REV PORTPNEUMOL VI (6): 607-617

ARTlGO ORIGINAUORIGINAL ARTICLE

Citometria de fluxo, concordancia e reprodutibilidade,.com
de diferentes metodos de colheita

Flow cytometry agreement and reproducibility, using different sampling methods

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

RESUMO

A do conteudo em ADN das celulas
neophisicas do carcinoma do pulmao, utilizando a
citometria de nuxo (CF), tern tido resultados dlspa-
res em aparentemente semelhantes.
Estas tern sido atribu.idas a erros, relacio-nadas tanto com o procedimento em si, como com o metodo de colheita das amostras.
Assim, as dificuldades na colhcita de material avaliavel para citometria de Ouxo e a heterogeneida-de das amostras processadas poderiam contribuir para uma menor fiabilidade dos resultados. Neste estudo foi determinado o conteudo em ADN por citometria de Ouxo (CF) em 93 doentes tendo sido possi'vel efectuar duas do conteudo em ADN em 47 dos 93 doentes. Em 24 casos, foi possivel processor por CF duas vezcs a mesma ampstra e em 23 processar duas amostras

para 00.08.29
Aceile para 00.1Ll6

Novembro/Dezembro 2000

ABSTRACT

The determination of the DNA content of the lung cancer cells using Row cytometry bas 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 thi., study the DNA content was detennined by flow cytometry in. 93 patients. In 47 out of 93 pati-ents was possible to do two Oow cytometric determi-nations 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 Oow cytometric determinations

Vol. VI N°6 607

REV!STA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA/ARTIGO ORIGINAL

difcrcotes, do mesmo tumor, colhidas na mesma
altura.
A valiou-se a concordancia das e a reprodutibilidadc do metodo nas duas Foi
ainda calcolada a dispcrsio dos valores obtidos para
cada parametro.
Verificou-sc uma excelente concordancia e rl!produtihilidade nas cfectuadas em ambos os grupos. No grupo em que foram avaliadas amos-tras diferentes, a nao foi de forma a alterar significativamente o calculo do indice de ADN. Concluiu-se que as metodologias de amostragem
e de processamento foram fiaveis. A utllizat;ao de

amostras de pequenas dime050es para CF e tiavel. E possivel determinar o contelido em ADN em docntes niio cirurgicos, utilizando pequenas amostras o que permitira e:\:pandir estes e outros parametros biologicos a doentes em que podem ter um significa-do ainda mais importante tanto na global como no progn6stico.

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

Palavras-chave: Carcinoma do pulmao; citometria de fluxo; concordfmcia e reprodutibilidade das

INTRODU<;AO

A variabilidade das efectuadas por qualquer tipo de medida obriga a tentar avaliar a exactidao dos valores obtidos, quantificar o erro inerente as medi9oes realizadas e apreciar a C'oncor-dancia dos procedimentos. E possfvel, por urn !ado, definir os limites do erro subjaceme a cada tipo de e por outro, veriticar se e utilizave1 uma ou
outra metodologia, sem que isso falseie os resultados. A revisao da Literatura (1-4) mostra que nao ha suficiente para avaliar a qualidade da
mediyao citometrica. Alem de toda a descriyao de natureza tecnica e da quantidade de celulas tumorais (em mlmero superior a 20% da amostra, se pretende calcular a percentagem de celulas.em fase de sfntese do ciclo celular), e necessaria definir a variabilidade das celulares dipl6ides e aneupl6ides. Torna-se, assim, dificil obter uma padronizac;ao de

608 Vol. VI N"6

and the reproducibility and rellablllty of the metho-dology were evaluated. Additionally was estimated the distribution of the each evaluation performed. We found an excellent and reproducibi-lity 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 cyto-metry methodologies were reliable and reproduci-ble. Using this methodology will be possible to determine DNA content and others DNA evaluations contributing to the management and global progno-sis of the great majority of lung cancer patients.

