

---

GLÁUCIA MARIA MACHADO-SANTELLI

TESE DE LIVRE-DOCÊNCIA

---

**PLOIDIA EM TUMORES DE MAMA HUMANA**

Tese apresentada ao  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de  
Livre-Docente, junto ao  
Departamento de Histologia e Embriologia,

SÃO PAULO  
1992



## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

T-ICB Machado-Santelli, Gláucia Maria.  
BMH Ploidia em tumores de mama humana / Gláucia  
M149p Maria Machado-Santelli. -- São Paulo, 1992.  
1992

Tese (livre-docência)--Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Histologia e Embriologia.  
Área de concentração: Histologia.

Descritores: 1.Ploidia 2.Tumor de mama  
3.Prognóstico 4.Alterações de DNA

USP/ICB-SDI.067/92

*À memória de minha mãe.*

## **ÍNDICE**

Resumo

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## **RESUMO**

O conteúdo de DNA nuclear de tumores de mama humana foi analisado em um estudo prospectivo com o objetivo de avaliar seu significado biológico. A incidência de aneuploidia nos diferentes tipos histológicos variou, refletindo sua agressividade. A primeira amostra consistiu nos resultados de 225 tumores de mama. Dentre estes tumores os carcinomas ductais infiltrativos representavam a maioria, 88% dos casos. Análise detalhada da associação entre este parâmetro e as características clínico-patológicas das pacientes foi, portanto, realizada apenas com estes tumores. Observamos que os tumores aneuplóides eram mais frequentes nos estádios mais avançados, representando em média 66,2% dos casos. A distribuição dos valores de DNA tendeu a ser bimodal, embora no estádio III um grande número de casos apresentasse valores entre 2C e 4C. Nenhuma associação foi observada entre ploidia e menopausa, comprometimento de linfonodos axilares ou porcentagem de recorrência. O tempo médio de recorrência foi de 22,4 e 18,8 meses nos grupos diplóides e aneuplóides respectivamente. Os dados indicam associação entre aneuploidia e agressividade tumoral. A probabilidade do tempo médio de recorrência ser menor no grupo aneuplóide do que no diplóide, dado os resultados, calculada usando métodos de análise estatística Bayesiana é 0,875.

Em outra abordagem analisamos o DNA de 141 tumores primários e de um a três linfonodos axilares suspeitos de comprometimento à cirurgia, em cada caso. Destes, 55 foram confirmados como comprometidos ao exame histopatológico. Os valores de DNA das metástases axilares dos tumores diplóides, embora na sua maioria também diplóides, apresentaram pequeno

desvio de 2C. Ao contrário, os valores observados nos linfonodos do grupo aneuplóide tenderam a ser menores do que os dos respectivos tumores primários.

A correlação entre ploidia e resposta à terapia adjuvante foi estudada em um grupo de 40 pacientes em estadio II, seguidas por um período mínimo de 30 meses. O único sub-grupo que se distinguiu foi o das pós-menopáusicas que apresentaram recorrência no período de observação: valores de mediana de DNA de 4,0 a 4,4C e histogramas apenas de tipo IV foram observados.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho e em especial:

à Dra. Lyria Mori e ao Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira, respectivamente, pela colaboração nas determinações de quantitativas de DNA e análises estatísticas.

à Fundação Oncocentro de São Paulo e ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) pelo fornecimento do material tumoral e informações imprescindíveis ao nosso trabalho. Dentre seus médicos, gostaria de destacar os Drs. Célia Tosello, Nidia Donozo, Amadeo J. Pinto, Edson Mantovani Barbosa, José Cândido de Souza, José Costa de Andrade e Luciano Barbosa Lemos.

aos Drs. Julio Boschini Filho e Luis A. G. Brondi da Faculdade de Medicina da PUC/campus Sorocaba, pela colaboração no estudo do DNA das metástases axilares.

às minhas alunas de pós-graduação pelo apoio e amizade.

à Cristine Colella pela editoração desta tese.

ao Dr. Roberto V. Santelli pelo apoio.

# **INTRODUÇÃO**

A manutenção da normalidade da célula, isto é, de seu estado diploide e perfeito equilíbrio gênico, depende primordialmente da exata distribuição do material genético entre as células filhas na divisão mitótica. Vários eventos coordenados que vão desde a síntese de DNA propriamente dita até a segregação cromossômica devem ocorrer com extrema exatidão em todos os níveis. Este equilíbrio envolve processos biológicos básicos, tais como os mecanismos pelos quais uma população de células precursoras, com potencial para um determinado fenótipo, recebe do meio sinais para proliferar ou diferenciar, ou o modo pelo qual estes sinais são transduzidos para alterar eventos nucleares (replicação de DNA e expressão gênica). A perda desta característica ocorre frequentemente durante a transformação malígna, provavelmente como consequência de erros espontâneos ou induzidos que desestabilizam o genoma, gerando o aparecimento de clones aneuploidados. Estas células podem apresentar vantagens em relação às suas parceiras normais quanto à sua capacidade proliferativa, não obedecendo mais aos mecanismos reguladores usuais.

Historicamente, a proposta de uma teoria cromossômica para o desenvolvimento do câncer data do início do século, quando Boveri (1929) sugeriu a possibilidade do envolvimento de alterações cromossômicas na etiologia da doença. E, mesmo antes de ter sido estabelecido em 1956 o número cromossômico exato em células humanas, já haviam sido descritas alterações cromossômicas em células tumorais humanas e animais. A descrição do cromossomo "Philadelphia" (Ph) na década de 60, como marcador da leucemia mielocítica crônica (Nowell, 1976), precedeu a de outros marcadores, também originados por translocação cromossômica, encontradas em outras leucemias e alguns tumores sólidos (Bishop, 1987).

Por vários anos, estudos envolvendo híbridos de células somáticas, integração viral e citogenética em células neoplásicas depararam com resultados inesperados, que somente puderam ser compreendidos posteriormente, à luz de novos conhecimentos ao nível molecular.

Numerosos agentes, muitos dos quais mutagênicos, tem sido implicados na etiologia dos tumores humanos (Doll e Peto, 1981), sem contudo uma ligação direta com lesões tumorais específicas. Dentre os agentes que podem ser considerados consistentemente como causadores de tumores somente alguns atuam como mutagênicos diretos: luz ultra-violeta no câncer de pele; cigarro no de pulmão; vírus do papiloma humano no do trato genito-urinário; vírus da hepatite B com carcinoma de fígado; vírus Epstein-Barr nos linfoma de Burkitt e carcinoma naso-faringeal; vírus da leucemia de células T humana com a leucemia aguda de células T (Bishop, 1991).

Está hoje bem estabelecido o conceito de que o processo de tumorigênese é uma lenta sucessão de inúmeros eventos, onde ocorre interações complexas entre fatores endógenos (genéticos, hormonais, etc) e exógenos (ambientais) (Weinstein, 1988). No homem, como o processo pode ser estudado apenas de forma indireta, a análise estatística das curvas de incidência de tumores em função da idade indica que seriam necessárias 3 a 4 alterações tipo mutação para desencadear leucemias, e 6 a 7 para carcinomas (Peto, 1977). Em modelos animais, como por exemplo na indução de tumor na pele de camundongos por agentes químicos, o processo é clássicamente dividido em 3 fases: iniciação, promoção e progressão tumoral (Farber e Cameron, 1980, Hecker et al., 1982). Um agente iniciador como o carcinógeno químico benzo(a)pireno, depois de convertido ao seu metabólito ativo benzo(a)pireno-7, 8-diol-9, 10-epóxido(BPDE) pelo sistema citocromo P-450 no fígado, interage com o DNA lesando-o. Esta célula entretanto, somente irá expressar o fenótipo transformado se de algum modo for exposta a um agente

promotor. Os promotores de tumores podem ser definidos como compostos que tem pouca ou nenhuma atividade carcinogênica quando testados sózinhos, mas que aumentam sensivelmente o aparecimento de tumores se aplicados repetidamente após uma dose baixa ou sub-ótima de um carcinógeno (iniciador). Agem como potentes promotores os esteres de forbol (por exemplo TPA), estando bem estabelecido que estes agentes não se ligam ao DNA, mas sim a receptores associados a membrana e portanto produzindo seu efeito inicial ao nível epigenético. Os efeitos fenotípicos induzidos pelo TPA podem ser agrupados em tres categorias: mimetismo do fenótipo transformado; modulação da diferenciação; alteração da membrana (Castagna et al., 1982; Johnson et al., 1987; Weinstein, 1988). E finalmente a progressão é caracterizada pelo grande aumento da massa tumoral e grande instabilidade genética, resultando no aparecimento de novos clones celulares que poderiam expressar uma agressividade crescente (Nowell, 1986). Deste modo as células adquiririam a capacidade de invadir os tecidos adjacentes e posteriormente a de colonização de órgãos a distancia, pelo processo de metastização.

Ao nível molecular grupos específicos de genes constituiriam os alvos para alterações que acarretariam modificações nos mecanismos de controle da proliferação e da diferenciação celulares: os proto-oncogenes, que quando ativados a oncogenes agiriam de modo dominante; e os genes supressores de tumores, também chamados de anti-oncogenes ou oncogenes recessivos. A análise citogenética de tumores tem possibilitado a visualização de tais alterações em alguns tipos de tumores, pela detecção de aberrações cromossômicas consistentes nestas células. Tanto alterações numéricas como estruturais tem sido encontradas em tumores e de um modo geral poderíamos assumir que a ativação de proto-oncogenes estaria mais intimamente associada a eventos tipo translocação e inserções (além de mutações pontuais somente detectáveis a nível sub-microscópico), enquanto que perdas de regiões ou mesmo

cromossomos inteiros levariam à oncogênese pela perda de genes supressores de tumores. (Bishop, 1991; Hunter, 1991; Cross & Dexter, 1991; Marshall, 1991).

Vários oncogenes envolvidos em cânceres humanos foram identificados e isolados por experimentos de tranfecção, usando a linhagem celular 3T3 NIH de camundongo como sistema. Este ensaio apresenta limitações, decorrentes basicamente de dois pontos: 1º as células receptoras são mesenquimais, podendo portanto ser inadequadas para a detecção de oncogenes específicos de outros tipos celulares; 2º sendo uma linhagem celular estabelecida *in vitro* estas células já são imortalizadas. A mutação pontual no codon 12 do gene c-Ha-ras da linhagem celular EJ derivada de carcinoma de bexiga humana, levando à substituição de uma glicina por valina no produto gênico, foi a primeira alteração caracterizada molecularmente (Tabin et al., 1982; Reddy et al., 1982).

De um modo geral, entretanto, a idéia de que um único oncogene possa dar origem a uma célula tumoral *in vivo* tem pouco ou nenhum suporte experimental. Mesmo *in vitro* experimentos de transfecção utilizando células primárias de embrião de rato em cultura mostraram que a transformação de células não imortalizadas *in vitro* requer a cooperação de pelo menos dois oncogenes (Land et al., 1983). Evidências deste tipo de cooperação foram também demonstradas com oncogenes virais (Rassoulzadegan et al., 1983), oncogenes e agentes químicos (Dotto et al., 1985) e oncogenes e genes supressores de tumores mutados (Rovinski & Benchimol, 1988).

Muitos exemplos de alterações genéticas em tumores foram bem definidas ao nível molecular, incluindo mutações pontuais, deleções e fusão gênica. As translocações e inserções cromossômicas podem desencadear a expressão exacerbada ou ectotópica de determinados genes em consequência de sua justaposição a sequências promotoras ou "enhancers" (estimuladoras) ativos no tipo celular do qual o tumor se origina. Mais de dez oncogenes foram descritos associados a mecanismos de desregulação deste tipo, principalmente em

cânceres hematológicos, envolvendo sequências "enhancers" de imunoglobulinas e de receptor de células T (TCR) (Lewin, 1991).

Poucos são os casos descritos envolvendo outros tipos de sequências reguladoras. Rosenberg et al. (1991) citam um rearranjo observado em adenomas de paratireóide (tumor benigno), provavelmente uma inversão entre o braço longo e o curto do cromossomo 11, que leva à justaposição dos elementos reguladores da transcrição do hormônio da paratireóide ao oncogene PRAD1 (que codifica uma proteína tipo ciclina, portanto relacionada à regulação do ciclo celular). Outra possível consequência de rearranjos cromossômicos seria a fusão de genes diferentes determinando a síntese de proteínas quiméricas. É o que ocorre na leucemia mielocítica crônica, em que a translocação entre os cromossomos 9 e 22 leva à fusão dos genes BCR e ABL. A proteína químérica codificada, p210, manteria os sítios ativos de ambas as proteínas, agora reunidas em uma única (ABL- tirosina quinase; BCR- proteína ativadora de guanosina trifosfatase para p21<sup>ras</sup>) (Motokura et al., 1991; Lammie et al., 1991).

Genes associados a leucemias e linfomas, que foram clonados a partir dos pontos de quebra, estariam ligados a diferentes níveis de regulação da ativação da transcrição, que são críticos para o controle do ciclo e da diferenciação celulares. Estes genes poderiam ser agrupados em: fatores de crescimento e seus receptores; fatores de transcrição; reguladores do ciclo celular; determinantes de diferenciação celular e da morte programada da célula (apoptosis). Na leucemia linfocítica aguda pré-B (ALL pre-B), a translocação entre os cromossomos 5 e 14, provoca a desregulação do gene para interleucina 3 (IL-3), aumentando a produção de glóbulos brancos. Este efeito pode ser compensado por antagonistas de IL-3, terapia alternativa viável e eficiente para este tipo de leucemia, que surgiu a partir da caracterização molecular de seu rearranjo cromossômico (Solomon, 1991).

Efeitos mais complexos foram observados em outros tipos de cânceres. A translocação t(15; 17)(q22; q11.2-12) observada na leucemia promielocítica, leva à fusão no produto gênico da região NH<sub>2</sub>-terminal de uma proteína tipo "zinc finger" (PML) à região COOH-terminal do alfa receptor para ácido retinóico (ARAR). O fator de transcrição quimérico retém os "zinc fingers" de ambas as moléculas, assim como o domínio ligante de ARAR, resultando na regulação aberrante dos genes envolvidos na diferenciação mielocítica (Pandolfi et al., 1991).

A caracterização molecular e a recorrência de determinadas translocações e inserções cromossômicas específicas em leucemias e linfomas atestam sua participação na etiologia da doença. Entretanto, isto não significa que sua presença seja suficiente para levar ao aparecimento do fenótipo maligno nestas células, sendo necessários fatores adicionais. O linfoma de Burkitt e a leucemia de células T estão associados à presença dos vírus Epstein-Barr e TCL, respectivamente. Admite-se que o vírus aumentaria a taxa de proliferação celular, favorecendo o aparecimento de um segundo evento (mutação, ou translocação), que levaria à transformação celular.

Nos tumores sólidos, em adição às translocações, inserções e inversões, observa-se alta frequência de deleções intersticiais ou monossomias e amplificação gênica (trissomias, "double minutes" e regiões homogeneamente coradas - HSR), o que sugere por si só um quadro mais complexo (Mitelman, 1991). Até o momento nenhuma translocação foi clonada nestes tumores. As aberrações cromossômicas numéricas, deleções e amplificações causam alterações na dose de grandes blocos de genes e portanto dificultam a identificação de um gene (ou genes) específico responsável pela indução da transformação do fenótipo destas células.

Os genes supressores de tumores foram inicialmente evidenciados por experimentos de fusão celular entre células normais e transformadas, em que o

fenótipo maligno era revertido pela presença do alelo normal (Sager, 1985). Alguns destes genes foram clonados molecularmente graças a sua associação com deleções específicas em determinados tipos tumorais: a região 13q14 em retinoblastoma, 17p e 18q no carcinoma colo-retal e 11p13 no tumor de Wilms (Benedict et al., 1983; Volgenstein et al., 1988; Bodmer et al., 1987; Franke et al., 1979). De acordo com o modelo de mutação recessiva, o gene de susceptibilidade ao retinoblastoma (Rb) estaria deletado em homozigose nas células tumorais, como visto em alguns tumores por Friend et al. (1986), ou o produto por ele codificado (p105-Rb) não seria expresso nas células destes tumores (Horowitz et al., 1990). Dois eventos genéticos são responsáveis pela inativação de cada alelo do gene Rb nestes tumores, confirmando o modelo de Knudson (1971), segundo o qual duas mutações recessivas levariam a perda de função. A localização nuclear da proteína Rb e sua capacidade de ligação ao DNA sugerem um papel na regulação da transcrição. Esta proteína é amplamente distribuída indicando sua participação na regulação do crescimento de vários tipos de células e tumores. Entretanto a inativação do gene Rb parece ser restrita a uma estreita gama de tumores (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987; Harbour et al., 1988; Horowitz et al., 1990). A proteína Rb oscila entre o estado fosforilado e o praticamente não fosforilado de modo ciclo-específico, sugerindo seu envolvimento na regulação da progressão da célula no ciclo (Weinberg, 1991).

