

# CITOMETRIA DE FLUXO DO ADN EM TUMORES SÓLIDOS\*

ANTÓNIO E. PINTO, ISABEL FONSECA, JORGE SOARES

Departamento de Patologia Morfológica e Centro de Investigação de Patobiologia Molecular. Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil. Lisboa

Serviço Universitário de Anatomia Patológica. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

(\*) Trabalho financiado em parte por uma bolsa concedida pelo Núcleo Regional do Sul da Liga Portuguesa Contra o Cancro, no âmbito do "Programa de Investigação em Oncologia 1998-2001".

## RESUMO/SUMMARY

Neste artigo de revisão, os autores descrevem os princípios básicos da citometria de fluxo e a sua aplicação em tumores sólidos na quantificação do ADN e na análise do ciclo celular. O tipo de amostra utilizada, as técnicas para o seu processamento e os métodos de análise e interpretação dos resultados são discutidos. A ploidia do ADN e a actividade proliferativa (fracção fase S) são os dois parâmetros biológicos geralmente determinados na análise de ADN por citometria de fluxo. O principal objectivo da maioria dos estudos nesta área é avaliar o valor prognóstico destes marcadores em adição à informação fornecida pelos factores clinicopatológicos usualmente associados com o prognóstico da doença. Numerosos estudos, que investigaram o significado preditivo da citometria de fluxo do ADN nos principais tipos de tumores sólidos, são revistos neste artigo. A conclusão geral é que, no mesmo estágio histopatológico da doença neoplásica, os tumores diplóides e/ou com baixa actividade proliferativa têm melhor prognóstico do que os tumores aneuplóides e/ou com alta proliferação celular, sugerindo um papel importante para a citometria de fluxo na análise do comportamento biológico tumoral e na avaliação do curso clínico da doença. Contudo, em alguns estudos esta correlação não foi demonstrada, o que pode questionar o significado prognóstico da análise citométrica do ADN. As razões potenciais para os resultados contraditórios, nomeadamente os problemas metodológicos relacionados com as técnicas de preparação de amostras e de interpretação dos resultados, são discutidas.

Palavras-chave: Ploidia do ADN, Fracção fase S, Citometria de fluxo, Tumores sólidos, Prognóstico.

## DNA FLOW CYTOMETRY IN SOLID TUMORS

This brief overview outlines the fundamental principles of flow cytometry with emphasis on DNA measurements and cell cycle analysis in human solid tumors. Type of material used, sampling processing procedures and methods of analysis of data are discussed. DNA ploidy and proliferative activity (S-phase fraction) are the two biological parameters commonly measured by DNA flow cytometric analysis. The prime purpose of most studies in this area is the investigation of the prognostic value of DNA flow cytometry in addition to the information provided by conventional clinicopathological factors known to affect disease prognosis. Numerous studies concerning the predictive significance of DNA flow cytometry in some types of solid tumors are reviewed in this article. The general statement, for tumors in the same histopathological stage of the disease, is that diploid and/or low proliferative tumors have a more favourable prognosis than aneuploid and/or high proliferative tumors, suggesting an important role of DNA flow cytometry in the assessment of tumor behaviour and in the outcome evaluation of the disease. However, in some studies this association could not be substantiated, and the prognostic relevance of DNA analysis has been questioned. The potential reasons for conflicting results, namely the methodological pitfalls related to the cell preparation techniques and the histogram interpretation are discussed.

Key words: DNA ploidy, S-phase fraction, Flow cytometry, Solid tumors, Prognosis

## INTRODUÇÃO

O conceito que define o cancro como uma doença genética das células somáticas<sup>1</sup> tem adquirido cada vez maior aceitação, após numerosos estudos de biologia molecular e de citogenética terem mostrado que a tumorigénese é o resultado de acidentes genéticos múltiplos, progressivos, culminando no crescimento autónomo das células neoplásicas, e na sua capacidade de invasão local e de colonização a distância<sup>2-4</sup>.

As anomalias genéticas cromossómicas que desempenham um papel-chave no desenvolvimento e na progressão dos tumores são acompanhadas geralmente por alterações do conteúdo global de ADN nuclear. A citometria de fluxo é actualmente a tecnologia mais utilizada na análise da ploidia do ADN e na determinação da actividade proliferativa (fracção fase S) tumoral. O principal objectivo dos estudos citométricos do ADN na doença neoplásica tem sido a avaliação do valor predictivo independente destes marcadores biológicos, em comparação com a informação prognóstica fornecida pelos parâmetros clínicos e histopatológicos convencionais<sup>5-7</sup>. Na maioria dos tumores sólidos, a extensão anatómica da disseminação tumoral, definida pelo sistema de classificação histopatológica TNM, é o factor predictivo mais consistente do curso clínico da doença e o guia mais importante do tratamento<sup>8</sup>. Contudo, sabe-se que o prognóstico do doente oncológico pode ser influenciado por uma grande variedade de factores para além dos que integram o sistema TNM<sup>9</sup>, nomeadamente factores relacionados com o doente (idade, sexo, estado geral), com o tumor (tipo histológico, grau de diferenciação, invasão vascular e perineural, ploidia, proliferação, etc.), e com a própria terapêutica (técnica cirúrgica, dose e intensidade da radiação, quimioterapia). Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de investigar a influência potencial de novos marcadores prognósticos, para a previsão do curso clínico da doença e eventualmente para a escolha do tratamento, utilizando métodos biométricos multivariados<sup>10</sup>. Neste artigo, fazemos uma breve revisão do *estado da arte*, analisamos os resultados publicados e referimos a nossa própria experiência sobre o valor prognóstico da análise de ADN por citometria de fluxo em alguns dos principais tipos de tumores sólidos, com o objectivo de situar o impacto desta tecnologia na avaliação do risco de recorrência tumoral e sobrevida do doente, e na previsão, em certos casos, da resposta aos tratamentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) O tipo de amostra

