

Análise da porcentagem da DNA ploidia e de células em fase S, determinada por citometria de fluxo e por outras variáveis prognósticas em carcinomas primários de mama

The analysis of DNA ploidy and the percentage of S phase cells determined by flow cytometry and other prognostic variables in primary breast carcinomas

Edison Mantovani Barbosa¹

Resumo

Analisaram-se a DNA ploidia e a porcentagem de células em fase S, determinadas por citometria de fluxo, em biópsias de 69 carcinomas mamários. Outras variáveis prognósticas foram estudadas: 1. clínicas (raça, idade, estado menstrual, estadiamento, tamanho do tumor e a avaliação dos linfonodos axilares); 2. histológicas (comprometimento metastático dos linfonodos axilares, embolização de células neoplásicas em vasos linfáticos e sanguíneos, grau de diferenciação histológica, número de mitoses e necrose tumoral); 3. bioquímicas (receptores de estradiol e progesterona). Cotejaram-se estas variáveis com o estudo da DNA ploidia e porcentagem de fase S.

Notou-se haver uma associação significativa entre a DNA diploidia em pacientes com idade acima de 50 anos, tumores de tamanho ou igual a 2,0 cm, receptores de estradiol e receptores de progesterona. Observou-se também uma associação significativa entre a porcentagem de fase S >7,15 e pacientes na pré-menopausa, receptores de estradiol negativo e comprometimento metastático linfonodal. Constatou-se que as pacientes com tumores classificados como DNA aneuplóides, com fase S maior que 7,15, apresentaram metástases mais frequentes e sobrevida menor que aquelas com tumores DNA diplóides e fase S menor que 7,15.

Sob o ponto de vista do prognóstico pode-se constatar a importância do estudo do DNA, particularmente para o grupo pN0. Verificou-se a viabilidade de esta técnica ser realizada em nossa rotina para o estudo prognóstico do câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama; citometria de fluxo; proliferação celular; conteúdo de DNA; prognóstico.

Trabalho desenvolvido no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Oncologia.

1 - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (São Paulo - SP).

Resumo da dissertação de mestrado defendida em 1995 na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof. Dra. Maria Mitze Brentani.

Endereço para correspondência: Edison Mantovani Barbosa - Rua Estados Unidos, 822 - 01427-002 - São Paulo - S.P

Abstract

This study shows the content analysis of DNA ploidy and the percentage of S phase cells determined by flow cytometry and other prognostic variable in 69 specimens of breast carcinomas. A significant association between DNA ploidy and the tumor size, estrogen and progesterone receptors, was noticed. Also another association was identified between the percentage of S phase and menstrual status, estrogen receptors, and axillary node metastases. Tumors classified as DNA aneuploid, with S phase bigger than 7.15 presented more metastasis and smaller survival compared to DNA diploid tumors and S phase lower than 7.15. According to the prognostic point of view, the importance of the DNA study was demonstrated privately for the axillary node negative group.

Key words: breast cancer; flow cytometry; cell proliferation; DNA content; prognosis

Introdução

No Brasil, o câncer de mama representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina em cidades do Sul e Sudeste (Porto Alegre e São Paulo) e a segunda em algumas cidades do Nordeste (Recife e Fortaleza). No Estado de São Paulo este tipo de câncer atingiu um coeficiente de mortalidade de 11,7 por 100.000 mulheres^(1, 2).

Já há algum tempo, determinados fatores clínico-morfológicos têm sido utilizados como sinalizadores das características evolutivas dos diferentes carcinomas mamários. No entanto, sabe-se hoje que as manifestações clínicas locais do câncer de mama, na realidade, só representam a fase tardia de um longo e silencioso período de proliferação celular, iniciado muitos anos antes de o diagnóstico clínico ser possível.

