

# A Ploidia de ADN é um Biomarcador Prognóstico Independente no Carcinoma Ductal Invasivo da Mama



## DNA Ploidy is an Independent Prognostic Biomarker in Breast Invasive Ductal Carcinoma

António E. PINTO, Teresa PEREIRA, Giovanni L. SILVA, Mónica C. FERREIRA, Saudade ANDRÉ  
*Acta Med Port* 2012 Nov-Dec;25(6):399-407

### RESUMO

**Objectivos:** Avaliar parâmetros prognósticos 'clássicos', bem como a ploidia de ADN e a fase S, em relação com o intervalo livre de doença e a sobrevivência global no carcinoma ductal invasivo da mama com follow-up de longo prazo.

**Materiais e Métodos:** O estudo envolveu 400 doentes com carcinoma ductal invasivo da mama e um *follow-up* mediano de 134 meses (50-240). O grau histológico, tamanho tumoral, envolvimento ganglionar axilar, estadiamento patológico e expressão dos receptores hormonais foram analisados como marcadores prognósticos convencionais. A ploidia e fase S foram determinadas prospectivamente por citometria de fluxo de ADN em tecido fresco/congelado. Foi usado um modelo de regressão de Cox para análise estatística das variáveis prognósticas.

**Resultados:** Ocorreram 106 mortes (26,5%) e 141 recorrências da doença (35,2%) durante o *follow-up*. Duzentos e trinta e cinco tumores (58,7%) foram considerados aneuploides. Fase S alta e aneuploidia associaram-se com tumores com maior grau de diferenciação, maior tamanho e receptores hormonais negativos. Em análise univariada, todos os parâmetros clínico-patológicos e citométricos (incluindo doentes com < 40 anos e um subgrupo apresentando tumores hipertetraploides/multiploides), com excepção de fase S e receptores de estrogénios para intervalo livre de doença, correlacionaram-se significativamente com o curso clínico. Em análise multivariada, o estágio avançado da doença, a aneuploidia e a ausência de receptores de progesterona apresentaram uma associação significativa com menor sobrevivência. No subgrupo de doentes com tumores de intermédia diferenciação (G2), a aneuploidia associou-se com pior prognóstico. No subgrupo sem envolvimento ganglionar, apenas os receptores de estrogénios mostraram correlação significativa com a evolução da doença. Nas doentes com envolvimento ganglionar, o maior tamanho tumoral e a aneuploidia (em relação com sobrevivência global) foram indicadores de pior prognóstico.

**Conclusão:** A par do estadiamento da doença e expressão dos receptores hormonais, a ploidia de ADN é um biomarcador prognóstico independente no carcinoma ductal invasivo da mama com *follow-up* de longo prazo.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate 'classic' prognostic parameters, as well as DNA ploidy and S-phase fraction, in relation to disease-free and overall survival in breast invasive ductal carcinoma with long-term follow-up.

**Material and Methods:** The study involved 400 patients with breast invasive ductal carcinoma and median follow-up of 134 months (50-240). Histological grading, tumour size, axillary nodal involvement, pathological staging and hormone-receptor status were assessed as established prognostic markers. Ploidy and S-phase fraction were determined prospectively by DNA flow cytometry using fresh/frozen tissue. A Cox regression model was used for statistical analysis of the prognostic variables.

**Results:** There were 106 deaths (26.5%) and 141 disease recurrences (35.2%) during follow-up. Two hundred thirty-five (58.7%) tumours were aneuploid. High S-phase fraction and aneuploidy were associated with tumours with higher grade of differentiation, greater size and negative hormonal receptors. In univariate analysis, all the clinicopathological and cytometric features (including patients < 40 years and a subgroup presenting hipertetraploid/multiploid tumours), but S-phase fraction and estrogen receptors for disease free survival, significantly correlated with clinical outcome. In multivariate analysis, advanced disease stage, DNA aneuploidy and lack of progesterone receptors retained statistically significant association with shorter survival. In the subgroup of patients with intermediate differentiation tumours (G2), aneuploidy associated with worse prognosis. In the subset of node-negative patients, only estrogen receptors showed significant correlation with disease evolution. In node-positive patients, greater size tumours and aneuploidy (in relation to overall survival) were indicators of worse prognosis.

**Conclusion:** Along with disease staging and hormone-receptor expression, DNA ploidy is an independent prognostic biomarker of long-term survival in breast invasive ductal carcinoma.

### INTRODUÇÃO

A extensão anatómica da doença, geralmente estimada de acordo com o sistema de classificação TNM (*tumour-node-metastasis*),<sup>1</sup> permanece o mais importante aspecto clínico-patológico na avaliação preditiva da sobrevivência no cancro da mama. O estadiamento é o primeiro passo para determinar a probabilidade de recorrência da doen-

ça e conduzir a terapêutica adjuvante. Contudo, é bem conhecido que doentes com tipos histológicos tumorais semelhantes, no mesmo estágio da doença, podem ter cursos clínicos diferentes. No sentido de melhorar a decisão clínica, vários factores prognósticos potencialmente úteis têm sido investigados, embora a grande maioria não tenha

A.E.P., T.P., M.C.F., S.A.: Serviço de Anatomia Patológica. Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E.. Lisboa, Portugal.

G.L.S.: Centro de Estatística e Aplicações da Universidade de Lisboa & Departamento de Matemática do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Recebido: 21 de Junho de 2012 - Aceite: 27 de Setembro de 2012 | Copyright © Ordem dos Médicos 2012

revelado valor suficiente para ser usado na monitorização prática do cancro da mama.