A análise de ADN por citometria de fluxo pode ser executada em fragmentos de tecido fresco ou congelado, em

amostras obtidas por aspiração citológica com agulha fina, e em material fixado em formol e incluído em blocos de parafina. A condição pré-analítica necessária é a amostra encontrar-se sob a forma de suspensão celular monodispersa antes da sua introdução no citómetro para a respectiva leitura<sup>11</sup>. Por este motivo, são utilizadas técnicas de desagregação mecânica e/ou enzimática<sup>12,13</sup>, no processamento de tumores sólidos, para obtenção de suspensões celulares. A possibilidade recente de execução da análise citométrica em material de parafina<sup>14</sup>, veio permitir a realização de estudos retrospectivos de correlação dos parâmetros citométricos com o curso clínico conhecido da doença, ultrapassando as limitações major dos estudos prospectivos, nomeadamente o número de doentes insuficiente e o curto período de *follow-up*. Contudo, esta metodologia torna também mais difícil a interpretação dos resultados, devido a presença frequente de um maior número de resíduos celulares e a qualidade global mais fraca dos histogramas. É, portanto, recomendado que a análise de ADN por citometria de fluxo seja executada, preferencialmente, em amostras frescas ou congeladas.

### 2) O citómetro de fluxo

O fundamento básico da citometria de fluxo é a medição de intensidade de fluorescências<sup>15-17</sup>. Qualquer molécula corada especificamente por uma substância fluorescente pode potencialmente ser analisada num citómetro de fluxo; como foi referido, o pré-requisito necessário é a obtenção de uma suspensão celular ou nuclear monodispersa. No aparelho, esta suspensão é dirigida para uma câmara de fluxo onde as partículas, uma-a-uma, são interceptadas por um feixe de luz monocromática, geralmente de tipo laser. A intensidade da luz dispersa para diante e perpendicularmente correlaciona-se com o tamanho e a complexidade interna das células, respectivamente. A emissão de fluorescência é medida simultaneamente através de um complexo sistema óptico de lentes, filtros e espelhos dicróicos. Os sinais luminosos são convertidos por fotomultiplicadores em impulsos eléctricos, que por sua vez são amplificados e digitalizados, sendo os resultados finais obtidos sob a forma de histogramas. Para otimizar o alinhamento óptico do citómetro, são utilizados padrões de calibração, geralmente microesferas fluorescentes com tamanho igual<sup>15-17</sup>. Com esta tecnologia podem ser analisados, em poucos minutos, dezenas de milhares de eventos, com a vantagem inerente de ser maior a fiabilidade e o rigor na avaliação estatística dos resultados. Depois de adquiridos e armazenados, os histogramas ADN são analisados por programas de computador especiais (algoritmos) que possibilitam a avaliação discriminada das diferentes fases do ciclo celular.

### 3) A interpretação do histograma

O histograma ADN reflecte a distribuição de frequência do conteúdo de ADN em relação com os núcleos analisados. Distinguem-se dois tipos: diplóide e aneuplóide. Num histograma diplóide *normal* (Figura 1), o primeiro pico

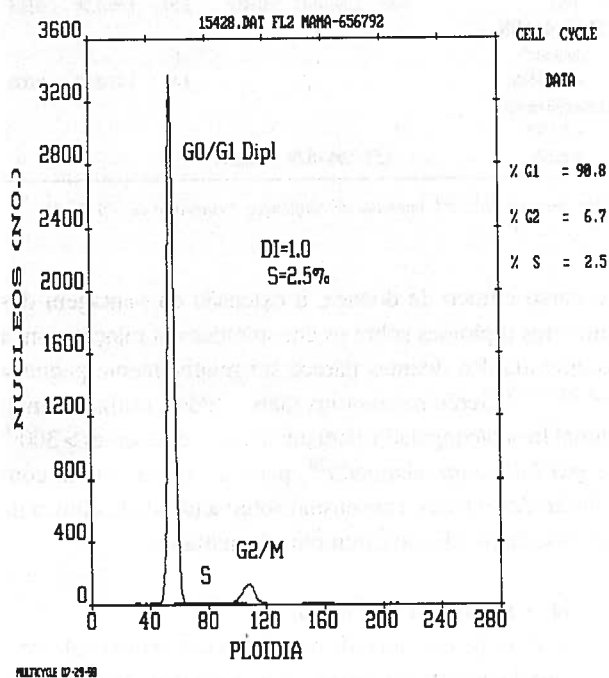


Fig. 1. Histograma representativo de um carcinoma da mama diplóide com baixa actividade proliferativa (fracção fase S = 2.5%)

à esquerda corresponde a células quiescentes (G0) e/ou na fase G1 do ciclo celular, representando o valor cromossômico diplóide (2C) das células somáticas. A localização deste pico é facilitada pela utilização de controlos internos, como os glóbulos vermelhos de galinha ou de truta que têm uma quantidade constante de ADN, cerca de 35% e 80% do conteúdo de ADN diplóide humano, respectivamente<sup>18</sup>. A dispersão dos eventos em volta do valor médio de G0/G1, definida como coeficiente de variação (CV), é um excelente indicador do estado de preservação e da qualidade da preparação da amostra. O segundo pico, com o dobro da quantidade de ADN do primeiro (4C), corresponde às células que se encontram nas fases G2 e/ou M do ciclo celular. Entre os dois picos, encontram-se as células em fase S (fase de síntese), distribuídas de acordo com o respectivo estágio de replicação do ADN (2C-4C). Nos histogramas aneuplóides (Figura 2), aparecem populações celulares com picos G0/G1 com uma quantidade de ADN diferente do *normal*. Como padrão interno diplóide, utilizam-se geralmente as células *não-malignas*, linfocitárias ou fibroblás-