A partir do final do século passado, determinados parâmetros morfológicos passaram a contribuir como referência básica para a avaliação do prognóstico destas pacientes; entretanto, o alto grau de subjetividade de sua interpretação passou a representar a principal barreira para sua ampla aceitação^(3,4). Embora a expressão metastática dos linfonodos axilares continue representando o melhor marcador prognóstico para o câncer de mama, devemos ressaltar que 30% das pacientes com ausência de linfonodos metastáticos (N0) irão apresentar recorrência e morte em 10 anos de seguimento, o que evidencia a deficiência deste fator como marcador isolado⁽⁵⁾. Recentemente, os estudos têm se concentrado em alguns indicadores prognósticos biológicos, particularmente aqueles correlacionados com a proliferação celular, como é o caso do estudo da DNA ploidy e da

porcentagem de células em fase S por citometria de fluxo.

A detecção da aneuploidia está diretamente relacionada à ocorrência de perda ou ganho de DNA, resultante de importantes mutações cromossômicas^(6, 7). Quanto ao estudo da porcentagem de células em fase S, ele representa a expressão da quantificação das células concentradas na fase S do ciclo de reprodução celular, ou seja, corresponde ao momento da replicação do DNA. Este marcador tem sido reconhecido como um importante sinalizador da proliferação celular por inúmeros autores⁽⁸⁾.

O principal objetivo deste estudo é realizar a análise da DNA ploidy e da porcentagem de células em fase S determinada por citometria de fluxo, e compará-las a outras variáveis prognósticas clássicas em carcinomas primários de mama de pacientes brasileiras; até o momento, não dispomos de estudo semelhante em nossa literatura.

Material e métodos

Analisamos os dados clínicos, morfológicos e bioquímicos de 69 pacientes portadoras de câncer de mama primário e estabelecemos suas relações de dependência com a quantificação do DNA. Todas as pacientes eram brancas, do sexo feminino e submeteram-se a tratamento cirúrgico, sendo oito (11,6%) mastectomias do tipo Halsted, 46 (66,6%) mastectomias do tipo Patey e 15 (21,8%) quadrantectomias. Todas as cirurgias foram precedidas de biópsia incisional ou excisional e exame histopatológico de congelamento.

A idade da população estudada variou de 32 a 83 anos, sendo que 23 (33,3%) mulheres

estavam na pré-menopausa e 46 (66,6%) na pós-menopausa. Consideramos como pré-menopausadas as pacientes que apresentaram-se amenorréicas há pelo menos um ano da data considerada. Quanto ao estadiamento (TNM-UICC-1989) oito (11,6%) foram classificadas como estágio I, 17 (24,6%) como estágio IIA, 20 (29,0%) como IIB, 17 (24,6%) como IIIA e sete (10,2%) como IIIB.

As pacientes tiveram um seguimento médio de 27 meses e a confirmação da recorrência foi obtida através de exames histopatológicos, radiológicos ou ultra-sonográficos.

Métodos

As amostras dos tumores foram colhidas no momento do ato cirúrgico e imediatamente dissecadas para remover os focos de tecido gorduroso associados; a seguir realizamos o congelamento e o armazenamento dos fragmentos em nitrogênio líquido.

Utilizamos a coloração de hematoxilina e eosina nos cortes do material fixado, para determinar o tipo histológico dos tumores. Foram considerados para este estudo apenas os tumores ductais infiltrativos (classificação histológica dos tumores mamários - OMS)

Os estudos microscópicos foram realizados por pelo menos dois patologistas, com o objetivo de diminuir a subjetividade da interpretação.

Consideramos a seguinte classificação para o estudo do número de mitoses: escasso, quando foram detectadas até 5 mitoses por 10 campos de grande aumento; moderado, de 5 a 10 mitoses por 10 campos, e abundante quando encontramos mais de 10 mitoses por 10 campos.

Para o estudo do grau de diferenciação histológica utilizamos a classificação de Bloom e Richardson (1957), levando-se em consideração os aspectos morfológicos da formação tubular, alterações nucleares e hiper-cromatismo nuclear.

A análise da embolização vascular e linfática e da presença de necrose foi realizada por simples constatação da sua presença ou ausência à microscopia óptica.

A dosagem bioquímica dos receptores de estradiol e progesterona foi realizada atra-

vés do clássico método do carvão-dextrana (DCC) conforme metodologia descrita previamente por Brentani (1981).

Consideramos positivos os valores de referência para os receptores de estradiol (RE) quando a concentração máxima foi maior ou igual a 10,0 fMol/mg de proteína; e 20,0 fMol/mg de proteína para os receptores de progesterona (RP).