A deleção inicialmente associada ao tumor de Wilms (11p13) resultou num quadro mais complexo. Embora com padrões esporádico e familiar semelhantes ao de retinoblastoma, este tumor difere quanto a inúmeros aspectos: os tumores são histopatologicamente heterogêneos, a deleção 11p13 não está associada a outros tumores e este locus pode representar apenas um de dois ou três loci envolvidos nesta patologia (Grundy et al., 1988; Reeve et al., 1989; Haber et al., 1990).

Outras deleções podem ser comuns a grupos de tumores: 3p13-23 ao carcinoma de células pequenas e adenocarcinoma de pulmão; 1p11-22 em melanoma, carcinoma de mama, leiomioma, mesotelioma e fibro-histiocitoma; 1p21-23, em carcinoma de útero e bexiga etc. (Mitelman et al., 1990). A perda de heterozigose de marcadores do braço curto de cromossomo 17 ocorre com alta frequênciia em astrocitomas (James et al., 1989), câncer de mama (Mackay et al. 1987), carcinoma de células pequenas de pulmão (Yokota et al., 1987) e câncer de colon (Baker et al., 1989). A região mais comumente afetada correspondia ao gene p53, uma fosfoproteína nuclear que foi classificada tanto como oncogene quanto como gene supressor de tumor (Lane & Benchimol, 1990). O tipo selvagem de p53 funcionaria como um componente regulador do ciclo celular, ativando a transcrição de genes supressores da proliferação celular (Fields & Jang, 1990; Farne et al. 1992) ou inibindo a progressão do ciclo (Mercer et al., 1991). Existe clara correlação entre altos níveis de p53 e células com evidênciias de ciclo aberrante ou falha mitótica (núcleos gigantes, micronúcleos ou células multinucleadas). Agentes químicos que induzem lesões no DNA ou venenos de fuso levam ao acúmulo de altos níveis de p53 em células normais (Kastan et al., 1990; Lu et al., 1992).

Dados citogenéticos de tumores sólidos são muito mais raros do que os de leucemias e linfomas, embora eles representem mais de 80% dos tumores humanos (Mitelman, 1991). Tal fato deve ser consequência de dificuldades metodológicas para a obtenção de metáfases quantitativa e qualitativamente analisáveis por um lado e, por outro, pela detecção de um grande número de aberrações cromossômicas no mesmo tumor, dificultando a identificação das primárias. Poderíamos tentar justificar este quadro, assumindo que normalmente os tumores sólidos seriam detectados em fases mais avançadas de sua progressão.

Por outro lado a análise de amostras obtidas durante a progressão tumoral reforçam a natureza sequencial da carcinogênese, consistente com o conceito segundo o qualsta fase do desenvolvimento tumoral seria consequência de alterações genéticas cumulativas em clones celulares. Assim marcadores genéticos presentes nas células iniciais continuariam presentes nas mais avançadas. Tomando como exemplo o carcinoma de colon humano, em que é possível definir diferentes estágios da progressão da doença, desde a hiperplasia até carcinoma metastático, pode-se propor a provável sucessão de alterações genéticas comumente encontradas no carcinoma maligno. Os eventos observados na progressão destes tumores desde a fase benigna incluem mutação ou perda de alelo na região do braço longo do cromossomo 5 onde se localiza o gene para polipose adenomatosa familiar (FAP) cuja mutação é ligada a predisposição hereditária ao carcinoma de colon; ativação de gene Ki-ras por mutação; perda alélica no braço longo do cromossomo 18, incluindo o gene DCC; perda alélica no braço curto do cromossomo 17 incluindo o gene p53; dentre outras mutações (Fearon & Volgelstein, 1990).

Em alguns tumores sólidos a amplificação de oncogenes foi observada consistentemente, associada ou não a aberrações cromossômicas do tipo "double-minute" ou "regiões homogeneamente coradas" (HSR). Em neuroblastomas o aumento do número de cópias do oncogene N-myc ocorre normalmente em alta frequência nos estadios mais avançados da doença, mas quando observado em estadios precoces estaria associada a maior agressividade tumoral (Brodeur & Seeger, 1986). A amplificação do oncogene N-myc foi também observada em outros tumores como o retinoblastoma, glioblastoma e leucemias, sem entretanto apresentar correlação com agressividade nestes tumores (McKenzie, 1991).

Nos tumores de mama humana a amplificação do oncogene erb-B2 (que codifica uma proteína homóloga mas diferente de EGF, a p185), descrita em

frequência variada (de 10 a 46, 5% dos tumores) por vários pesquisadores (Slamon et al., 1987; van de Vijver et al, 1987; Varley et al., 1987; Berger et al., 1988; Zeillinger et al., 1989; Borg et al., 1990; Clark & McGuire, 1991; dentre outros), foi inicialmente proposta por Slamon como fator prognóstico independente mais forte do que o comprometimento axilar. Em geral os pacientes com metástases axilares apresentam maior frequência de amplificação deste oncogene, embora a correlação entre esta o desenvolvimento da doença sejam ainda controversos. Foi postulado que a expressão exacerbada de erb-B2 levaria a alta taxa de crescimento em células tumorais, mas não aumentaria o seu potencial metastático. Confirmam esta hipótese o fato de que anticorpos contra o domínio extra-membrana da p185 inibem o crescimento de apenas das células de câncer de mama que contem erb-B2 amplificado (Hudzeak et al., 1989). Paterson et al. (1991) postulam que a amplificação de erb-B2 identifica 18% do grupo de alto risco, em consequência da existência de múltiplos mecanismos de transformação para um mesmo tipo histológico de tumor. Portanto, embora possa ter importante papel na biologia dos tumores de mama, a amplificação de oncogene não seria absoluto como fator prognóstico (Clark & McGuire, 1991).

As alterações genéticas que ocorrem durante este processo de progressão determinam, na maioria dos tumores sólidos, o aparecimento de aberrações cromossômicas numéricas, que podem ser detectadas pela quantificação do DNA nuclear em células interfásicas por diferentes métodos citométricos. Podemos portanto assumir que a ploidia do tumor reflete seu cariotípico, embora os dois conceitos não possam ser confundidos. A resolução destes métodos, em situações ótimas somente permitem a detecção de perdas ou ganhos maiores do que dois cromossomos (Vindelov et al., 1983).

Segundo Barlogie et al.(1983) o conteúdo de DNA anormal é um marcador conclusivo de malignidade, sendo encontrado em crescente proporção nas leucemias (23%), linfomas (53%), mielomas e tumores sólidos (76%). Estudos

iniciais feitos por citofotometria estática em carcinoma de útero permitiram a Atkin et al. em 1959 estabelecer que a maioria tumores analisados era hiperdiploides ou tetraploides, com uma população modal que seria responsável pelo crescimento tumoral. Posteriormente o conteúdo de DNA nuclear de inúmeros outros tumores tem sido estudados por diferentes abordagens metodológicas: citometria de varredura, citometria de fluxo e análise de imagem. Entretanto, o papel da aneuploidia na etiologia do câncer é ainda pouco conhecido. Assume-se que estas alterações devem determinar um desequilíbrio gênico em consequência da perda e ganho de determinados blocos de genes, ou mesmo de cromossomos inteiros, que eventualmente estariam associados a vantagens proliferativas nestas células. A busca do significado biológico da aneuploidia no processo de carcinogênese levou ao estudo da correlação deste parâmetro com outras características tumorais, objetivando avaliar a associação entre eles e o comportamento tumoral. De um modo geral, embora com certa controvérsia, os dados da literatura sugerem a aneuploidia como indicador de pior prognóstico em vários tipos de tumores. Em câncer avançado de ovário o índice aneuploide de DNA é forte fator prognóstico (Friedland et al., 1984; Rodenburg et al., 1987), enquanto que em outros como carcinoma de bexiga e próstata estaria correlacionado com o estadio da doença ou grau de diferenciação nuclear (Stone, 1987; Frankfurt et al., 1985). Em outros, como carcinoma de células pequenas de pulmão, a aneuploidia não tem valor prognóstico (Bunn et al., 1983).

A aneuploidia tem sido amplamente avaliada nos tumores de mama humana, principalmente por abordagens retrospectivas de material tumoral emblocado. Os dados indicam de um modo geral associação entre a aneuploidia e menor sobrevida ou tempo de recorrência (Kallioniemi et al., 1987; Cornelisse et al., 1987; Merkel & McGuire, 1990; Yuan et al., 1991). Associação entre a ploidia e outros parâmetros tidos como prognóstico tem sido descrita,

tais como idade (Coulson et al., 1984; Kallioniemi et al., 1987), menopausa (Bedrossian et al., 1981; Dowle et al., 1987), tamanho do tumor primário (Ewers et al., 1984; Fallenius et al., 1988), comprometimento do linfonodos axilares (Fossa et al., 1984; Hedley et al. 1984; Sharma et al., 1991), estadiamento (Ewers et al., 1984) e com a fração de células em fase S (Dowell et al., 1987; Kallioniemi et al., 1987). A associação entre ausência de receptores de estrógeno e a aneuploidia, ambos sugestivos de mau prognóstico, foi mostrada pela análise sequencial destes dois parâmetros em preparações citológicas de biopsia aspirativa de tumores de mama, em nosso laboratório (Pestana et al., 1991). Além de concordarem com dados prévios de outros grupos (Coulson et al., 1984; Cornelisse et al., 1987; Baildam et al., 1987), estes dados mostram a viabilidade da análise destes fatores antes da cirurgia.

Embora alterações epigenéticas participem da carcinogênese, o papel mais importante neste processo é representado por alterações genéticas. O fenótipo transformado (maligno) requer numerosas trocas na estrutura e função da células normais. Deste modo, a princípio é possível estabelecer a correlação entre características morfológicas e funcionais das células tumorais com o comportamento biológico do tumor.

A determinação precisa do prognóstico é extremamente importante para a otimização da terapia ao nível individual do paciente de cancer. No cancer de mama este é um problema complexo, em consequência de sua histopatologia e progressão clínica heterogeneas. Investigações extensivas tem tido como objetivo a identificação de fatores prognósticos que possibilitem a definição de sub-grupos mais homogêneos dentre os tumores com mesmas características histo-patológicas e em mesmo estadio de desenvolvimento. Dentre os fatores que foram sugeridos como de bom prognóstico podemos citar: tumores primários de pequeno tamanho e bem diferenciados (Fisher et al., 1985;

Bonadonna & Valagussa, 1988), positivos para receptores hormonais (Adami et al., 1983) e sem comprometimento axilar (Bonadonna & Valagussa, 1985).

O sistema de classificação TNM, baseado no tamanho do tumor primário (T), envolvimento dos linfonodos axilares (N) e metastases distantes (M), é até o momento o melhor guia na escolha do tratamento primário. Entretanto, alguns destes fatores podem refletir mais a idade do tumor do que seu potencial biológico (Cornelisse et al., 1987).

Vários outros parâmetros morfológicos (necrose tumoral, índice mitótico, grau citológico and histológico, contorno da borda, etc) ou clínicos (estado menstrual, idade, numero de gravidez, idade à primeira gravidez) foram tambem investigados como preditores de recorrência da doença (Bloom & Richardson, 1957; Baak et al., 1985; McDivitt et al; 1986). Nenhum deles parece melhorar o poder prognóstico da classificação pelo sistema TNM.

Muitos destes fatores foram considerados como de valor prognóstico independente na tentativa de se explicar a variabilidade observada na sobrevida e intervalo livre da doença em pacientes de mama. Entretanto, segundo alguns autores, índices resultantes da combinação de diferentes parâmetros teriam maior potencial para determinação do prognóstico da doença: estadio, idade da menarca, estado menstrual e idade (Caleffi et al., 1989) ou índice mitótico, tamanho do tumor primário e comprometimento dos linfonodos axilares (van der Linden et al., 1989).

O presente trabalho teve por objetivo determinar o conteudo de DNA nuclear em células de tumores primários de mama humana e respectivas metástases axilares, e correlacionar estes dados com parâmetros clinico-patológicos da doença. E deste modo, avaliar o possivel significado biológico de alterações quantitativas do DNA nuclear nestas células tumorais, para o estabelecimento de indicadores prognósticos e terapeuticos mais seguros.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### a. Pacientes

Os dados apresentados neste trabalho são referentes a dois grupos de pacientes. Na análise da relação entre a ploidia e tempo de recorrência da doença partimos de um grupo inicial de 225 pacientes da Fundação Oncocentro de São Paulo, das quais foram selecionadas aquelas com carcinoma ductal invasivo. A avaliação da resposta à quimioterapia foi feita em um sub-grupo das destas pacientes, em estadio II. Todas foram submetidas ao protocolo de tratamento estabelecido pela equipe clínica daquela Fundação, responsável também pelo seu seguimento.

O segundo grupo, constituído por 141 pacientes, incluindo um homem, foi atendido no Centro Médico da PUC- Campus de Sorocaba, de onde recebíamos material para a análise do DNA em tumores primários e respectivos linfonodos axilares suspeitos. Fragmento adjacente ao que nos era enviado, era submetido ao exame histopatológico. Dados referentes a estes tumores não foram incluídos na análise de sobrevida pela maior dificuldade na obtenção de informações referentes ao seu seguimento.

As pacientes foram classificadas pelo sistema TMN, segundo as normas estabelecidas para câncer de mama pela União Internacional Contra o Câncer (UICC, 1978). Recorrência da doença (reaparecimento das lesões diagnosticadas ou de novas lesões) foi considerada quando confirmada microscopicamente ou pela combinação conclusiva de dados clínicos, cintiligráficos e radiológicos.

### b. Preparações citológicas

As preparações citológicas foram feitas a partir de um fragmento representativo da massa tumoral, enviado ao laboratório em meio de cultura de células (meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado por 100 µg/ml de ampicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino), a temperatura ambiente. Estes fragmentos eram cortados em pedaços menores e estes esfregados sobre uma lâmina de vidro. Depois de secas as preparações foram fixadas por 5 minutos em uma mistura de etanol:clorofórmio:ácido acético (3:1:1), lavadas rapidamente em etanol e secas. Para a coloração pelo método de Feulgen e Rossenbeck (1924) as preparações foram colocadas por dois minutos em água destilada a 60°, transferidas para HCl 1N a 60° por 12 minutos e então coradas pelo Schiff por 90 minutos, a temperatura ambiente. A seguir as preparações foram submetidas a três banhos de água sulfurosa (5% de HCl 1N e 5% de metabissulfito de sódio 10%), de 10 minutos cada um, passadas em água destilada e desidratadas em série de alcoóis e secas. Preparações de fibroblastos humanos diplóides foram incluídas em cada série de lâminas, como controles.

### c. Quantificação do DNA

As determinações quantitativas do DNA foram feitas em um citofotômetro de varredura (Zeiss) acoplado a um computador Polymax. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 570 nm e com um passo de 0,5 µm, utilizando objetiva de imersão (aumento 100X). A coloração de fundo era checada antes da análise de cada lâmina.

A leitura de cada núcleo resultava na impressão dos valores de absorbância lidos, absorbância média, área do núcleo e absorbância total. A comparação dos valores obtidos nas células tumorais com os das controles (diploídes) permitia a conversão das unidades de absorbância para C, unidade arbitrária para correspondente a quantidade haploide de DNA. Foram lidos 60 núcleos por preparação, sendo calculado o valor da mediana e construído o histograma de distribuição dos valores de DNA obtidos para cada preparação. Estes histogramas, quando necessário, eram classificados segundo os padões propostos por Auer et al., 1980: I-população celular predominantemente diploide; II-população com valor modal na região tetraploide, podendo apresentar um segundo pico, diploide; III-valores intermediários entre 2 e 4C; e IV-distribuição espalhada atingindo valores muito altos.

#### **d. Análise estatística.**

A associação entre ploidia e outra parâmetros considerados com de valor prognóstico foi analisada pelos métodos de tabelas de contingência (Aitchison & Dunsmore, 1975). Foram utilizados métodos estatísticos Bayesianos para a análise do tempo de recorrência da doença (ver apêndice).