A citometria de fluxo de ADN e respectivos parâmetros biológicos, ploidia e fase S (FS), têm sido avaliados como indicadores do comportamento biológico tumoral, sobretudo devido às suas características intrínsecas relacionadas com o estado do ciclo celular das células tumorais. A aneuploidia identifica a instabilidade genética, e potencialmente, a maior capacidade metastática, e a FS corresponde *grasso modo* à actividade proliferativa celular.

Em estudos anteriores, o nosso grupo mostrou, em análise multivariada com *follow-up* de curto prazo,<sup>2</sup> e na doença localmente avançada,<sup>3</sup> a relevância prognóstica destes parâmetros citométricos no cancro da mama. Contudo, os achados relacionados com o significado clínico do padrão de ploidia e FS não são consensuais. Alguns estudos reportaram a utilidade dos parâmetros citométricos na previsão do curso clínico,<sup>4-9</sup> enquanto outros concluíram que eles não fornecem informação prognóstica adicional.<sup>10-12</sup> Para além da questão da heterogeneidade tumoral, as razões invocadas para os resultados contraditórios prendem-se sobretudo com a ausência de padronização laboratorial em termos de tipo de material e programas de controlo de qualidade, diferentes métodos para análise de dados e critérios distintos para interpretação dos histogramas.<sup>14,15</sup> Para minimizar a variabilidade intra- e inter-laboratorial, algumas directrizes de consenso têm sido propostas,<sup>16-18</sup> embora na prática nem sempre cumpridas, como se observa no grande número de estudos retrospectivos publicados em material de parafina, com a inerente limitação da qualidade dos resultados.

Os achados prometedores num estudo anterior,<sup>2</sup> levaram-nos a tentar caracterizar melhor o valor preditivo dos parâmetros citométricos, seguindo recomendações técnicas amplamente aceites que incluem, nomeadamente, um maior número de doentes e um *follow-up* mais longo, a utilização de amostras frescas/congeladas e análise estatística com múltiplas variáveis.

O objectivo do presente estudo foi avaliar prospectivamente o significado prognóstico da ploidia de ADN e FS, comparados com parâmetros clássicos bem estabelecidos, numa grande série de doentes com carcinoma ductal invasivo da mama e *follow-up* de longo prazo. A abordagem analítica incluiu quatro passos sucessivos: a) a análise de associação entre os dados citométricos e os factores prognósticos convencionais, b) o impacto prognóstico de cada variável em relação com o intervalo livre de doença e a sobrevivência global, c) o seu valor independente num modelo multivariado e d) a potencial aplicação desta informação em subgrupos de doentes com/sem envolvimento ganglionar axilar.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Dados clínico-patológicos

O estudo envolveu 400 doentes do sexo feminino com carcinoma ductal primário invasivo da mama, diagnosticadas e tratadas entre Agosto de 1990 e Dezembro de 1999

no Instituto Português de Oncologia de Lisboa, E.P.E. Os critérios primários de inclusão foram a disponibilidade de amostras não-fixadas frescas/congeladas para citometria de fluxo de ADN e dados completos de *follow-up*. O estudo seguiu as directrizes aprovadas pela Comissão local institucional de investigação. A grande maioria das doentes ( $n = 393$ ) não recebeu tratamento antes da cirurgia e nenhuma doente tinha doença metastática na altura do diagnóstico. Sete doentes, cujo grau de diferenciação tumoral não foi avaliado, foram submetidas a terapêutica neoadjuvante e incluídas na série devido a ineficácia do tratamento, documentada pela presença de extensa neoplasia no exame histopatológico pós-terapêutico. A idade média (e mediana) das doentes foi de 59 anos (intervalo, 23 - 88 anos). O tipo histológico e o estadiamento patológico foram avaliados de acordo com a classificação da OMS.<sup>1</sup> A diferenciação tumoral foi analisada segundo o sistema de graduação de Elston e Ellis.<sup>19</sup> A Tabela 1 mostra, em detalhe, as características clínico-patológicas da série investigada.

As doentes foram tratadas por mastectomia radical modificada ( $n = 281$ ) ou cirurgia conservadora da mama ( $n = 119$ ), incluindo dissecação dos gânglios linfáticos axilares, a que se seguiu radioterapia local, quando indicada. Pelo menos, dez gânglios foram identificados na amostra axilar de ressecção. Duzentos e noventa doentes receberam tratamento sistémico adjuvante, consistindo em terapia hormonal ( $n = 123$ ), quimioterapia ( $n = 113$ ), ou ambas ( $n = 54$ ).

A informação do *follow-up* foi obtida por revisão dos processos clínicos ou consulta do Registo Oncológico Regional do Sul (ROR- SUL) na nossa Instituição. O intervalo livre de doença (ILD) foi definido como o tempo decorrido desde o diagnóstico até à data da primeira recorrência local ou à distância, enquanto o *end point* da sobrevivência global (SG) foi a morte por doença. No final do *follow-up*, 250 doentes (62,5%) estavam vivos sem evidência de doença (*follow-up* mediano: 134 meses; intervalo, 50-240), 11 (2,8%) estavam vivos com doença, 106 (26,5%) tinham morrido da doença (*follow-up* mediano: 56 meses; intervalo, 1-193), e 33 (8,2%) tinham morrido de outras causas. Cento e quarenta e um doentes (35,2%) tiveram recorrência da doença (*follow-up* mediano: 43 meses; intervalo, 1 - 204). Os doentes vivos e os que morreram de outras causas foram tratados estatisticamente como observações censuradas.