Em todos os ensaios, foram realizados controles de população DNA diplóide com linfócitos obtidos no sangue periférico de doadores humanos considerados clinicamente normais.

No que se refere à análise da DNA ploidia e à porcentagem de células em fase S realizada por citometria de fluxo, empregamos a técnica descrita por Vindelov (1990) e utilizamos apenas material a fresco para este estudo. Para esta análise empregamos o citômetro de fluxo EPICS-Profile II. A análise da ploidia e da fração de células em cada fase do ciclo celular foi realizada utilizando-se o programa de computador Multicycle (Phoenix Flow-Systems) San Diego, Ca. USA.

Consideramos para este estudo o padrão de distribuição de DNA classificado em DNA diplóide e DNA aneuplóide, e como critério de definição do ponto de corte (alta ou baixa) da porcentagem de células em fase S, a mediana dos valores encontrados^(7, 15).

Resultados

No que se refere à quantificação do DNA nas células neoplásicas, foram estudadas através da citometria de fluxo uma média de 22.059 células por amostra de tumor, com um coeficiente médio de variação (CV) do pico G1 diplóide de 4,72.

O índice de DNA apresentou uma média de 1,43 (desvio-padrão = 0,39) sendo que 28 (43,1%) dos tumores foram classificados como DNA diplóide e 37 (56,9%) como DNA aneuplóide.

Os resultados referentes à análise da DNA ploidia em relação aos fatores prognósticos estão apresentados na Tabela 1, onde pode-se observar uma relação estatisticamente significativa com a idade, tamanho do tumor, receptores de estradiol e progesterona e fase S.

Tabela 1 - Resultado da análise estatística da DNA ploidia em relação aos fatores analisados.

Fatores analisados	DNA Ploidia		c ²	p
	DNA Diplóide N (%)	DNA Aneuplóide N (%)		
Idade			4,94	0,033
≤ 50	8 (28,6)	22 (59,5)		
> 50	20 (71,4)	15 (40,5)		
Tamanho			7,26	0,026
≤ 2,0	9 (32,1)	4 (10,8)		
> 2,0 e ≤ 5,0	16 (57,2)	23 (62,2)		
> 5,0	3 (10,7)	10 (27,0)		
Estado menstrual			0,08	0,782
pré-menop.	8 (28,6)	11 (29,7)		
pós-menop.	20 (71,4)	26 (70,3)		
Recep. de estradiol				
≤ 10	5 (17,9)	21 (56,8)		
> 10	23 (82,1)	16 (43,2)		
Recep. de progest.			6,83	< 0,01
≤ 20	9 (32,1)	25 (67,6)		
> 20	19 (67,9)	12 (32,4)		
Comp. metas. axilar			0,15	0,703
pN(-)	14 (50,0)	19 (51,4)		
pN(+)	14 (50,0)	18 (49,6)		
Emb. linfática			0,15	0,704
sim	8 (28,6)	10 (27,0)		
não	20 (71,4)	27 (73,0)		
Emb. sangüínea			0,00	0,952
sim	6 (21,4)	7 (18,9)		
não	22 (78,6)	30 (81,1)		
Número de mitoses			2,85	0,241
escasso	10 (35,7)	11 (29,8)		
moderado	15 (53,6)	17 (45,9)		
abundante	3 (10,7)	9 (24,3)		
Grau de dif.			0,13	0,937
grau alto (GI)	5 (17,9)	5 (13,5)		
grau interm. (GII)	17 (60,7)	21 (56,8)		
grau baixo (GIII)	6 (21,4)	11 (29,7)		
Necrose			0,48	0,486
sim	15 (53,6)	22 (59,5)		
não	13 (46,4)	15 (40,5)		
Fase S			7,39	< 0,01
≤ 7,15	19 (82,6)	9 (39,1)		
> 7,15	4 (17,4)	14 (60,9)		

Nas pacientes com idade superior a 50 anos, os tumores apresentaram-se DNA aneuplóides em 59,5% dos casos e DNA diplóides em 40,5%, enquanto para o grupo com idade inferior a 50 anos o inverso ocorreu, predominando os tumores diplóides (71,4%) em relação aos aneuplóides (28,6%) (p=0,033).

