

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

Citometria de fluxo, concordância e reprodutibilidade, com utilização de diferentes métodos de colheita

Flow cytometry agreement and reproducibility, using different sampling methods

V. ESPANHOL, I. AMENDOEIRA, F. SANSONNETTY, A. MARQUES

RESUMO

A determinação do conteúdo em ADN das células neoplásicas do carcinoma do pulmão, utilizando a citometria de fluxo (CF), tem tido resultados díspares em investigações aparentemente semelhantes. Estas diferenças têm sido atribuídas a erros, relacionadas tanto com o procedimento em si, como com o método de colheita das amostras.

Assim, as dificuldades na colheita de material avaliável para citometria de fluxo e a heterogeneidade das amostras processadas poderiam contribuir para uma menor fiabilidade dos resultados.

Neste estudo foi determinado o conteúdo em ADN por citometria de fluxo (CF) em 93 doentes tendo sido possível efectuar duas medições do conteúdo em ADN em 47 dos 93 doentes. Em 24 casos, foi possível processar por CF duas vezes a mesma amostra e em 23 processar duas amostras

ABSTRACT

The determination of the DNA content of the lung cancer cells using flow cytometry has had inconsistent results depending the investigation in spite of the apparent similarity of the procedures. These anecdotal results had been attributed to the errors related with the procedure itself and with the sampling methodology. The difficulties to obtain evaluable specimens for flow cytometry and the heterogeneity of the samples could contribute to the low reliability of the results.

In this study the DNA content was determined by flow cytometry in 93 patients. In 47 out of 93 patients was possible to do two flow cytometric determinations of the same tumor sample. In 23 out of 47 patients were processed two different samples obtained at the same time of the same tumor. The agreement of the flow cytometric determinations

Recebido para publicação: 00.08.29

Aceite para publicação: 00.11.16

diferentes, do mesmo tumor, colhidas na mesma altura.

Avaliou-se a concordância das medições e a reprodutibilidade do método nas duas situações. Foi ainda calculada a dispersão dos valores obtidos para cada parâmetro.

Verificou-se uma excelente concordância e reprodutibilidade nas medições efectuadas em ambos os grupos. No grupo em que foram avaliadas amostras diferentes, a variação não foi de forma a alterar significativamente o cálculo do índice de ADN.

Concluiu-se que as metodologias de amostragem e de processamento foram fiáveis. A utilização de amostras de pequenas dimensões para CF é fiável. É possível determinar o conteúdo em ADN em doentes não cirúrgicos, utilizando pequenas amostras o que permitirá expandir estes e outros parâmetros biológicos a doentes em que podem ter um significado ainda mais importante tanto na orientação global como no prognóstico.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (6): 607-617

Palavras-chave: Carcinoma do pulmão; citometria de fluxo; concordância e reprodutibilidade das avaliações.

and the reproducibility and reliability of the methodology were evaluated. Additionally was estimated the distribution of the each evaluation performed. We found an excellent agreement and reproducibility of the evaluations in each group. In every groups we didn't found significant variation in order to induce changes in DNA indices.

We concluded that the sampling and flow cytometry methodologies were reliable and reproducible. Using this methodology will be possible to determine DNA content and others DNA evaluations contributing to the management and global prognosis of the great majority of lung cancer patients.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (6): 607-617

Key-words: Lung cancer; Flow cytometry; agreements and reproducibility of the evaluations.

INTRODUÇÃO

A variabilidade das medições efectuadas por qualquer tipo de medida obriga a tentar avaliar a exactidão dos valores obtidos, quantificar o erro inerente às medições realizadas e apreciar a concordância dos procedimentos. É possível, por um lado, definir os limites do erro subjacente a cada tipo de medição e por outro, verificar se é utilizável uma ou outra metodologia, sem que isso falseie os resultados.

A revisão da literatura (1-4) mostra que não há informação suficiente para avaliar a qualidade da medição citométrica. Além de toda a descrição de natureza técnica e da quantidade de células tumorais (em número superior a 20% da amostra, se pretende calcular a percentagem de células em fase de síntese do ciclo celular), é necessário definir a variabilidade das populações celulares diplóides e aneuplóides. Torna-se, assim, difícil obter uma padronização de

métodos que possa permitir uma melhor avaliação do valor da citometria. A variabilidade dos resultados (1) e a quase inexistência de estudos realizados nos estádios avançados da doença (5,6) tornam difícil a aplicabilidade na clínica destes parâmetros.

