

## Estudo prospectivo de derrames pleurais através da análise de ploidia do DNA por citometria de fluxo\*

GIULIANO BORILE<sup>1</sup>, LUCIANO DA SILVA SELISTRE<sup>1</sup>, SAMIR ABU EL HAJE<sup>2</sup>, LUIZ JAIME TELLEZ<sup>2</sup>, JOÃO CARLOS PROLLA<sup>3</sup>, JORGE NEUMANN<sup>4</sup>, HELOISA SPORLEDER<sup>5</sup>, JOSÉ DE JESUS PEIXOTO CAMARGO<sup>6</sup>, JOSÉ CARLOS FELICETTI<sup>7</sup>, PAULO FRANCISCO GUERREIRO CARDOSO<sup>6</sup>

**Objetivos:** Avaliar prospectivamente derrames pleurais benignos e malignos através de comparação dos resultados da citopatologia convencional com a ploidia de DNA analisada por citometria de fluxo com o objetivo de esclarecer o valor desta última na diferenciação entre derrames benignos e malignos. **Casuística e métodos:** 26 amostras de derrames pleurais de pacientes adultos foram colhidas por toracocentese e os líquidos pleurais analisados através de citopatologia convencional e análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo. O diagnóstico etiológico foi confirmado por exame anatomopatológico de biópsias pleurais em todos os casos. Dez amostras foram excluídas por problemas técnicos, restando 16 para análise. **Resultados:** Havia 13 derrames malignos e 3 benignos. A citopatologia revelou 9 exames positivos para a malignidade e 7 benignos (4 falso-negativos). A citometria de fluxo revelou conteúdo de DNA euploide nos 3 derrames benignos (valor preditivo positivo e especificidade de 100%) e em 8 derrames malignos (sensibilidade de 38,4%, valor preditivo negativo de 27,2%). A citopatologia revelou especificidade de 100%, sensibilidade de 69,2%, valores preditivos positivo de 100% e negativo de 42,8%, respectivamente. **Conclusões:** Na diferenciação entre derrames benignos e malignos, a baixa sensibilidade e o valor preditivo negativo da citometria de fluxo em relação à citopatologia convencional nesta amostra limitaram a utilidade do método ao achado da presença de conteúdo de DNA euploide em derrames benignos. (*J Pneumol* 1999;25(3):153-158)

### *A prospective study of pleural effusions through analysis of DNA ploidy by flow cytometry*

*This is a prospective study of benign and malignant pleural effusions carried out to determine the diagnostic yield of standard cytopathology compared to findings of DNA ploidy obtained by flow cytometry. Twenty-six samples of pleural effusion obtained by thoracocentesis were analyzed by cytopathology and flow cytometry. Final diagnosis was confirmed in all instances by histopathology of pleural biopsies. Ten samples were excluded from the analysis due to technical reasons, and the remaining 16 were used in the study. There were 13 malignant and 3 benign pleural effusions. Cytopathology revealed 9 malignant effusions and 7 benign effusions (4 false negatives). Flow cytometry findings have shown euploid DNA content in all 3 benign effusions (positive predictive value and specificity of 100%) and in 8 malignant effusions (positive value and specificity of 100%) and in 8 malignant effusions (sensitivity of 38.4% and negative predictive value of 27.2%). Cytopathology showed specificity of 100%, sensitivity of 69.2%, and positive and negative predictive values of 100% and 42.8%, respectively. The authors concluded that in this study the low sensitivity and negative value of flow cytometry in comparison to conventional cytopathology have limited the usefulness of flow cytometry to the finding of euploid DNA contents in benign pleural effusions.*

\* Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia Torácica do Pavilhão Pereira Filho e Laboratório de Transplantes da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, com recursos fornecidos pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

1. Estudante de Medicina e bolsista do CNPq, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.
2. Médico residente, Departamento de Cirurgia Torácica, Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.
3. Professor titular, Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
4. Chefe do Laboratório de Imunologia de Transplantes, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