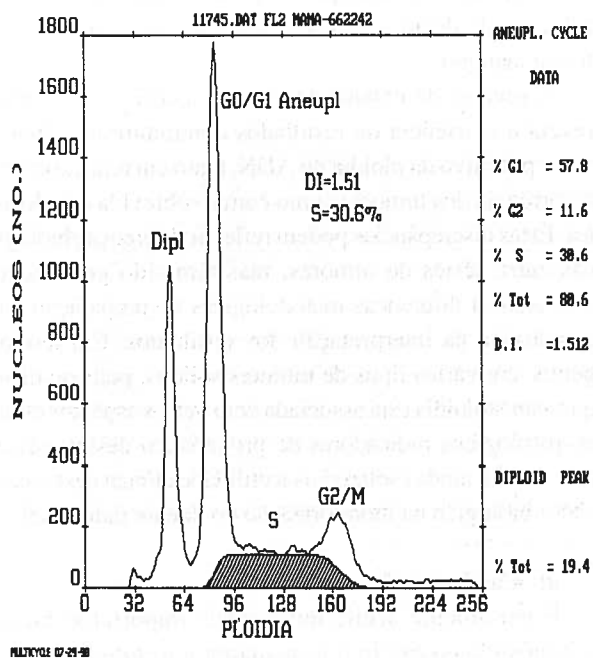


Fig. 2. Histograma representativo de um carcinoma da mama aneuplóide com índice ADN (DI) 1.51 e alta actividade proliferativa (fracção fase S = 30.6%). O primeiro pico à esquerda, utilizado como padrão interno diplóide, representa células linfocitárias e fibroblásticas misturadas na amostra tumoral.

ticas, misturadas na amostra tumoral analisada. A ploidia do ADN é habitualmente expressa como *índice ADN* (DI), isto é, a razão entre a fluorescência média do pico G0/G1 tumoral e a do pico G0/G1 da população de referência diplóide. Por exemplo, se a posição do pico anormal, expressa em número de canais, for 75 na escala de intensidade de fluorescência, e a posição do pico diplóide 50, o DI da população tumoral aneuplóide será  $75:50 = 1.5$ . O DI de uma população diplóide será, pela mesma ordem de ideias,  $50:50 = 1.0$ <sup>6,19</sup>.

## RESULTADOS

### 1) Ploidia do ADN

A aneuploidia é um fenómeno biológico que ocorre frequentemente nos tumores sólidos, não sendo porém um marcador universal de malignidade: Por exemplo, na nossa casuística, que inclui uma série grande de tumores da glândula tiroideia (> 400 casos), cerca de 35% dos adenomas foliculares são aneuplóides, enquanto quase todos os carcinomas papilares apresentam um padrão diplóide. Populações aneuplóides têm sido também referidas em lesões ditas pré-malignas, como displasias ou carcinomas *in situ* do colo do útero<sup>20</sup>, da pele<sup>21</sup>, do esófago<sup>22</sup> ou do cólon<sup>23</sup>. Apesar do significado prognóstico da ploidia não estar ainda esclarecido nestes casos, a questão prática que se

o intervalo livre de doença. Zarbo et al<sup>52</sup>, num estudo prospectivo de 309 doentes com um período de *follow-up* entre 4 e 6 anos, utilizando marcação dupla de fluorescência na análise citométrica, concluíram que a citometria de fluxo do ADN não é preditiva da sobrevida em qualquer estágio da doença.

Neste momento, apesar da investigação de novos factores prognósticos, o estadiamento clínico e histopatológico continua a ser o parâmetro preditivo major do comportamento clínico do carcinoma colo-rectal.

### c) Carcinoma da bexiga

Alguns estudos<sup>53-55</sup> demonstraram a existência de correlação positiva entre o padrão de ploidia, a classificação histológica e o comportamento tumoral. Os tumores papilares de grau I são geralmente diplóides, enquanto os tumores de grau III e os carcinomas invasivos são maioritariamente aneuplóides. Gustafson et al<sup>56</sup> estudaram 229 doentes com tumores Ta ou T1, e concluíram que a ploidia define diferentes grupos de risco em relação com a progressão tumoral. Os tumores diplóides, apesar de terem capacidade de recorrência, não progridem habitualmente para cancro invasivo ou metastático, ao contrário dos tumores aneuplóides que têm uma forte tendência para progressão local. A ploidia pode fornecer adicionalmente informação prognóstica sobre o comportamento, que é difícil de prever, dos tumores com grau II ou intermédio<sup>53-55</sup>. Observação curiosa foi referida por Jacobsen et al<sup>57</sup> num estudo de 43 doentes com cancro avançado da bexiga (T2 e T3): os tumores aneuplóides, apesar de relacionados com pior prognóstico, foram aqueles que responderam melhor à radioterapia pré-cirúrgica.

### d) Carcinoma da próstata

A ploidia do ADN correlaciona-se com o estadiamento clínico, sendo diplóide a maioria dos tumores no estágio A, enquanto que os tumores nos estádios C e D são, na sua maioria, de tipo aneuplóide. Além disso, tem sido observada uma tendência, embora não-significativa, em favor da associação de aneuploidia com a menor diferenciação histológica tumoral<sup>58-60</sup>. O prognóstico global dos carcinomas da próstata diplóides parece ser também significativamente mais favorável que o dos tumores aneuplóides<sup>61,62</sup>. Fordham et al<sup>59</sup>, numa série de 72 doentes tratados com prostatectomia radical, mostraram que a sobrevida mediana foi de três anos no grupo de doentes portadores de tumores aneuplóides e de nove anos para os que apresentaram tumores diplóides. De forma similar, num estudo retrospectivo, com um *follow-up* mediano de 7,5

anos<sup>58</sup>, Winkler et al observaram que 85% dos carcinomas da próstata diplóides tiveram um comportamento clínico favorável, enquanto 75% dos tumores aneuplóides progrediram localmente ou metastizaram.