Neste estudo, por condicionalismos de natureza ética e técnica, nem sempre foi possível utilizar o mesmo tipo de amostra para processamento por citometria de fluxo (CF). Sempre que existia material processável por CF, em excesso, repetiu-se a determinação.

No final do estudo, foi possível obter vinte e quatro pares de avaliações feitas à mesma amostra e, vinte e três pares de amostras diferentes do mesmo doente. Estas amostras foram colhidas simultaneamente e foram constituídas por produtos obtidos por biópsia brônquica, escovagem brônquica e/ou biópsia aspirativa transtorácica.

OBJECTIVO

O objectivo foi avaliar o erro e a concordância das determinações de CF entre dois fragmentos da mesma amostra e entre duas amostras diferentes, do mesmo tumor, colhidas simultaneamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na sequência de uma investigação prospectiva mais alargada e estruturada, com o objectivo de avaliar a importância de alguns parâmetros clínicos e biológicos no prognóstico e na estratégia terapêutica de doentes com cancro do pulmão. Ao longo de três anos (1994-1996) foi possível efectuar 146 determinações de CF correspondentes a 93 doentes.

O material foi obtido pela técnica que, caso a caso, foi considerada mais eficaz para o diagnóstico. As técnicas utilizadas foram a biópsia brônquica (BBR) em 68 determinações (47%), a escovagem brônquica (EB) em 27 casos (18%) e a biópsia aspirativa transtorácica (BAT) nas restantes 51 (35%) determinações de CF. Não foram incluídas três amostras: uma obtida por aspirado ganglionar e duas por lavagem brônquica, incluídas no estudo inicial (6) por abandono destes métodos de colheita.

Muitos doentes foram excluídos por insuficiência de material, dado só ter sido processado o material excedentário, após definido o diagnóstico citológico/histológico.

Esta metodologia motivou que fossem utilizadas amostras obtidas por técnicas diferentes, podendo aumentar a variabilidade dos resultados obtidos. Tentou-se processar todo o material disponível, mesmo que a amostra fosse a mesma. Sempre que uma amostra permitia dois processamentos, repetiu-se a determinação. Esta duplicação foi possível em vinte e quatro casos. Em vinte e três doentes, foram colhidas, na mesma altura, duas amostras diferentes (p.ex.: BBR e EB, BBR e BAT) do mesmo tumor, também processadas em simultâneo.

O processamento das amostras (6) dependeu da técnica utilizada na sua colheita. Quando os fragmentos eram obtidos por BBR, foi previamente realizado um teste de identificação de malignidade nesse mesmo fragmento. A técnica utilizada nesse rastreio de malignidade foi o "imprint" (6) em lâmina, sendo rejeitados todos os fragmentos em que não foram identificadas células neoplásicas no "imprint". Quando se tratou de EB ou BAT, a técnica de rastreio de malignidade foi a citologia. Depois de seleccionadas, as amostras foram criopreservadas numa solução de dimetilsulfóxido a 11%. A CF foi realizada utilizando um citómetro de fluxo Coulter Epics C, sendo o material processado após tratamento adequado (6). A determinação do índice de ADN (ID) e da fracção de células em fase-S foi obtida utilizando "software" específico (Multicycle, Phoenix Flow Systems) (6).

Esta duplicação de medições por CF permitiu testar a concordância e a variabilidade dos resultados obtidos, na mesma e em diferentes amostras do mesmo doente.

O estudo estatístico baseou-se na metodologia aconselhada por Bland e Altman (7), quando se pretendem comparar novas técnicas de medição de variáveis clínicas. Neste estudo, pretende-se provar que a técnica de leitura é reprodutível e que os valores obtidos pelo processamento das diferentes amostras do mesmo doente são concordantes, podendo ser utilizados indistintamente sem originar diferenças significativas de classificação nos parâmetros medidos pela CF.