5. Bioquímica do Laboratório de Imunologia de Transplantes, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

6. Professor Adjunto, Departamento de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre.

7. Professor Assistente, Departamento de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

*Endereço para correspondência* – Paulo F. Guerreiro Cardoso, Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa, Rua Prof. Annes Dias, 285, 1º andar – 90020-090 – Porto Alegre, RS. Tel/fax: (051) 227-3909, 228-2510; E-mail: cardoso@santacasa.tche.br

**Recebido para publicação em 28/12/98. Reapresentado em 10/3/99. Aprovado, após revisão, em 21/4/99.**

**Descritores** – Citometria de fluxo. Citopatologia. Ploidia de DNA. Derrame pleural.

**Key words** – Flow cytometry. Cytopathology. DNA ploidy. Pleural effusion.

**Sigla utilizada neste trabalho**

PI – Iodeto de propídio

## INTRODUÇÃO

Os derrames pleurais permanecem dentre as entidades mais comumente encontradas na prática da cirurgia torácica e pneumologia. Os métodos de investigação diagnóstica estão consolidados e incluem, além da anamnese, exame físico e radiologia, a toracocentese com análise bioquímica, bacteriológica, micológica e citopatológica do líquido. A biópsia pleural, seja por agulha, ou dirigida por via toracoscópica, situa-se dentre os métodos mais sensíveis para o diagnóstico etiológico do derrame pleural. Os derrames pleurais neoplásicos estão entre as formas mais comuns de derrames exsudativos encontrados na prática clínica, representando entre 44% e 77% dos casos<sup>(1,2)</sup>. Nesse particular, a análise citopatológica do líquido pleural desempenha papel fundamental no diagnóstico; entretanto, a positividade da citopatologia para neoplasia pode variar entre 40% e 87% dos casos<sup>(3)</sup>. Essa variabilidade depende da natureza e localização do tumor primário, bem como da qualidade da amostra obtida e experiência do citopatologista. Portanto, mesmo em condições ideais, haverá derrames neoplásicos que não serão diagnosticados pela citopatologia. Vários métodos complementares têm sido propostos para aumentar a acurácia diagnóstica no caso dos derrames neoplásicos. Dentre esses, a análise da ploidia de DNA através da citometria de fluxo tem sido considerada como método complementar na diferenciação entre derrames benignos e malignos<sup>(4)</sup>, uma vez que permite rápida e precisa avaliação quantitativa de grande número de células tumorais, através de índices que medem o conteúdo de DNA intracelular. A utilização desse método como adjuvante da citopatologia visa aumentar a acurácia diagnóstica, sobretudo nos casos falso-positivos ou falso-negativos.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar prospectivamente uma seqüência de derrames pleurais malignos e benignos, comparando-se os achados da citopatologia convencional com a citometria de fluxo, usando-se a histopatologia das biópsias pleurais como padrão áureo, no intento de esclarecer o valor diagnóstico da citometria de fluxo no que tange ao conteúdo de DNA intracelular no líquido pleural.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 26 derrames pleurais de diversas etiologias, obtidos de pacientes adultos de ambos os sexos, idade média de 43 anos, num período de 24 meses (entre 8/95 e 7/97). Devido à heterogeneidade dos métodos de conservação do material, foram excluídas dez amostras que haviam