Tumores menores que 2,0 cm apresentaram-se, em sua maioria, diplóides (32,1%), enquanto os maiores que 5,0 cm eram majoritariamente aneuplóides (27,0%) (p=0,026).

Quanto à expressão de receptores hormonais com a DNA ploidia, percebemos que os tumores mais indiferenciados não expressavam receptores de estradiol e progesterona, e eram predominantemente DNA aneuplóides (RE = 56,8% - RP = 67,6%), enquanto aqueles que expressavam estes receptores mostraram-se mais DNA diplóides (RE = 82,1% - RP = 67,9%) (p < 0,01).

Outra interessante correlação obtida neste estudo foi a da DNA ploidia com a porcen-

tagem de células em fase S, onde observamos que os tumores DNA diplóides têm fase S menor (82,6%), enquanto os DNA aneuplóides possuem fase S maior (60,9%) ($p < 0,01$).

A DNA ploidia apresentou, ainda, uma tendência de correlação sem significado estatístico com o número de mitoses (DNA diplóide e mitoses escassas), o grau de diferenciação (GI/DNA diplóide e GIII/DNA aneuplóide) e necrose tumoral (presente/DNA aneuplóide). A DNA ploidia não mostrou qualquer correlação com estado mens-

trual, comprometimento metastático axilar e embolizações linfática e sangüínea.

De forma semelhante, estabelecemos a correlação da porcentagem de fase S com os fatores descritos e observamos uma correlação estatisticamente significativa entre o estado menstrual, o receptor de estradiol e comprometimento axilar (Tabela 2). Pacientes pré-menopausadas possuíam maior síntese de DNA (fase S = 7,15), enquanto pacientes pós-menopausadas apresentaram tumores com menor síntese de DNA (fase S = 7,15); ($p = 0,041$).

Tabela 2 - Resultado da análise estatística da porcentagem de fase S em função dos outros fatores estudados.

Fatores analisados	% Fase S		c ²	p
	≤ 7,15 N (%)	> 7,15 N (%)		
Idade			1,31	0,25
≤ 50	8 (32,0)	13 (52,0)		
> 50	17 (68,0)	12 (48,0)		
Tamanho			1,77	0,413
≤ 2,0	8 (32,0)	4 (16,0)		
> 2,0 e ≤ 5,0	14 (56,0)	17 (68,0)		
> 5,0	3 (12,0)	4 (4,0)		
Estado menstrual			4,16	0,041
pré-menop.	6 (24,0)	13 (52,0)		
pós-menop.	19 (76,0)	12 (48,0)		
Recept. de estradiol			4,50	0,033
≤ 10	4 (16,0)	12 (48,0)		
> 10	21 (84,0)	13 (52,0)		
Recep. de progest.			1,30	0,254
≤ 20	16 (64,0)	12 (48,0)		
> 20	9 (36,0)	13 (52,0)		
Comp. metast. axilar			5,20	0,023
pN(-)	15 (60,0)	7 (28,0)		
pN(+)	10 (40,0)	18 (72,0)		
Emb. linfática			0,99	0,320
sim	8 (32,0)	4 (16,0)		
não	17 (68,0)	21 (84,0)		
Emb. sangüínea			0,12	0,733
sim	5 (20,0)	6 (24,0)		
não	20 (80,0)	19 (76,0)		
Número de mitoses			0,76	0,685
Escasso	9 (36,0)	12 (48,0)		
Moderado	9 (36,0)	7 (28,0)		
Abundante	7 (28,0)	6 (24,0)		
Grau de dif.			1,03	0,596
grau alto (GI)	6 (24,0)	7 (28,0)		
grau interm. (GII)	17 (68,0)	14 (56,0)		
grau baixo (GIII)	2 (8,0)	4 (16,0)		
Necrose			0,74	0,390
sim	13 (52,0)	16 (64,0)		
não	12 (48,0)	9 (36,0)		

Os tumores com fase S = 7,15 correlacionaram-se mais com aqueles que não expressaram receptores de estradiol (52,0%); já aqueles com fase S = 7,15 apresentaram maior correlação com os receptores positivos (84,0%; $p = 0,033$). Em relação ao comprometimento metastático axilar houve correlação maior com tumores de fase S = 7,15 (72,0%), enquanto as axilas negativas se correlacionaram mais com tumores de fase S = 7,15 (60,0%; $p = 0,023$).