Neste trabalho, a concordância foi avaliada pela correlação entre a diferença e a média das duas avaliações efectuadas (8-11). A dispersão dos valores obtidos nas duas determinações emparelhadas foi calculada estimando o desvio padrão e o intervalo de confiança de 95% dos valores (10,11). Adicionalmente, foi testada a hipótese da diferença entre as duas determinações ser significativamente diferente de zero (11). Utilizou-se o "teste t" emparelhado e desemparelhado, respectivamente, para a mesma amostra e amostras colhidas por métodos diferentes. A rejeição desta hipótese e a dispersão de 95% dos

valores das diferenças inferior a dois desvios padrões da média das determinações permitiu aceitar como reprodutíveis as duas medições (12).

RESULTADOS

Concordância de leituras consecutivas da mesma amostra

Em vinte e quatro doentes com carcinoma de células não pequenas do pulmão foi possível realizar duas determinações da mesma amostra. Foi possível obter uma medição dupla do pico da referência interna (conteúdo em ADN dos núcleos de eritrócitos de galinha que permite comparativamente determinar o conteúdo em ADN das células neoplásicas), do pico diplóide (PD), índice de ADN diplóide (IADNd) e aneuplóide (IADNa). Não foi possível, na maior parte dos doentes, realizar em número suficiente determinações emparelhadas, do valor da fracção de células em fase S.

Referência Interna

Compararam-se vinte e quatro pares de medições da referência interna (núcleos de eritrócitos de galinha).

Verificou-se que a dispersão (Quadro I) das medições da RI é da ordem das centésimas, tanto no que se

refere ao cálculo do desvio padrão como em relação ao intervalo de confiança de 95% dos valores. Assim, 95% dos valores da RI, encontram-se no intervalo 0,3291 e 0,3544, o que representa um erro aceitável para a medição. Este erro poderá ser observado no gráfico (Fig.1) onde se comparam a média da referência interna (X) com a diferença entre cada duas observações emparelhadas (Y).

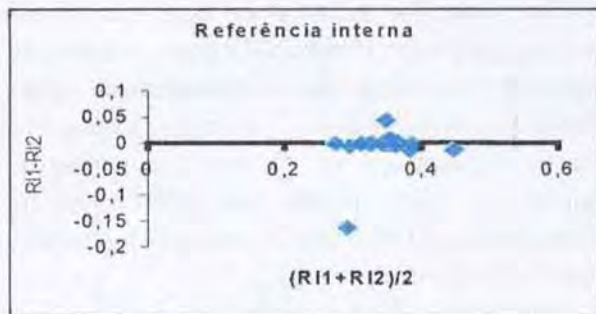


Fig. 1 - Variabilidade da referência interna

Só existe uma determinação com dispersão significativa em relação a todas as outras, o que revela a excelente concordância do método utilizado nas duas determinações (Fig. 1).

Adicionalmente foi possível determinar a reprodutibilidade da técnica testando a hipótese da média das diferenças ser ou não significativamente diferente de zero, valor este, considerado como limite para que tenham duas mediações reprodutíveis (Quadro II).

QUADRO I
Variabilidade das medições da RI

Referência Interna	
Variabilidade da média das diferenças	
Média ref. Interna = 0,3454	
Média diferenças = -0,0051	
Desvio padrão = 0,0347	$-0,0051 \pm (2 \times 0,0347) = -0,0746 / 0,0643$
I.C. 95%* = 0,0142	$-0,0051 \pm 0,0142 = -0,0193 / 0,0090$

* dispersão de 95% das diferenças da RI

QUADRO II

Rejeição da hipótese das diferenças entre as médias da RI serem significativamente diferentes de zero, $p=0,4778$

t – Test: Duas médias emparelhadas

	RI1	RI2
Média	0,3430	0,3483
3 Obs.	23	23
Hipótese		RI1-RI2=0
G. L*		22
p		0,4778

* graus de liberdade

Pico diplóide e índice de ADN diplóide e aneuplóide

Foram efectuadas duas medições do pico diplóide, índice de ADN diplóide e índice de ADN aneuplóide. A correlação entre as diferenças de cada par de determinações e a sua média não foi significativa para cada um dos três parâmetros estudados (Figs. 2, 3 e 4), sugerindo uma elevada concordância entre elas.