sido testadas a fresco no mesmo dia, pois os tempos de processamento diferiram em várias horas, causando alterações significativas da morfologia celular. Portanto, foram incluídas nesta análise apenas as 16 amostras congeladas em nitrogênio líquido e preservadas a -80 C. O material foi obtido por toracocentese, anticoagulado com heparina (1.000U/L), rotulado e dividido para citopatologia e citometria de fluxo. O processamento seguiu o protocolo da Becton-Dickinson (*Cycle Test Plus DNA Reagent Kit*). As amostras e padrões internos obtidos para a citometria de fluxo não analisadas no mesmo dia foram conservados a -80 C, uma vez que se tem demonstrado que as amostras podem ser conservadas dessa maneira até por cinco anos, sem alterar seus histogramas de DNA<sup>(5)</sup>. O líquido pleural foi centrifugado a 2.000 rotações/minuto em centrífuga clínica por dez minutos à temperatura ambiente. A preparação da suspensão de células foi feita em tampão citrato (citrato de sódio, sucrose e dimetilsulfóxido) e congelada em tubos de polipropileno (38 x 12,5mm), através da imersão desta mistura em gelo seco e etanol (-80 C). Antes do processamento, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 C. Para cada amostra, três tubos foram assim preparados: um tubo com padrão interno contendo  $0,5 \times 10^6$  linfócitos do sangue periférico; um tubo com a suspensão de células do líquido pleural ( $0,5 \times 10^6$ ) em tampão citrato acrescido de  $0,25 \times 10^6$  de linfócitos normais do sangue periférico; um tubo com uma alíquota de  $0,5 \times 10^6$  células de líquido pleural. Todos os tubos foram então incubados com tampão contendo tripsina e espermina, seguido de incubação com inibidor da tripsina e ribonuclease A e, posteriormente, com iodeto de propídio. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo *B-D Facs Scan* e analisadas nos programas *Cell Fit* e *Multicycle AV*. Os histogramas obtidos demonstraram as populações celulares analisadas diferenciando populações euplóides de aneuplóides pela presença de mais de um pico e sua relação com o índice de DNA. Este pode ser representado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{taxa de G0/G1 da população celular examinada}}{\text{taxa de G0/G1 da população diplóide de referência}}$$

As Figuras 1 e 2 representam os histogramas de populações celulares euplóide e aneuplóide, respectivamente.

A histopatologia da pleura foi obtida em todos os casos e o diagnóstico etiológico esclarecido com base na anatomopatologia e demais evidências clínicas e exames complementares.

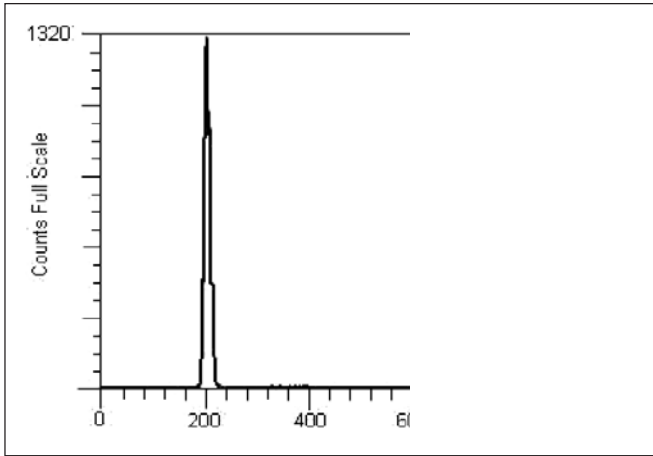


Figura 1 – Histograma representando população celular com conteúdo de DNA euplóide

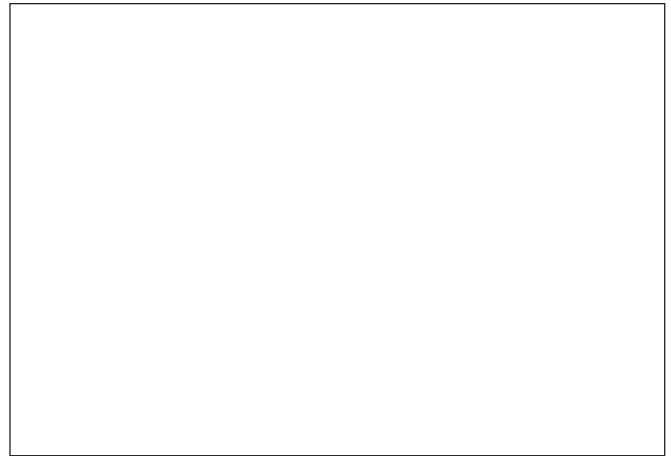
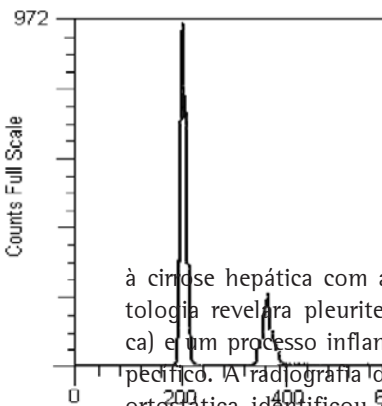