Comparando-se a fase S com a idade não se observou significado estatístico no tamanho do tumor, na embolização linfática, no grau de diferenciação e necrose tumoral. Não houve correlação estatística da fase S com o receptor de progesterona, embolização sanguínea a número de mitoses.

No que se refere ao seguimento destas pacientes, observamos que, naquelas com axila negativa (pN0), predominaram os tumores DNA aneuplóides com porcentagem de fase S maior que 7,15. Da mesma forma, os óbitos estiveram relacionados com tumores aneuplóides com porcentagem de fase S maior que 7,15, independente do comprometimento metastático axilar (Tabela 3).

Discussão

A exemplo de outras neoplasias malignas, o câncer de mama é caracterizado pela proliferação incontrollável das células que sofreram alterações hereditárias ou adquiridas em seu genoma. Sabemos que certas particularidades decorrentes da heterogenicidade celular do tumor podem originar comportamentos clínicos inesperados dependentes do tipo de modificação genética ocorrido nas células tumorais. Tais situações particulares nos forçam a pensar em condutas terapêuticas individualizadas, e para tanto é fundamental conhecermos melhor os tumores a serem tratados, através de novos fatores prognósticos.

A quantificação do conteúdo de DNA, realizada por citometria de fluxo, tem sido reconhecida como um importante indicador prognóstico para o câncer de mama⁽⁹⁻¹¹⁾. Por este método de análise, podemos obter basicamente dois tipos de informação: a quantidade de DNA existente nos núcleos das células tumorais (DNA ploidia) e a distribuição porcentual das células ao longo das diferentes fases do ciclo celular (fase S).

Tabela 3 - Seguimento das pacientes em 27 meses.

	Metástase	Óbito	DNA Ploidia	(%) Fase S	Axila
Caso 47	pulmonar	não	diplóide	3,5	0/30
Caso 33	pulmonar	não	diplóide	6,0	0/23
Caso 16	óssea	não	diplóide	0	1/23
Caso 35	óssea	não	diplóide	6,2	1/30
Caso 6	óssea	não	diplóide	5,8	4/28
Caso 17	pulmonar	não	aneuplóide	7,0	0/25
Caso 43	óssea	não	aneuplóide	11,1	0/22
Caso 8	óssea+hep.+pulm.	sim	aneuplóide	14,9	0/16
Caso 3	hepática	sim	aneuplóide	17,1	0/12
Caso 41	óssea+pulmonar	sim	aneuplóide	17,4	0/32
Caso 14	óssea	não	aneuplóide	13,2	2/10
Caso 21	óssea	não	aneuplóide	10,5	4/32
Caso 24	óssea	não	aneuplóide	20,7	7/24
Caso 49	óssea	não	aneuplóide	7,8	10/30
Caso 48	óssea+hep.+pulm.	sim	aneuplóide	15,5	12/35
Caso 22	óssea	não	aneuplóide	27,4	15/21
Caso 39	óssea+hepática	não	aneuplóide	12,3	41/42

Do ponto de vista prático, os padrões de distribuição da quantidade de DNA das células dos carcinomas mamários podem ser divididos em DNA diplóides e DNA aneuplóides^(12,13).

No nosso estudo, encontramos 56,9% de DNA aneuploidia e 43,1% de DNA ploidia, enquanto observamos na literatura porcentagens que variam de 53,5 a 70,0%⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

A frequência de DNA aneuploidia mostrou-se dependente da idade da paciente, como podemos observar na tabela 1. Estas observações são superponíveis àquelas publicadas por Taylor et al. em 1983, Dinçol et al. em 1994 e Beerman et al. em 1990.