Apesar da dispersão, ser maior, na avaliação do pico diplóide, os valores não interferem significativamente no cálculo do índice de ADN (IADN), não determinando alteração significativa na classificação da ploidia do ADN. Calculando a variabilidade do IADN da população diplóide, verificamos que em 95% das determinações, os valores obtidos oscilam entre 0,98 e 0,96*, enquanto os valores do ADN aneuplóide oscilam entre 1,594 e 1,628**. A reprodutibili-

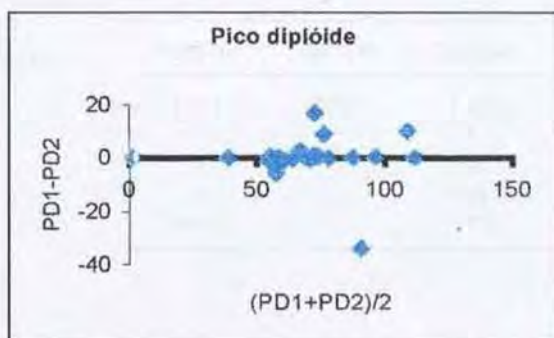


Fig. 2 – Correlação entre medições do pico diplóide

* média do IADNd \pm I.C. 95%

** média do IADNa \pm I.C. 95%

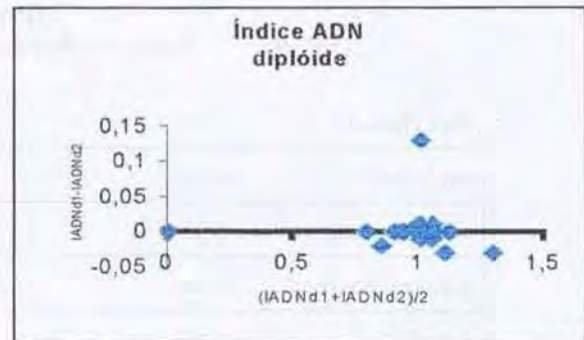


Fig. 3 – Correlação entre avaliações do índice de ADN

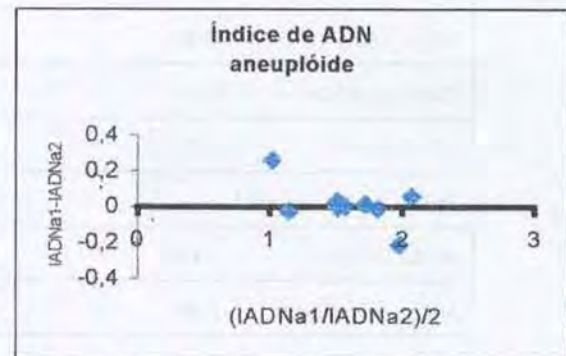


Fig. 4 – Correlação entre avaliações do índice de ADN

dade das determinações foi testada pela metodologia já referida, verificando-se que para todos os parâmetros estudados não foram encontradas diferenças significativas.

Em nenhuma das variáveis, a diferença entre as mediações, foi significativamente diferente de zero, podendo ser aceite que exista reprodutibilidade, entre as determinações.

Concordância de leituras consecutivas de amostras

Diferentes

Nos 23 doentes em que foi possível obter duas amostras diferentes, calculou-se a concordância, a variabilidade e a reprodutibilidade das determinações de CF. Foi excluída a RI, pois o procedimento foi

QUADRO III
Cálculo da variabilidade de PD, IADNd e IADNa

Pico Diplóide		
Média PD =	68,282	
Média diferenças =	-0,17	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	8,524	$-0,17 \pm (2 \times 8,524) = 16,878 / -17,218$
I.C. 95% =	3,483	$-0,17 \pm 3,483 = 3,313 / -3,653$
Índice ADN diplóide		
Média IADNd =	0,969	
Média diferenças =	0,002	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	0,029	$0,002 \pm (2 \times 0,029) = 0,058 / -0,057$
I.C. 95% =	0,012	$0,002 \pm 0,012 = 0,014 / -0,01$
Índice ADN aneuplóide		
Média IADNd =	1,629	
Média diferenças =	0,009	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	0,108	$0,009 \pm (2 \times 0,108) = 0,225 / -0,215$
I.C. 95% =	0,044	$0,009 \pm 0,044 = 0,053 / -0,035$