Figura 2 – Histograma representando população celular com conteúdo de DNA aneuplóide

Análise estatística computadorizada dos resultados obtidos no citômetro foi realizada automaticamente pelo programa *Verify* (Software House Inc., EUA). Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo foram calculados para citopatologia e citometria de fluxo com ploidia de DNA.

sugestivas de mesotelioma, impressão esta que não se confirmou após nova coleta e reanálise citopatológica, que afirmou o diagnóstico de benignidade. As mesmas amostras analisadas por citometria de fluxo revelaram conteúdo euplóide. Quanto aos métodos diagnósticos, dentre os 16 pacientes submetidos a citopatologia convencional, 9 apresentaram exame citopatológico positivo para células malignas e 7 foram negativos. Nesse mesmo grupo, as amostras analisadas pela citometria de fluxo revelaram 5 aneuploidias e 11 apresentaram-se euplóides. Os achados da citopatologia, biópsias e citometria estão descritos na Tabela 1. Nos três derrames não neoplásicos, a citometria de fluxo demonstrou conteúdo de DNA euplóide em todos. Na detecção de neoplasia, a sensibilidade e especificidade, bem como valores preditivos



es estudados, 13 apresentavam neohistopatologia das biópsias pleurais, outros locais (e.g., linfonodos e outros). Os três derrames não neoplásicos tuberculose, um derrame secundário

à cirrose hepática com ascite (cuja histopatologia revelara pleurite crônica inespecífica) e um processo inflamatório pleural inespecífico. A radiografia do tórax em posição ortostática identificou derrame pleural em todos os pacientes. Os derrames foram unilaterais em 13 e bilaterais em três casos. Apenas um paciente apresentava derrame septado. Dentre as neoplasias malignas diagnosticadas, o adenocarcinoma e o carcinoma epidermóide de pulmão foram as mais frequentes. O adenocarcinoma de mama foi encontrado em dois casos e houve um caso de sarcoma de pulmão. Dentre os diagnósticos de derrame benigno, houve um caso de tuberculose, um de cirrose criptogênica (cuja biópsia pleural revelou pleurite crônica inespecífica) e um infiltrado inflamatório inespecífico na biópsia pleural, cuja citopatologia num primeiro exame havia sugerido a presença de células mesoteliais atípicas

TABELA 1  
Resultados da citopatologia, citometria de fluxo e histopatologia das biópsias

| Caso | Citopatologia           | Citom. fluxo | Histopatologia                |
|------|-------------------------|--------------|-------------------------------|
| 1    | Positivo céls. malignas | Aneuplóide   | Sarcoma                       |
| 2    | Benigno                 | Aneuplóide   | Carcinoma epidermóide         |
| 3    | Positivo céls. malignas | Aneuplóide   | Adenocarcinoma                |
| 4    | Benigno                 | Euplóide     | Carcinoma epidermóide         |
| 5    | Benigno                 | Euplóide     | Carcinoma epidermóide         |
| 6    | Positivo céls. malignas | Euplóide     | Carcinoma epidermóide         |
| 7    | Positivo céls. malignas | Euplóide     | Adenocarcinoma                |
| 8    | Benigno                 | Euplóide     | Carcinoma epidermóide         |
| 9    | Positivo céls. malignas | Euplóide     | Adenocarcinoma                |
| 10   | Benigno                 | Euplóide     | Pleurite crônica inespecífica |
| 11   | Benigno                 | Euplóide     | Tuberculose                   |
| 12   | Positivo céls. malignas | Aneuplóide   | Adenocarcinoma                |
| 13   | Positivo céls. malignas | Aneuplóide   | Adenocarcinoma                |
| 14   | Positivo céls. malignas | Euplóide     | Adenocarcinoma                |
| 15   | Positivo céls. malignas | Euplóide     | Adenocarcinoma                |
| 16   | Benigno                 | Euplóide     | Infiltrado inflamatório       |