### Expressão dos receptores hormonais

Os receptores de estrogénios (RE) e progesterona (RP) foram determinados por análise imunohistoquímica em material incluído em parafina (peroxidase-indirect-polymer with Ventana *ultraview* universal DAB 760-500) (8' / 37°C) (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA). Os anticorpos primários utilizados foram ER Ventana 790-4324 (SP1), pré-diluído (60' / 37°C), e PGR Ventana 760-4296 (1E2) (A&B). Os resultados obtidos responderam à percentagem de núcleos das células neoplásicas corados positivamente (critério de positividade > 10%).

**Citometria de fluxo de ADN**

A análise por citometria de fluxo foi executada de acordo com uma técnica descrita anteriormente.<sup>2,20</sup> Em resumo, uma amostra representativa do tumor, obtida no momento da cirurgia, foi imediatamente processada ou congelada a -80°C para posterior análise. Foi então desagregada mecanicamente usando lâminas de bisturi em tampão fosfato salino (PBS), e a suspensão celular obtida foi corada com azul de toluidina e contada numa câmara de Bürker. Para coloração do ADN, os núcleos foram incubados com iodeto de propídio (Sigma, St Louis, MO, USA) 50 µg/ml em tampão Tris-MgCl<sub>2</sub> durante 1 hora no escuro a 4°C, e tratados com Ribonuclease (Sigma) 1mg/ml em PBS, para digestão

do ARN de dupla cadeia, e o detergente não-iónico Nondet P40 (Sigma), para lise da membrana celular. Antes da aquisição, as amostras foram filtradas em rede de malha de 55 µm. Os núcleos corados foram analisados num citómetro de fluxo Epics Profile II (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), alinhado diariamente com fluoressferas calibradas (DNA-Check, Coulter). Geralmente, foram adquiridos 20.000 núcleos a uma velocidade de ± 200 por segundo, gravados num histograma de fluorescência de 256 canais.

A análise do ciclo celular dos histogramas de ADN foi executada usando o programa de software Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Para melhor padronização, todos os histogramas foram adaptados num

**Tabela 1** - Associações entre as características clínicas e patológicas e os parâmetros citométricos no carcinoma ductal invasivo da mama.

Variáveis	Ploidia de ADN (%)			Fase S (%)				
	n	Dipl	Aneupl	Valor P	n	Baixa	Alta	Valor P
Idade (anos)				0,928				0,939
< 40	25	40,0	60,0		20	45,0	55,0	
40-70	289	40,8	59,2		215	47,4	52,6	
≥ 70	86	43,0	57,0		65	49,2	50,8	
“Status” menopáusico				0,191				0,322
Pré-menopáusico	97	35,1	64,9		76	42,1	57,9	
Pós-menopáusico	303	43,2	56,8		224	49,1	50,9	
Grau de diferenciação				< 0,001				< 0,001
G1	97	60,8	39,2		79	68,4	31,6	
G2	195	43,6	56,4		143	51,7	48,3	
G3	101	17,8	82,2		73	16,4	83,6	
Tamanho tumoral				0,013				< 0,001
pT1	169	47,3	52,7		118	61,9	38,1	
pT2	219	38,4	61,6		174	39,7	60,3	
pT3	12	8,3	91,7		8	12,5	87,5	
“Status” ganglionar				0,408				0,584
Negativo	220	44,1	55,9		169	50,3	49,7	
Positivo ≤ 3	140	38,6	61,4		99	44,4	55,6	
Positivo > 3	40	35,0	65,0		32	43,7	56,3	
Estádio da doença				0,085				0,005
I	117	48,7	51,3		86	61,6	38,4	
IIA	147	42,9	57,1		109	47,7	52,3	
IIB	92		66,3		72	33,3	66,7	
IIIA	44	31,8	68,2		33	42,4	57,6	
RE				0,001				< 0,001
Positivo	290	46,2	53,8		220	53,6	46,4	
Negativo	108	27,8	72,2		78	30,8	69,2	
RP				0,040				0,031
Positivo	207	45,9	54,1		157	54,8	45,2	
Negativo	169	34,9	65,1		124	41,1	58,9	

n - número de casos; Dipl - Diploide; Aneupl - Aneuploide; RE - Receptores de estrogénios; RP - Receptores de progesterona

**Tabela 2** - Análise de regressão de Cox univariada dos aspectos clínicos e patológicos e parâmetros citométricos em relação com o curso clínico da doença.

Variáveis	Sobrevivência global			Intervalo livre de doença		
	RR	IC 95%	Valor P	RR	IC 95%	Valor P
<b>Idade (anos)</b>						
< 40 *	1	-	-	1	-	-
40-70	0,44	0,24-0,82	0,009	0,59	0,33-1,09	0,092
≥ 70	0,48	0,23-0,99	0,046	0,47	0,23-0,95	0,035
<b>Grau de diferenciação</b>						
G1 *	1	-	-	1	-	-
G2	1,38	0,81-2,35	0,231	1,28	0,82-1,99	0,269
G3	2,19	1,26-3,81	0,005	1,88	1,17-3,01	0,008
<b>Tamanho tumoral</b>						
pT1 *	1	-	-	1	-	-
pT2	1,44	0,96-2,18	0,081	1,27	0,90-1,81	0,171
pT3	4,98	2,39-10,4	< 0,001	3,59	1,77-7,28	< 0,001
<b>“Status” ganglionar</b>						
Negativo *	1	-	-	1	-	-
Positivo ≤ 3	2,19	1,42-3,36	< 0,001	1,80	1,25-2,57	0,001
Positivo > 3	4,27	2,52-7,23	< 0,001	2,74	1,68-4,46	< 0,001
<b>Estádio da doença</b>						
I *	1	-	-	1	-	-
IIA	1,02	0,58-1,80	0,946	0,94	0,59-1,48	0,789
IIB	2,28	1,31-3,95	0,003	1,86	1,17-2,93	0,008
IIIA	4,63	2,61-8,24	< 0,001	2,92	1,75-4,87	< 0,001
<b>Ploidia de ADN</b>						
Diploide *	1	-	-	1	-	-
Aneuploide	2,05	1,33-3,14	0,001	1,76	1,23-2,51	0,002
<b>Subgrupos de ploidia</b>						
Diploide *	1	-	-	1	-	-
Hiperdiploide + Tetraploide	1,88	1,21-2,94	0,005	1,64	1,13-2,39	0,009
Hipertetraploide + Multipl	2,75	1,41-4,79	< 0,001	2,22	1,23-3,64	0,003
<b>Fase S</b>						
Baixa *	1	-	-	1	-	-
Alta	1,68	1,05-2,70	0,031	1,30	0,87-1,93	0,193
<b>RE</b>						
Positivo *	1	-	-	1	-	-
Negativo	1,61	1,08-2,39	0,019	1,28	0,89-1,83	0,175
<b>RP</b>						
Positivo *	1	-	-	1	-	-
Negativo	1,76	1,18-2,62	0,005	1,53	1,09-2,15	0,014