QUADRO IV

Rejeição da hipótese das diferenças entre as médias do PD, IADNa e IADNd serem significativamente diferentes de zero, $p=0,92$, $p=0,77$ e $p=0,73$

t – Test: Duas amostras emparelhadas

	PD1	PD2	IADNa1	IADNa2	IADNd1	IADNd1
Média	68,19	68,36	1,624	1,615	1,018	1,011
Obs.	24	24	11	11	13	13
Hipótese*		0		0		0
G. L.	23	23	10	10	11	11
p		0,92		0,77		0,73

* diferença entre cada par de avaliações igual a zero

idêntico ao calculado para a mesma amostra. Observamos, em relação às três variáveis PD, IADNd e IADNa, diferentes graus de concordância que poderão ser avaliados nos Quadros e Gráficos que se apresentaram (Figs. 5-7).

Como se pode verificar, apesar da variabilidade ser superior à observada para a mesma amostra, a concordância dos valores dos índices de ADN da população celular diplóide e aneuplóide é elevada. Assim, considerando o Índice do ADN da população celular diplóide, verificamos que 95% dos valores se encontram no intervalo 0,95 e 1,03* (Quadro V). Poderá considerar-se que, na grande maioria dos casos, a mudança da amostra não alterou a tendência dos valores do IADNd. O mesmo se observa em relação ao IADNa, cujos valores poderão oscilar entre e 1,505 e 1,609**, o que também não alterará a decisão acerca da ploidia do ADN.

A reprodutibilidade das medições é excelente, o que é comprovado pelo facto da diferença entre as médias de ambas as determinações, para cada parâmetro estudado, não ser significativamente diferente de zero (Quadro VI).

É de referir que em dois casos se verificou que numa das duas medições por CF foi encontrado um pico aneuplóide donde resultou uma alteração na classificação da ploidia do ADN. Estas situações verificaram-se em dois casos, diagnosticados por BAT; embora não sendo de excluir a possível ocorrência de heterogeneidade tumoral, problemas associados à má qualidade da amostras obtidas por este método poderiam também ter influenciado o resultado.

* média do IADNd \pm I.C. 95%

** média do IADNa \pm I.C. 95%

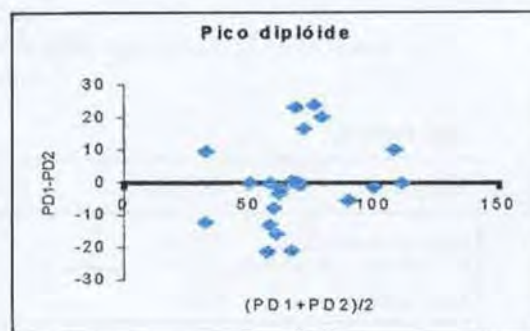


Fig. 5 – Dispersão dos valores do PD nas duas amostras

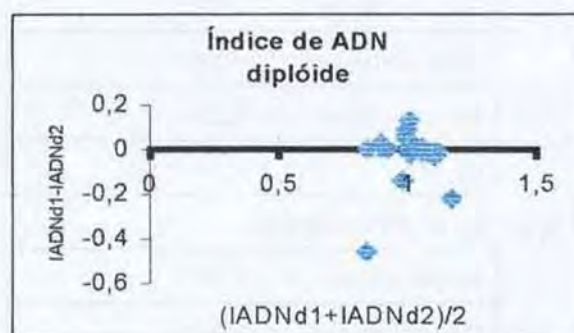


Fig. 6 – Dispersão dos valores do índice de ADN da população celular diplóide

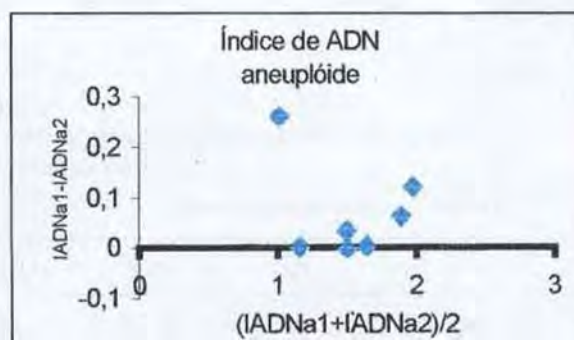


Fig. 7 – Dispersão dos valores do ADN da população aneuplóide

QUADRO V

Variabilidade do PD, IADNd e IADNa em amostras diferentes do mesmo doente colhidas na mesma altura