TABELA 2

Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos da citopatologia e citometria de fluxo (ploidia de DNA)

| Avaliação/método         | Citopatologia | Citometria fluxo |
|--------------------------|---------------|------------------|
| Sensibilidade            | 69,2%         | 38,4%            |
| Especificidade           | 100%          | 100%             |
| Valor preditivo positivo | 100%          | 100%             |
| Valor preditivo negativo | 42,8%         | 27,2%            |

Sensibilidade = (positivos verdadeiros/positivos verdadeiros + falso-negativos) x 100

Especificidade = (negativos verdadeiros/negativos verdadeiros + falso-positivos) x 100

Valor preditivo positivo = (positivos verdadeiros/positivos verdadeiros + falso-positivos) x 100

Valor preditivo negativo = (negativos verdadeiros/negativos verdadeiros + falso-negativos) x 100

positivo e negativo da citopatologia e citometria de fluxo, estão descritos na Tabela 2.

## DISCUSSÃO

Do mesmo modo que o gene supressor p53 é a anomalia de DNA mais comum nas células tumorais, as aneuploidias (qualquer número de cromossomos que não seja múltiplo de 23) são o achado citogenético usual. A determinação do conteúdo de DNA de células é feita por citometria de fluxo. A citometria de fluxo consiste na medida de algum parâmetro intracelular, por exemplo, o conteúdo de DNA ou de outra proteína, célula a célula, de uma população de células em suspensão. Os componentes dessa técnica incluem: um feixe de luz *laser* que permite a dosagem de grande número de células em um período curto de tempo e de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Nesse método, os núcleos preparados de tecidos tumorais são impregnados com um corante fluorescente que se liga ao DNA, tal como o iodeto de propídio. A análise da citometria de fluxo possibilita que sejam definidas as várias fases do ciclo celular. A aneuploidia é avaliada pelo conteúdo de DNA das fases G0/G1 da célula em relação ao conteúdo de DNA das células normais diplóides. As populações aneuplóides são representadas graficamente como picos separados do pico normal diplóide durante o processo de leitura dos resultados no computador.

A análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo é realizada em uma suspensão de núcleos celulares. Para tanto, é indispensável que os componentes celulares estejam intactos, o que nem sempre ocorre com amostras frescas, na dependência do intervalo de tempo que transcorre entre a obtenção das amostras e sua preparação para a leitura no citômetro. No início de nossa experiência com o método, observamos que o fator tempo em amostras de líquido pleural frescas alterava significativamente a qualidade e uniformidade dos resultados e, a exemplo de análise de líquido ascítico, optamos pelo congelamento imediato das amostras e análise ulterior. No processamento do material, os núcleos

limpos foram obtidos na primeira etapa pela combinação de um detergente não iônico à tripsina. Para complementar, a tripsinização aumenta a fluorescência de núcleos com densa cromatina, como granulócitos, provavelmente por eliminar algumas proteínas cromossômicas. A espermina foi essencial para a estabilidade de núcleos não fixados durante a tripsinização. A segunda etapa do processo envolve o tratamento com RNAase evitando a ligação com a dupla fita de RNA. Nessa etapa adiciona-se um inibidor da tripsina, porque a atividade da tripsina após a adição do iodeto de propídio (PI) resulta em núcleos instáveis. Na última etapa adiciona-se o PI e aumenta-se a concentração de espermina para melhorar a estabilidade dos núcleos. O PI liga-se à fita dupla de ácido nucléico por intercalação<sup>(6)</sup>.

As aplicações da citometria de fluxo em oncologia clínica são múltiplas, podendo ser utilizada para diagnóstico e prognóstico dos tumores, expressão de receptores hormonais, de fatores de crescimento ou diferenciação, bem como para a avaliação de diferentes modalidades de tratamento.

Os tumores são divididos, em geral, em dois grupos em relação a sua ploidia: os tumores com quantidade normal ou "diplóide de DNA", e os tumores com conteúdo anormal ou "aneuplóide (não diplóide) de DNA". Verifica-se, pois, que a ploidia dos tumores é definida pela quantidade de DNA relativa à quantidade normal. O índice de DNA pode ser definido pela relação descrita anteriormente.