\* Categoria de referência; RR - Risco relativo; IC - Intervalo de confiança; Multipl - Multiplóide; RE - Receptores de estrogénios; RP - Receptores de progesterona

**Tabela 3** - Análise multivariada de regressão de Cox em doentes com carcinoma ductal invasivo da mama.

Variáveis	Sobrevivência global			Intervalo livre de doença		
	RR	IC 95%	Valor P	RR	IC 95%	Valor P
<b>Estádio da doença</b>						
I/IIA *	1	-	-	1	-	-
IIB	2,11	1,33-3,34	0,002	1,86	1,25-2,76	0,002
IIIA	4,44	2,69-7,31	< 0,001	3,01	1,87-4,81	< 0,001
<b>Ploidia de ADN</b>						
Diploide *	1	-	-	1	-	-
Aneuploide	1,88	1,21-2,95	0,005	1,60	1,10-2,32	0,013
<b>RP</b>						
Positivo *	1	-	-	1	-	-
Negativo	1,49	1,00-2,23	0,050	1,35	0,95-1,90	0,091

\* Categoria de referência; RR - Risco relativo; IC - Intervalo de confiança; RP - Receptores de progesterona

**Tabela 4** - Análise multifactorial de acordo com o envolvimento ganglionar axilar em doentes com carcinoma ductal invasivo da mama.

Variáveis	Envolvimento ganglionar positivo						Envolvimento ganglionar negativo					
	SG			ILD			SG			ILD		
	RR	IC 95%	Valor P	RR	IC 95%	Valor P	RR	IC 95%	Valor P	RR	IC 95%	Valor P
<b>Tamanho tumoral</b>												
pT1 *	1	-	-	1	-	-						
pT2	1,48	0,82-2,65	0,189	1,53	0,85-2,74	0,152						
pT3	5,99	2,39-14,9	< 0,001	6,01	2,43-14,9	< 0,001						
<b>Ploidia de ADN</b>												
Diploide *	1	-	-									
Aneuploide	1,95	1,19-3,51	0,016									
<b>RE</b>												
Positivo *							1	-	-	1	-	-
Negativo							2,26	1,19-4,27	0,012	2,27	1,20-4,31	0,011

\* Categoria de referência; SG - Sobrevivência global; ILD - Intervalo livre de doença; RR - Risco relativo; IC - Intervalo de confiança; RE - Receptores de estrogénios

modelo que aplica o ajustamento de ordem zero da fase S e correcções para núcleos fragmentados, resíduos e agregados. Os histogramas com coeficiente de variação superior a 6% foram excluídos de análise posterior. As células diploides,

e.g., fibroblastos, linfócitos, células epiteliais normais, misturadas na amostra tumoral foram usadas como padrão de referência interna. Os carcinomas da mama foram definidos em relação com o padrão de ploidia em diploides vs.

