

PRÉMIO THOMÉ VILLAR  
BOEHRINGER INGELHEIM, 1994  
(SECÇÃO B)

## Citometria de fluxo no cancro do pulmão. Eficácia da citologia como técnica de selecção dos espécimes a processar

V. HESPAHOL\*, A.R. SANTOS\*, I. AMENDOEIRA\*\*, F. SANSONETTY+, A. MARQUES\*

### RESUMO

O cancro do pulmão é a neoplasia mais frequente no sexo masculino nos países da U.E., mostrando actualmente tendência crescente em todos os países. O cancro do pulmão é a maior causa de morte por neoplasia, tanto na E.U. como nos E.U.A. A sobrevida é geralmente curta, sendo a maioria dos doentes diagnosticados em fases avançadas da doença, dificultando a decisão terapêutica. Para estabelecer a opção terapêutica há necessidade de conhecimento mais aprofundado dos factores que podem influenciar a sobrevida, não só relativos ao doente, mas também em relação ao próprio tumor.

O presente estudo insere-se numa avaliação prognóstica global, incluindo características do doente e do tumor. Na avaliação das características do tumor utilizamos citometria de fluxo (FCM) que permite avaliar o conteúdo e o índice do ADN e a fracção de células em Fase-S. As amostras a processar são colhidas por técnicas diagnósticas (biopsia, escovagem e lavagem brônquicas, biopsia aspirativa transtorácica - BAT e aspirado ganglionar), sendo utilizado no processamento o material restante, após ter sido obtido o diagnóstico. Pretendemos nesta investigação preliminar definir um controlo de qualidade dos espécimes a processar por FCM em relação à presença ou não de células neoplásicas, através de um rastreio citológico. Por outro lado, verificar se é

\* Serviço de Pneumologia

\*\* Serviço de Anatomia Patológica

+ IPATIMUP

Faculdade Medicina do Porto - H.S. João

exequível utilizando amostras tão exíguas obter resultados de FCM fiáveis. Estudámos 78 doentes suspeitos de terem neoplasia maligna do pulmão. Só nos 43 em que se provou existir neoplasia maligna se procedeu à realização de FCM. Obtivemos resultados avaliáveis de FCM em 62% (27/43). As técnicas de colheita mais rentáveis, após rastreio citológico, foram a biopsia brônquica (76%) e a escovagem brônquica (100%). Encontramos uma deficiente rentabilidade utilizando a BAT (31%). A citologia é um bom método de selecção para espécimes colhidos por biopsia brônquica e escovagem brônquica. A utilização desta metodologia parece-nos um bom método de controlo de qualidade para seleccionar amostras para realização de FCM.

## INTRODUÇÃO

O cancro do pulmão (CP) é no sexo masculino, a neoplasia maligna mais frequente nos países da União Europeia (UE); no feminino, é muito inferior, embora mostre tendência crescente em todos os países (1).

A sobrevida é na generalidade curta, encontrando-se a maioria dos doentes em estádios avançados na altura do diagnóstico. Esta situação dificulta a escolha da opção terapêutica. Só 30% dos doentes são potenciais candidatos à cirurgia, e só um número significativamente inferior será considerado como "curado" após tratamento cirúrgico (2). Os restantes doentes, que são a maioria, têm limitadas perspectivas terapêuticas e portanto prognóstico mais sombrio. Há necessidade de definir o risco-benefício dos tratamentos disponíveis, de forma a determinar qual a sua adequação a cada doente em particular. O conhecimento dos factores prognósticos é elemento importante na, por vezes difícil, decisão terapêutica. Os estudos efectuados nesta área têm, na generalidade, sido sectoriais, analisando separadamente características clínicas ou biológicas (3). O estudo global das características do doente e do próprio tumor é do maior interesse pois permite determinar com mais exactidão a importância de cada característica no prognóstico global. Reportando-nos a estudos já efectuados no serviço de Pneumologia, verificamos que, num grupo de 411 doentes com carcinoma de não pequenas células (4) e idêntico estadiamento, se encontram 25% dos doentes a sobreviver menos de dois meses (não permitindo avaliar o efeito da terapêutica), 20% a sobreviver dez