### e) Carcinoma do ovário

A ploidia do ADN tem sido repetidamente referida como um determinante major do prognóstico deste tipo de neoplasias derivadas do epitélio celómico, tendo as doentes com carcinomas diplóides ou peridiplóides taxas de sobrevida significativamente mais favoráveis do que aquelas em que os tumores são aneuplóides<sup>64-68</sup>. Num estudo retrospectivo de 157 doentes<sup>64</sup>, Kallioniemi et al. mostraram que, após correcção dos efeitos prognósticos relacionados com o estadiamento tumoral, a doença residual e o tipo histológico, a ploidia mantém uma associação significativa com a sobrevida. Além disso, o risco relativo de morte causada pela doença é seis vezes maior nos tumores com vários clones aneuplóides (multiploidia) comparativamente com o que ocorre em doentes com tumores diplóides. Num estudo de Friedlander et al<sup>66</sup> englobando 128 doentes com carcinoma avançado do ovário, conclui-se que os tumores diplóides estão associados com um bom prognóstico, mas exclusivamente nos estádios I a III da doença, enquanto os tumores classificados no estágio IV têm prognóstico desfavorável, independentemente do padrão de ploidia. Silvestrini et al<sup>68</sup> estudaram a importância clínica de alguns biomarcadores como a ploidia, a proliferação celular, o p53 e o bcl-2 em 168 doentes com carcinoma invasivo, sendo a ploidia o mais relevante factor preditivo em relação com o curso clínico e a resposta ao tratamento.

### f) Carcinoma do endométrio

Lindhal et al<sup>69</sup>, como outros autores<sup>70,71</sup>, mostraram a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a aneuploidia e outros factores de prognóstico desfavorável, nomeadamente o menor grau de diferenciação histológica do tumor, a ausência de receptores de progesterona e a invasão extensa do miométrio. Na análise multivariada de todos estes factores, só a ploidia mantinha valor preditivo independente em relação com a recorrência tumoral. Observação similar foi referida por Lukes et al<sup>72</sup>, que analisaram vários marcadores prognósticos como o p53, HER-2/neu e receptores hormonais numa série de 100 carcinomas primários do endométrio, concluindo que a ploidia é o indicador mais potente de doença persistente ou recorrente. Um estudo recente de 293 doentes<sup>73</sup> confirma o valor preditivo da ploidia e a sua utilidade clínica como factor prognóstico independente nesta neoplasia.

## 2) Fração de células em fase S

Apesar de não existir unanimidade em relação à escolha e fiabilidade da metodologia a adoptar, a análise da actividade proliferativa tumoral tornou-se cada vez mais importante como complemento biológico da informação prognóstica fornecida pelos parâmetros clinicopatológicos convencionais. Um dos métodos actualmente mais vulgarizados, como alternativa rápida e objectiva aos métodos clássicos, de execução demorada, de incorporação pela timidina tritiada ou bromodeoxiuridina e aos métodos imunocitoquímicos com anticorpos monoclonais como o Ki-67 ou o PCNA, é a análise por citometria de fluxo, que permite a determinação simultânea da ploidia e da fração fase S (FFS). Esta metodologia apresenta, todavia, duas limitações técnicas fundamentais: uma prende-se com o facto da FFS ser uma variável contínua, e não existir um critério-padrão universalmente aceite para definir o(s) valor(es) *cut-off* que diferencia(m) os tumores com actividade proliferativa alta daqueles que têm baixa proliferação celular<sup>34,74-76</sup>, e a segunda relaciona-se com as dificuldades ou mesmo a impossibilidade verificada, em cerca de 20% dos casos, de determinar a FFS, devido a factores técnicos, como a presença de muitos resíduos celulares e a má qualidade dos histogramas<sup>34,35,75</sup>. Apesar destas dificuldades técnicas, que podem ser a causa de alguns resultados contraditórios, vários estudos sugerem que, em certas neoplasias, este marcador de proliferação celular pode ter um impacto prognóstico maior do que o conteúdo de ADN.

### a) Carcinoma da mama

A maioria dos estudos tem mostrado uma forte e consistente associação entre a actividade proliferativa tumoral elevada e o aumento do risco de recorrência e mortalidade nos doentes com carcinoma da mama<sup>29,34,35,74,77-82</sup>. Camplejohn et al.<sup>35</sup>, num estudo de 881 doentes, referiram que a FFS tem valor preditivo independente em termos de sobrevida global, intervalo livre de doença e sobrevida pós-recorrência. Sigurdsson et al.<sup>78</sup> demonstraram que a FFS fornece a mais relevante informação prognóstica, numa série de 367 doentes sem metastização axilar. Num estudo de 308 doentes tratadas no Instituto Português de Oncologia (Centro de Lisboa), verificámos que a FFS, em análise multivariada, tem valor prognóstico independente em relação com o intervalo livre de doença (Quadro I)<sup>31</sup>. O poder predictivo desta variável biológica permanece após ajustamento com outros factores prognósticos estabelecidos, o que sugere fortemente a sua potencial utilidade clínica.

### b) Carcinoma colo-rectal

Bauer et al foram os primeiros investigadores a salien-

tar o significado prognóstico da proliferação celular no cancro do cólon, num estudo retrospectivo de 120 doentes<sup>83</sup>, em que notaram que os tumores com FFS superior a 20% estavam significativamente associados com pior prognóstico da doença. Schutte et al<sup>49</sup>, numa série de 279 casos, chegaram à mesma conclusão mas exclusivamente em relação aos doentes no estágio C de Dukes da doença. Witzig et al<sup>84</sup>, num estudo retrospectivo de 694 doentes nos estádios B2 e C, verificaram que os parâmetros citométricos são factores prognósticos independentes, com uma taxa de sobrevida aos cinco anos de 74% para os doentes com tumores diplóides e/ou com baixa proliferação, e de 54% para os doentes com aneuploidia e/ou alta proliferação. Na nossa experiência, com um estudo prospectivo de 61 doentes<sup>85</sup>, observámos uma associação estatisticamente significativa entre a FFS e, nomeadamente, o grau histológico, a metastização ganglionar e a distância, o estadiamento tumoral, a invasão venosa e a permeabilidade linfática (Quadro II). Quando utilizámos o valor *cut-off* de 21% para dividir os doentes em dois grupos, notá-