Diversos estudos têm demonstrado um aumento da frequência de DNA aneuploidia em carcinomas de maior tamanho, justificado pela maior instabilidade genética das células neoplásicas e pela maior heterogenicidade celular presente⁽¹⁹⁻²²⁾. Em concordância com estas publicações, o nosso estudo demonstrou uma correlação com significância estatística ($p = 0,0026$) entre o DNA ploidia e o diâmetro tumoral. (Tabela 1) Sabemos hoje que tanto a expressão dos receptores hormonais quanto as modificações de estrutura e da quantidade do DNA espelham alterações biológicas das células neoplásicas; entretanto, a relação entre estes dois aspectos tem sido controvertida na literatura⁽²²⁻²⁶⁾.

Observamos uma relação com significância estatística quando correlacionamos a DNA aneuploidia a taxas não significativas de expressão dos receptores hormonais, assim como a DNA diploidia com os tumores receptores hormonais considerados positivos.

A quantificação do DNA comparada ao comprometimento linfonodal metastático não mostrou qualquer correlação estatística com o estado e a embolização linfática e sanguínea.

Houve uma tendência significativa de correlação entre a DNA ploidia e a necrose, o número de mitoses e o grau de diferenciação, mas necessitamos de uma casuística maior para melhores conclusões (Tabela 1).

Autores como Stäl et al. (1989) e Witzig et al. (1994) chamam atenção para a frequência de observações referidas na literatura envolvendo a correlação DNA ploidia e porcentagem de fase S. O nosso estudo nos conduziu à confirmação desta afirmação, com alto significado estatístico ($p < 0,01$; Tabela 1). Shankey et al. (1993) e Baldetrop et al. (1995), em suas revisões de literatura, referem-se à considerável variação dos valores apresentados para a porcentagem de fase S, decorrentes da falta de padronização técnica e de diferentes modelos e processos utilizados para o seu cálculo, aconselhando que cada pesquisador defina o seu próprio ponto de corte. Desta maneira, estabelecemos como faixa de corte o valor mediano de nossas amostras^(7, 15).

A partir daí, empregando os mesmos parâmetros utilizados para o estudo da DNA ploidia, analisamos a distribuição da porcentagem de fase S em nossos tumores. Houve correlação estatística da fase S com o estado menstrual, observando-se que nas pacientes pós-menopausadas predominaram os tumores com porcentagem de fase S menor, enquanto nas pré-menopausadas predominaram os tumores com fase S maior que 7,15. A mesma correlação foi observada com a expressão do receptor de estradiol e a porcentagem de células em fase S, uma vez que tumores com expressão negativa para estes receptores mostraram-se com fase S maior, e tumores com receptores positivos apresentaram-se com fase S menor. Em relação ao comprometimento metastático dos linfonodos axilares (pN) com a fase S, houve uma importante correlação entre axila negativa e tumores com fase S abaixo de 7,15 e axila positiva e tumores com fase S maior que este valor (Tabela 2). Este fato é de fundamental importância, pois vem colaborar para uma possível diferenciação entre axilas negativas com boa e má evolução.

De acordo com o trabalho de Tubiana (1971), no câncer de mama apenas cerca de 40% das células estão em divisão ativa, ou seja, a fração de crescimento ou a capacidade proliferativa envolve apenas parte das células; além disso, o crescimento tumoral está condicionado a certos fenômenos passivos, como necrose, descamação, imunodestruição, cé-

lulas em G0 e em diferenciação. Esta observação pode explicar o motivo de ocorrer apenas uma tendência de correlação entre tamanho do tumor e fase S.

Observamos uma tendência de correlação entre a embolização linfática presente e tumores com porcentagem de fase S maior que 7,15 (Tabela 2). Inúmeros estudos têm demonstrado que a associação da DNA ploidia com a porcentagem de fase S constitui um fator de suma importância para a orientação terapêutica, podendo indicar maior ou menor capacidade proliferativa ou metastática do tumor⁽³²⁻³⁴⁾.

Em nosso estudo, após 27 meses de seguimento, pudemos verificar que de um total de 28 neoplasias DNA diplóides, cinco (17,8%) apresentaram manifestações metastáticas, sendo duas pN0; que de 37 DNA aneuplóides, 12 (32,4%) apresentaram metástases, sendo 5 pN0; e que das quatro que foram a óbito, todas eram aneuplóides e 3, pN0 (Tabela 3). Dos sete carcinomas com axila negativa que metastatizaram, 5 (7,14%) eram DNA aneuplóide e destes, quatro (80,0%) tinham porcentagem de fase S maior que 7,15. Notamos ainda que 11 (64,7%) pacientes dentre as 17 que apresentaram metástases possuíam tumores com fase S alta.