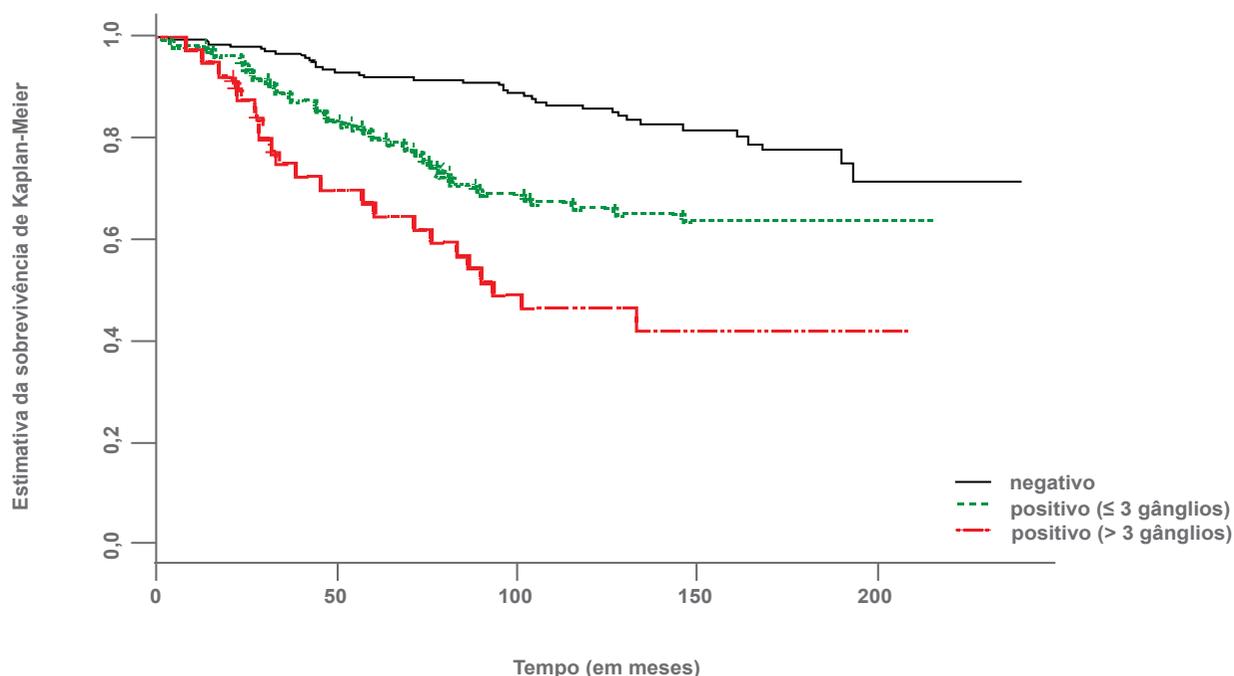


Fig. 1 – Probabilidade de sobrevivência global em doentes com carcinoma ductal invasivo da mama de acordo com o envolvimento ganglionar axilar ( $p < 0,001$ ).

aneuploides, sendo subclassificados em várias categorias dependendo do índice de ADN (DI), i.e., a razão entre o número de canais do pico  $G_0/G_1$  tumoral e o do pico de referência diploide. Os histogramas que incluem um único pico  $G_0/G_1$  foram definidos como diploides ( $DI = 0,95-1,05$ ). Os tumores com picos adicionais foram classificados como aneuploides. Para definição de tetraploidia, analisaram-se 100 tumores consecutivos da mama diploides, cuja média  $\pm$  desvio-padrão do pico  $G_2M$  foi  $1,98 \pm 0,06$ ; logo, os tumores com DI entre 1,92 e 2,04 foram considerados tetraploides. Os tumores hiperdiploides compreendem aqueles situados entre os diploides e os tetraploides ( $1,05 < DI < 1,92$ ), enquanto os tumores hipertetraploides exibiram  $DI > 2,04$ . Os tumores multiploides apresentaram, pelo menos, dois clones aneuploides.

A fase S (FS) foi determinada no histograma de ADN de acordo com um modelo polinomial,<sup>21</sup> como percentagem de células na fase S do ciclo celular. Dos 400 tumores primários, 100 (25%) não puderam ser avaliados para FS, por razões técnicas, nomeadamente, fluorescências inespecíficas e resíduos celulares, sobreposição de populações celulares ou presença de tumores hipertetraploides e multiploides. O valor *cut-off* seleccionado para FS (6,1%) num estudo anterior,<sup>2</sup> e que tem sido utilizado no nosso laboratório para discriminar os tumores com baixa ( $\leq 6,1\%$ ) e alta ( $> 6,1\%$ ) proliferação celular, foi também utilizado no presente estudo.

#### Análise estatística

As associações entre as características clínico-patológicas e os parâmetros citométricos foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado de Pearson e o teste exacto de Fi-

sher, quando apropriado. A probabilidade cumulativa de sobrevivência foi estimada por meio do método de Kaplan-Meier, e as curvas de sobrevivência comparadas usando o teste log-rank. Para avaliar o valor independente e a relativa força preditiva dos factores prognósticos, foi usado um modelo de regressão proporcional de Cox. Na análise multivariada, os estádios I e IIA do estadiamento da doença foram reunidos em conjunto como categoria de referência. O significado estatístico foi avaliado usando o teste de Wald, e os resultados incluíram o risco relativo e o intervalo de confiança de 95% para cada categoria. Um modelo multifactorial complementar foi também aplicado nas doentes com cancro da mama com e sem envolvimento ganglionar axilar, de maneira a determinar as variáveis prognósticas mais relevantes em cada subgrupo. Valores  $P < 5\%$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### RESULTADOS

Da série total analisada por citometria de fluxo, 165 tumores (41,2%) apresentaram um padrão diploide e 235 (58,8%) foram considerados aneuploides. Neste grupo, 172 tumores (43%) foram hiperdiploides, 24 (6%) foram tetraploides, 20 (5%) foram hipertetraploides e 19 (4,8%) foram multiploides.

A FS mediana foi 6,9% (intervalo, 1%-27,8%), sendo significativamente mais alta ( $p < 0,001$ ) nos tumores aneuploides (mediana: 10,8%; intervalo, 3,7% - 27,8%) do que nos tumores diploides (mediana: 4%; intervalo, 1%-12%). Cento e trinta e um de 143 tumores com FS baixa (91,6%) foram diploides, enquanto 131 de 157 tumores com FS alta (83,4%) foram aneuploides.