meses e os restantes entre 3 a 7 meses. Esta verificação leva-nos a pensar que características clínicas do doente e biológicas do tumor (para além do tipo histológico) deverão desempenhar um papel crucial na história natural destas neoplasias pulmonares. O estudo destas características poderá assim contribuir para a avaliação dos doentes com carcinoma pulmonar e das respectivas neoplasias e influenciar consequentemente tanto a decisão terapêutica como o aconselhamento individualizado.

Ao analisarmos a situação geral do cancro do pulmão, verificamos um crescente aumento da incidência acompanhado paralelamente pela elevação da taxa de mortalidade em face da reduzida eficácia dos meios terapêuticos disponíveis. Dado que a grande maioria dos doentes é diagnosticada em fases avançadas, foi tentada a detecção precoce, contudo, sem êxito (5). Há portanto que investir na detecção e estudo dos factores de risco, identificando-os e tentando minimizar os seus efeitos. Uma vez instalada a doença é necessário decidir qual a melhor opção de tratamento para cada doente tendo em conta as características, tanto do hospedeiro como da neoplasia.

Este estudo foi executado na sequência de uma investigação prospectiva cujo principal objectivo é a avaliação da importância prognóstica de um grande número de características clínicas, anatómicas, laboratoriais e biológicas em doentes com cancro do pulmão. As características biológicas em estudo são o conteúdo de ADN das células tumorais, a fracção de células em fase de síntese e a presença do  $P_{53}$ , avalia-

dos por citometria de fluxo (FCM) multiparamétrica. A contribuição prognóstica da FCM está ainda mal definida. Problemas de padronização entre os laboratórios torna difícil comparar os resultados obtidos nas diferentes séries já publicadas (6,7,8,9).

Este estudo preliminar resulta da necessidade de certificar a existência de células neoplásicas em número suficiente nos espécimes a processar por citometria de fluxo (FCM). A FCM processará indiferentemente núcleos de células neoplásicas ou de células de tecidos normais podendo daí resultar erros de avaliação decisivos para a validade da investigação em curso.

## OBJECTIVOS

Neste estudo pretendemos determinar a eficácia da CITOLOGIA como método de controlo de qualidade dos espécimes a processar por FCM, relativamente à presença ou não de células neoplásicas. Na colheita das amostras a processar por FCM utilizamos técnicas de diagnóstico correntes: biopsia brônquica (BBR), lavagem brônquica (LB), escovagem brônquica (EB), biopsia aspirativa transtorácica (BAT) e aspiração ganglionar por agulha (AG).

## DOENTES E MÉTODOS

Estudámos 78 doentes com suspeita de cancro do pulmão de Março a Dezembro de 1993.

Estes doentes foram submetidos a uma ou mais técnicas diagnósticas com o objectivo de despistar a existência de neoplasia maligna do pulmão (BBR, LB, EB, BAT e AG), para colheita de espécimes para diagnóstico.

A citologia é utilizada como procedimento de rotina no rastreio de células malignas na avaliação diagnóstica do LB, EB, BAT e AG, pelo que após ter sido definido o diagnóstico de malignidade usamos o material restante, não preciso para diagnóstico, para ulterior processamento por FCM. No processamento dos fragmentos de mucosa obtidos por biopsia brôn-

quica incluímos uma técnica de rastreio não usada na rotina, o "IMPRINT" em lâmina, que permite avaliar se existem células neoplásicas no material restante após estabelecido o diagnóstico e decidir ou não o seu processamento por FCM. O fragmento de tecido utilizado para efectuar o "IMPRINT" era seleccionado do material restante, após assegurado o diagnóstico. O material a processar por FCM era suspenso numa solução de dimetilsulfoxido a 11% e criopreservado.