Quadro II – Correlação entre as características histopatológicas e a fracção fase S tumoral em 61 doentes com carcinoma colo-rectal tratados no IPOFG (Centro de Lisboa)

Características	n	% Fase S (média ± DP)	valor p
<b>Grau histológico</b>			<0.0016
G1	23	15.6 ± 6.2	
G2	32	17.2 ± 8.1	
G3	6	29.8 ± 14.3	
<b>Invasão local</b>			NS
pT1	5	12.3 ± 3.7	
pT2	5	17.4 ± 6.3	
pT3	45	17.8 ± 9.2	
pT4	6	23.4 ± 11.4	
<b>Status ganglionar</b>			0.0007
pN0	40	15.4 ± 6.8	
pN1	14	19.2 ± 8.3	
pN2	7	28.9 ± 13.4	
<b>Metástases a distância</b>			<0.0001
M0	54	16.2 ± 7.9	
M1	7	30.3 ± 7.3	
<b>Estadiamento tumoral</b>			<0.0001
I	8	13.1 ± 3.9	
II	29	14.9 ± 6.7	
III	17	20.0 ± 10.0	
IV	7	30.3 ± 7.2	
<b>Invasão venosa</b>			<0.0002
não	56	16.6 ± 7.8	
sim	5	32.0 ± 11.2	
<b>Permeabilidade linfática</b>			<0.0104
não	37	15.5 ± 6.5	
sim	24	21.5 ± 11.0	
<b>Crescimento perineural</b>			NS
não	50	17.2 ± 8.5	
sim	11	20.9 ± 11.0	

n: número de doentes; DP: desvio padrão; NS: não significativo.

mos que 72,2% dos doentes com tumores com capacidade proliferativa alta apresentaram metastização regional ou a distância, enquanto naqueles em que se determinou uma proliferação celular baixa este comportamento só surgiu em 25.6% dos casos.

### c) Carcinoma do ovário

Kallioniemi et al<sup>64</sup> analisaram uma série de 118 doentes, e mostraram que os tumores diplóides com fase S baixa tinham melhor prognóstico que os diplóides com fase S alta, não tendo a actividade proliferativa importância significativa nos tumores aneuplóides. Dividiram assim os doentes em três grupos de risco, revelando-se esta classificação conjunta um melhor indicador do prognóstico do que o padrão de ploidia ou a FFS, quando avaliados individualmente.

### d) Tumores das glândulas salivares

No nosso laboratório, estudámos uma série de 97 casos consecutivos de tumores das glândulas salivares<sup>64</sup>, e verificámos uma diferença estatisticamente significativa do valor médio da fase S dos tumores benignos vs malignos, dos diplóides vs aneuplóides e dos de baixo grau vs de alto grau (Quadro III), o que sugere a potencial utilidade da determinação da FFS na avaliação do comportamento clínico das neoplasias de malignidade histológica incerta.

*Quadro III – Correlação entre a fracção fase S e a classificação histológica, o grau de diferenciação tumoral e a ploidia em 97 tumores das glândulas salivares tratados no IPOFG (Centro de Lisboa)*

Características	% Fase S (média ± DP)	valor p
<b>Classificação histológica</b>		0.046
Benigno	3.7 ± 2.6	
Maligno	6.5 ± 6.1	
<b>Grau de diferenciação</b>		0.023
Baixo grau	3.7 ± 2.7	
Alto grau	8.8 ± 7.3	
<b>Ploidia do ADN</b>		0.028
Diplóide	3.8 ± 2.6	
Aneuplóide	13.9 ± 8.1	

DP: desvio padrão.

## DISCUSSÃO

A principal limitação à aplicação mais alargada da citometria de fluxo do ADN na prática clínica, tem sido a ausência de standardização metodológica e de controlo de qualidade laboratorial, com o conseqüente desacordo nas conclusões finais dos diferentes estudos<sup>87</sup>. Apesar de certas discrepâncias poderem ser atribuídas ao *formato* pouco

apropriado de alguns deles, nomeadamente a ausência de um número significativo de doentes e de um adequado *follow-up*, em muitos casos os resultados contraditórios são sobretudo devidos a factores técnicos. Algumas razões específicas têm sido referidas para esta situação: a) A natureza do tecido analisado: os histogramas obtidos a partir do processamento de material fixado em formol e incluído em parafina apresentam geralmente coeficientes de variação mais altos e são mais difíceis de interpretar do que os provenientes de amostras de tecido fresco ou congelado. Alguns estudos concluíram que se podem obter resultados similares a partir de fontes diversas de material<sup>14,88,89</sup>, mas outros mostraram a existência de uma variação significativa<sup>90,91</sup>. b) A representatividade da amostra tumoral: é muito importante confirmar que aquilo que se analisa é realmente o que se quer analisar, já que na leitura final no citómetro de fluxo não se visualizam as células, sendo necessário fazer previamente a verificação da celularidade da amostra através, por exemplo, da coloração pela H&E da mesma ou de uma amostra contígua<sup>12,15,16</sup>. c) A extensão da colheita da amostra: vários tipos de tumores sólidos apresentam heterogeneidade intra-tumoral do conteúdo de ADN, daí resultando histogramas com diferentes padrões de ploidia consoante o local de colheita da amostra. A melhor forma de contornar esta questão é, sempre que possível, executar a análise citométrica de vários fragmentos da mesma amostra tumoral<sup>92,93</sup>. d) A interpretação dos histogramas: a presença de populações anormais peridiplóides e de pequenos picos aneuplóides bem como a distinção entre clones tetraplóides e células normais G2/M é, por vezes, difícil de definir<sup>5,6</sup>. Problemas específicos relacionados com os diferentes modelos matemáticos utilizados, ou mesmo a impossibilidade técnica de análise, podem ocorrer na determinação da fracção fase S, especialmente nos histogramas que apresentam excessiva fluorescência inespecífica e/ou muitos resíduos celulares<sup>34,35,75,94,95</sup>.