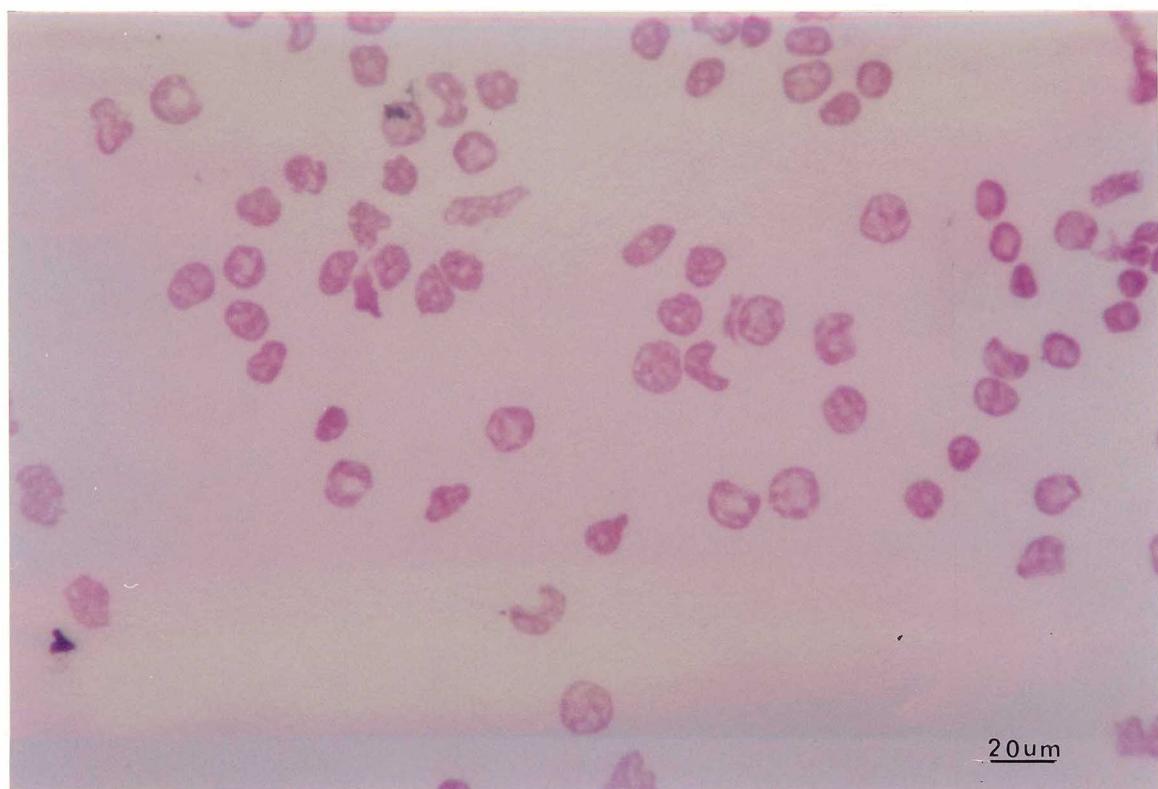
## **RESULTADOS**

## I- Quantificação do DNA nuclear.

As preparações citológicas analisadas eram ricas em células tumorais e como estas podiam ser reconhecidas previamente ao microscópio, nossas leituras não incluem células normais provientes do estroma. Núcleos de células tumorais eram lidos ao acaso até completar o número pre-estabelecido, sendo para isto enquadrados um a um nos eixos X e Y, definindo assim a área de leitura. A figura 1a ilustra uma destas preparações citológicas, coradas por Feulgen. A varredura determinava leituras a passos de 0,5  $\mu\text{m}$ , desprezando automaticamente os valores de fundo. Os dados resultantes da leitura citofotométrica eram impressos como na figura 1b e a partir da leitura dos núcleos de cada tumor foram construídos histogramas que nos permitiam o cálculo do valor da mediana de DNA e a confirmação da classificação do tumor como diplóide ou aneuplóide. Células diplóides normais eram coradas e lidas juntamente com cada lote de preparações tumorais (figura 2).

Na figura 3 apresentamos exemplos de histogramas de DNA resultantes da leitura de preparações citológicas tumorais, classificados segundo os padrões de Auer et al., 1980.

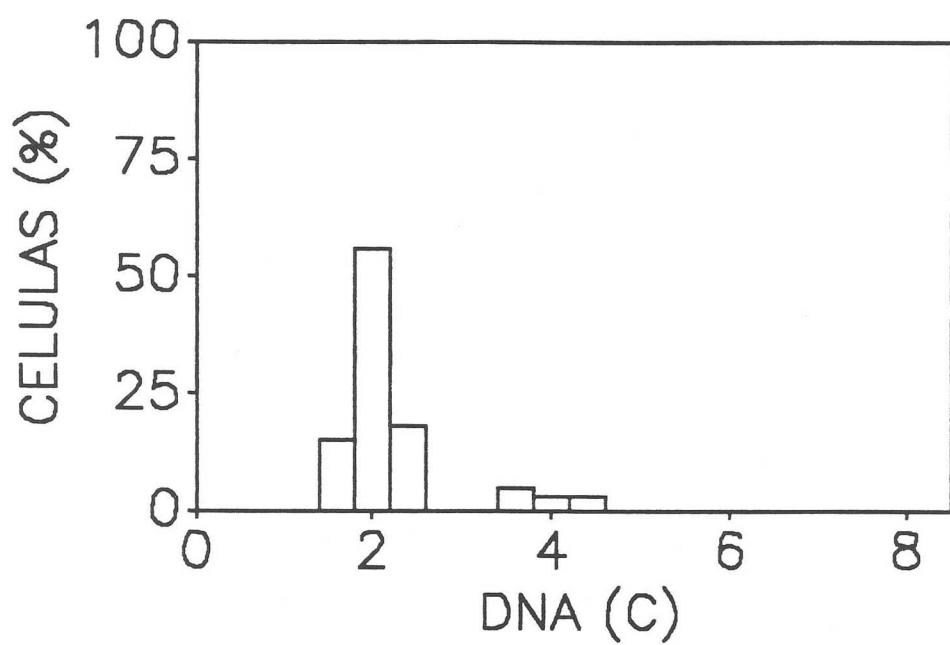
a



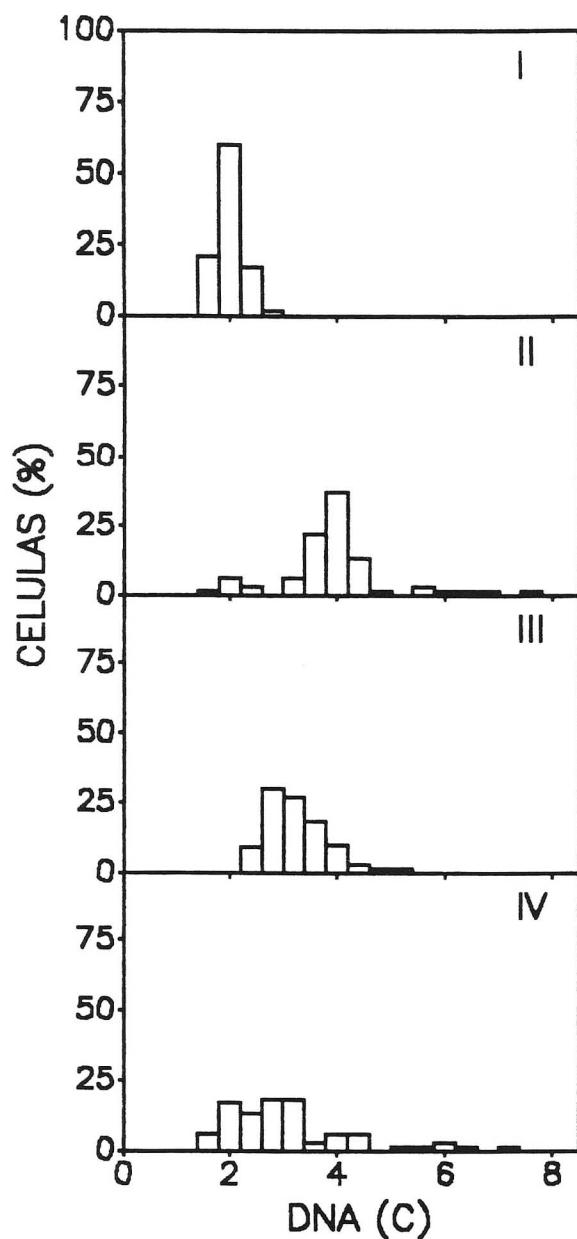
b DADOS X 100

	7	8	9	7	10	8
7	14	9	6	12	10	7
7	7	9	11	6	14	6
11	13	16	12	8	10	9
12	11	14	16	3	12	8
12	11	8	12	14	11	11
12	11	13	12	19	14	10
12	11	13	12	14	10	10
11	11	8	12	11	13	6
12	11	8	10	14	13	6
12	11	8	10	14	13	6
14	12	16	8	15	9	11
	11	13	13	14	7	8

**Figura 1a.** Fotomicrografia de uma preparação citológica de um tumor de mama humana corada pelo método de Feulgen; **1b.** valores de absorbância a 570nm de um núcleo de célula tumoral.



**Figura 2.** Histograma correspondente a uma preparação controle.



**Figura 3.** Histograma dos valores de DNA determinados em diferentes tumores:  
I,II,III e IV corresponde ao padrão.

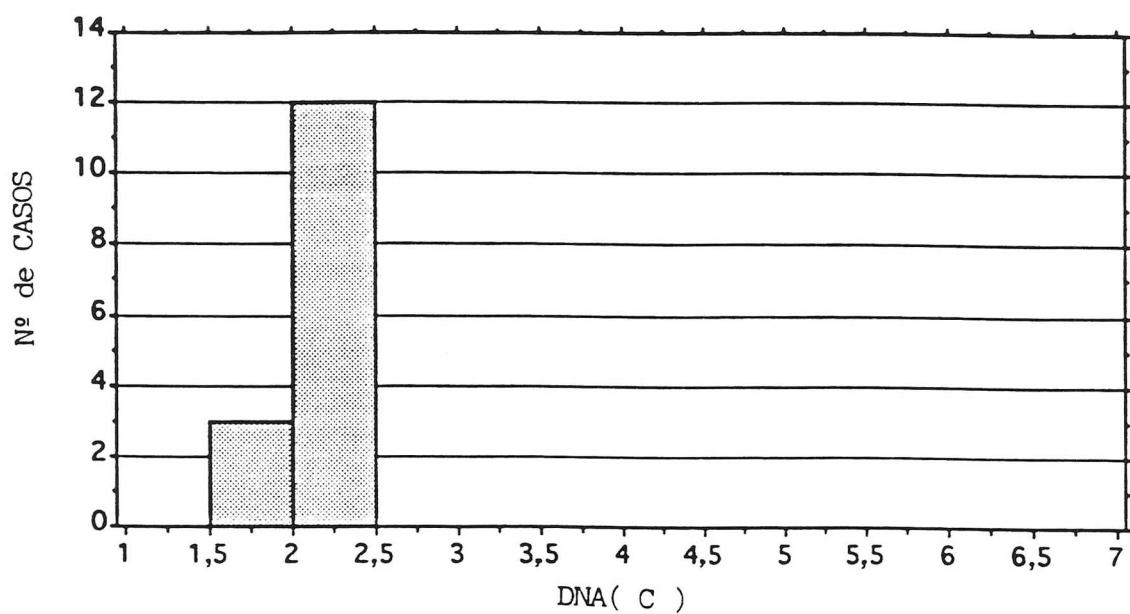
## II- Análise prospectiva da associação entre ploidia e recorrência da doença.

O conteúdo de DNA nuclear foi quantificado em preparações citológicas de 225 tumores de mama. A incidência total de aneuploidia, considerando como aneuplóide o tumor cuja mediana foi igual ou maior que 2,5C, é mostrada na tabela I. A maioria dos carcinomas ductais invasivos (65,6%), assim como praticamente todos os carcinomas medulares (94%) são aneuplóides.

**Tabela I-** Incidência de aneuploidia nos tumores de mama segundo seu tipo histológico.

Tipo histológico	aneuplóides	nº de casos
carc. ductal invasivo	130	198
carc. medular	16	17
carc. papilifero	2	3
carc. lobular	1	4
cistossarcoma filodes	1	3
Total	150	225

Como um controle adicional às células normais, introduzimos em nosso estudo um grupo de 15 fibroadenomas, lesões benignas de mama, que apresentaram valores diplóides (figura 4).



**Figura 4.** Histograma mostrando a distribuição dos valores das medianas de DNA de 15 fibroadenomas (lesões benignas de mama).

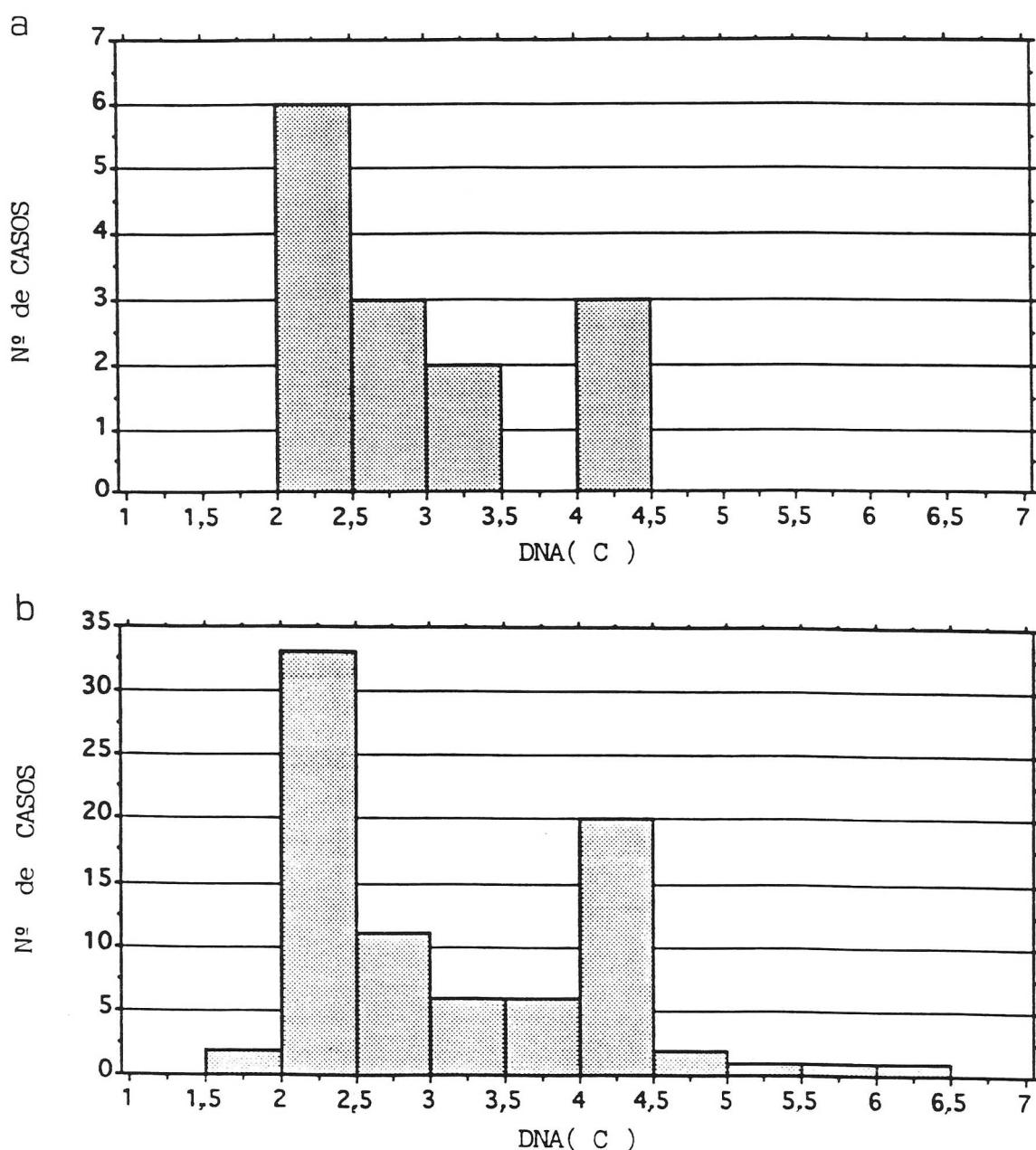
Quando comparada com a dos fibroadenomas, as medianas de DNA dos carcinomas desviam muito de 2C, atingindo valores muito altos (maiores que 6C), mas apresentando uma distribuição que tende a ser bimodal, com picos em 2 e 4C (figura 5 e 6). A frequência de tumores com valores entre 2 e 4C aumenta de modo marcante no estadio III.

As médias dos valores de DNA aumentam gradativamente com o desenvolvimento da doença, diminuindo no estadio IV, provavelmente em consequência da maior heterogeneidade dos tumores nesta fase terminal (figura 7).