Desta forma, concluímos que os carcinomas de mama devem ser analisados separadamente, uma vez que existem grandes diferenças entre as características biológicas de cada neoplasia. Particularmente no grupo de axila negativa, as avaliações da DNA ploidia e da porcentagem de fase S podem contribuir de maneira eficiente para separarmos as pacientes com uma possível má evolução, facilitando a nossa orientação terapêutica.

Referências Bibliográficas

1. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro 1991. Câncer no Brasil. Dados dos Registros de Base Populacional. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer, Rio de Janeiro, 1991.
2. Azevedo, G.; Mendonça, S. - Câncer no Brasil : um risco crescente. Rev Bras Cancerol, 38(4): 167-76, 1992.
3. Von Hansemann, D.P. - Studie über die spezifität den altruismus und anaplasie der zellen. Berlin, Hirschwald, 93-118, 1983.
4. Greenough, R.B. - Varying degress of malignancy in cancer of the breast. J Cancer Res Clin Oncol, 9: 453-63, 1925.
5. Dressler, L.; Clark, C.; Owens, M.; Pounds, G.; Oldaker, T.; McGuire, W. - DNA flow cytometry predicts for relapse in node negative breast cancer patients. In: Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, Proceedings, 6: 57, 1987.
6. Koike, M.A.A.; Federico, M.H.H.; Roela, R.H.; Nogueira, C.R.; Barbosa, E.M. - Hormonal influences on kinetic properties of breast carcinoma cells and DNA analyses. Cytometry, 4(7): 85, 1994.
7. Koike, M.A.A.; Roela, R.H.; Barbosa, E.M.; Federico, M.H.H. - Flow-cytometric DNA analyses and hormonal receptor status in breast cancer. Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science), 46 (1/2): 88-91, 1994.
8. McGuire, W.L.; Tandon, A.K.; Allaed, D.C.; Chamness, G.C.; Clark, G.M. - How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. J Nat Cancer Inst 82(12): 1006-14, 1990.
9. Silvestrini, R.; Daidone, M.G.; DiFranzo, G. - Prognostic implication of labeling index versus estrogen receptors and tumor size in node negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 7: 161-69, 1986.
10. Hedley, D.W.; Clark, G.M.; Cornelisse, C.J.; Killander, D.; Kute, T.; Merkel, D. - Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Cytometry, 14: 482-85, 1993.
11. Leivonen, M.; Krogerus, L.; Nordling, S. - DNA analysis in advanced breast cancer patients. CancerDet Prev, 18, 2: 87-96, 1994.
12. Batsaki, J.G.; Sneig, N.; El-Naggar, A.K. - Flow cytometry (DNA content and S phase fraction). Analysis of breast cancer. Cancer, 15(71): 2151-53, 1992 (Supplement).