Apesar das dificuldades técnicas e de alguns resultados contraditórios, a análise global dos estudos publicados mostra que a citometria de fluxo tornou-se um instrumento útil de abordagem prognóstica tanto nas lesões pré-malignas como na doença neoplásica invasora. A visão prevalente na comunidade científica refere os parâmetros citométricos, ploidia do ADN e fracção fase S, como importantes indicadores prognósticos numa grande variedade de tumores sólidos. No carcinoma da mama sem metastização axilar, a análise destes marcadores pode ajudar a distinguir os doentes que, em princípio, ficariam *curados* exclusivamente com a cirurgia e que não beneficiariam da adição de terapêutica adjuvante, daqueles cujo eventual

curso clínico, sem o apoio deste tipo de intervenção, seria a recorrência ou a morte. Uma situação semelhante acontece no carcinoma colo-rectal, especialmente nos estádios intermédios da doença, podendo a citometria de fluxo contribuir na identificação dos doentes que provavelmente irão evoluir para recorrência ou metastização após ressecção cirúrgica com intenção curativa, e nos quais poderia estar indicada terapêutica adjuvante. Também no carcinoma do ovário os biomarcadores citométricos, para além da sua importância prognóstica independente, com a aneuploidia significativamente associada a menor sobrevida em qualquer estágio da doença, parecem ter utilidade clínica na delimitação da terapêutica e na previsão da resposta ao tratamento. Estes exemplos realçam o facto da determinação dos parâmetros citométricos poder ter utilidade prática adicional, na resolução de problemas clínicos específicos em tipos vários de tumores.

Os problemas major que têm impedido a aceitação consensual do valor preditivo da análise de ADN por citometria de fluxo e a sua mais rápida divulgação como teste clínico de rotina, têm sido: a) a demonstração do valor independente da informação citométrica em relação com a que é fornecida pelos factores clinicopatológicos tradicionais geralmente associados com o prognóstico da doença e, b) em caso afirmativo, a investigação da vantagem predictiva destes marcadores biológicos, isto é, a amplitude da sua capacidade para prever a evolução da doença, seleccionar um grupo de doentes de risco ou ajudar na escolha de um tratamento. No fundo, a questão crítica é saber se a citometria de fluxo do ADN, sem ser redundante ou repetitiva, pode alterar a algum nível, clínico ou terapêutico, a monitorização do doente individual portador de um determinado tipo de neoplasia.

Por outro lado, o problema do estabelecimento da análise de ADN por citometria de fluxo na rotina clínica, é ampliado pelo facto de não existir um acordo universal sobre padrões laboratoriais e controlo de qualidade no que diz respeito a colheita e preparação da amostra, e a análise e interpretação dos histogramas. A ausência de standardização metodológica conduz a variabilidade intra e interlaboratorial que, por sua vez, leva a dificuldades na avaliação e comparação dos resultados. Existe, portanto, a necessidade urgente de padronizar os métodos de selecção, colheita e preparação das amostras tumorais, bem como de standardizar a utilização sistemática de modelos matemáticos na análise do ciclo celular, com o objectivo de atingir-se um consenso sobre a utilidade clínica da citometria de fluxo do ADN<sup>87</sup>. Segundo as propostas recomendadas na Conferência de Consenso de Citometria<sup>87</sup>, cada laboratório deve definir os seus intervalos de variação, sendo

necessário desenvolver esforços para a validação dos dados de cada um em comparação com os demais. O impacto prognóstico da determinação dos parâmetros citométricos em vários tipos de tumores sólidos será, sem dúvida, uma contribuição relevante da citologia quantitativa na área da oncologia clínica, ao mesmo tempo que possibilitará que a citometria de fluxo do ADN seja definitivamente transferida do campo da investigação para a aplicação clínica.

## BIBLIOGRAFIA

- HEIM S, MITELMAN F: Chromosomal abnormalities in specific disorders: solid tumors. In: Cancer cytogenetics, edited by Heim S, Mitelman F. New York: Alan R. Liss Inc 1987, p. 227
- CAIRNS J: The origin of human cancers. *Nature* 1981;289:353-7
- WEINBERG RA: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49:3713-21
- BISHOP JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-58
- WERSTO RP, LIBBIT RL, KOSS LG: Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol* 1991;22:1085-98
- KOSS LG, CZERNIAK B, HERZ F, WERSTO RP: Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989;20:528-48
- MERKEL DE, MCGUIRE WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990;65:1194-205
- International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumours. Hermanek P, Sobin LH, editors. 4<sup>th</sup> ed., 2<sup>nd</sup> rev. Berlin: Springer, 1992
- International Union Against Cancer. Prognostic factors in cancer. Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, editors. Berlin: Springer, 1995
- HERMANEK P, SOBIN LH, FLEMING ID. What do you need beyond TNM? *Cancer* 1996;77:815-7
- KRISHAN A: Rapid cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975;66:188-93
- TRAGANOS F: Flow cytometry: Principles and applications. *Cancer Invest* 1984;2:239-58
- DEITCH AD, LAW H, WHITE RD: A stable propidium iodide staining for flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1982;30:967-72
- HEDLEY DW, FRIEDLANDER ML, TAYLOR IW, RUGG CA, MUSGROVE EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-5
- SHAPIRO HM: Practical flow cytometry. New York: Alan R Liss, 1988
- MELAMED MR, LINDMO T, MENDELSON ML: Flow cytometry and sorting. Wiley-Liss, 1990
- DARZYNKIEWICZ Z, ROBINSON JP, CRISSMAN HA: Flow cytometry. *Methods in cell biology*. Vol. 41-42, 2<sup>nd</sup> edn. San Diego: Academic Press, 1994
- VINDELOV LL, CHRISTENSSON IJ, NISSEN NI: Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analyses by simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* 1983;3:328-31
- MELLIN W: Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. *Path Res Pract* 1990;186:37-62
- JAKOBSEN A, KRISTENSEN PB, POULSEN HK: Flow cytometric classification of biopsy specimens from cervical intraepithelial neoplasia. *Cytometry* 1983;4:166-9