Tumores com população diplóide em DNA têm o valor do índice de DNA de 1,00 por convenção, ao passo que os tumores com valores menores que 1,00 são ditos hipodiplóides e os tumores com valores em excesso são designados hiperdiplóides<sup>(7)</sup>. Mais recentemente, determinou-se que não mais seria utilizada a terminologia acima descrita (hipodiplóide, etc.) em estudos citométricos, substituindo-a pelas denominações "euplóide" e "aneuplóide" apenas<sup>(8)</sup>. O método imunocitoquímico em lâmina de microscopia tem melhores probabilidades de identificar heterogeneidade de diferentes áreas de um mesmo tumor<sup>(9)</sup>. Já o método de citometria de fluxo avalia um número muito maior de células, propiciando a contagem aleatória das mesmas e a ploidia dos tumores<sup>(7)</sup>.

Até recentemente, o fator que detinha o avanço da citometria era a necessidade de lidar com o tecido fresco não fixado. Entretanto, Hedley *et al.*<sup>(7)</sup> desenvolveram um método de citometria de fluxo com uso de material fixado em parafina, em vez de tecido fresco. Outra contribuição essencial foi o uso da tripsina, para que ocorra maior dissociação na população celular do tumor<sup>(10)</sup>. Esses fatores associados possibilitaram o uso da citometria de fluxo no auxílio do diagnóstico patológico. A associação entre anormalidades cromossômicas na presença de neoplasias malignas é hoje bem estabelecida. A aneuploidia consiste em parâmetro fundamental para o prognóstico de alguns tumores sólidos. A literatura tem demonstrado a correlação entre o índice de DNA e a sobrevida em pacientes portadores de carcinoma brônqui-

co de pequenas células. Estudos de Trindelli-Danesi *et al.*<sup>(11)</sup> demonstraram que os tumores malignos de pulmão são essencialmente aneuplóides em DNA (96% dos 101 casos estudados). Ao estudar 77 pacientes submetidos a ressecção, esses autores encontraram correlação entre o índice de DNA e a sobrevida pós-operatória, que era superior em casos com índice de DNA entre 1 e 2, quando comparados com os com 1 ou maiores do que 2. Filderman *et al.*<sup>(12)</sup> observaram que os tumores diplóides em carcinoma brônquico estágio I possuíam sobrevida em cinco anos superior à dos tumores aneuplóides do mesmo estágio (77% *versus* 42%, respectivamente). Outros trabalhos que analisaram retrospectivamente peças em parafina também demonstraram que a maioria das neoplasias pulmonares era de aneuplóides em DNA e que, neste casos, relacionavam-se a uma sobrevida menor quando comparadas com os tumores de conteúdo diplóide<sup>(11,13)</sup>. Estudos utilizando tecido fresco (não fixado ou incluído) demonstraram que pacientes portadores de carcinoma brônquico de pequenas células com conteúdo diplóide apresentavam sobrevida mais longa quando comparados com os pacientes com o mesmo tipo histológico, porém cujo conteúdo era aneuplóide<sup>(14,15)</sup>. O valor diagnóstico da ploidia de DNA nos derrames pleurais foi considerado impreciso em estudo anterior<sup>(16)</sup>. Mais recentemente, seu rendimento melhorou consideravelmente com a modernização dos equipamentos e *software* para análise, tendo sido utilizada com sucesso por alguns autores<sup>(4,17)</sup> na diferenciação entre derrames neoplásicos com citopatologia falso-negativa.