Pico Diplóide

Média PD =	68,774	
Média diferenças =	0,0304	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	12,704	$0,03 \pm (2 \times 12,704) = 25,438 / -25,026$
I.C. 95% =	5,191	$0,03 \pm 5,191 = 5,221 / -3,653$

Índice ADN diplóide

Média IADNd =	1,011	
Média diferenças =	-0,0247	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	0,116	$-0,02 \pm (2 \times 0,116) = 0,229 / -0,234$
I.C. 95% =	0,047	$-0,02 \pm 0,047 = 0,027 / -0,067$

Índice ADN aneuplóide

Média IADNa =	1,523	
Média diferenças =	0,067	Variabilidade da média das diferenças
Desvio padrão =	0,095	$0,067 \pm (2 \times 0,095) = 0,177 / -0,183$
I.C. 95% =	0,039	$0,039 \pm 0,047 = 0,086 / -0,008$

QUADRO VIRejeição da hipótese das diferenças entre as médias do PD, IADNa e IADNd serem significativamente diferentes de zero, $p=0,99$, $p=0,59$ e $p=0,31$

t – Test: amostras desemparelhadas

	PD1	PD2	IADNd1	IADNd2	IADNa1	IADNa1
Média	68,78	68,75	0,99	1,02	1,512	1,61
3 Obs.	3	23	12	12	9	11
Hipótese*		0		0		0
G. L.		22		11		10
P		0,99		0,31		0,59

* diferença entre cada par de avaliações igual a zero

DISCUSSÃO

Uma das grandes dificuldades inerentes à avaliação do conteúdo em ADN das células e análise do ciclo celular, é a validação dos resultados obtidos. As dificuldades encontradas relacionam-se com uma variedade de problemas, desde a padronização de procedimentos entre os vários laboratórios (1), até às discrepâncias inerentes a erros de estrutura dos trabalhos já realizados. A utilização de termos usados em citogenética (hipodiplóide, peritetraplóide,...) são posteriormente relacionados com outros parâmetros (p.ex., sobrevida) obtendo-se associações dificilmente reprodutíveis. Sempre que possível deverá ser usada a quantificação do conteúdo de ADN utilizando o índice de ADN, bem como, a percentagem de células em fase S, sempre que for efectuada a análise do ciclo celular (13-16).

Um elevado número de investigações tem vindo a chamar a atenção para a heterogeneidade tumoral como mais um factor para elevar as discrepâncias observadas nos diferentes estudos publicados com metodologias aparentemente sobreponíveis (17-20). Esta situação poderá dificultar a interpretação dos resultados, levar a erros de classificação e invalidar as associações que se pretendem investigar, nomeadamente, o interesse complementar destes parâmetros em relação a variáveis clínicas bem conhecidas.

As observações referidas levaram alguns investigadores a tentar identificar alguns dos pontos mais passíveis de gerarem erros, de forma a evitá-los e a padronizar os procedimentos (21), aumentando a precisão das determinações por CF. Outros estudos foram realizados de forma a quantificar o erro inerente às medições efectuadas (22,23), estendendo as técnicas de colheita (24,25) para além da excisão cirúrgica e aumentando assim o universo dos doentes nos quais seria possível realizar CF, permitindo uma maior generalização dos resultados.