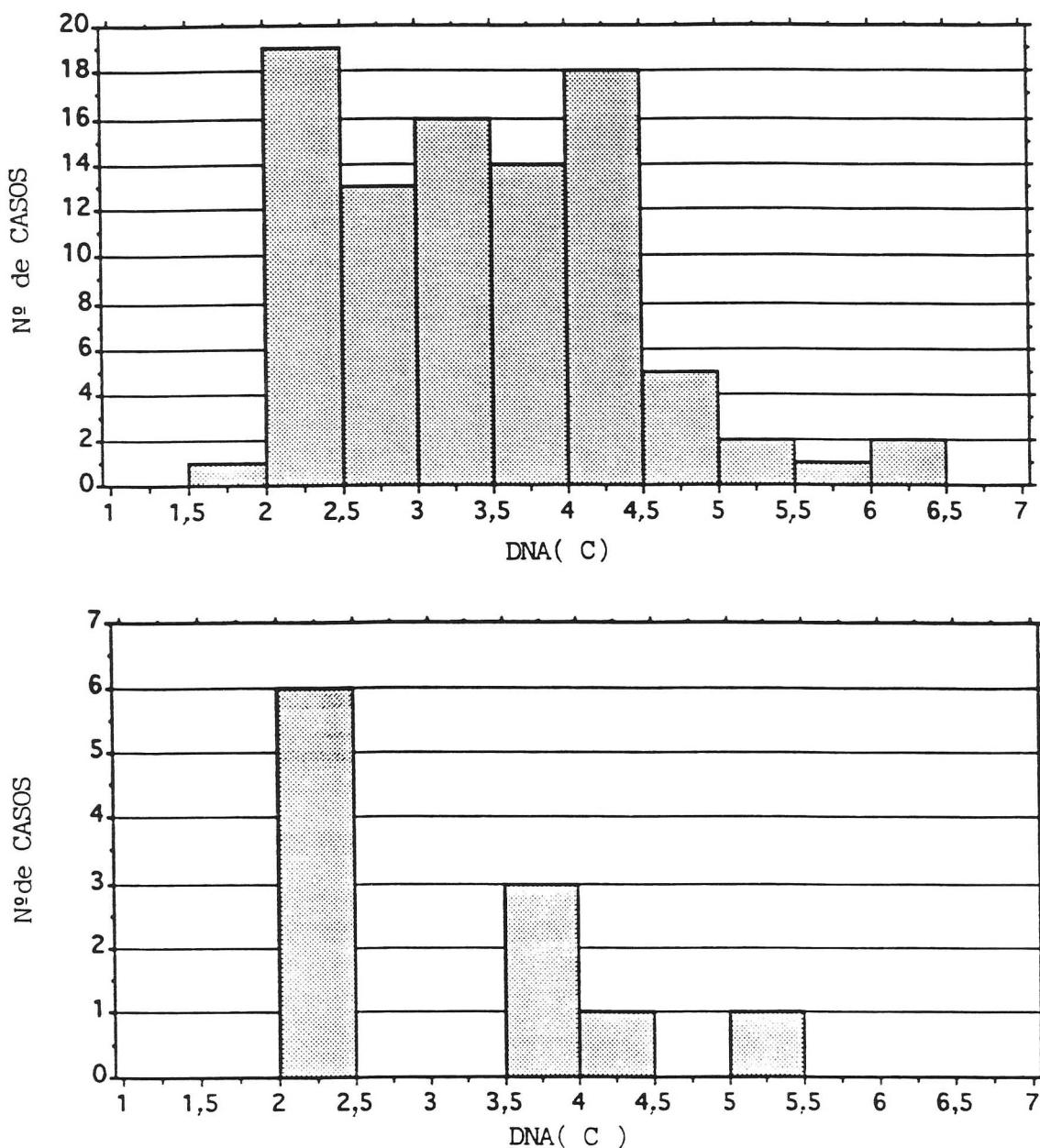
Definindo a ploidia em diplóide (1,8 a 2,4C), hiperdiplóide (2,5 a 3,7C), tetraplóide (3,8 a 4,3C) e hipertetraplóide (maior que 4,3C), a maioria dos tumores enquadra-se no primeiro e no terceiro grupo, 33,8% dos casos em cada um. Na verdade os tumores altamente aberrantes representam a minoria dos casos.(tabela II). A maioria dos tumores malignos analisados era aneuplóide (66,2%).

**Tabela II-** Distribuição dos tumores de acordo, com o grau de ploidia.

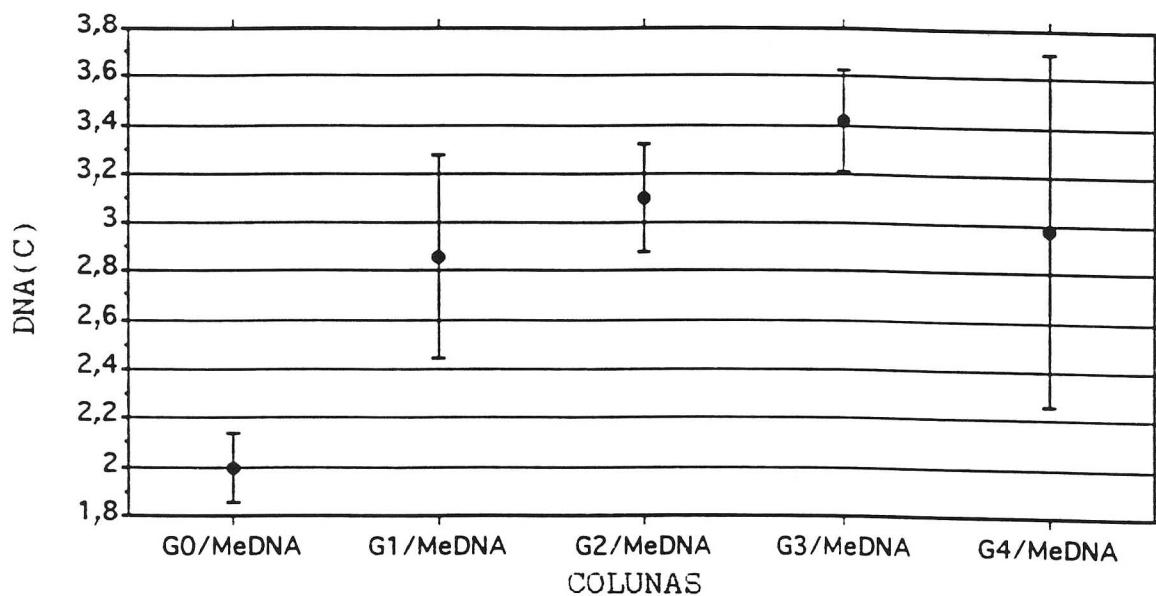
Grau de ploidia	nº de casos (%)
diplóide	67 (33,8)
hiperdiplóide	49 (24,8)
tetraplóide	67 (33,8)
hipertetraplóide	15 ( 7,5)
Total	198



**Figura 5.** Distribuição dos valores das medianas de DNA dos carcinomas ductais invasivos de mama: a) estadio I ( $n=14$ ) e b) estadio II ( $n=83$ ).



**Figura 6.** Distribuição dos valores das medianas de DNA dos carcinomas ductais invasivos de mama: a) estadio III ( $n=91$ ) e b) estadio IV ( $n=11$ ).



**Figura 7.** Valores médios de DNA observados nos diferentes estadios de desenvolvimento tumoral: G1, G2, G3 e G4 correspondendo respectivamente aos estadios I, II, III e IV dos carcinomas ductais invasivos. Para efeito de comparação incluimos também G0 que corresponde aos fibroadenomas.

Das 198 pacientes com carcinoma ductal invasivo inicialmente analisadas, 15 não retornaram após a cirurgia e assim foram seguidas neste estudo as demais 183, cujas características clínico-patológicas estão resumidas na tabela III. A associação entre estes parâmetros, importantes para a caracterização dos tumores estudados, foi realizada por análises de tabelas de Contingência.

A maioria dos tumores analisados correspondia aos estadios II(41,9%) e III(45,9%) de acordo com a classificação pelo sistema TNM, estando o pequeno número de casos restantes igualmente distribuídos entre I e IV. Pareceu-nos portanto adequado agrupá-los em E (early=I+II) e L (late=III+IV) em algumas das análises. Foi observada associação significante entre os tumores diplóides e estadios iniciais da doença (E), como mostra a tabela IV, diferentemente do que ocorre nos estadios mais avançados (L).

**Tabela III-** Características clínico-patológicas das 183 pacientes com carcinoma ductal invasivo.

	nº de casos
<i>Idade</i>	
< 40 anos	24 (13%)
40 a 49 anos	38 (21%)
50 a 59 anos	73 (40%)
> 60 anos	48 (26%)
Total	183
<i>Menopausa</i>	
(nm) pre-menopáusica	60 (33%)
(pm) pós-menopáusica	123 (67%)
Total	183
<i>Estadio (TNM)</i>	
I	14 ( 7,7%)
II	76 (41,5%)
III	82 (44,8%)
IV	11 ( 6,0%)
Total	183
<i>Linfonodos comprometidos</i>	
0	50 (29,1%)
1 a 3	66 (38,4%)
> 3	56 (32,5%)
Total	172

A maioria das pacientes (67,2%) era pós-menopáusica e esta frequência não se alterou grandemente quando elas foram agrupadas segundo o estadio da doença (E e L) ou com a ploidia (Aneuplóides e Diplóides). As mulheres pós-menopáusicas representavam 68,48% do total de pacientes, 75% das aneuplóides/E e 63,33% das aneuplóides/L. Havia uma tendência para a incidência um pouco mais elevada de pós-menopáusicas nos estadios mais precoces.

**Tabela IV-** Distribuição dos tumores de acordo com a ploidia e estadiamento da doença.

DNA	Estadios		Total
	E(TNM I+II)	L(TNM III+IV)	
diplóide	37 (68,5%)	17 (31,5%)	54
aneuplóide	59 (45,7%)	70 (54,3%)	129
Total	96 (52,5%)	87 (47,5%)	183

(p=0,008)

Embora o comprometimento de linfonodos axilares seja um dos parâmetros utilizados na classificação dos tumores de mama pelo sistema TNM, achamos interessante avaliar sua possível associação, como um fator isolado, com a ploidia. Definimos assim três grupos, com 0, 1 a 3 e mais de 3 linfonodos axilares comprometidos. A maioria das pacientes apresentava 1 a 3 ou mais de 3 linfonodos afetados, respectivamente 35,1% e 38,3%. Na tabela V podemos

observar a distribuição destes sub-grupos entre os tumores diplóides e aneuplóides. Dentre as 50 que não tinham comprometimento axilar, 20 (40%) eram diplóides, e esta porcentagem diminuiu para 28% naquelas que apresentavam metástases axilares.

**Tabela V-** Extensão do comprometimento dos linfonodos axilares

DNA	nº de linfonodos comprometidos		
	0	1 a 3	+ de 3
Diplóide	20(40%)	18(27,3%)	20(27,7%)
Aneuplóide	30(60%)	48(72,7%)	52(72,2%)
Total	50	66	72

A progressão da doença foi definida com base no tempo decorrido desde a apresentação da doente com sintomas até a manifestação de um novo sintoma: recorrência local ou metástases a distância. Excepcionalmente, no caso do pequeno número de tumores em estadio IV, estabelecemos como indicador de progressão o aparecimento de metástase em novo local ou morte por câncer. Assim as pacientes foram divididas em dois grupos : e0 correspondendo as que não apresentaram estes sintomas durante o periodo de observação; e e1 àquelas em que foram observados sintomas indicativos de progressão da doença.

**Tabela VI-** Recorrência no grupo total, em relação ao estadiamento.

Recorrência	Estadio		Total
	E(TNM I+II)	L(TNM III+IV)	
e1 (+)	25(39,1%)	39(60,9%)	64
e0 (-)	71(59,7%)	48(40,3%)	119
Total	96(52,5%)	87(47,5%)	183

(p=0,0122)

Coerentemente com o esperado, a tabela VI mostra que a proporção de tumores em estadios mais avançados é显著mente maior no sub-grupo e1 (p=0,0122), considerando-se o total dos tumores estudados, assim como entre os tumores aneuplóides os mais avançados (L) representam 67,35% daqueles que recidivaram (tabela VII). Esta proporção não foi observada entre os diplóides, como mostra a tabela VIII.

**Tabela VII-** Recorrência nos tumores aneuplóides, de acordo com o estadiamento.

Recorrência	Estadio		Total
	E(TNM I+II)	L(TNM III+IV)	
e1 (+)	16(32,6%)	33(67,4%)	49
e0 (-)	43(53,8%)	37(46,2%)	80
Total	59(45,7%)	70(54,3%)	129

(p=0,0314)

**Tabela VIII-** Recorrência em tumores diplóides em relação ao estadiamento da doença.

Recorrência	Estadio		Total
	E(TNM I+II)	L(TNM III+IV)	
e1 (+)	9(60,0%)	6(40,0%)	15
e0 (-)	28(71,8%)	11(28,2%)	39
Total	37(68,5%)	17(31,5%)	54

(p=0,6109)

**Tabela IX-** Recorrência do tumor em relação a ploidia

DNA	Recorrência		Total
	e1 (+)	e0 (-)	
diplopóide	15(27,8%)	39(72,2%)	54
aneuplopóide	49(38,0%)	80(62,0%)	129
Total	64(35,0%)	119(65,0%)	183

(p=0,2499)

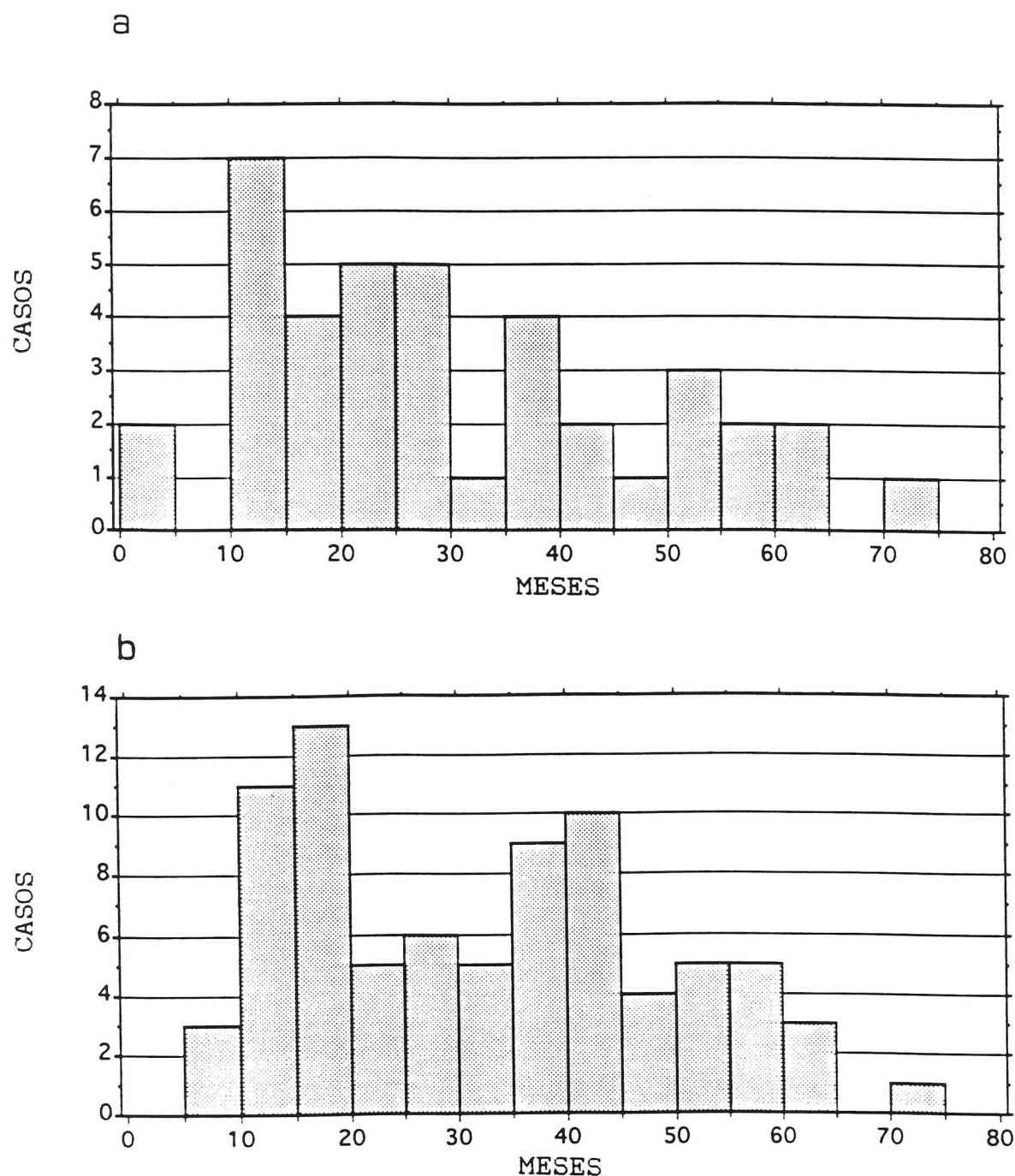
O tempo de observação das pacientes com tumores diplóides e aneuplopóides (figura 8) variou em decorrência de diferentes fatores, embora possamos assumir que estes estariam influenciando igualmente os dois sub-

grupos (Diplóides e Aneuplóides). A figura 9 ilustra a frequência dos intervalos decorridos para a recorrência da doença nas pacientes cujos tumores eram diplóides ou aneuplóides. Embora não se tenha observado diferença na frequência de pacientes que recidivaram nos dois sub-grupos, diplóide e aneuplóide (tabela IX), a distribuição do tempo do recorrência dos diplóides é bastante irregular. Os tumores aneuplóides definiram um grupo de pacientes com de recorrência, em que o intervalo de tempo para que esta ocorra varia desde poucos meses após a cirurgia até varios anos. O tempo médio de observação foi de 28 meses para os tumores diplóides e 26,9 meses para os aneuplóides, estendendo-se para 30,2 e 31,3 meses, respectivamente se considerarmos apenas os que não apresentaram recorrência. A figura 10 possibilita a comparação destes valores, mostrando ainda que o tempo médio de recorrência foi de 22,4 meses nos tumores diplóides e de 18,8 meses nos aneuplóides.