O derrame pleural é uma patologia freqüente na prática médica, necessitando elucidação diagnóstica para definição da conduta terapêutica. O exame citopatológico dos derrames pleurais foi e tem sido o método de escolha, por ser prático e objetivo, e cujo rendimento se traduz em positividade média situada em torno de 60 a 80%. Resultados falso-negativos e ocasionalmente falso-positivos podem ocorrer devido a dificuldades na diferenciação entre células neoplásicas de células mesoteliais anormais e macrófagos sedimentados. A análise do conteúdo cromossômico das células contidas no líquido pleural através de estudo de ploidia de DNA pela citometria de fluxo tem sido apontada por alguns autores como um importante recurso adjuvante no diagnóstico dessas anormalidades<sup>(15,18,19)</sup>. O diagnóstico de derrames pleurais neoplásicos, através da citometria de fluxo em combinação com a citopatologia, como demonstrado por Huang *et al.*<sup>(4)</sup>, possuía especificidade de 100%, sensibilidade de 94% e valor preditivo positivo de 100%. Mais recentemente, os mesmos autores<sup>(17)</sup> analisaram 71 derrames pleurais (38 com doenças benignas e 33 com adenocarcinoma de pulmão) e demonstraram que todos os derrames benignos possuíam conteúdo nuclear euplóide de DNA, fato este que se confirmou em nosso estudo. Já com respeito aos derrames malignos, os mesmos autores encontraram 52% de aneuploidia, enquanto nosso estudo apresentou 38,4% de derrames aneu-

plóides (5 em 13 casos) dentre as neoplasias malignas diagnosticadas histopatologicamente. Carrilo *et al.*<sup>(20)</sup> também encontraram conteúdo euplóide em todos os derrames benignos analisados. Quando esses autores analisaram os derrames malignos diagnosticados pela citopatologia, a cifra de aneuploidia foi de 35%, algo inferior ao que encontramos no presente estudo nas mesmas condições (44%, ou seja, 4 em 9 casos). Nossos resultados falso-negativos com a citometria de fluxo (72%, ou seja, 8 em 11 casos) são similares aos achados de Hedley *et al.*<sup>(7)</sup>. O índice elevado de falso-negativos torna evidente que a citometria de fluxo não constitui método de escolha para a triagem no diagnóstico de derrames pleurais, cujo padrão áureo permanece sendo a citopatologia. Em contrapartida, a especificidade de 100% que encontramos nesta pequena amostra analisada, a qual é reproduzida por outros autores na literatura<sup>(7,16,21)</sup>, corrobora o fato de que, na ausência de resultados falso-positivos, o método é mais confiável quando o conteúdo de DNA no material for euplóide na presença de derrame benigno. No caso 16 o achado citopatológico inicial de atipia mesotelial sugestiva de mesotelioma, cuja análise de uma segunda amostra foi diagnóstica para benignidade, possuía conteúdo de DNA euplóide em ambas. A biópsia pleural por toracoscopia confirmou tratar-se de processo inflamatório benigno. A utilidade da citometria de fluxo nos mesoteliomas é limitada, uma vez que foi demonstrado por Burmer *et al.*<sup>(22)</sup> que 65% dos 46 casos de mesoteliomas estudados pelos autores continham DNA euplóide em contraposição aos 85% dos casos de tumores malignos não mesoteliais cujo conteúdo fora aneuplóide.

Recentemente, outros métodos têm sido propostos para aumentar o rendimento da citometria de fluxo nos derrames pleurais. Sikora *et al.*<sup>(23)</sup> encontraram aneuploidia em 64% dos casos de derrames neoplásicos e conteúdo diplóide em todos os derrames benignos, perfazendo especificidade também de 100%. Os autores testaram parâmetros adicionais à ploidia de DNA na citometria de fluxo, tais como a determinação da fase S, índice de DNA e a expressão de antígeno Ki-67. Concluíram que este último possuía a melhor sensibilidade (92%, comparado com os 80% da citopatologia) e mantém correlação fortemente positiva com a presença de população aneuplóide, sugerindo sua utilização como adjuvante à ploidia de DNA para incrementar o rendimento do método na detecção de malignidade nos derrames pleurais.

Concluimos que, nesta pequena amostra estudada, a citometria de fluxo pode representar um recurso adicional na avaliação diagnóstica dos derrames pleurais. Entretanto, no que tange à diferenciação entre derrames benignos e malignos, a baixa sensibilidade da análise de ploidia de DNA por citometria de fluxo em relação à citopatologia convencional nesta amostra limita a utilidade do método. Atualmente, ao contrário do que alguns autores têm demonstrado na literatura, a utilidade do método restringe-se à presença de euploidia em derrames benignos. Estudos futuros com amos-

tras mais expressivas se fazem necessários para que essas impressões se confirmem.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem o auxílio prestado pelo CNPq no provimento de fundos para aquisição de *software* para análise dos dados da citometria de fluxo e fornecimento de bolsas de iniciação científica para a execução do trabalho. Os autores agradecem à Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre pelo auxílio prestado na importação de equipamentos.