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

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

metodos que possa perrnitir uma melhor avaHac;ao do valor da citometria. A variabilidade dos resultados (1) e a quase inexistencia de estudos realizados nos estadios avan9ados da (5,6) tomam diffcil a aplicabilidade na clinica destes parametros.

Neste estudo, por condicionaJismos de natureza etica e tecnica, nem sempre foi possfvel utilizar o mesmo lipo de amostra para processamento por citometria de fluxo (CF). Sempre que existia material processavel por CF, em excesso, repetiu-se a detemli-
nacrao.

No fina] do estudo, foi possfvel obter vinte e qualm pares de feilas a mesma amostra e, vinte e tres pares de amostras diferentes do mesmo doente. Estas amostras foram colhidas simultanea-mente e foram constitufdas por produtos obtidos por biopsia bronquica, escovagem bronquica e/ou biopsia aspiraliva transtonicica.

Novembro/Dezembro 2000

CITOMETRJA DE FLUXO, CONCORDANCIA E REPRODUTffiiLIDADE, COM UTILIZAGAO DEDIFERENTES METODOS DE COLHEITA/Y. ESPANAOL.

OBJECTIVO

0 objective foi avaliar o erro e a concordancia das de CF entre dois fragmentos da mesma
amostra e entre duas amostras diferentes, do mesmo tumor, colhidas simultaneamente.

MATERIAL E METODOS

Este estudo foi realizado na sequencia de uma investiga9ao prospectiva mais alargada e estruturada, como objectivo de avaliar a importancia de alguns parametros clfnicos e biol6gicos no progn6stico e na estrategia terapeutica de doentes com cancro do pulmao. Ao Iongo de tres anos (1994-1996) foi possf vel efectuar 146 determi na90es de CF correspon-dentes a 93 doentes.
0 matelial foi obtido pela tecnica que, caso a caso, foi considerada mais eficaz para o dlagn6stico. As tecnicas utilizadas foram a biopsia bronquica (BBR) em 68 determina96es (47%), a escovagem bronquica (EB) em 27 casos (18%) e a biopsia aspirativa transto-racica (BAT) nas restantes 51 (35%) determina96es de CF. Nao foram inclufdas tres amostras: uma obtida por aspirado ganglionar e duas por lavagem bronqui-ca, inclufdas no estudo inlcial (6) por abandono destes· metodos de colheita.
Muitos doentes foram excluidos por insuticiencia de material, dado s6 ter sido processado o material excedentario, ap6s definido o diagn6stico citol6gi-co/histol6gico.
Esta metodologia motivou que fossem utilizadas amostras obtidas por tecnicas diferentes, podendo aumentar a variabilidade dos resultados obtidos. Tentou-se processar todo o material disponfvel, mesmo que a amostra fosse a mesma. Sempre que uma amostra permitia dois processamentos, repetiu-se a determina9ao. Esta duplica9ao foi possfvel em vinte e quatro casos. Em vinte e tres foram colhi-das, na mesma altura, duas amostras diferentes (p.ex.: BBR e EB, BBR e BAT) do mesmo tumor, tambern processadas em simultaneo.