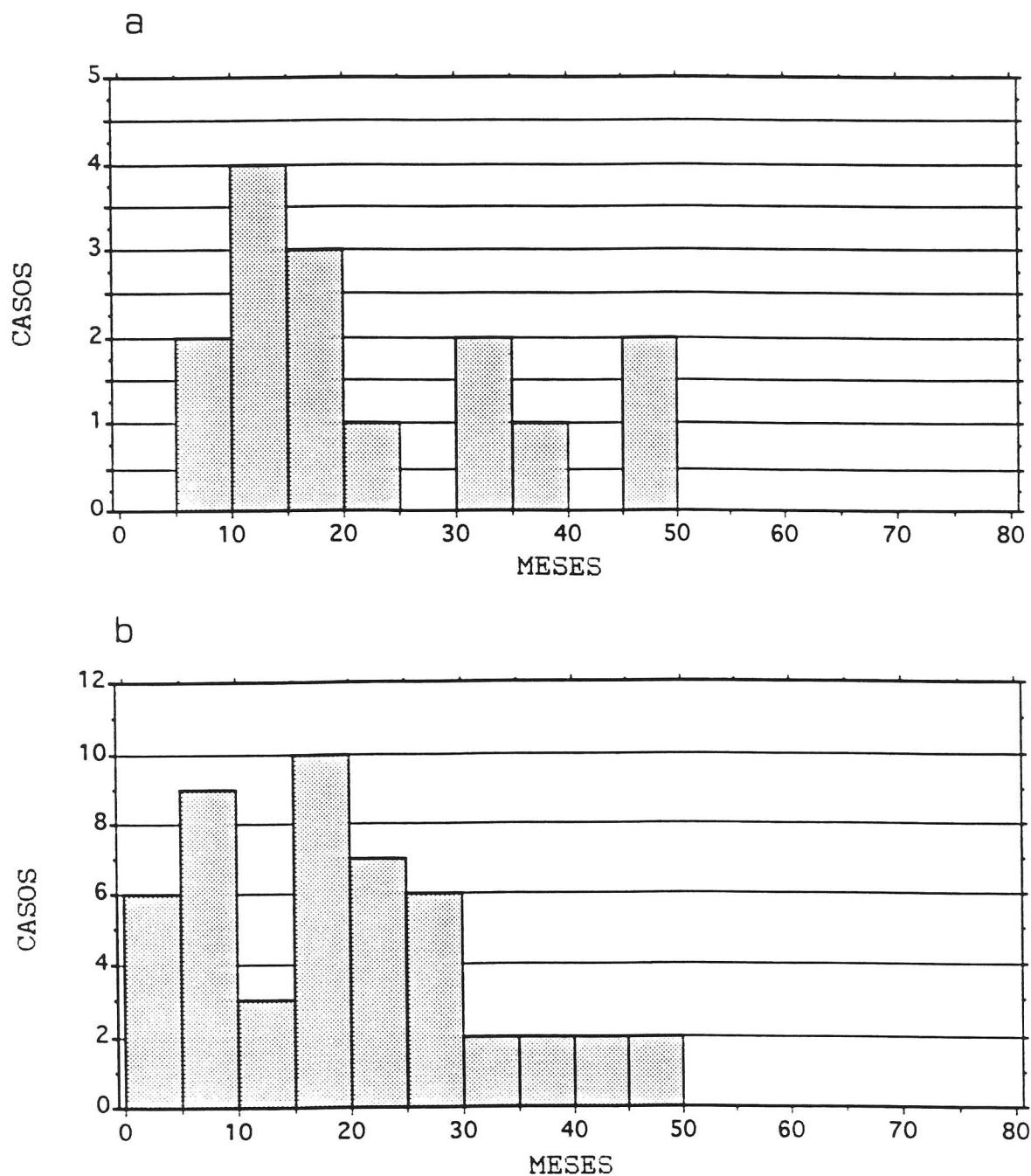
Com base nos dados aqui apresentados formulamos a hipótese de que a progressão da doença seria mais rápida nos portadores de tumores primários aneuplóides, utilizando como parâmetro o tempo de recorrência.

Normalmente, a análise de sobrevida de pacientes de câncer de mama para definição de fatores prognósticos requer grande número de casos e longos períodos de seguimento, devido ao comportamento heterogêneo da doença. Os estudos prospectivos dificilmente preenchem estas exigências, sendo especialmente difíceis no Brasil, onde não há centralização das informações dos pacientes de câncer.

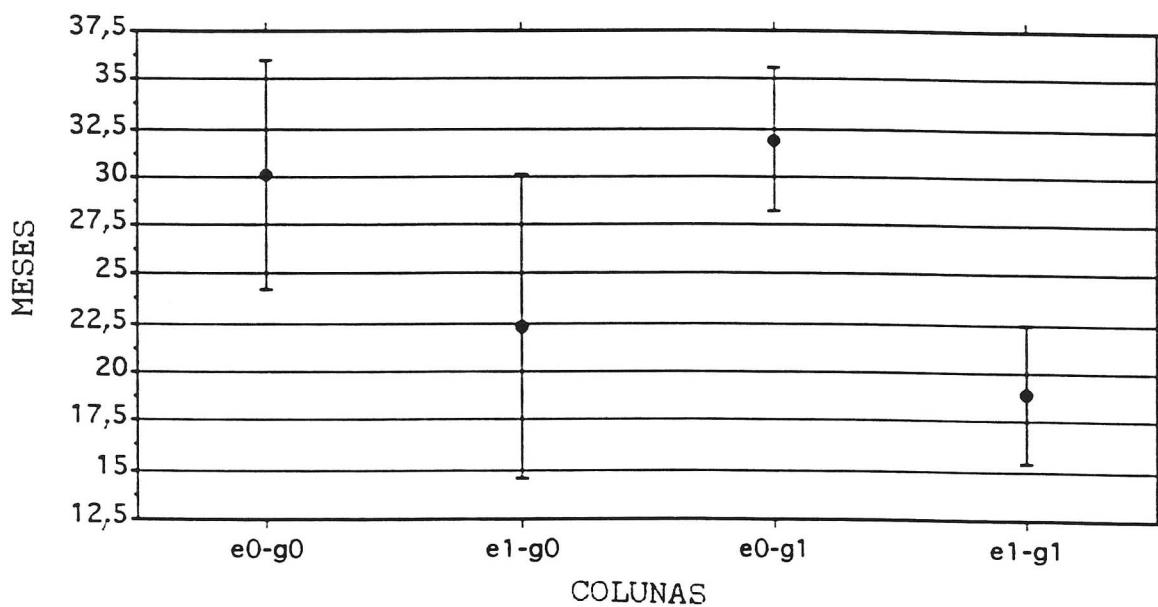
Muitos individuos abandonam o estudo por diferentes razões e consequentemente o seguimento dos doentes mostra uma grande variação. Temos de considerar ainda que é impossível seguir completamente pacientes que apresentarão recorrência ou morte após longos períodos de tempo.



**Figura 8.** Distribuição dos casos de acordo com o tempo de seguimento:  
a) diplóides e b) aneuplóides



**Figura 9.** Distribuição dos casos de acordo com o tempo de recorrência:  
a) diplóides e b) aneuplóides.



**Figura 10.** Comparação dos tempos médios de observação e recorrência: g0-diplóides; g1 aneuplóides; e0-não recorrentes e e1-recorrentes.

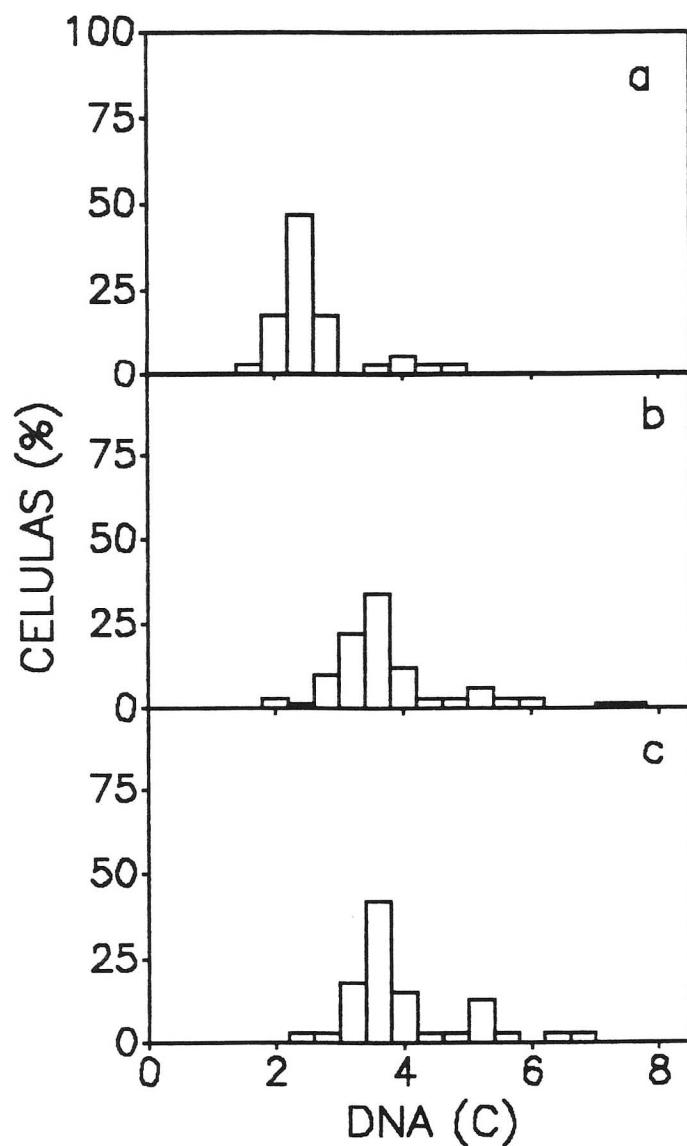
Isto leva a um grande número de dados censurados. Pode-se assumir, todavia, que ambos os grupos, diplóide e aneuplóide, são igualmente afetados por estes fatores. Conclusões diretas são dificeis. Evidentemente, amostras com muitos eventos censurados apresentam grande variabilidade nos dados o dificultando a aplicação de métodos estatísticos padrões. A análise estatística Bayesiana é baseada no cálculo de probabilidades e as conclusões e decisões são baseadas nos resultados destes cálculos.

No presente trabalho, utilizando métodos Bayesianos, calculamos a probabilidade da média do tempo de recorrência de um grupo (diplóide) ser maior que a do outro (aneuplóide), estabelecendo as conclusões com base nestes cálculos. As probabilidades foram calculadas usando o modelo exponencial de sobrevivência, que permite incluir os dados censurados. Na realidade, usamos a informação  $x > t$  quando o elemento abandona o estudo no tempo  $t$  com  $x$  sendo o tempo necessário para recorrência da doença. Consideramos como distribuições *a priori*, uniformes no eixo positivo da reta. Embora impróprias estas distribuições são usadas para evitar qualquer influência do pesquisador sobre os resultados finais. Assim, calculamos as distribuições *a posteriori* das médias de sobrevida dos dois grupos envolvidos. Foi obtida a distribuição da razão entre as duas médias e esta distribuição é F de Snedecor. Calculamos então a probabilidade de que a média do primeiro grupo (diplóide) seja maior do que a do segundo (aneuplóide). O resultado final encontrado é 0,875. Na realidade, foi calculada  $\text{Pr}\{F < 1,363\}$ , onde  $1,363 = \frac{1518}{16}$

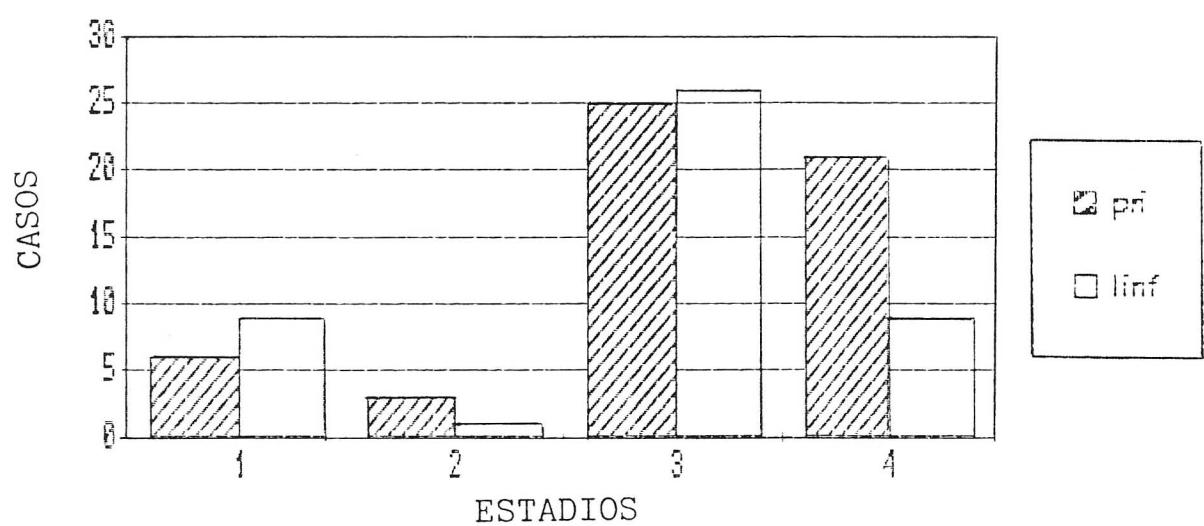
### **III- Ploidia em tumores primários e respectivas metástases axilares.**

Em outra abordagem analisamos o DNA nuclear de 141, tumores primários e de um a três linfonodos axilares suspeitos de comprometimento à cirurgia , em cada caso. Um dos casos correspondia a um tumor de mama de um homem e não foi computado com os demais 140. Em 55 dos casos os gânglios foram confirmados como comprometidos ao exame histopatológico. O grau de ploidia do tumor primário foi utilizado para definir os dois sub-grupos: diplóides, 14(25%) dos casos, e aneuplóides 41(75%).