13. Robertson, J.F.R.; Ellis, I.O.; Pearson, D.; Elston, C.W.; Nicholson, R.I.; Blamey, R.W. - Biological factors of prognostic significance in local advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 29: 259-64, 1994.
14. Raber, M.N.; Barlogie, B. - DNA flow cytometry of human solid tumors. *Flow cytometry and sorting Wiley-Lisso. Inc. 2nd edition*, 745-54, 1990.
15. Kalra, R.; Camplejohn, R.S.; Horak, E.; Stuart, N.; Harris, A.L. - Growth factor receptor in human cancer and the relationship with cellular proliferation. *Br J Cancer*, 22, 1993. Supplement XX.
16. Dinçol, D.; Timlick-Aller, C.; Küçük, Ö.; Gilman-Sachs, A.; Ereku, S.; Içli, F. - Tumor - cell heterogeneity of DNA ploidy in premenopausal node-positive breast cancer. *J. Exp Clin Cancer Res*, 13(3): 223-27, 1994.
17. Friedman, N.S.; Freedman, M.D. - Correlation of DNA cytometry and hormone receptors with axillary lymph node status in patients with carcinoma of the breast. *Maryland Med J*, 43(11): 963-65, 1995.
18. Taylor, I.W.; Musgrove, E.A.; Friedlander, M.L.; Foo, M.S.; Hedley, D.W. - Influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 19: 623-28, 1983.
19. Beerman, H.; Kelvin, P.M.; Hermans, J.; Van de Velde, C.J.H.; Cornelisse, C.J. - Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int. J Cancer*, 45: 34-9, 1990.
20. Fallenius, A.; Auer, G.U.; Carstensen, J.M. - Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer*, 62: 331-41, 1988.
21. Mink, D.; Von-Tongelen, B.; Villena, H.C.; Heiss, C.; Schmidt, W. - Breast cancer and prognostic factors : tumor size, degree of differentiation, proliferation kinetics and expression hormone receptors. *Eur J Gynaecol Oncol*, 15(6): 424-36, 1994.
22. Merkel, D.E.; McGuire, W.L. - Ploidy, proliferative activity and prognosis DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 65: 1194-205, 1990.
23. Erhardt, K.; Auer, G.; Folin, A.; Silfverswärd, C.; Kool, L. - Comparison between histologic type, estrogen receptor and nuclear DNA content in mammary carcinoma. *Am J Clin Oncol*, 9(1): 83-9, 1986.
24. Hedley, D.W.; Rugg, C.A.; Ng, A.B.P.; Taylor, I.W. - Influence of cellular DNA content and disease-free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res*, 44: 5395-98, 1984.
25. Baildam, A.D.; Zaloudik, J.; Howell, A.; Barnes, D.M.; Turnbull, L.; Swindell, R. - DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br J Cancer*, 55: 553-9, 1986.
26. Stål, O.; Carstensen, J.M.; Wingren, S.; Rutqvist, L.E.; Skoog, L. - S-phase fraction to survival after recurrence of breast cancer. *Acta Oncol*, 33(4): 423-29, 1994.
27. Stål, O.; Wingren, S.; Carstensen, J. - Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variables in primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25: 3019, 1989.
28. Witzig, T.E.; Ingle, J.N.; Cha, S.S.; Shaid, D.J.; Tabery, R.L.; Wold, L.E.; Grant, C.; Gonchoroff, J.; Katzmann, J.A. - DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer*, 74(6): 1752-61, 1994.
29. Shankey, T.V.; Rabinovitch, P.C.; Bagwell, B.; Bayer, K.D.; Duque, R.E.; Hedley, D.W.; Mayall, B.H.; Wheeler, L. - Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 14: 427-77, 1993.
30. Baldetrop, B.; Bendahl, P.O.; Ferno, M.; Alanen, K.; Delle, U.; Falkmer, U.; Hansson-Aggesjö, B.; Hockenstrom, T.; Lindgren, A.; Mossberg, L.; Nordling, S.; Sigurdsson, H.; Stål, O.; Visakorpi, T. - Reproducibility in DNA flow cytometric analysis of breast cancer. *Commun. Clin Cytometry*, 22(2): 115-27, 1995.
31. Tubiana, M.; Koscielny, S. - Cell kinetics, growth rate and the natural history of breast cancer. The Heuson Memorial Lecture. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24(1): 9-14, 1988.

32. Koester, S.K.; Maenpaa, J.U.; Wiebe, V.J.; Baker, W.J.; Wurz, G.T.; Seymour, R.C.; Koehler, R.E.; De Gregorio, M.W. - Flow cytometry: potetial utility in monitoring drug effects in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 32: 57-65, 1994.
33. Daidone, M.G.; Silvestrini, R.; Luisi, A.; Mastore, M.; Benini, E.; Veneroni, S.; Brambilla, C.; Ferrari, L.; Grecco, M.; Andreola, S.; Veronesi, U. - Changes in biological markers after primary chemotherapy for breast cancers. *Int J Cancer*, 61: 301-05, 1995.
34. Hietanen, P.; Blomqvist, C.; Wasenius, V.M.; Niskanen, E.; Franssila, K.; Nordling, S. - Do DNA ploidy and S-phase fraction in primary tumor predict the response to chemotherapy in metastatic breast cancer? *Br J Cancer*, 71: 1029-32, 1995.