Novembro/Dezembro 2000

I. AMENDOEIRA, F. SANSONNETIY, A. MARQUES

0 processamento das amostras (6) dependeu da ttknica utilizada na sua colheita. Quando os fragmen-tos erarn obtidos por BBR, foi previamente realizado urn teste de de malignidade nesse rnesmo fragmento. A tecnlca utilizada nesse rastreio de malignidade foi o "imprint" (6) em lamina, sendo rejeitados todos os fragmentos em que nao foram identificadas celulas neophisicas no "imprint". Quan-do se tratou de EB ou BAT, a tecnica de rastreio de malignidade foi a citologja. Depois de seleccionadas, as amostras forarn criopreservadas numa solu9ao de dirnetilsulf6xido a II%. A CF foi reallzada utilizando urn cit6metro de fluxo Coulter Epics C, sendo o material processado apos tratamento adequado (6). A deteonina9ao do fndice de ADN (ID) e da de celulas em fase-S foi obtida utilizando "software" especffico (Multicycle, Phoenix Flow Systems) (6). Esta de medi96es por CF perrnitiu testar a concorctancia e a variabilidade dos resultados obtidos, na mesma e em diferentes amostras do rnesmo doente.
0 estudo estatfstico baseou-se na metodologia aconselhada por Bland e AJtman (7), quando se pretendem comparar novas tecnicas de medi9ao de variaveis clfnicas. Neste estudo, pretende-se provar que a tecnica de leitura e reprodutfvel e que os valores obtidos pelo processamento das diferentes amostras do mesmo doente sao concordances, podendo ser utmzados indistintamente sem originar diferen9as significativas de classificayao nos parametros medi-dos,pela CF.
Neste trabalho, a concordancia foi avaliada pela correlayao entre a e a media das duas avalia-95es efectuadas (8-1 t). A dispersao dos valores obtidos nas1 duas determina96es emparelhadas foi caJculada estimando o desvio padrao eo intervalo de confian9a de 95% dos val ores (10,11). Adicionalmen-te, foi testada a hip6tese da entre as duas determina96es ser significativamente diferente de zero (11). Utilizou-se o "teste t" ernparelhado e de-semparelhado, respectlvamente, para a mesma amos-tra e arnostras colhidas por metodos diferentes. A rejei9ao desta hip6tese e a dispersao de 95% dos

Vol. YLW6 609

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGINARTIGO ORIGINAL

valores das diferen9as ipferior a dois desvios padroes
da media das determina9oes permiliu aceitar como reprodutfveis as duas (12).

RESULTADOS

Concordancia de leituras consecutivas
da mesma amostra

Em vinte e quatro doentes com carcinoma de celulas nao pequenas do pulmao foi possfvel realizar duas determinac;oes da mesma amostra. Foi possfvel obter uma dupla do pico da referencia intema (conteudo em ADN dos nucleos de eritr6citos de galinha que permite comparativamente determinar o conteudo em ADN das celulas neoph1sicas), do pico dipl6ide (PD), fndice de ADN dipl6ide (JADNd) e aneupl6ide (lAONa). Nao foi possfvel, na maior parte dos doentes, realizar em numero suficiente detenni-na9oes emparelhadas, do valor da fracc;ao de celulas em fase S.

Referenda Interna

Compararam-se vinle e quatro pares de me<.li96es da referencia intema (nucleos de eritr6citos de galinha). Verificou-se que a dispersao (Quadro I) das medi-9oes da Rl e da ordem das centesimas, tanto no que se

refere ao dilculo do desvio padrao como em
ao intervale de confian9a de 95% dos valores. Assim, 95% dos valores da RI, encontram-se no intervalo 0,3291 e 0,3544, o que representa urn erro aceitavel para a medi9ao. Este erro poden1 ser observado no grat'ico (Fig.l) onde se comparam a media da refe-renda interna (X) com a diferen9a entre cada duas observa9oes emparelhadas (Y).

Referencia interna

0,05 •

o -t---__,,.... ... ..,, ...-oa. r----. 0,1 l

· 0,05 0,2 0,4
· 0 1
· 0,,.5

- 0,2 •
(R11+RI2)/2

Fig. 1- Variabilidadc da refcrcncia intema

0,6

S6 existe uma determina9ao com dispersao signifi-cativa em rela9ao a todas as outras, o que revela a excelente concordancia do metodo utilizado nas duas determina9oes (Fig. l).
Adjcionalmente foi possfvel detenninar a reprodu-tibiUdade da tecnica testando a hip6tese da media das diferem;as ser ou nao significativamente diferente de zero, valor este, considerado como limite para que tendem duas media96es reprodutiveis (Quadro 11).