A Tabela 1 mostra as tabelas de contingência e os res-

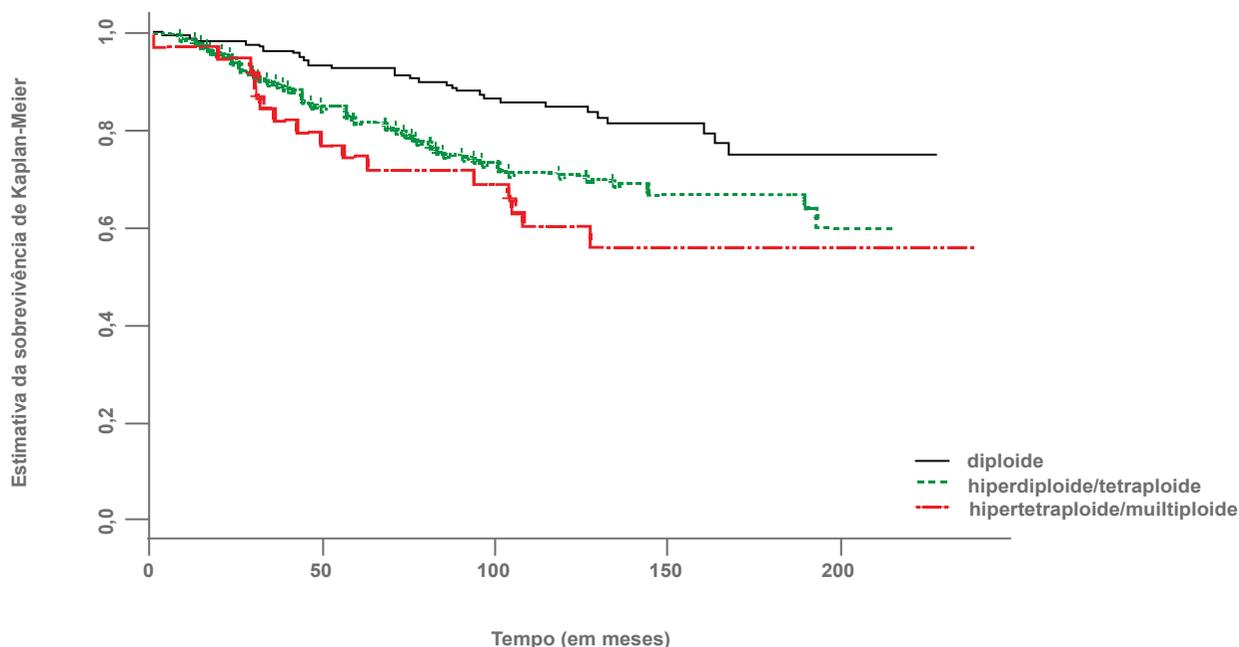


Fig. 2 – Probabilidade de sobrevivência global em doentes com carcinoma ductal invasivo da mama de acordo com a ploidia de ADN ( $p = 0,001$ ).

pectivos testes de independência que avaliaram as associações entre as características clínicas e patológicas e os parâmetros citométricos na série investigada. A aneuploidia e alta proliferação celular foram significativamente associadas com tumores de maior tamanho, maior grau de diferenciação e sem expressão dos receptores hormonais. A FS alta correlacionou-se também com o estágio avançado da doença.

A análise das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier mostrou que todas as co-variáveis investigadas, com exceção da idade, FS e receptores de estrogénios em relação com ILD, foram estatisticamente significativas. Embora exibindo pior prognóstico, a FS alta ( $p = 0,193$ ) não atingiu significado estatístico. Vários subgrupos específicos de doentes, nomeadamente com < 40 anos para SG, apresentando > 3 gânglios linfáticos axilares (Fig. 1) e com tumores hipertetraploides/multiploides (Fig. 2), apresentaram um curso clínico desfavorável. A Tabela 2 ilustra, na análise de regressão de Cox simples, as associações entre os factores prognósticos e a sobrevivência dos doentes com carcinoma ductal invasivo da mama. Em geral, doentes mais novos, apresentando envolvimento ganglionar axilar e estadiamento avançado, com tumores maiores, pouco diferenciados, aneuploides, com alta proliferação e sem receptores hormonais, tiveram maior risco de pior curso clínico. Na análise de regressão de Cox múltipla (Tabela 3), o estágio avançado da doença, a aneuploidia e a ausência de receptores de progesterona mantiveram valor prognóstico independente.

No subgrupo de doentes com tumores de diferenciação intermédia (G2;  $n = 195$ ), a aneuploidia nuclear ( $n = 111$ ), quando comparada com a diploidia ( $n = 84$ ), foi indicador

de pior prognóstico tanto em relação com ILD (47 / 111, 42,4% de recorrências vs. 20 / 84, 23,8%;  $p = 0,011$ ) como com SG (35 / 111, 31,5% de mortes por doença vs. 15 / 84, 17,9%;  $p = 0,045$ ).

Devido ao evidente interesse clínico, foi executada também uma análise prognóstica multifactorial complementar em relação com o *status* dos gânglios linfáticos axilares (Tabela 4). Enquanto, nas doentes com envolvimento ganglionar, os tumores pT3 e aneuploides (em relação com SG) mostraram valor preditivo, no subgrupo das doentes sem envolvimento ganglionar apenas a ausência de receptores de estrogénios se relacionou significativamente com prognóstico desfavorável.

## DISCUSSÃO

No presente estudo prospectivo de uma grande série de carcinoma ductal invasivo da mama, com longo *follow-up*, verificámos que a ploidia de ADN é um factor prognóstico independente em relação com a sobrevivência das doentes (Tabela 3), confirmando os nossos achados numa análise de curto prazo.<sup>2</sup> Contudo, ao contrário do estudo anterior, não foi provada a putativa influência preditiva da fase S (FS) no modelo múltiplo, mesmo usando um *cut-off* similar para definir a actividade proliferativa tumoral. A muito frequente e significativa inter-relação entre ploidia, FS e grau de diferenciação tumoral no cancro da mama tem conduzido a variabilidade entre estudos do valor prognóstico de cada variável, dependendo sobretudo do método estatístico utilizado. A forte associação entre a FS e as outras variáveis pode explicar a ausência de impacto prognóstico em análise multivariada. Para além disso, a FS, apesar da sua documentada relevância,<sup>2,4-9</sup> apresenta limitações técnicas

intrínsecas: não pode ser determinada num certo número de casos (25% no nosso estudo) e a reprodutibilidade inter-laboratorial é relativamente escassa. A incapacidade para determinar a FS, principalmente nos tumores aneuploides, seria deste modo outra razão a acrescentar.