Neste estudo foram estudadas amostras não cirúrgicas, obtidas com intenção diagnóstica, e condicionadas a aspectos técnicos e éticos que doentes com carcinomas do pulmão, na sua maioria em

situações avançadas, frequentemente colocam. O material disponível para a técnica foi frequentemente insuficiente para a sua realização. Assim se explica a necessidade de mais de três anos de recrutamento para a obtenção de 93 doentes avaliáveis, quando no mesmo período, seriam elegíveis mais de 400. De facto, apesar do optimismo inicial baseado no estudo piloto (6), a taxa de casos que puderam ser avaliáveis não ultrapassou 25% dos potencialmente elegíveis. O tipo de material processado dependeu da escolha dos médicos que orientaram o diagnóstico do doente, sendo portanto, o mais eficaz para obter esse diagnóstico e não, para a eventual realização da CF. A possibilidade de no final do estudo existirem duas amostras diferentes em 23 doentes, colhidas na mesma altura e processáveis para CF, só resultou da necessidade diagnóstica de cada caso particular. Esta ocorrência e o facto de metodologicamente ter sido decidido processar todo o material disponível desde que suficiente para análise, permitiu estimar a concordância das avaliações, e a sua reprodutibilidade. Embora o critério de selecção dos casos que agora se analisam não tenha sido norteado pela metodologia aceite e aplicável a esta situação (aleatorização), poderão ser aceites como tendo sido uma escolha completamente aleatória e eventualmente cega, pois foi completamente alheia ao investigador e mesmo ao médico do doente.

Globalmente, os resultados apontam para uma significativa concordância entre as medições obtidas por CF, tanto para a mesma amostra como entre amostras diferentes. Na primeira parte do estudo foi avaliada a variação das medições intra-observador, verificando-se para todos os parâmetros estudados uma excelente concordância e reprodutibilidade. Pode concluir-se que os factores relacionados com o processamento das amostras não influenciaram de forma significativa os resultados obtidos e que o erro calculado não obrigou a qualquer mudança de classificação, em relação ao índice do ADN nem das populações diplóides e aneuplóides.

Na segunda parte do estudo utilizaram-se técnicas de diagnóstico diferentes para determinar o índice do

ADN, da população celular diplóide e aneuplóide. Embora a dispersão observada nas determinações dos picos aneuplóide e diplóide fosse maior que a observada quando a amostra foi a mesma, não houve influência significativa nos índices de ADN diplóide e aneuplóide, permitindo concluir por uma também boa concordância e uma boa reprodutibilidade.

Só em dois casos, em que se utilizou BAT e EB, foi encontrada, numa das avaliações, uma população aneuplóide, não identificada na outra. O reduzido número de células nas amostras, nestes dois casos, levou-nos a pensar que fenómenos dilucionais poderiam ter contribuído para a não identificação deste pico numa das amostras. A possibilidade de se tratar de um resultado relacionado com a heterogeneidade

tumoral, poderá constituir outra explicação para esta ocorrência.

O número reduzido de resultados obtidos da fase S, nestas amostras, impossibilitou a avaliação da concordância e reprodutibilidade das medições deste parâmetro.