QUADR01
Yariabilidade das da Rl
Referenda Jnterna

Media ref. !merna= 0,3454

Media = -0,0051 Variabilidade da medja das diferem;as

Desvio padrao = 0.0347 -0,005 I ± (2 X 0,0347) = -0,0746/0,0643

I.C. 95%'=0.0142 -0,0051 ± 0,0142 = -0,0193/0,0090 d•spersao de 95% das difcrcn9as da Rl

610 Vol. V£ N° 6 Novembro!Dezembro 2000

CITOMETRIA DE FLUXO, CONCORDANCIA E REPRODUTIBil.IDADE, COM UTlLIZA<;AO DE DIFERENTES METODOS DECOLHEITNV. ESPANHOL,
I. AMENDOEIRA, F. SANSONNEITY, A. MARQUES

QUADRO li
da hip6tese das entre as medias du Rl serem signilicativamente diferentes de zero, p=0,4778
1- Test: Duas medias emparelhadas

Media
3 Obs.
Hip6tcse
G.L*
p
• graus de liberdade

RII

0,3430
23

Rl2

0,3483
23
RII-RI2=0
22
0.4778

Pico dipl6ide e indice de ADN dipl6ide e aneupl6ide

Foram efectuadas duas medir;oes do pica dipl6ide, fndice de ADN dipl6ide e fndice de ADN aneupl6ide. A correlactao entre as de cada par de deter-minar;oes e a sua media nao foi significativa para cada urn dos tres parfunetros esLudados (Figs. 2, 3 e 4), sugerindo uma elevada concordancia emre elas. Apesar da dispersao, ser maior, na ava liayao do pica dipl6ide, os valores nao intetferem significativa-mente no calculo do fndice de ADN (lADN), nao deterrninando altera9ao significativa na classificac;ao da ploidia do ADN. Calculando a variabilidade do IADN da popular;ao dipl6ide, verificamos que em 95% das determinact5es, os valores obtidos oscilam entre 0,98 e 0,96·, enquanto os valores do ADN aneu-pl6ide oscilam enlre 1,594 e I ,628··. A reprodutibili-

Plco dlpl61de

:l •

. ,_., • ...• .

a..

-wJ • 50 100 150 Ci

a..

-40 •
(PD1+PD2)/2

Fig. 2- entre medi96es do pi co dipl6ide

• do IADNd I.C. 95%
"''" media do lAONa± I. C. 95%

Novembro/Dezembro 2000

indice ADN
dipl6ide

0,15

>;J • i5 0,1
* 0,05 '0

z

·4: 0

5 0

- 0,05 (0,5 1 • 1,5
(IA0Nd1 +·IA 0 Nd2)/2

Fig. 3- Correlavao entre avaliavoes do fndice de ADN

lndice de ADN
aneup16ide

1·

•

., •• ... ·*
• -0,2 3
- 0,4
(IADNa111ADNa2)/2

Fig. 4 - cnLre nvalim;ocs do fndicc de ADN

dade das determinar;oes foi tcstada pela metodologia ja referida, verificando-se que para todos os parame-lros estudados nao foram encontradas

sign i ficati vas.
Em nenhuma das variaveis, a diferencta entre as mediactoes: foi significalivamente diferentc de zero, podendo ser aceite que exista reprodutibilidade, entre as deLerminact5es.

Concordancia de leituras consccutivas de amostras

Diferentes

Nos 23 doentes em que foi possfvel obter duas amostras diferentes, calculou-se a concordancia, a variabilidade e a reprodulibilidade das determinact5es de CF. Foi exclufda a Rl, pois o procedimento foi

Vol. VI N"6 6 11

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGWARTIGO ORIGINAL

612

QUADROill
C<ilculo da variabilidadc de PD, IADNd e lAONa

Pico Dipl6ide

PD = 68,282

MMia diferenc;as = -0.17 Variabilidade da mMia das difcren9As

Desvio padrao = 8.524 -0, 17 ± (2 X 8,524) = 16,878/-17,218

I.C. 95%= 3.483 -0,17 ± 3.483 = 3,3 13/-3,653

fndice ADN dipl6ide

M6dia !ADNd = 0,969

diferenc;as = 0,002 VariabiUdadc da das

Desvio padriio = 0,029 0,002 ± (2 X 0,029) = 0,058/ -0,057

I,C.95%= 0,012 0,002 ± 0,012 = 0,014/-0,01

fndice ADN aneupl6ide

Media !ADNd = 1,629

Media diferenc;as = 0.009 Variabilidade da media das

Desvio padrao = 0,108 0,()()9 ± (2 X 0,1 08) : 0.225/-0,215

I,C. 95% = 0,044 0,009 ± 0,044 = 0.053/-0,035

QUADRO IV
Rejeic;ao da hip6tese das diferenc;as entre as do PD,lADNa e !ADNd screm significativamente
difcrentcs de zero, p=0.92, p=0,77 e p=0,73
t-Test: Duas amostras emparelhadas