Uma perspectiva semelhante pode explicar a exclusão da graduação histológica tumoral do modelo múltiplo de Cox no nosso estudo. Apesar de a sua utilização prognóstica estar bem estabelecida, a natureza subjectiva da graduação em conjunto com a heterogeneidade tumoral podem levar a variabilidade entre observadores. Neste contexto, a ploidia de ADN, como variável categórica objectiva, pode ter um importante papel adicional. Como os tumores bem diferenciados (G1) e os pouco diferenciados (G3) são na sua grande maioria diploides e aneuploides, respectivamente, a vantagem de analisar a ploidia de ADN, confirmada neste estudo, seria o facto de permitir a identificação de diferentes subgrupos de risco entre as doentes com tumores de diferenciação intermédia (G2).<sup>2</sup> No palco clínico, esta avaliação podia ajudar em algumas circunstâncias na difícil decisão de submeter a doente a terapia adjuvante. Por outro lado, os nossos dados salientam a importância clínica da detecção, por citometria de fluxo, de subcategorias aneuploides de tumores. Num estudo anterior,<sup>24</sup> verificámos que a hipertetraploidia se relaciona com aspectos clínico-patológicos geralmente associados com um curso clínico desfavorável. Outros autores<sup>25</sup> referiram também que a subdivisão dos tumores aneuploides de acordo com o índice de ADN (DI) melhora a discriminação de diferentes grupos de risco. No presente estudo, verificámos que o subgrupo de doentes com tumores hipertetraploides/multiploides teve o pior prognóstico (Fig. 2). Num estudo anterior que focou especificamente uma série de doentes com este tipo de tumores aneuploides, o nosso grupo,<sup>26</sup> utilizando hibridação genómica comparativa (CGH), encontrou uma alta incidência de aberrações genéticas tumorais, relacionadas principalmente com ganhos cromossómicos. Estes achados poderiam reflectir mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença, relacionados com a selecção de clones neoplásicos mais agressivos que teriam capacidade de resistir à quimioterapia ou de metastizar.

O factor prognóstico mais significativo no nosso estudo foi, como era esperado, o estágio da doença (Tabela 3), que inclui por definição o *status* dos gânglios linfáticos axilares (classificação TNM) (Fig. 1). Para melhor compreendermos o relativo poder preditivo das variáveis prognósticas, executámos uma análise multifactorial complementar nos subgrupos de doentes sem e com envolvimento ganglionar (Tabela 4). Neste último subgrupo, que geralmente apresenta um maior risco de progressão da doença, os tumores de maior tamanho e aneuploides (em relação com SG) identificaram doentes com maior probabilidade de um pior curso clínico, e portanto, potenciais candidatos a receberem tratamento sistémico mais intensivo. Nas doentes sem envolvimento ganglionar, onde a identificação de subgrupos de alto risco continua difícil, verificámos que o *status* dos receptores de estrogénios (RE) pode actuar como

factor prognóstico, estando a ausência de actividade dos RE significativamente associada com prognóstico desfavorável.

A análise múltipla de regressão de Cox mostrou que o *status* dos receptores de progesterona (RP) é um factor prognóstico independente (Tabela 3). Recentemente, Liu et al,<sup>27</sup> numa série de 4.046 doentes com cancro da mama, também referiram RP como biomarcador significativo de menor sobrevivência, tanto na série total como entre os casos RE+ tratados com tamoxifeno. Para além do bem conhecido papel preditivo na selecção de doentes para tratamento endócrino, os nossos dados, de acordo com outros autores,<sup>28</sup> reforçam o valor prognóstico dos receptores hormonais no carcinoma ductal invasivo da mama.

Apesar de ser pouco frequente, o carcinoma da mama em doentes jovens tem sido relacionado com pior prognóstico em alguns estudos.<sup>29-31</sup> Corroborando este achado, verificámos em análise univariada de regressão de Cox (Tabela 2) que o subgrupo de doentes < 40 anos apresentou uma significativa menor sobrevivência global. Tem sido colocada a hipótese destes tumores serem biologicamente diferentes dos encontrados em mulheres mais velhas. Embora tendo sido verificada no corrente estudo uma correlação significativa com o envolvimento ganglionar axilar (dados não mostrados), não existiu associação entre a idade das doentes e os parâmetros citométricos, o que parece excluir a eventual influência destes biomarcadores no cancro precoce da mama.

## CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a relevância prognóstica da citometria de fluxo de ADN no carcinoma ductal invasivo da mama com *follow-up* de longo prazo. Em particular, a ploidia de ADN, como biomarcador prognóstico independente, parece ser capaz de identificar doentes com curso clínico desfavorável nos subgrupos com envolvimento ganglionar axilar ou que apresentam tumores moderadamente diferenciados (G2). Desta maneira, no quadro clínico, a análise de ploidia poderia ajudar adicionalmente na monitorização do carcinoma ductal invasivo da mama, sobretudo através duma melhor selecção das doentes para terapia adjuvante.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o excelente trabalho realizado na análise estatística pelos alunos de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, Márcia Santos, Mariana Branco e Ângelo Dias.

## CONFLITOS DE INTERESSE:

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse.

