREIRA, M.V.P. MIB-1 is a suitable marker of proliferative activity in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast cancer. *Intern. J. Surg. Pathol.* v. 2, n.4, p. 287-294, 1995.
- 132 - _____. FIGUEIREDO, P, LACERDA, M. DNA content in intraductal breast proliferation: a study with image analysis in Feulgen-stained paraffin-embedded sections. 20th International Congress of the International Academy of Pathology. Hong-Kong, 1994.
- 133 - _____, PEREIRA, E.M., ANDRADE, L.M, *et al.* Proliferative activity in paraffin-embedded of breast carcinoma detected by monoclonal antibody PC-10 does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. *Pathol. Res. Pract.* v. 190, p. 786-791, 1994.
- 134 - _____, LED, C., LOPES, C. p53 protein expression and nuclear DNA content in breast intraductal proliferation (in press).
- 135 - _____, *Prognóstico no Câncer de Mama: Avaliação do impacto de novos métodos face aos fatores prognósticos tradicionais. Arquivos de Med. (Port.)*, (in press).
- 136 - SCHNELLEIR, J., EPPICH, E., GREENEBAUM, E. *et al.* Flow cytometry and Feulgen cytophotometry in evaluation of effusion. *Cancer*, v. 59, p. 1307,1313, 1987.
- 137 - SHARMA, S., MISHRA, M.C., KAPUR, B.M.L., *et al.* The Prognostic significance of ploidy analysis in operable breast cancer. *Cancer*, v. 68, p. 2612-2616, 1991.
- 138 - SIGURDSSON, H., BALDETORP, B, BORG, A., *et al.* Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, p. 1045-1053, 1990.
- 139 - SIITONEN, S.M., KALLIONIEMI, O-P, HELIN, J.H., *et al.* Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer as determined by image cytometric from tissue section. *Human Pathol.*, v. 24, n. 12, p. 1348-1353, 1990.
- 140 - SILFVERSWARD, C., GUSTAFSSON, J., GUSTAFSSON, S.A., *et al.* Estrogen receptor concentrations in 269 cases of histologically classified human breast cancer. *Cancer*, v. 45, n. 8, p. 2001-2005, 1980.

- 141 - SILVESTRINI, R., BENINI, E., DAIDONE, M.G., et al. p53 as an independent prognostic marker in lymphonode-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 85, n. 12, p. 665-670, 1993.
- 142 - Soomro, S., Shousha, F., Sinnett, H.D. Oestrogen in progesterone receptors in screen-detected breast carcinoma: immunohistological study using paraffin sections. *Histopatol.*, v. 21, p. 543-547, 1992.
- 143 - SPYRATOS, F., BRIFFOD, M., GENTILE, A., et al. Flow cytometric study of DNA distribution in cytopunctures of benign and malignant breast lesions *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 9, p. 485-94, 1987.
- 144 - STAL, O., WINGREN, S., CARSTENSEN, J., et al. Prognostic value of DNA ploidy an S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinic pathological variables in primary breast cancer. *J. Cancer Clin. Oncol.*, v. 25, p. 301-309, 1989.
- 145 - TAYLOR, I.W., MUSGROVE, E.A., FRIEDLANDER, M.L., et al. The Influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumours. *Am J. Cancer Clin. Oncol.*, v. 29, p. 623-628, 1983.
- 146 - TAYLOR, S.R., ZACHARIAH, S., CHAKRABORTY, S., et al. Ploidy studies by image analysis on fine needle aspirates of the breast. *Acta Cytol.*, v. 37, n. 6, p. 923-928, 1993.
- 147 - TERENIUS, L., JOHANSSON, H., RIMSTEN, A., THORAAN, L. Malignant and benign human mammary disease. Estrogen binding in relation to clinical data. *Cancer*, 33:1364-1368, 1974.
- 148 - THOR, A.D., MOORE, D.H. F., EDGERTON, S.M., et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 84, n. 11, p. 845-855, 1992.
- 149 - THORUD, E., FOSSA, S.D., VAAGE, S., et al. Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer*, v. 57, p. 808-11, 1986.
- 150 - TOIKKANEN, S., JOENSUU, H., KLEMI. Nuclear DNA content as a prognostic factor T1-T2, No breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 93, p. 471-479, 1989.
- 151 - TORLONI, H. Registro Nacional de Patologia Tumoral. Diagnósticos de Câncer. Brasil, 1981/85: Rio de Janeiro, 1991. 324p.
- 152 - UYTERLINDE, A.M., SMENLDERS, A.M., BAAK, J.P. Reproducibility and comparison of quantitative DNA histogram features obtained with a scanning microdensitometer and flow cytometer in breast cancers. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 11:353-357, 1989.
- 153 - UYTERLINDE, A.M., SCHIPPER, N.M., BAAK, J.P.A. Comparison of extent of disease and morphometric and DNA flow cytometric prognostic

- factors in invasive ductal breast cancer. *J. Clin. Pathol.*, v. 40, p. 1432-1436, 1987.
- 154 - VALAGUSSA, P., BONADONNA, G., VERONESI, U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. *Cancer*, v. 41, p. 1170-1178, 1978
- 155 - VALLEY, J.M., BRAMMAR, W.J., LANE, D., et al. Loss of chromosome 17q13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene*, v. 6, p. 413-421, 1991.
- 156 - VISSCHER, D.W., SARKAR, F.H., WYKES, S., et al. Clinicopathologic significance of p53 immunostain in adenocarcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab. Med.*, v. 117, p. 973-976, 1993.
- 157 - _____, ZARBO, R.J., JACOBSEN, G., et al. Multiparametric deoxyribonucleic acid and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry. Clinicopathologic correlation. *Lab. Invest.*, v. 62, p. 370-378, 1990.
- 158 - WEIDNER, N., MOORE, D.H., VARTANIAN, R. Correlation of Ki-67, antigen expression with mitotic figure index and tumors grade in breast carcinomas using the novel "paraffin", reactive MIB-1 antibody. *Human pathol.*, v. 25, n. 4, p. 337-342, 1994.
- 159 - WINCHESTER, D.J., DUDA, R.B., AUGUST, C.Z., et al. The importance of DNA flow cytometry in node-negative breast cancer. *Ach. Surg.*, v. 125, p. 886-889, 1990.
- 160 - YUAN, J., HENNESSY, C., GIVAN, A.L., et al. Predicting outcome for patients with node negative breast cancer: a comparative study of the value of flow cytometry and cell image analysis for determination of DNA ploidy. *Br. J. Cancer*, v. 65, p. 461-465, 1992.
- 161 - ZBIERANOWSKI, I., LERICHE, J.C., PALVIC, B. et al. Determination of DNA ploidy in archival tissue non-Hodgkins lymphoma using flow and image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.*, v. 4, p. 303-313, 1992.