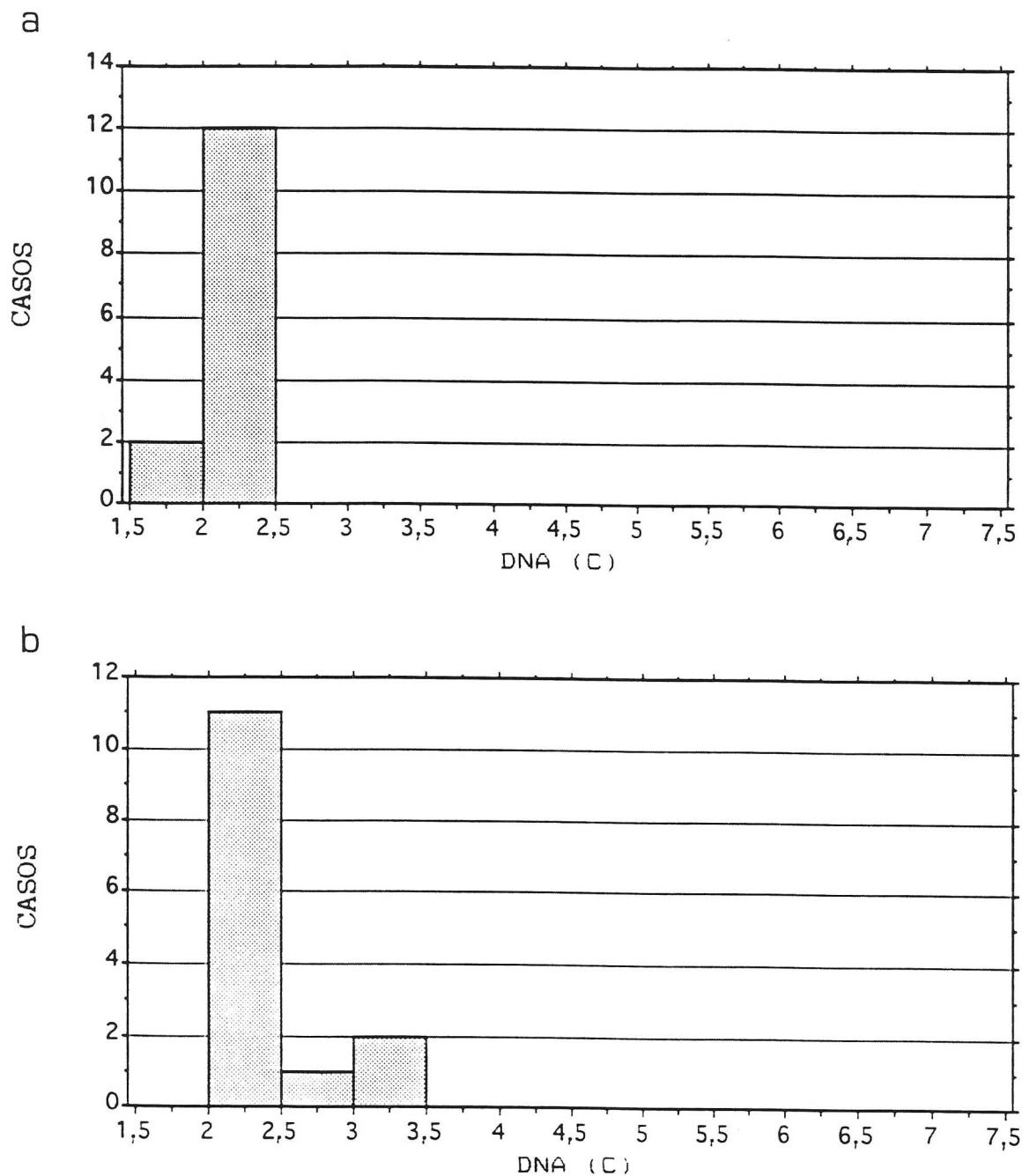
A classificação dos histogramas segundo seus padrões foi utilizada nesta análise para melhor comparação dos dados referentes aos tumores primárioa com os das recpectivas metástases axilares. A figura 11 mostra os dados de um dos casos analisados em que um dos linfonodos era comprometido e o outro não. Os padrões dos histogramas concordaram em 80% dos casos, predominando os de tipo III (figura 12). A distribuição das medianas de DNA observadas nestes sub-grupos diplóides e aneuplóides, é mostrada respectivamente nas figuras 13a e 14a. Os valores de DNA das metástases axilares dos tumores diplóides, embora em sua maioria também diplóides, desviam de 2C em alguns casos (figura 13b). Ao contrário , os valores de DNA tendem a ser menores nas metástases ganglionares do que nos respectivos tumores primários, quando estes são aneuplóides (figura 14b). Nestes observa-se predominância de valores entre 2,5C e 3,5C, tendendo a uma distribuição bimodal. com picos em 2C e a região hiperdiplóide. Estas diferenças ficam mais evidentes na figura 15, onde podemos comparar os dois sub-grupos e respectivas metástases, quanto aos seus valores médios.



**Figura 11.** Histogramas dos valores de DNA :a) linfonodo não comprometido; b) linfonodo comprometido e c) tumor primário.

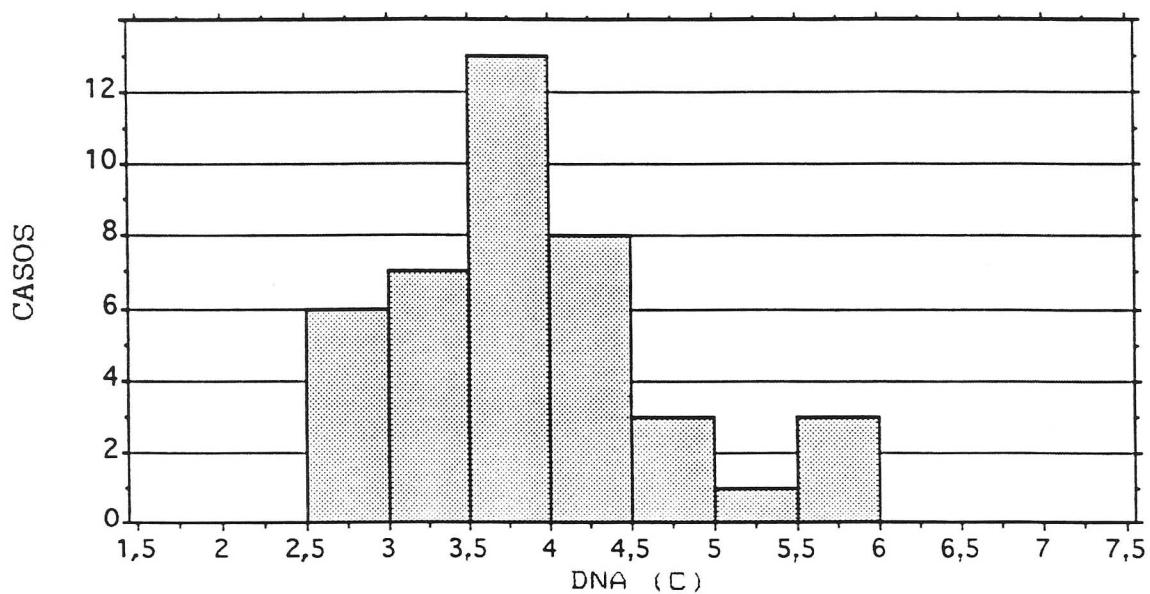


**Figura 12.** Distribuição dos tumores primários e metástases axilares, segundo o padrão do histograma.

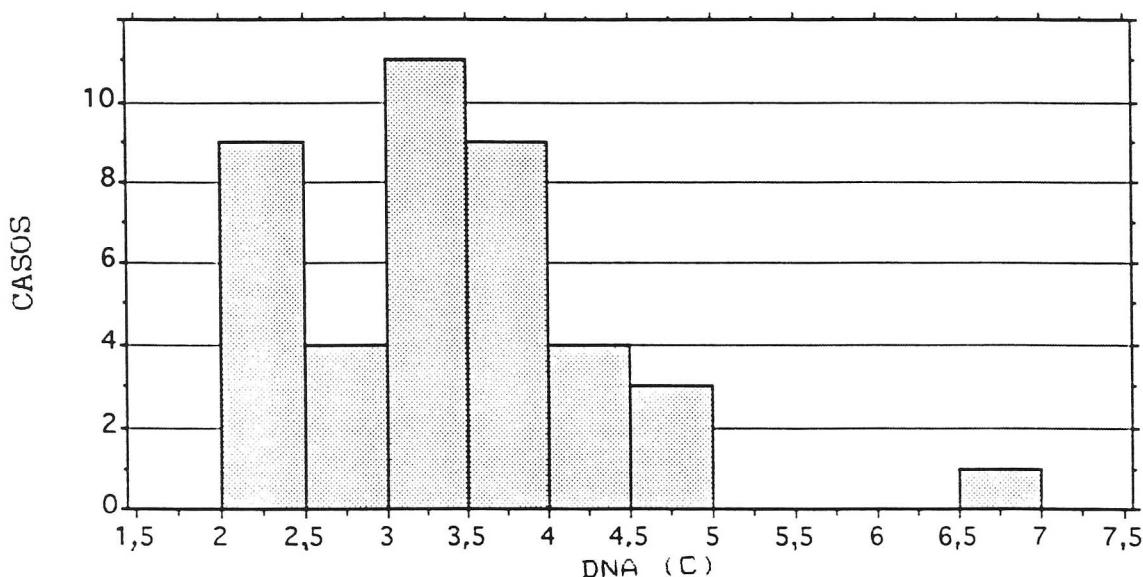


**Figura 13.** Valores das medianas de DNA observadas nos tumores primários (a) e respectivas metastases axilares (b), nos tumores considerados diplóides.

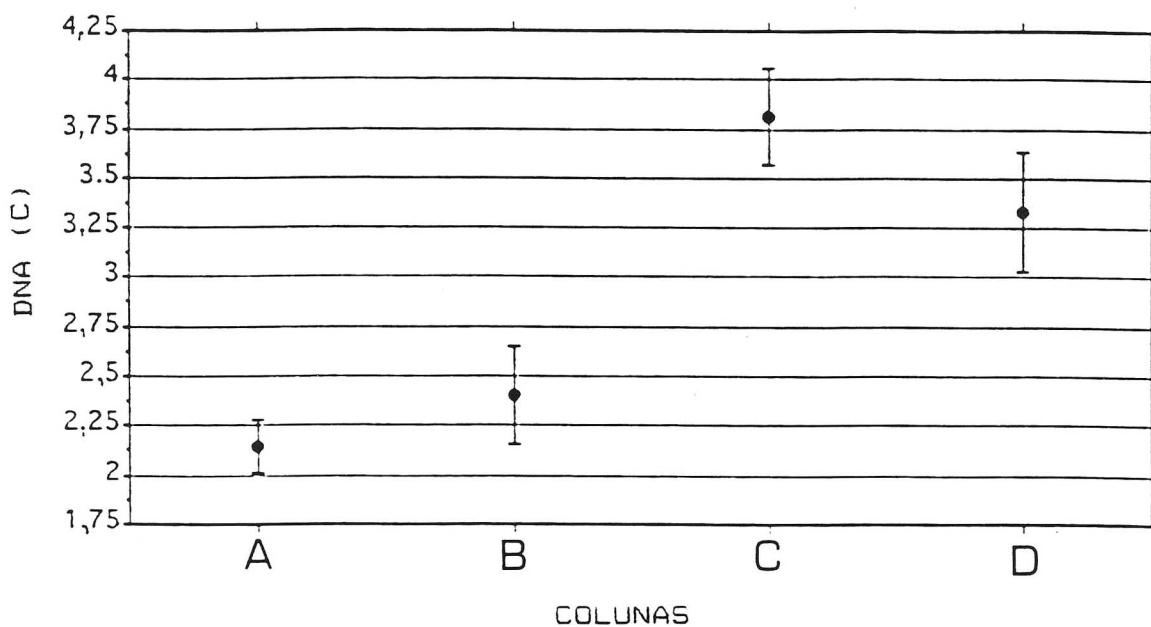
a



b



**Figura 14.** Valores das medianas de DNA observados nos tumores primários (a) e respectivas metástases axilares (b), nos tumores classificados como aneuplóides



**Figura 15.** Valores médios das medianas de DNA em: A-tumores primarios diplóides; B-respectivas metástases axilares; C-tumores primários aneuplóides e D-respectivas metástases axilares.

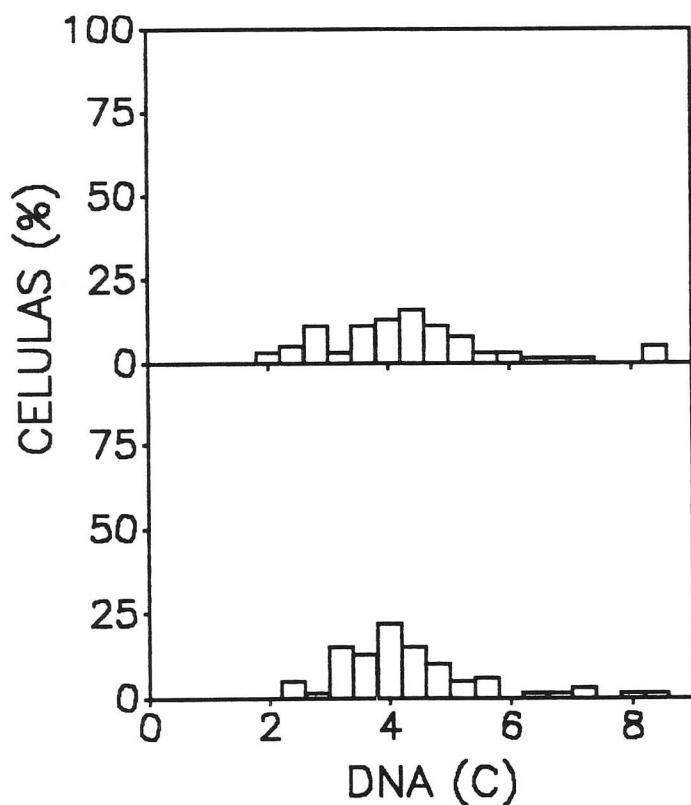
#### **IV- Avaliação resposta a quimioterapia em pacientes em estadio II, em relação a ploidia do tumor.**

Um grupo de 40 pacientes em estadio II foi seguido por um tempo mínimo de 30 meses. Aquelas que apresentavam linfonodos axilares foram submetidas a quimioterapia adjuvante (tipo CMFVP-ciclofosfamida, metotrexato, fluoracil, vincristina e prednisona). Foi considerada má resposta ao tratamento a manifestação de sintomas indicativos de recorrência local ou metástases a distância e este dado analisado em relação a ploidia do tumor. As pacientes foram estratificadas de acordo seu estado menopáusico. Estes resultados são mostrados na tabela X. O único sub-grupo que se distingue dos demais é o das pós-menopáusicas, com metástases axilares que apresentaram novas manifestações da doença no periodo de observação: todas apresentavam valor de DNA 4 a 4,4C. Estes valores eram mais altos que os observados nos outros sub-grupos, apresentavam pouca variação entre si e os histogramas de distribuição em cada tumor era do mesmo tipo: valores amplamente espalhados sem definição de um pico, correspondendo ao padrão IV (figura 16). Nos outros sub-grupos esta uniformidade não foi observada (figura 1).

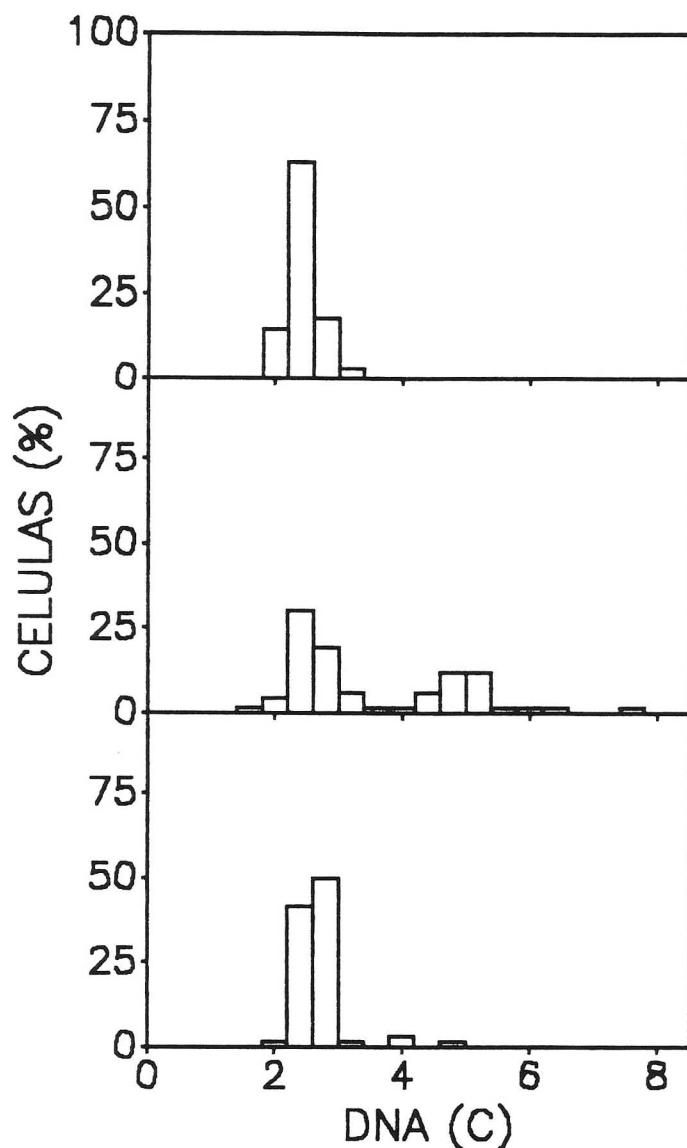
O número de pacientes analisados nestes estudo é muito pequeno, mas os resultados das pos-menopáusicas de má resposta é muito uniforme, sugerindo que esta avaliação deve ser ampliada para maior número de casos. 14 das 40 (35%) das mulheres eram pre-menopáusicas com idade média de 35 anos, enquanto que as demais, pós-menopáusicas, tinham idade média de 60 anos. As pacientes com linfonodos comprometidos compreendiam 62,5% dos casos.