21. NEWTON JA, CAMPLEJOHN RS, MCGIBBON DH: Aneuploidy in Bowen's disease. *Br J Dermatol* 1986;114:691-4
22. REID BJ, HAGGITT RC, RUBIN CE, RABINOVITCH PS: Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987;93:1-11
23. PORSCHE R, ROBIN U, SCHUMACHER A et al: DNA aneuploidy in Crohn's disease and ulcerative colitis: results of a comparative flow cytometric study. *Gut* 1992;33:663-7
24. TAVASSOLI FA: Pathology of the breast. Norwalk: Appleton & Lange, 1992
25. MCGUIRE WL, CLARK GM: Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:1756-61
26. GASPARINI G, POZZA F, HARRIS AL: Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1206-19
27. MANSOUR EG, RAVDIN PM, DRESSLER L: Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994;74:381-400
28. BEERMAN H, KLUIN PM, HERMANS J, VAN DE VELDE CJH, CORNELISSE CJ: Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990;45:34-9
29. 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. *Cytometry* 1993;14:482-5
30. 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
31. 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
32. STANTON PD, COOKE TG, OAKES SJ et al: Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66:925-9
33. CORNELISSE CJ, VAN DE VELDE, CASPERS RJ, MOOLENAAR AJ, HERMANS J: DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 1987;8:225-34
34. CLARK GM, DRESSLER LG, OWENS MA, POUNDS G, OLDAKER T, MCGUIRE WL: Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by flow cytometry. *N Engl J Med* 1989;320:627-33
35. CAMPLEJOHN RS, ASH CM, GILLET CE et al: The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: Results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer* 1995;71:140-5
36. UYTERLINDE AM, BAAK JPA, SCHIPPER NW, PETERSE H, MATZE E, MEIJER CJL: Further evaluation of the prognostic value of morphometric and flow cytometric parameters in breast-cancer patients with long follow-up. *Int J Cancer* 1990;45:1-7
37. FALLENIEUS AG, FRANZÉN SA, AUER GU: Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphological factors: A retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer* 1988;62:521-30
38. O'REILLY SM, RICHARDS MA: Is DNA flow cytometry a useful investigation in breast cancer? *Eur J Cancer* 1992;28:504-7
39. ARMITAGE NC, ROBINS RA, EVANS DF, TURNER DR, BALDWIN RW, HARDCASTLE JD: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1985;72:828-30
40. KOKAL W, SHEIBANI K, TERZ J, HARADA JR: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* 1986;255:3123-7
41. SCOTT N, WIEAND H, MOERTEL C, CHA S, BEART R, LIEBER M: Colorectal cancer: Duke's stage, tumor site, preoperative plasma CEA level and patient prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 1987;122:1375-9
42. KOURI M, PYRHONEN S, MECKLIN JP et al: The prognostic value of DNA ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 1990;62:976-81
43. DEAN PA, VERNAVA AM III: Flow cytometric analysis of DNA content in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1992;35:95-102
44. LANZA G, GAFÀ R, SANTINI A et al: Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma: A prospective flow cytometric study. *Cancer* 1998;82:49-59
45. ROGNUM TO, THORUD E, LUND E: Survival of large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy. *Br J Cancer* 1987;56:633-6
46. HOOD DL, PETRAS RE, EDINGER M, FAZIO V, TUBBS RR: Deoxyribonucleic acid ploidy and cell cycle analysis of colorectal carcinoma by flow cytometry: a prospective study of 137 cases using fresh whole cell suspensions. *Am J Clin Pathol* 1990;93:615-20
47. ENKER WE, KIMMEL M, CIBAS ES, CRANOR ML, MELAMED MR: DNA/RNA content and proliferative fractions of colorectal carcinomas: a five-year prospective study relating flow cytometry to survival. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:701-7
48. BOTTGGER TC, POTRATZ D, STOCKLE M, WELLEK S, KLUPP J, JUNGINGER T: Prognostic value of DNA analysis in colorectal carcinoma. *Cancer* 1993;72:3579-87
49. SCHUTTE B, REYNDERS MM, WIGGERS T et al: Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma. *Cancer Res* 1987;47:5494-6
50. EMDIN SO, STENLING R, ROOS G: Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma: a flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 1987;60:1282-7
51. ARMITAGE NC, BALLANTYNE KC, EVANS DF, CLARKE P, SHEFFIELD J, HARDCASTLE JD: The influence of tumor cell DNA content on survival in colorectal cancer: a detailed analysis. *Br J Cancer* 1990;62:852-6
52. ZARBO RJ, NAKHLEH RE, BROWN RD, KUBUS JJ, MA CK, MACKOWIAK P: Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* 1997;79:2073-86
53. GUSTAFSON H, TRIBUKAIT B, ESPOSTI PL: DNA pattern, histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumours. *Scand J Urol Nephrol* 1982;16:135-9
54. TRIBUKAIT B, GUSTAFSON H, ESPOSTI PL: The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: A study of 100 untreated cases. *Br J Urol* 1982;54:130-5
55. TRIBUKAIT B: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito-urinary neoplasms. *World J Urol* 1987;5:108-22
56. GUSTAFSON H, TRIBUKAIT B, ESPOSTI PL: DNA profile and tumour progression in patients with superficial bladder tumours. *Urol Res* 1982;10:13-8
57. JACOBSEN AB, FOSSA SD, LUNDE S, MELVIK JE, PETERSEN EO: Flow cytometric DNA measurements in paraffin-embedded bladder carcinoma tissue before and after precystectomy radiotherapy. *Radiother Oncol* 1987;10:149-55
58. WINKLER HZ, RAINWATER LM, MYERS RP et al: Stage D1 prostatic adenocarcinoma: Significance of nuclear DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 1988;63:103-12
59. FORDHAM MVP, BURDGET AH, MATTHEWS J, WILLIAMS G, COOKE T: Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome. *Br J Surg* 1986;73:400-3