PDJ PD2 lAONa I IADNa2 IADNdl IADNdl

M6dia 68,19 68,36 1,624 1,615 1.018 1,011
Obs. 24 24 Jl II 13 13

; Hip6tese 0 0 0
G. L. 23 23 JO 10 II II
p 0,92 0,11 0,73 . en1re cada par de avalia,.oos igual a zero

Vol. VI W6 Novembro/Dezcmbro 2000

CITOMETRIA DE FLUXO, CONCORDANCIA E REPRODUTffiiLIDADE, COM UTILIZA<";AO DEDIFERENTES METODOS DECOLHEITAN. ESPANROL,
I. AMENDOEIRA, F. SANSONNETTY, A. MARQUES

identico ao calculado para a mesma amostra. Obser-vamos, em rela9ao as tres variaveis PD, lADNd e lADNa, diferentes graus de concordancia que poderao ser avaliados nos Quadros e Graficos que se apresen-tarn (Figs. 5-7).
Como se pode verificar, apesar da variabilidade ser superior a observada para a mesma amostra, a concor-dancia dos valores dos Indices de ADN da popula9ao celuJar dipl6ide e aneupl6ide e elevada. Assim, considerando o fndice do ADN da popula9ao celular dipl6ide, verificarnos que 95% dos valores se encon-tram no intervalo 0,95 e 1,03. (Quadro Y). Poden} considerar-se que, na grande maioria dos casos, a mudan9a da amostra olio alterou a tendencia dos valores do IADNd. 0 mesmo se observa em rela9ao ao lAONa. cujos valores poderao oscilar entree I ,505 e 1 ,609 .. , o que tam bern nao alterara a decisao acerca da ploidia do ADN.
A reproduLibiJidade das medi9oes e excelente, o que e comprovado pelo facto da diferen9a entre as medias de am bas as determinay6es, para cada parfune-tro estudado, nao ser significativamente diferente de zero (Quadro Vl).
E de referir que em do is casos se verificou que nu-ma das duas medi9oes por CF foi encontrado um pico aneup16ide donde resu]tou uma altera9ao na classifi-cayao da ploidia do ADN. Estas situa9oes verifica-ram-se em dois casos, diagnosticados por BAT; embora nao sendo de excluir a possfvel correncia de heterogeneidade tumoral, problemas associados a ma qualidade da amostras obtidas por este metodo pode-riam tambem ter influenciado o resultado.

• media do IADNd ± I.C. 95%
*" do lAONa± I. C. 95%

Novembro/Dezembro 2000

P lc;o d lplolde

30
20
•

N 10
0 • •
0

0 50..,-..,-:,

Q. 15 0 - I 0 • " -20 ••

- 30

(PO 1 +P 0 2)/2

Fig. 5- Dispersao dos valores do PD nas duas amostras

indice de ADN
dipl6ide

0,2 .&it

z 0 . -.

- 0,2 0,5 1,5 j
0 -0,4 ,g.
- 0,6
(IADNd 1 +lAD Nd2)/2

Fig. 6- Dispersao dos val ores do Cndice de ADN da celular dipl6ide

lndice de ADN

0,3

aneupl6ide

<'I

.. • z 0,2 a
0,1 • .... .. • z
a ..... 0 • """ .