#### REFERÊNCIAS

1. Storey DD, Dines DE, Coles DT. Pleural effusion: a diagnostic dilemma. *JAMA* 1976;236:2183-2186.
2. Light RW, Erozan YS, Ball WC. Cells in pleural fluid: their value in differential diagnosis. *Arch Intern Med* 1973;132:854-860.
3. Grunze H. The comparative diagnostic accuracy efficiency and specificity of histologic techniques used in the diagnosis of malignant neoplasm in serous effusions of the pleural and pericardial cavities. *Acta Cytol* 1964;8:150-164.
4. Huang MS, Tsai MS, Wang TH. Flow cytometric analysis of pleural effusions. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 1992;8:640-646.
5. Rodrigues FC, Molero T, Acosta O. Value of DNA analysis in addition to cytological testing in the diagnosis of malignant pleural effusions. *Thorax* 1994;49:692-694.
6. Ryan DH, Mitchell SJ, Hennessy LA, et al. Improved detection of rare CALLA-positive cells in peripheral blood using multiparameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 1984;74:115-120.
7. Hedley DW, Phillips J, Rugg CA, Taylor IW. Measurement of cellular DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984;20:749-752.
8. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al. Guidelines for the implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-477.
9. Ensley JF, Maciorowski Z, Pietraszkiewicz H, et al. Solid tumor preparation for flow cytometry using a standard murine model. *Cytometry* 1987;8:479-487.
10. Peters LJ, Brock WA, Shapeman JD, et al. Predictive assays of tumor radiocurability. *Am J Clin Oncol* 1988;11:275-287.
11. Trindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, et al. Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. A 5-years study. *Cancer* 1987;60:844-851.
12. Filderman AE, Silvestri GA, Gatsonis C, Luthringer DJ, Honing J, Flynn SD. Prognostic significance of tumor proliferative fraction and DNA content in stage I non-small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:707-710.
13. Garcia RL, Coltrera MD, Grown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989;134:733-739.
14. Zimmerman PV, Hawson GAT, Bint MH, Parsons PG. Ploidy as prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet* 1987;2:530-533.
15. Ogawa J, Tsurumi T, Inoue I, Shohtsu A. Relationship between tumor DNA ploidy and regional lymph node changes in lung cancer. *Cancer* 1992;69:1688-1695.
16. Schneller J, Eppich E, Greenebaum E, Elequin F, Sherman A, Wersto R, et al. Flow cytometry and fulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 1987;59:1307-1313.
17. Huang MS, Tsai M, Hwang JJ, Tung-Heng W. Comparison of nucleolar organizer regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusion. *Thorax* 1994;49:1152-1156.
18. Salvati F, Teodori L, Gagliardi L, Signora M, Aquilini M, Storniello G. DNA ploidy and regional lymph node changes in lung cancer. *Chest* 1989;96:1092-1098.
19. Rice TW, Bauer TW, Gordon N, Gephardt SV. Prognostic significance of flow cytometry in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:210-217.
20. Carrillo R, Sneige N, El-Naggar AK. Interface nucleolar organizer regions in the evaluation of serosal cavity effusions. *Acta Cytol* 1994;38:367-372.
21. Evans DA, Thornwaite JT, Ng APB, Sugarbaker EV. DNA flow cytometry of pleural effusions: comparison with pathology for diagnosis of malignancy. *Anal Quant Cytol* 1983;5:19-27.
22. Burmer GC, Rabinovitch PS, Kulander BG, Rush V, McNutt MA. Flow cytometric analysis of malignant pleural mesotheliomas. *Hum Pathol* 1989;20:777-783.
23. Sikora J, Dworacki G, Zeromski J. DNA ploidy, S-phase, and Ki-67 antigen expression in the evaluation of cell content of pleural effusions. *Lung* 1996;174:303-313.