60. LUNDBERG S, CARSTENSEN J, RUNDQUIST I: DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res* 1987;47:1973-7
61. KOSS LG. The puzzle of prostatic carcinoma. *Mayo Clin Proc* 1988;63:193-7
62. STEPHENSON RA, JAMES BC, GAY H et al: Flow cytometry of prostate cancer: Relationship of DNA content to survival. *Cancer Res* 1987;47:2504-7
63. RODENBURG CJ, CORNELISSE CJ, HEINTZ PA, HERMANS J, FLEUREN GJ: Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer* 1987;59:317-23
64. KALLIONIEMI OP, PUNNONEN R, MATTILA J, LEHTINEN M, KOIVULA T: Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988;61:334-9
65. IVERSON O-E: Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma. *Cancer* 1988;61:971-5
66. FRIEDLANDER ML, HEDLEY DW, SWANSON C, RUSSELL P: Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1988;6:282-90
67. BLUMENFELD D, BRALY PS, BEN-EZRA J, KLEVEZC RR: Tumor DNA content as a prognostic feature in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987;27:389-402
68. SILVESTRINI R, DAIDONE MG, VENERONI S et al: The clinical predictivity of biomarkers of stage III-IV epithelial ovarian cancer in a prospective randomized treatment protocol. *Cancer* 1998;82:159-67
69. LINDHAL B, ALM P, FERNO M et al: Prognostic value of flow cytometric DNA measurements in Stage I-II endometrial carcinoma: Correlations with steroid receptor concentration, tumor myometrial invasion, and degree of differentiation. *Anticancer Res* 1987;7:791-8
70. JACOBSEN M, JAKOBSEN A, NEDERGAARD L, ANDERSEN J-E, NIELSEN K: Endometrial carcinomas. Flow cytometric DNA content and S-phase values. *Pathol Res Pract* 1997;193:283-90
71. SYMONDS DA: Prognostic value of pathologic features and DNA analysis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990;39:272-6
72. LUKES AS, KOHLER MF, PIEPER CF et al: Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer. *Cancer* 1994;73:2380-5
73. ZAINO RJ, DAVIS ATL, OHLSSON-WILHELM BM, BRUNETTO VL: DNA content is an independent prognostic indicator in endometrial carcinoma. A gynecologic oncology group study. *Int J Gynecol Pathol* 1998;17:312-9
74. STAL O, DUFMATS M, HATSCHEK T et al: S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1993;11:1717-22
75. MUSS HB, KUTE TE, CASE LD et al: The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989;64:1894-900
76. SIGURDSSON H, BALDETORP B, BORG A et al: Flow cytometry in primary breast cancer: improving the prognostic value of the fraction of the cells in the S-phase by optimal categorization of cut-off levels. *Br J Cancer* 1990;62:786-90
77. KALLIONIEMI O, BLANCO G, ALAVAikko M et al: Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 1988;62:2183-90
78. SIGURDSSON H, BALDETORP B, BORG A et al: Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045-53
79. CLARK GM, MATHIEU M-C, OWENS MA et al: Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1992;10:428-32
80. JOENSUU H, ALANEN K, FALKMER UG et al: Effect of DNA ploidy classification on prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 1992;52:701-6
81. REMVIKOS Y, MOSSERI V, ASSELAIN B et al: S-phase fractions of breast cancer predict overall and post-relapse survival. *Eur J Cancer* 1997;33:581-6
82. PEIRÓ G, LERMA E, CLIMENT MA, SEGUÍ MA, ALONSO MC, PRAT J: Prognostic value of S-phase fraction in lymph node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol* 1997;10:216-22
83. BAUER KD, LINCOLN ST, VERA-ROMAN JM et al: Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Invest* 1987;57:329-35
84. WITZIG TE, LOPRINZI CL, GONCHOROFF NJ et al: DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991;68:879-88.
85. PINTO AE, CHAVES P, FIDALGO P, OLIVEIRA AG, LEITÃO CN, SOARES J: Flow cytometric DNA ploidy and S-phase fraction correlate with histopathologic indicators of tumor behavior in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:411-9.
86. PINTO AE, FONSECA I, SOARES J: The clinical relevance of ploidy and S-phase fraction determination in salivary gland tumors: A flow cytometric study of 97 cases. *Cancer* 1999;85:273-81.
87. SHANKEY TV, RABINOVITCH PS, BAGWELL B et al: Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-7.
88. HEDLEY DW: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five years on. *Cytometry* 1989;10:229-41.
89. FRIERSON HF: Flow cytometric analysis of ploidy in solid tumors: Comparison of fresh tissues with formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Hum Pathol* 1988;19:290-4.
90. SCHULTZ DS, ZARBO RJ: Comparison of eight modifications of Hedley's method for flow cytometric DNA ploidy analysis of paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 1992;98:291-5.
91. COON JS, PAXTON H, LUCY L, HOMBURGER H: Interlaboratory variation in DNA flow cytometry. Results of the College of American Pathologists' Survey. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:681-5
92. CAREY FA, LAMB D, BIRD CC: Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 1990;65:2266-9.
93. BONSING BA, BEERMAN H, KUIPERS-DIJKSHOORN N, FLEUREN GJ, CORNELISSE CJ: High levels of DNA index heterogeneity in advanced breast carcinomas. *Cancer* 1993;71:382-91.
94. BALDETORP B, BENDHAL P-O, FERNO M et al: Reproducibility in DNA flow cytometric analysis of breast cancer: Comparison of 12 laboratories' results for 67 sample homogenates. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1995;22:115-27
95. BERGERS E, MONTIRONI R, VAN DIEST PJ, PRETE E, BAAK JPA: Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometric DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases. *Hum Pathol* 1996;27:553-60