- 0,1 b 1 2 3
(IADNa1 +IADNa2)/2

Fig. 7-Dispersao dos valores do ADN da aneup16ide

Vol. VIW6 613

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA/ARTIGO ORIGINAL

614

QUADROV
Variabilidade do PO, lAONd e lADNa em amostras diferentes do mesmo doente colhidas
nu mcsma altura

Pico Dipl6idc

Media PD= 68,774

Media = 0,0304 Variabilidadc da media das

Oesvio padrao = 12,704 0.03 ± (2 X 12,704) = 25,438/-25,026

I.C.95%= 5,191 0.03 ± 5.191 = 5,221/ -3,653

lndice ADN djpJ6ide

Media lADNd = 1.011

Media diferen9as = -0,0247 Variabilidadc da media das diferen\aS

Oesvio padrao = 0,116 -0,02 ± (2 X 0, 116) = 0,229/ -0,234

I.C. 95% = 0.047 -0,02 ± 0,047 = 0,027 I -0,067

fndice ADN ancupl6ide

Media lAONa= 1,523

Media = 0,067 Variabilidade da media das dlferen9as

Desvio pndriio = 0,095 0,067 ± (2 X 0,095) = 0,177/-0,183

I.C. 95%= 0,039 0,039 ± 0,047 = 0,086/-0,008

QUADROVI
Rcjei\ao da hip6tcsc das entre as medias do PD, lAONa c IADNd serem signillc:uivamcntc diferentes c.le zero, p=0.99. p=O,S9 c p=Q,31
t-Test: amostras c.lcsemparelhac.lns

POl PD2 IADNdl IAONd2 lAONa I lAONa!

Media 68,78 68,75 0,99 1,02 1.512 1,6 1
3 Obs. 3 23 12 12 9 II
Hip6tese 0 0 0
G. L. 22 II 10
p 0,99 0,31 0,59
.

entre cada par de avaJi:v;&s igual n zero

Vol. VI N• 6 Novembro!Oezembro 2000

CITOMETRIA DE FLUXO, CONCORDANCIA E REPRODUTIBILIDADE, COM UTILIZA<;AO DE DIFERENTES METOOOS DE COLHEIT AIV. ESPANHOL,
I. AMENOOEIRA, F. SANSONNETIY, A. MARQUES

DISCUSSAO

Uma das grandes dificuldades inerentes a avalia-do conteudo em ADN das celulas e analise do ciclo celular, e a dos resultados obtidos. As dificuldades encontradas relacionam-se com uma

variedade de problemas, desde a de procedimentos entre OS varios laborat6rios (I), ate as discrepancias inerentes a erros de estrutura dos trabalhos ja realizados. A de termos usados ern citogenetica (hipodipl6ide, peritetrapl6ide, ...) sao posteriorrnente relacionados com outros parfunetros (p.ex., sobrevida) obtendo-se associa96es dificilmente reprodutfveis. Sempre que possfvel devera ser usada a do conteudo de ADN utilizando o

(ndice de ADN, bern como, a percentagem de celulas ern fase S, sempre que for efectuada a analise do ciclo celular (13-16).
Urn elevado numero de tern vindo a chamar a aten9ao para a heterogeneidade tumoral como mais urn factor para elevar as discrepancias observadas nos diferentes estudos publicados com rnetodologias aparentemente sobreponfveis (L 7-20). Esta situa9ao podera dificultar a interpreta9ao dos resultados,levar a erros de classificac;ao e invalidar as associa9oes que se pretendem invesligar, nomeada-mente, o interesse complementar destes pararnelros em rela9ao a variaveis clinicas bern conhecidas.
As referidas levaram alguns investi-gadores a tentar identificar alguns dos pontos mais passiveis de gerarem erros, de forma a evita-los e a padronizar os procedimentos (21), aumentando a precisao das por CF. Outros estudos foram reaUzados de forma a quantificar o erro ineren-te as medic;oes efectuadas (22,23), estendendo as tecnicas de colheita (24,25) para alem da excisao cirurgica e aumentando assim o un.iverso dos doentes nos quais seria possfvel realizar CF, perm.itindo uma maior generaliza9ao dos resultados.
Neste escudo foram estudadas aniostras nao cirurgicas, obtidas com intenc;ao diagn6stica, e condicionadas a aspectos Ltknicos e elicos que doen-tes com carcinomas do pulmao, na sua maioria ern