A conclusão global, aponta para a exequibilidade da CF, utilizando amostras colhidas por BBR, EB e BAT, como aliás é referido por outros autores (23,24), permitindo estender estes estudos à grande maioria dos doentes com carcinoma pulmonar. Será possível avaliar se estes e outros parâmetros biológicos (26) obtidos por esta metodologia poderão, em associação com a avaliação clínica, contribuir para uma melhor orientação dos doentes com carcinoma do pulmão e permitir um melhor aconselhamento prognóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. SHANKEY VT, RABINOVITCH PS, BAGWELL B, BAUER KD, DUKE RE, HEDLEY DW, MAYALL BH, WHEELESS L. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472-477.
2. VINDELOV LL, CHRISTENSEN LJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA Analysis. *Cytometry* 1990; 7: 753-770.
3. ARIYOSILI I. Characteristics and problems of flow cytometric nuclear DNA content analysis in lung cancer using bronchoscopically obtained specimens. *Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi* 1992; 9: 1704-1710.
4. SHANKEY TV, RABINOVITCH PS et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14: 472-477.
5. JEANFAIVRE T, CHASSEVENT A, LARRA F, TUCHAIS E. Apport de la cytométrie en flux dans l'évaluation du pronostic des cancers bronchiques non à petites cellules. *Revue de la littérature. Bull Cancer* 1994; 81: 605-609.
6. HESPANHOL V, SANTOS AR, SILVEIRA P, AMENDOEIRA I, SANSONETTY F, MARQUES A. Determinação do conteúdo de ADN no carcinoma do pulmão. *Arquivos de Medicina* 1996; 4: 246-249.
7. BIANI JM, ALTMAN GD. Statistical methods for a assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986; 8: 307-310.
8. ANDERSON S, AUQUIER A, HAUCK WW, OAKES D, VANDAELE W & WEISEBERG HI. *Statistic methods for comparative studies*. John Wiley & Sons. New York 1980.
9. ARMITAGE P, BERRY G. *Statistical methods in medical research*, 2nd eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987.
10. BRADFORD HA. *Short Textbook of Medical Statistics*, 11th eds. Hodder & Stoughton, London 1984.
11. OLDHAM PD. *Mesurement in medicine: the interpretation of numerical data*. English Universities Press. London 1968.
12. BRITISH STANDARDS INSTRUCTION. *Precision of test methods I: Guide for determination and reproducibility for standard test method (BS 5497, part I)*. London BSI 1979.
13. KALLIONIEMI OP, JOENSUU H et al. Inter-laboratory comparison of DNA flow cytometry in interinstitutional analysis. *Cytometry (suppl)* 1991; 5: 46.
14. KALLIONIEMI OP, JOENSUU H, KLEMI P, KOIVULA T. Interlaboratory comparison of DNA flow cytometric results from paraffin-embedded breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 17: 59-61.
15. WHEELESS LL, COON JS, COX C, DEITCH AD, DEVERE WHITE RW, FRADET Y, KOSS LG, MELAMES MR,

CITOMETRIA DE FLUXO, CONCORDÂNCIA E REPRODUTIBILIDADE, COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLHEITA/V. ESPANHOL, I. AMENDOEIRA, F. SANSONNETTY, A. MARQUES

- O'CONNELL MJ, REEDER JE, WEINSTEIN RS, WERS-TO RP. Precision of DNA flow cytometry in interinstitutional analysis. *Cytometry* 1991; 12: 405-412.
16. SHANKEY TV, BADALAMENT R, BENSON M, CARROLL P, DEVERE WHITE RW, DUQUE R, HERMAN CJ. Inter-laboratory assesment of the reproductibility of flow cytometry DNA content analysis of archival tumor samples. *Cytometry (suppl)* 1991; 5: 56S.
17. JOENSUU H, KALLIONIEMI OP. Different opinions on classification of DNA histograms produced from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1993; 10: 711-717.
18. MAURO F, MODINI C, BIOTTI C, CICONETTI F, STIPA S. Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer: A 5-year study. *Cancer* 1987; 60: 844-851.
19. MIZOBUCHICHI K, FUJITA K et al. Detection of intratumoral DNA heterogeneity in primary lung cancer using a multiple sampling method. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1994; 10: 963-969.
20. CAREY FA, LAMB D, BIRD CC. Importance of sampling method in DNA analysis of lung cancer. *J Clin Pathol* 1990; 10: 820-823.
21. D'HAUT CJL, SYRATOS F et al. Quality control study by the French Cytometry Assotiation on FCM DNA content au S-phase fration (S %). *Association Francaise de cytometrie. Cytometry* 1996; 1: 32-39.
22. SARA A, NAGGAR AK. Intratumoral DNA content variability. A study of non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 1991; 3: 311-317.
23. HANEDA H, MYAMOTO H et al. Accuracy of bronchoscopic DNA content analysis of non small cell lung carcinoma. *J Surg Oncol* 1992; 3: 182-188.
24. BELANI CP. Introduction: International Symposium on Thoracic Malignancies. *Chest (suppl)* 1998; 113 :1S.
25. GREENBERGER JS, BAHRI S, JETT J, BELANI CKAL-LEND A, EPPERLY M. Considerations in optimizing radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Chest suppl.* 1998; 113: 46S-52S.
26. SHANKEY SE, SMITH CA, POLLICE A, LEVITT M, MAGOVERN JA WIECHMANN RJ, SILVERMAN J, SWEENEY L, LANDRENEAU RJ. Genetic evolutionary staging of early nonsmall cell lung cancer: P53 → HER-2/NEU → ras sequence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118 (2): 259-267.
-