**Tabela X-** Valores de DNA (C) em carcinomas ductais invasivos, estadio II, em relação à resposta a terapia adjuvante.

	Linfonodo negativo	Linfonodo positivo	
	s/ sintomas	recidiva	s/sintomas
<b>Pré-menopausa</b>			
	3,2	2,4	2,4
	2,0		2,8
	4,0		3,2
	2,4		3,6
<b>Média</b>	2,9	----	2,9
			2,3
<b>Pós-menopausa</b>			
	2,4		2,4
	4,8		2,0
	4,0		2,8
	4,0		2,8
	2,0		2,4
	3,2		2,8
	4,4		4,4
	2,0		2,8
	4,0		4,0
	3,6		
<b>média</b>	3,4	----	2,5
			4,1



**Figura 16.** Histogramas de DNA representativos dos tumores com linfonodos comprometidos, que apresentaram recorrência antes de 30 meses, nas mulheres pos-menopáusicas



**Figura 17.** Histogramas de DNA representativos de tumores com linfonodos comprometidos, de mulheres pos-menopausicas, que não apresentaram recorrência no periodo de 30 meses.

## **DISCUSSÃO**

O papel da aneuploidia na biologia tumoral é ainda pouco compreendido e por representar um fenômeno muito amplo, provavelmente envolve além das alterações cromossômicas númericas, alterações estruturais. Como consequência poderia haver desequilíbrio na dosagem e regulação gênica que por sua vez determinaria um efeito promotor de crescimento celular. De um modo geral a aneuploidia tem sido grandemente estudada na fase de progressão tumoral, havendo pouca informação sobre seu envolvimento em fases iniciais da transformação maligna (iniciação e promoção tumorais) e talvez este seja um dos aspectos que dificultam o entendimento de seu papel na etiologia do câncer.

A alta frequência de aneuploidia (67%) observada nos tumores malignos, contrastando com os fibroadenomas (todos diplóides) confirmou mais uma vez o conteúdo anormal de DNA como marcador de malignidade. Embora a maioria dos tumores analisados fossem carcinomas ductais invasivos e outros tipos histológicos representassem um número muito pequeno de casos em nossa amostra, observamos que os carcinomas medulares tendem a ser aneuplóides em quase sua totalidade. Estes dados concordam com os de outros autores (Moran et al., 1984; Feichter et al., 1988) que compararam a frequência de aneuploidia em diferentes tipos histológicos de tumores de mama. McDivitt et.al. (1986) postulam ainda que a não-diploidia estaria sempre associada a tumores mais agressivos, de mesmo tipo histológico ou não. Estes autores observaram que os carcinomas papilíferos e coloides tendem a ser diplóides com pequena fração de células em S, enquanto que os medulares além de aneuplóides apresentam grande fração de células em S. A aneuploidia estaria ainda associada ao baixo índice de diferenciação do tumor (Olszewski et al., 1981).

A frequência de aneuploidia por nós observada nestes tumores está dentro da faixa encontrada na maioria dos outros estudos realizados em tumores de mama. Feichter et al. (1988) constroem em seu trabalho uma tabela resumindo os principais dados relativos a frequência de aneuploidia em câncer

de mama, determinada por citometria de fluxo. Das 21 citações, 13 apresentam mais de 60% de casos aneuplóides. Outros estudos utilizando métodos diferentes de quantificação de DNA (Auer et al., 1984) mostram incidências semelhantes de tumores não diplóides. Entretanto devemos considerar que uma comparação direta entre os diferentes trabalhos teria de levar em conta vários fatores que possam ser determinantes de variabilidade tais como: tipo de material utilizado nas análises, coloração, método de quantificação, etc. A comparação entre os diferentes métodos mostra uma razoável concordância entre análise de imagem e citometria de fluxo e entre esta e citometria de varredura (Fossa et al., 1983; Cornelisse & van Driel-Kulker, 1985). Maiores diferenças seriam decorrentes do uso de material emblocado em estudos retrospectivos, pois além de possíveis variações na fixação, necessitam ser desparafinizados e dissociados enzimaticamente antes da coloração, o que por sua vez pode levar ao aparecimento de grande proporção de debris celulares. O uso de material fresco para a obtenção de dados mais confiáveis, como no presente estudo é portanto grandemente oportuno.

A distribuição dos valores de DNA observados nos carcinomas ductais invasivos, tende a ser bimodal, concordando com dados prévios da literatura (Fossa et al., 1983; Ewers et al., 1984; Moran et al., 1984). Esta tendência é reforçada pela classificação dos tumores em sub-classes de ploidia, que mostra como dominantes as classes diplóide e tetraplóide. Se considerarmos ainda que o valor do DNA corresponderia ao número modal de cromossomos nestas células, poderíamos inferir que os nossos dados concordam com a hipótese de Ewers et al. (1984). A hipótese postula que linhagens hipotetraplóides seriam originadas via um processo de poliploidização das células normais, seguida pela perda gradual de cromossomos. Consequentemente, a probabilidade de existirem linhagens tetraplóides seria maior do que a de linhagens hipotetraplóides.

Os histogramas referentes a distribuição dos valores de DNA nos diferentes estadios da doença e os valores médios de cada estadio sugerem que as alterações quantitativas de DNA aumentariam com a progressão da doença, podendo refletir instabilidade genética decorrente da progressão tumoral (Nowell, 1986).

Observamos associação significante entre a frequência de tumores diplóides e estadios iniciais da doença. Este dado é importante uma vez que é a alta proporção de tumores em estadio III em nossa amostra, característica usualmente não observada nos demais estudos. Deste modo há um equilíbrio em relação ao número de casos em fases iniciais e tardias, quando definimos os sub-grupos E(TNM I+II) e L(TNM III+IV). Nos países mais avançados programas de prevenção de câncer mais eficientes deslocam a maior frequência de casos para estadios precoces, II ou até mesmo I. Sharma et al. (1991) analisam o DNA em um grupo de pacientes na Índia chamando a atenção para algumas de suas características específicas dentre as quais idade menor, elevado número de paridades e idade mais jovem ao 1º parto, não fazendo referência aos estadios. Por outro lado, as pacientes por nós analisadas são mais velhas, havendo, portanto, maior número de pós-menopáusicas entre elas.

Informações adicionais e conclusivas sobre fatores prognósticos podem ser obtidas a partir de estudos de tumores representando diferentes regiões geográficas e portanto diferente "background" genético. A importância da inclusão destas diferentes amostras neste tipo de estudo foi previamente assinalada por Paterson et al. (1991) quando analisaram o valor prognóstico da amplificação do oncogene erb-B2 em uma população bem controlada de mulheres com câncer de mama em Alberta, Canadá. Dentre estas pacientes foi possível identificar um sub-grupo de alto risco de recorrência e morte associada a amplificação deste oncogene, com tumores sem comprometimento axilar.

Não observamos diferenças quando comparamos a frequência de casos aneuplóides e diplóides em relação a correlação entre o número de linfodos comprometidos, como parâmetro isolado dos demais utilizados na classificação pelo sistema TNM. Este aspecto é bastante controvertido, alguns autores sugerem uma correlação positiva (Fossa et al., 1984) enquanto outros não a detectam (Moran et al., 1984; Ewers et al., 1984) e Cornelisse et al. (1987) encontram correlação entre aneuploidia e tumores com mais de dez linfonodos comprometidos. De um modo geral podemos assumir que a correlação entre estes dois parâmetros é fraca.

Os dados discutidos até aqui levam-nos a questionar qual seria a subpopulação de células tumorais com capacidade de metastização. Se a aneuploidia está associada com a progressão da doença, meramente como consequência da instabilidade genética, poderíamos imaginar que as mais aberrantes quanto a ploidia fossem as que apresentassem maior agressividade.

A análise de especimens oriundos de metástases distantes é praticamente inviável e portanto abordamos este problema analisando comparativamente tumores primários respectivas metástases axilares. As células tumorais do linfonodo tem valores de DNA menores do que os dos tumores primários, quando estes são aneuplóides. E ainda em parte dos casos tumores primários e metástases axilares apresentaram mesmo valor de mediana e mesmo padrão de histograma de DNA. Estes dados sugerem que as populações celulares que teriam capacidade de metastização não seriam as grandemente aberrantes quanto ao seu conteúdo de DNA, embora devam ter mesma origem, isto é, as células das metástases representariam pela menos parte da população do tumor primário. Dados de Remvikos et al. (1988) mostram grande concordância entre os índices de ploidia de tumores primários e respectivas metástases axilares, atestando sua origem comum, contrariamente aos tumores bilaterais simultâneos.

Resumindo, nossos dados apontam para o envolvimento da aneuploidia na progressão tumoral e colocam as células hipotetraplóides como candidatas a maior potencial de agressividade. Não temos informações entretanto que nos permitam excluir um possível papel adicional de alterações quantitativas do DNA em fases anteriores do desenvolvimento tumoral, ou mesmo a existência de subgrupos de tumores em que a aneuploidia, presente desde suas fases iniciais, constitua uma característica biológica específica. Em neuroblastomas por exemplo, a amplificação do oncogene N-myc foi correlacionada com o estágio da doença, mas um elevado número de cópias do gene indica pior prognóstico, independentemente do estadio da doença (Brodeur & Seeger, 1986).

A recorrência (local ou distante) foi o parâmetro utilizado na análise da associação entre a progressão da doença e a aneuploidia. Esta análise resultou em alguns pontos interessantes: entre os tumores diplóides que apresentaram recidiva 60% representavam estadios iniciais e na avaliação da resposta a quimioterapia dos tumores em estadio II onde observamos má resposta nas mulheres pós-menopáusicas com valor da mediana de DNA de 4C e histograma tipo IV. Neste caso, é importante a associação dos dois parâmetros, pois o padrão IV não define uma população celular principal. Estes dados concordam com os de Falenius et al., 198 , que mostram a associação entre pior prognóstico e padrão IV de histograma de DNA. O número de pacientes que constituem estes dois estudos é insuficiente para conclusões definitivas, embora Cornelisse et al. (1987) tenham também observado que, nas mulheres pós-menopáusicas com linfonodos comprometidos, a ploidia é um fator prognóstico adicional independente, (definido por análise de regressão de Cox). Neste grupo de pacientes a aneuploidia pode ser considerada como um fator associado a agressividade biológica do tumor.

A proporção de tumores aneuplóides e diplóides que recidivam é equivalente, como já mostrado anteriormente, embora outros pesquisadores

tenham mostrado maior frequência de recorrência (Ewers et al., 1984; Sharma et al., 1991) ou morte (Kallioniemi et al., 1988) em pacientes com tumores não diplóides. Alguns autores mostram a inexistência de efeito da ploidia sobre o prognóstico de sobrevida após o aparecimento de metástases a distância (Friedlander et al., 1984; Cornelisse et al., 1987; Hedley et al., 1987), o que reforça o interesse no estudo do tempo de recorrência, parâmetro este que reflete diretamente a progressão tumoral.

A observação de tempo de recorrência mais curto em pacientes com tumores aneuplóides mostrou-se consistente. Empregando métodos de análises Bayesiana, determinamos como sendo de 0,875 a probabilidade da paciente com tumor aneuplóide manifestar sintomas indicativos da progressão da doença em tempo mais curto do que aquelas com tumor diplóide. Este dado sugere a ploidia do tumor como um parâmetro relevante na avaliação clínica da paciente de câncer de mama, cuja exata dimensão depende ainda de dados adicionais sobre sua possível correlação com a resposta a terapia adjuvante. A viabilização da análise sequencial da presença de receptor de estrógeno e quantificação do DNA nuclear em uma mesma preparação citológica, feita a partir de biópsia aspirativa de agulha fina (Pestana et al., 1991), amplia as possibilidades de estudos prospectivos mais detalhados, assim como possibilita a escolha da terapia adjuvante mais efetiva.

Dados correlacionando ploidia do tumor primário com a resposta à terapia adjuvante são ainda insuficientes para estabelecimento de qualquer conclusão. Pode-se imaginar que células tumorais aneuplóides respondam diferentemente ao tratamento secundário, como sugerido por Herman et al. (1984) e Quirke & Dyson (1986), afetando assim a avaliação do prognóstico. Dados preliminares de nosso grupo mostraram que a resposta a quimioterapia neoadjuvante, avaliada pela remissão do tumor primário, é mais eficiente nos aneuplóides.

Considerando ainda a incidência de recorrência mais alta nos estadios iniciais entre os tumores diplóides, podemos inferir que o envolvimento deste tipo de alterações com o processo de carcinogênese é realmente muito complexo. A expressão do fenótipo plenamente transformado em um tipo celular pode resultar de mecanismos diferentes, embora levando a tumores semelhantes pelos critérios histopatológicos usuais. Entretanto, eles apresentariam comportamento biológico diferente. Deste modo, dentro de ambos os grupos de tumores, diplóides e aneuplóides, devem existir sub-grupos mais homogêneos.

Alterações de DNA ao nível molecular, tais como amplificação e deleções em genes específicos, ao contrário de mutações pontuais são frequentes nos tumores de mama. A amplificação principalmente de erb-B2 e int-2 tem sido bastante estudadas objetivando basicamente avaliar seu valor prognóstico (Cline et al., 1987; Theillet et al., 1989; Slamon et al., 1989; Paterson et al., 1991). As deleções principalmente do cromossomo 17, envolvendo ou não o gene p53, tem sido detectadas em alta frequência em tumores de mama (Sato et al., 1990; Thompson et al., 1992).

O risco aumentado de câncer de mama em mulheres com mãe ou irmã afetadas, especialmente quando a doença desenvolve-se antes da menopausa ou é bilateral, foi demonstrado com base em evidências epidemiológicas (McKenzie, 1991). Exemplificando a interação entre alterações gênicas específicas e o background genético do indivíduo no processo de transformação maligna, podemos citar os dados obtidos em camondongos com mutação "null" (negativa) de p53, que apresentam alta taxa de tumores. O tipo histológico de tumor observado nestes animais obedece a predisposição particular da linhagem de camondongo (Donehower et al., 1992).

Portanto, a análise da associação entre estas alterações de DNA em vários níveis, e também das suas possíveis consequências sobre a expressão gênica, deverão possibilitar a estratificação segura de sub-grupos tumorais quanto a sua agressividade, melhorando as perspectivas de cura da doença.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adami HO, Graffman S, Lindgren A, Sallstrom J. Prognostic implication of oestrogen receptor content in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, **5**:293-300, 1985.

Atkin NB, Richards BM, & Ross AJ. The deoxyribonucleic acid content of carcinoma of uterus: an assessment of its possible significance in relation to histopathology and clinical course, based on data from 165 cases. **Br. J. Cancer**, **13**:773-786, 1959.

Auer G ,Casperson SA, Humla U, Ljung BM, Norsdenskjold BA & Wallgren AS. Relationship between nuclear DNA distribution and estrogen receptors in human mammary carcinomas. **Analyt Quant.Cytol.**, **2**:280-284, 1980.

Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T & Wallgren A. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. **Cancer Res.**, **44**:394-396, 1984.

Baak JPA, van Dop H, Kurver PHJ & Hermans J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**, **56** :379-382, 1985.

Baaldam Ad, Zaloudik J, Howell A. DNA analysis by flow cytometry: response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma. **Br. J. Cancer**, **55**:553-559, 1987.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton Sr, Preisinger AC, VanTuinem M< Ledbetter DH, Baker DF, Nakamura Y , White R & Volgenstein. Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. **Science**, **244**:217-221, 1989.

Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B., Swartzendruber DE, Goehde W, & Freireich E. Flow cytometry in clinical cancer research. **Cancer Res.**, 43:3982 -3997. 1983

Bedrossian CWM, Rager M & Barlogie B. Flow Cytometry and cytomorphology in primary resectable breast cancer. **Analyt. Quant. Cytol.**, 3:112-116, 1981.

Benedict WF, Murphee AL, Banerjee A, Spina CA, Sparkes MCS & Sparkes RS. Patient with 13 chromosome deletion evidence that the Rb gene is a recessive cancer gene. **Science**, 219:973-975, 1983

Berger MS, Locher GW, Sauer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B & Hyes NE. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. **Cancer Res.**, 48:1238-1243, 1988.

Bishop J M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, 64:235-248, 1991.

Bishop J M. The molecular genetics. **Science**, 235:305-311, 1987.

Bloom HJ & Richardson WW. **Histological grading and prognosis in breast cancer**. **Br. J. Cancer**, 11:359-377, 1957.

Bodmer WF, Bailey CJJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucubello FC, Murday VA, Reder SH, Scambler P, Sheir D, Solomon E & Spurr NK. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. **Nature**, 328:614-616, 1987.

Bonadonna G & Valagussa P. Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, 3:259-275, 1985.

Bonadonna G & Valagussa P. New prognostic in primary breast cancer: how useful to clinicians? **Oncol. Club.**, 1:14-15, 1988.

Borg A, Baldetrop B, Ferno M, Killander D, Olsson H & Sigurdsson H. ERB-B2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. **Oncogene**, 6:137-143, 1991. 1990

Boveri T. The origin of malignant tumors (Baltimore: The Williams and Wilkns Co.) pp.26-27, 1929.

Brodeur GM & Seeger RC. Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 19:101-111, 1986.

Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF, Whang-Peng J & Matthews MS Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. **Cancer Res.**, 43:5026-5032, 1983.