Novembro/Dezembro 2000

frequentemente colocam. 0
material disponfvel para a recnica foi frequentemente insuficiente para a sua realizacrao. Assim se ex plica a necessidade de mais de tees anos de recrutamento para a de 93 doentes avaliaveis, quando no mesrno periodo, seriam elegfveis mais de 400. De facto, apesar do optimismo inicial baseado no escudo piloto (6), a taxa de casos que puderam ser avaliaveis nao ultrapassou 25% dos potencial mente elegiveis. 0 tipo de material processado dependeu da escolha dos medicos que orientaram 0 diagn6stico do doente, sendo portanto, o mais eficaz para obter esse diagn6s-tico e nao, para a eventual realiza9ao da CF. A possi-bilidade de no final do estudo existirem duas amostras diferentes em 23 doentes, colhldas na mesma altura e processaveis para CF, s6 resultou da necessidade diagn6stica de cada caso particular. Esta ocorrencia e o facto de metodologicamente ter sido decidido processar todo o material disponfvel desde que suficiente para analise, permitiu estimar a concordan-cia das avaliacr5es, e a sua reprodutibilidade. Embora o criteria de dos casas que agora se analisam nao tenha sido norteado pela metodologia aceite e aplicavel a esta situar;ao (aleatoriza9ao), poderao ser aceites como tendo sido uma escolha completamente aleat6ria e eventualmente cega, pois foi completa-mente alheia ao investigador e mesmo ao medico do doente.

Globalmente, os resultados apontam para uma significativa concordancia entre as medi96es obtidas por CF, tanto para a mesma amostra como entre amostras diferentes. Na primeira parte do escudo foi avaUada a varia9ao das medi9oes intra-observador, verificando-se para todos os parfunetros estudados uma excelente concorctancia e reprodutibilidade. Pode concluir-se que os factores relacionados com o processamento das amostras nao influenciaram de forma significativa os resultados obtidos e que o erro calculado nao obrigou a qualquer mudaor;a de classi-ficac;ao, em relac;ao ao fndice do ADN nem das popu-Iar;oes dip16ides e aneupl6ides.
Na segunda parte do estudo utilizaram-se tecnicas de diagn6stico diferentes para determinar o indice do

Vol. VIN"6 615

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA/ARTIGO OR1GINAL

ADN, da celular dipl6ide e aneupl6ide.
Em bora a dispersao observada nas determinayees dos
picas aneupl6ide e dipT6ide fosse maior que a obser-
vada quando a amostra foi a mesma, nao houve influencia significativa nos (ndices de ADN dipl6ide
e aneupl6ide, pennitindo concluir por uma tambem boa concordancia e uma boa reprodutibilidade.
S6 em dois casas, em que se utilizou BATe .EB, foi encontrada, numa das uma populayao aneupl6ide, nao identificada na outra. 0 reduzido numero de celulas nas amostras, nestes dois casos, levou-nos a pensar que fen6menos dilucionais pode-riam ter contribufdo para a nao identifica9ao deste pica numa das amostras. A possibilidade de se tratar de urn resu1tado relacionado com a heterogeneidade

BIDLIOGRAFIA

I. SHANKEY VT, RABlNOVITCH 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 U. A review of tchniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of melbods designed for routine clinical flow cytome-tricDNA Analysis. Cytometry 1990; 7:753-770.
3. ARIYOSILII. Characteristics and problems of flow cytome-tric nuclear DNA content analysis in lung cancer using bronchoscopically obtained speciments. Nippon-Kyobu-·Shikkan-Gakkai-Zasshi 1992; 9: 1704-1710.
4. SHANKEY TV, RAB1NOVJTCH 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 Ia cytornetrie en flux dans revaluation du prognostic des cancers bronchiqus non tl petites cellules. Revue de Ia literature. Bull Cancer 1994; 81: 605-609.
6. HESPANHOL V, SANTOS AR, SILVEIRA P. AMENDOE-IRA l, SANSONElTY F, MARQUES A. Dctcnninayao do contcudo de ADN no carcinoma do pulmlio. Arquivos de Medicina 1996; 4: 246-249.
7. BlAND JM, ALTMAN GD. Statistical methods for a asses-