## FONTES DE FINANCIAMENTO:

Este trabalho foi em parte financiado pelo projecto "Pest-OE/MAT/UI0006/2011" da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

## REFERÊNCIAS

- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC Press; 2012.
- Pinto AE, André S, Soares J. Short term significance of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic markers in a series of 308 patients. *J Clin Pathol.* 1999;52:604-11.
- Pinto AE, André S, Mendonça E, Silva G, Soares J. Overall survival in advanced breast cancer: relevance of progesterone receptor expression and DNA ploidy in fine-needle aspirates of 392 patients. *Int J Biol Markers.* 2003;18:7-12.
- Stål O, Dofmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintenberg C, Rutqvist L-E, et al. S-phase fraction is a prognostic factor in Stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 1993;11:1717-22.
- Camplejohn RS, Ash CM, Gillett CE, Raikundalia B, Barnes DM, Gregory WM, et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer.* 1995;71:140-5.
- Michels JJ, Duigou F, Marnay J. Flow cytometry in primary breast carcinomas. Prognostic impact of proliferative activity. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;62:117-26.
- Michels JJ, Marnay J, Delozier T, Denoux Y, Chasle J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer.* 2004;100:455-64.
- Vielh P, Carton M, Padoy E, de Rycke Y, Kljanienco J, El-Naggar AK, et al. S-phase fraction as an independent prognostic factor of long-term overall survival in patients with early-stage or locally advanced invasive breast carcinoma. *Cancer.* 2005;105:476-82.
- Gazic B, Pizem J, Bracko M, Cufer T, Borstnar S, Pohar-Marinek Z, et al. S-phase fraction determined on fine needle aspirates is an independent prognostic factor in breast cancer – a multivariate study of 770 patients. *Cytopathology.* 2008;19:294-302.
- Stanton PD, Cooke TG, Oakes SJ, Winstanley J, Holt S, George WD, et al. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer.* 1992;66:925-9.
- Bergers E, Baak JPA, van Diest PJ, Willig AJP, Los J, Peterse JL, et al. Prognostic value of DNA ploidy using flow cytometry in 1301 breast cancer patients: results of the prospective Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Mod Pathol.* 1997;10:762-8.
- Prasad AR, Divine G, Zarbo RJ. Two-color, cytokeratin-labeled DNA flow cytometric analysis of 332 breast cancers. Lack of prognostic value with 12-year follow-up. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125:364-74.
- Bergers E, van Diest PJ, Baak JPA. Tumour heterogeneity of DNA cell cycle variables in breast cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol.* 1996;49:931-7.
- Baldetorp B, Stål O, Ahrens O, Cornelisse C, Corver W, Falkmer U, et al. Different calculation methods for flow cytometric S-phase fraction: prognostic implications in breast cancer? The Swedish Society of Cancer Study Group. *Cytometry.* 1998;33:385-95.
- Bergers E, Montironi R, van Diest PJ, Prete E, Baak JP. Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometric DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases. *Hum Pathol.* 1996;27:553-60.
- Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry.* 1993;14:482-5.
- Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardization of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Anal Cell Pathol.* 1998;17:103-10.
- Chassevent A, Jourdan ML, Ferrero-Pous M, Colonna M, Romain S, Spyrtos F, et al. Standardisation et mise en place d'une assurance qualité dans l'évaluation des paramètres de prolifération de 1003 cancers du sein T1T2, N0N1, M0: étude multicentrique II. ADN-ploidie et phase de synthèse d'ADN. *Bull Cancer.* 1999;86:685-91.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.
- Deitch AD, Law H, White RD. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* 1982;30:967-72.
- Dean PN, Jett JH. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol.* 1974;60:523-7.
- Komaki K, Sano N, Tanokoku A. Problems in histological grading of malignancy and its clinical significance in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer.* 2006;13:249-53.
- Pinto AE, André S, Pereira T, Silva G, Soares J. DNA flow cytometry but not telomerase activity as predictor of disease-free survival in pT1-2/N0/G2 breast cancer. *Pathobiology.* 2006;73:63-70.
- Pinto AE, André S, Nogueira M, Mendonça E, Soares J. Flow cytometric DNA hypertetraploidy is associated with unfavourable prognostic features in breast cancer. *J Clin Pathol.* 1997;50:591-5.
- Michels JJ, Duigou F, Marnay J, Denoux Y, Delozier T, Chasle J. Flow cytometry in primary breast carcinomas: prognostic impact of multiploidy and hypoploidy. *Cytometry Part B Clin Cytom.* 2003;55B:37-45.
- Pinto AE, Roque L, Rodrigues R, André S, Soares J. Frequent 7q gains in flow cytometric multiploid/hypertetraploid breast carcinomas: a study of chromosome imbalances by comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol.* 2006;59:367-72.
- Liu S, Chia SK, Mehl E, Leung S, Rajput A, Cheang MC, et al. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119:53-61.
- Brouckaert O, Pintens S, van Belle V, van Huffel S, Camerlynck E, Amant F, et al. Short-term outcome of primary operated early breast cancer by hormone and HER-2 receptors. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115:349-58.
- Liukkonen S, Leidenius M, Saarto T, Sjöström-Mattson J. Breast cancer in very young women. *Eur J Surg Oncol.* 2011;37:1030-7.
- Peng R, Wang S, Shi Y, Liu D, Teng X, Qin T, et al. Patients 35 years old or younger with operable breast cancer are more at risk for relapse and survival: a retrospective matched case-control study. *Breast.* 2011;20:568-73.
- Xiong Q, Valero V, Kau V, Kau SW, Taylor S, Smith TL, et al. Female patients with breast carcinoma age 30 years and younger have a poor prognosis. The M.D. Anderson Cancer Center Experience. *Cancer.* 2001;92:2523-8.