Caleffi M, Fentiman IS & Birkhead BG. Factors at presentation influencing the prognosis. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, 25:51-56, 1989.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kakkawa U & Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J. Biol.Chem.**, 257:7847-7851, 1982.

Clark GM & McGuire WL. Follow-up study of Her-2/neu amplification in primary breast. **Cancer Res.**, 51:944-948, 1991.

Cline MJ, Battifora H & Yokota J. Proto-oncogene abnormalities in breast cancer: correlationwith anatomic features and clinical course of disease . **J.Clin. Oncol.**, 5:999-1006, 1987.

Cornelisse CJ, van de Velde CJH, Casper RJC, Molenaar AJJ & Hermans J. DNA ploidy and survival in breast cancer. **Cytometry**, 8:225-234, 1987.

Cornelisse CJ, van Driel-Kulker AMJ. **DNA image cytometry on machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow cytometry and scanning cytometry. Cytometry**, 6:471-477, 1985.

Cross M & Dexter TM. Growth factors in development transformation and tumorigenesis. **Cell**, 64:271-280, 1991.

Doll R & Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today (New York: Oxford University Press, Inc.), 1981.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery Jr. CA, Butel JS & Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, 356:215-221, 1992.

Dotto GP, Parada LF & Weinberg RA. Specific growth response of *ras*-transformed fibroblasts to tumor promoters. **Nature**, 318:472-475, 1985.

Dowell CS, Owainati AA & Robbins. Prognostic significance of DNA content of human breast cancer. **Br.J.Surg.**, 74:133-136, 1987.

Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B & Killander P. Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinoma and clinicopathological correlations. **Cytometry**, 5:408-419, 1984.

Fallenius A. Dna content and prognosis in breast cancer(thesis). Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. 1986.

Farber E & Cameron R. The sequential analysis of cancer development. **Adv. Cancer Res.**, **31**:125-226, 1980 Hecker 1982.

Farmer G, Bargonetti, Zhu H, Friedman P, Prywes R Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. **Nature**, **358**:83-86, 1992.

Fearon ER & Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, **61**:759-777, 1990.

Feichter GE, Mueller A, Kaufmann M, Haag D, Born IA, Abel U, Klinga K, Kubli F & Goerttler R. Correlation of DNA flow cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. **Int. J. Cancer**, **41**:823-828, 1988.

Feulgen R & Rossenbeck H. Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf besuehnde elektive Farbung von Zellkernen in mikroskopischchen praparate. **Z. Physiol. Chem.**, **135**:203-248, 1924.

Fields S & Jang SK. Presence of a potent transcription activating in the p53 protein. **Science**, **249**:1046-1051, 1990.

Fisher B, Bauer M & Margolese R. Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with and without radiation in the treatment of breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, **312**:665-673, 1985.

Fossa T, Thorund E, Vaage S & Shoaib M. DNA cytometry of primary breast cancer. **Acta Pathol. Microbiol. Im. Scand. Sect. A**, **91**:235-243, 1983.

Franke U, Holmes LB, Atkins L & Riccardi VM. Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. **Cytogenet. Cell. Genet.**, **24**:185-192, 1979.

Frankfurt OS, Chin JL, Englander LS, Greco, WR, Pontes, JE and Rustum YM.

Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation and tumor spread in human prostate cancer. **Cancer Res.**,**45**:1418-1423, 1985.

Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Coates AS & Tattersall HN.

Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer.

**Cancer Res.**, **44**:397-400, 1984.

Friend SH, Bernards R, Rogely S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM & Dryja

TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature**, **323**:643-646, 1986.

Grundy P, Koufos A, Morgan K, Li FP, Meadows AT & Cavenee WK. Familial predisposition to Wilms' tumour does not map to the short arm of chromosome 11. **Nature**, **336**:374-376, 1988.

Haber DA, Bucler AJ, Glasser T, Call KM, Pelletier KM, Sohn RL, Douglass EC & Housman DE. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilm's tumor. **Cell**, **61**:1257-1269, 1990.

Harbour JW, Lai S-L, Whang-Peng J, Gazdar AD, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. **Science**, **241**:353-357, 1988.

Hecker E, Fusenig N E, Kunz , W, Marks F & Thielman HW. Carcinogenesis - a comprehensive Survey, vol. 7. New York: Raven Press, 1982.

Hedley D, Rugg CA, Ng ABP & Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients. **Cancer Res.**, **44**:5395-5398, 1984.

Hedley DW, Rugg CA & Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of node positive early breast cancer. **Cancer Res.**, **47**:4729-4735, 1987.

Herman CJ, Vooijs GP, Baak JPA & Boon ME. Quantitative cytologic and histologic techniques to assist in cancer evaluation. **Methods Archiev. Exp. Pathol.**, **11**:73-95, 1984.

Horowitz JM, Yandel DM, Park S-H, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA & Dryja TP. Point mutation inactivation of the retinoblastoma antioncogene. **Science**, **243**:937-940, 1990.

Hunter T, Cooperation between oncogenes **Cell**, **64**:249-270 1991.

James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP & Cavenee, Wk. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **86**:2558-2862, 1989.

Johnson MD, Housey GM, Kirschmeier P, & Weinstein IB. Molecular cloning of gene sequences regulated by tumor promoters and mitogenic through protein kinaseC. **Mol. Cell Biol.**, **7**:2821-2829, 1987.

Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Matilla S, Lauslahti K, Lehtinen M & Koivula T. Tumor ploidy is an independent prognostic factor in breast cancer. **Br. J. Cancer**, **56**:637-642,

Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Matilla S, Lauslahti K, Lehtinen M & Koivula T. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. **Cancer**, **62**:2183-2190, 1988.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Volgenstein B, and Craig RW.

Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, **51**:6304-6311, 1991.

Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res.**, **45**:1437-1443, 1985.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **68**:820-823, 1971.

Lammie GA, Fantl V, Smith R, Schwing E, Brookes S, Michelides R, Dickson C, Arnold A & Peters G. DIIS287 a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinoma and linked to BCL-1. **Oncogene**, **6**:439-444, 1991.

Land H, Parada LF & Weinberg, RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. **Nature**, **304**:596-602, 1983

Lane D & Bechimol S. p-53: oncogene or antioncogene. **Genes Dev.**, **4**:1-8, 1990.

Langlands AO & Kerr GR. **Clin Oncol.** **5**:123-133, 1979.

Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Young L-J, Shew J-Y & Lee E Y-HP. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. **Science**, **235**:1394-1399, 1987.

Lu X, Park SH, Thompson TC & Lane DP. ras-Induced hyperplasia occurs with mutation of p53 but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation. **Cell**, **70**:153-161, 1992.

Mackay J, Steel CM, Elder PA , Forrest AP & Evans HJ. Allele loss on short arm of chromosome17 in breast cancers. **Lancet**, **2**:13384-1385, 1988.

Marshall CJ. Tumor suppressor genes. **Cell**, **64**:313-326. 1991.

McDivitt RW, Stone KR, Craig RB, Palmer JO, Meyer JS & Bauer WC. A proposed classification of breast cancer based on kinetic information. **Cancer**, **57**:269-279, 1986.

McGuire WL & Dressler LG. Emerging impact of flow cytometry in predicting recurrence and survival in breast cancer patients. **J Cancer Inst.**, **75**:405-410, 1985.

McGuire WL, Meier JS, Barlogie B & Kute TE. **Breast Cancer Res. Treat.**, **13**:111-128, 1985.

McKenzie, S. Diagnostic utility of oncogenes and their products in human cancer. **Bioch. Bioph. Acta**, **1072**:193-214, 1991.

Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E M & Ulrich SJ. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **88**:1958-1962, 1991.

Merkel DE & McGuire, WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. **Cancer**, **65**: 1194-1205, 1990.

Minna JD, & Kaye FJ. Abnormalties in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. **Science**, **241**: 353-357, 1988.

Mitelman F, Kaneko Y & Trent JM. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet. Cell Genet.**, **55**:358-386,1990.

Mitelman F. Catalogue of Chromosomal Aberrations in cancer. (Wiley-Liss, New York, ed.4, 1991).

Moran RE, Black MM, Alpert L & Straus MJ. Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology, and nodal status in human breast cancer. **Cancer**, 54:1586-1590, 1984.

Motomura T, Bloom T, Kun HG, Juppuer H, Ruderna JV, Kronenberg HM & Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. **Nature**, 350:512-515, 1991.

Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, 46:2203-2207, 1986.

Olszewski W, Darzynkiewics Z, Rosen PP, Schwartz JK & Melamed MR. Flow cytometry of breast cancer. **Cancer**, 8:985-988, 1981.

Pandolfi PP, Grignani F, Alcalay M, Mencarelli A, Biondi A, Locardi F, Grignani F & Pelicci PG. Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alfa cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. **Oncogene**, 6:1285-1292, 1991.

Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AHG, Lees AW, Hamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA, Slamon DJ & Fourney RM. **Cancer Res.**, 51:556-567, 1991.

Pestana CB, Donozo N, Pinto AJ, de Almeida PC & Machado-Santelli GM. Breast Cancer Res, Treat., 19:39-46, 1991.

Peto R. Epidemiologic, multistage models and short term mutagenesis tests. In: *Origins of human cancer*, pp. 1403-1428. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.

Quirke P & Dyson JED. Flow cytometry: methodology and application in pathology. **J Pathol.**, **149**:79-87, 1986.

Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A Glaichenhaus N, Kamen R & Cuzin The roles of individuals polyomavirus early proteins in oncogenic transformation. **Nature**, **300**:596-602, 1983.

Reddy EP, Reynolds RK, Santos E & Barbacid M. A point mutation responsible for acquisition of transforming properties by the t24 human bladder carcinoma oncogene. **Nature**, **300**:149-152, 1982.

Reeve AE, Sih SA, Raizis AM & Feinberg AP. Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. **Mol. Cel. Biol.**, **9**:1799-1803, 1989.

Rodenburg CJ, Ploem-Zaaijer JJ & Cornelisse Cj. **Cancer Res**, **47**:3938-3941, 1987.

Rosenberg CL, Kim HG, Shoros TB, Kronenberg & Arnold A. Rearrangement and overexpression of DIIS287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumors. **Oncogene**, **6**:449-53, 1991.

Rovinski B & Benchimol S. Immortalization of rat embryo fibroblast by the cellular p53 oncogene. **Oncogene**, **2**:445-452, 1988.

Sager R. Genetic suppression of tumor formation. **Adv.Cancer Res.**, **44**:43-68, 1985.

Sato T, Tanikami A, akiyama F, kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumour progression in primary breast cancer. **Cancer Res.**, **50**:7184-7189, 1990.

Sharma S, Mishra MC, Kappur BML, Verma K, & Nath I. The prognostic significance of ploidy analysis in operable breast cancer. **Cancer**, **688**:2612-2616, 1991.

Slamon DJ, Cark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A & McGuire WL. **Science**, **235**:177-182, 1987.

Slamon DJ, Godolphin W., Jones LA, Wong SG, Keith DE, Levin WF, Stuart SG, Udove J & Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in breast and ovarian cancer. **Science**, **244**:707-712, 1989.

Solomon E, Borrow J & Goddard . Chromosome aberrations and cancer. **Science**, **254**: 1154-1160, 1991.

Stone KR. The role of flow cytometry in urologic oncology. In:McGuire WL, ed. Genito-urinary cancer. Boston:Martins Nijhoff, pp 241-271, 1987.

Tabin C, Bradley S, Bargman C, Weinberg R, Papageorge A, Dhar R, Lowy DR & Chang E. Mechanisms of activation of human oncogene. **Nature**, **300**:143-148, 1982.

Theillet C, Le Roy X, De Lapeyriere O, Grosgeorges J, Adnane J, Raynaud SD, Simony-Lafotaine J, Golfarb M, Escot C, Birnbaum D & Gaudray F. **Oncogene** **4**:915-922. 1989.

Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, Evans HJ & Steel CM. p53 allele losses mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. **Int. J. Cancer**, **50**:528-532, 1992.

Tribukait B, Granberg-Ohman I & Wijkstrom H. **Flow cytometric DNA and cytogenetic studies in human tumors: a comparison and discussion of the differences in modal values obtained by the two methods.** *Cytometry*, 7:194-199, 1986.

UICC International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors, Third Edition, Geneve, 1978.

van de Vijver M, van de Bersselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Petersen S & Nusse R. Amplification of the neu oncogene in human mammary tumors is frequent and is often accompanied by amplification of the linked gene c-erb A. **Mol. Cell Biol.**, 7:2019, 1987.

van der Linden JC, Lindenman J, Baak CJ, Meyer LM & Herman CJ. The multivariate prognostic index and nuclear dNA content are independent prognostic factors in primary breast cancer patients. **Cytometry**, 10:56-61, 1989.

Varley JM, Brammar WJ, Lane DP, Swallow JE, Dolan C & Walker RA. **Oncogene**, 6:413-421, 1991.

Varley JM, Swallow JE Brammar WS Whitaker JL & Walker RA. Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short term prognosis. **Oncogene**, 1:423-430, 1987.

Vindelov LL, Christensen IJ & Wilson NJ. Standardization of high resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. **Cytometry**, 3:328-331, 1983.

Volgenstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura V, White R, Smits AM & Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N. Engl. J. Med.**, **319**:525-532, 1988.

Weinberg RA, Tumor suppressor genes. **Science**, **254**:1138-1146, 1991.

Weinstein IB. The oncogenes of human cancer. **Cancer Res.**, **46**:4135-4143, 1988.

Yokota J, Wadw M, Shimosato Y, Terada M & Sugimura Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13 and 17 in small cell lung carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **84**:9252-9256, 1987.

Yuan J, Hennessy C, Corbett IP, Dkin R, Givan AL, Shenton Bk, Henry JA, Wright C Lennard TW. Node negative breast cancer: the prognostic value of DNA ploidy for long-term survical. **Br.J. Surg.**, **78**:844-848, 1991. 1991.

Zeillinger R,, Kury F, Czerwenka K, Kubista E, Slivtz G, Knogler W, Huber S, Zielinsk C, Reiner G, Sakesz R, Staffen A, Reiner A, Wrba F & Sporr J. Her-2 amplification, steroid receptor in primary breast cancer. **Oncogene**, **4 :109-114**, 1989.

## APPENDIX

### A.1. Model

Consider two exponential populations with parameters  $\alpha$  and  $\beta$  respectively. That is, the probability density functions relative to these populations are  $f(\alpha|x) = \alpha e^{-\alpha x} x > 0$  and  $f(\beta|y) = \beta e^{-\beta y} y > 0$ .

The expected values of these two densities are  $1/\alpha$  and  $1/\beta$ , respectively. From the two densities, samples of sizes 54 and 129 elements are observed. Since part of the sample was censored, the likelihood function obtained from the data is  $L(\alpha, \beta) = [\alpha^{m-1} e^{-\alpha S_x}] [\beta^{n-1} e^{-\beta S_y}]$ , where  $S_x$  and  $S_y$  are the total time on test (Kalbfleisch and Prentice, 1980) of the two samples and  $m-1$  and  $n-1$  are the numbers of units that were complete observed in the two samples. In our case we have  $m = 16$ ,  $n = 50$ ,  $S_x = 1512$  e  $S_y = 3481$ .

The maximum likelihood estimates of the means of the two populations are  $1512 / 15 = 100.80$  and  $3481 / 49 = 71.04$ , respectively.

To estimate  $\alpha$  and  $\beta$  it is enough to take the inverse of these two numbers.

### A.2. Analysis

Using the Bayesian Approach (Aitchison & Dunsmore, 1975), we consider non-informative flat prior densities for the parameters  $\alpha$  and  $\beta$ . Consequently, the posterior densities of  $\alpha$  and  $\beta$  are independent gamma densities with parameters  $(16; 1512)$  and  $(50; 3481)$ , respectively. This is equivalent to say that  $\alpha' = \alpha 1512 / 16$  and  $\beta' = \beta 3481 / 50$  are distributed as  $X^2$  distributions with 32 and 100 degrees of freedom, respectively.

Our interest is to compute the probability that the mean of the first population is greater than the mean of the second population; that is, we want to compute  $\Pr\{1/\alpha > 1/\beta\} = \Pr\{\alpha/\beta < 1\} = \Pr\{\alpha'/\beta' < 94.50/69.62\} = \Pr\{\alpha'/\beta' < 1.36\}$ .

Since  $\alpha'/\beta'$  is distributed as F-Snedecor with 32 and 100 degrees of freedom we finally have  $\Pr \{\alpha/\beta < 1\} = \Pr \{\alpha'/\beta' < 1.36\} = 0.875$ .

Hence, with probability 0.875 the mean of the first population is greater than the mean of the second. With this result, our decision is in favor of the hypothesis erased in this paper.

## References

- Aitchison, J. and Dunsmore, I.R. 1975. Statistical Prediction Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, 272 pages.
- Kalbfleish, J.D. and Prentice, R.L. 1980. The Statistical Analysis of Failure Time Data. John Wiley, N.York.