616 Vol. VI W6

tumoral, poden1 constituir outra explica9ao para esta ocorrencia.
0 numero reduzido de resultados obtidos da fase S, nestas amostras, impossibilitou a avalia9ao da concordancia e reprodutibmdade das mediy5es deste parametro.
A conclusao global, aponta para a exequibilidade da CF, utilizando amostras colhidas por BBR, EB e BAT, como alias e referido por outros auto res (23.24), permitindo estender estes estudos a grande maioria dos doentes com carcinoma pulmonar. Sera possfvel avaliar se estes e outros parametros bio16g1cos (26) obtidos por esta metodoJogia poderao, em
com a avaliayiio clfnica, contribuir para melhor orientayao dos doentes com carcinoma do pulrnao e permitir urn melhor aconselhamento progn6stico.

sing agreement between two methods of clinical measure-ment. The Lancel1986; 8: 307-310.
8. ANDERSON S, AUQUlER A, HAUCK WW, OAKES D, VANDAELE W & WEISEBERG Hl. Statistic methods for comparative sudies. John Wiley & Sons. New York 1980.
9. ARMITAGE P, BERRY G. Statistical methods in medical research, 2"" eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987.
10. BRADFORD HA. Short Textbook of Medical Statistics, ll1

h

eds. Hodder & Stoughton, London 1984.
II. OLDHAM PD. Mesurement in medicine: the interpretation of numerical data. English Universities Press. London 1968.
12. BRITlSH STANDARDS INSTRUCTION. Precision of lest methods 1: Guide for determination and reproducibility for standard test method (BS 5497, part n. London BSI 1979.
13. KALUONIEMI OP, JOENSUU H et al. inter-laboratory comparison of DNA flow cytometry in interinstitutional analysis. Cytometry (suppl) 1991; 5: 46.
14. KALLIONIEMl OP, JOENSUU H, KLEMl 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, DEVE-RE WHITE RW, FRADET Y, KOSS LG, MELAMES MR,

Novembro/Dezembro 2000

CITOMETRIA DE FLUXO, CONCORDANCIA E REPRODUTIBILIDADE, COM lJTILIZA<;AO DE DlFERENTES METODOS DECOLHEITAN. ESPANHOL,
I. AMENDOEIRA, F. SANSONNETrY, A. MARQUES

O'CONNELL MJ, REEDER JE, WEINSTEIN RS, WERS-TO RP. Precision of DNA flow cytometry in interinstutional analysis. Cytometry 1991; 12: 405-412.
16. SHANKEY TV, BADALAMENT R. BENSON M, CAR-ROLL P, DEVERE WHITE RW,,DUQUE R, HERMAN CJ. Inter-laboratory assesscment of the rcproductibility of flow cytometryc DNA content analysis of archival tumor samples. Cytometry (suppl) 1991; 5: 56S.
17. JOENSUU R, KALLIONIEMJ OP. Differents opinions on classification of DNA hjstograms produced from paraffin-embedded tissue. Cytometry 1993; 10:711-717.
18. MAURO F, MODINI C, BIOTTI C, CICCONETTI F, STlPA S. Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer: A 5-year study. Cancer 1987; 60: 844-851.
19. MIZOBUCHlCHI K, FUJJTA Ketal. Detection of intratu-moral 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.

Novembro/Dezembro 2000

21. D'HA UT CJL, SYRA TOS 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. Intraturnoral DNA content variabi-lity. A study of non-small cell lung cancer. Am J Clin Pathol 1991; 3:311-317.
23. HANEDA H. MY AMOTO H et al. Accuracy of bronohosco-pic 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 :IS.
25. GREENBERGER JS, BAHRJ S, JEIT J, BELANT CKA-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, SIL YERMAN 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.

617