Não foi realizada qualquer técnica invasiva unicamente para colheita de material para processar por FCM.

Na realização da FCM utilizámos um citómetro Coulter Epic.

A suspensão nuclear obtida de cada amostra processada era adicionada de uma referência interna (núcleos de eritrócitos de galinha) do laboratório e era corada com iodeto de propídeo.

Obtiveram-se histogramas representando o ADN que foram analisados utilizando um "software" específico de forma a poder determinar o índice do ADN (ID), divisão da moda da razão  $G_2/G_1$  as amostras da população em estudo pela moda da razão  $G_2/G_1$  da referência interna (conteúdo corrigido de ADN da referência interna - núcleos de eritrócitos de galinha), e a fracção de células em fase-S. Um tumor diplóide terá um  $ID = 1.0 \pm 0.1$ , se ID for superior a 1.1 será considerado aneuplóide.

As amostras foram colhidas utilizando a técnica mais adequada para atingir o diagnóstico, em cada caso. Realizámos 35 biopsias brônquicas, 22 escova-

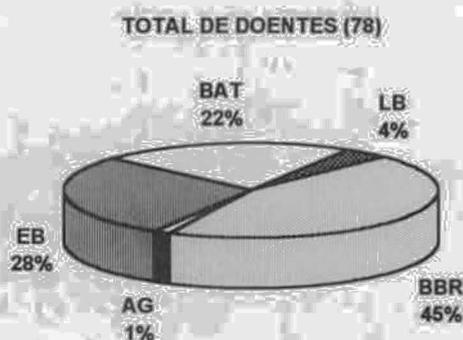


Fig. 1 - Técnicas diagnósticas

dos brônquicos, 17 biopsias aspirativas transtorácicas, 3 lavados brônquicos e 1 aspirado ganglionar.

**RESULTADOS**

Utilizando a CITOLOGIA como método de rastreio de malignidade nos espécimes obtidos pelas diferentes técnicas diagnósticas encontramos 45 (55%) espécimes com características de malignidade; nos restantes 35 (45%) não foi identificada malignidade. Nos 43 espécimes com neoplasia maligna encontramos um predomínio de carcinoma de não pequenas células - 36 (adenocarcinomas - 18, carcinoma epidermóides - 16, carcinoma - 2) e 7 carcinomas de pequenas células.

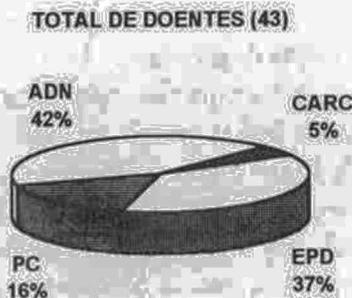


Fig. 2 - Tipos histológicos

ESPECIMENS MALIGNOS - CITOLOGIA

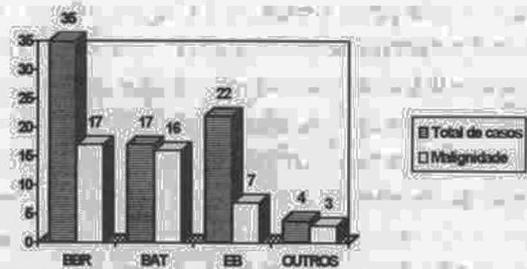


Fig. 3 - Malignidade de acordo com análise citológica - BBR 17/35 (49%), EB 7/22 (32%), BAT 16/17 (94%), OUTROS 3/4 (75%).

Sempre que o rastreio de malignidade foi considerado positivo por análise citológica 43/78 (55%), os espécimes foram processados por FCM. Das 43 amostras processadas só 27 permitiram obter histogramas avaliáveis para análise.

De acordo com as técnicas de colheita dos espécimes processados por FCM encontramos diferentes rentabilidades.

Encontramos uma predominância de carcinomas de não pequenas células 20/27 (74%), o adenocarcinoma foi o tipo histológico predominante 11/27 (41%), seguido pelo carcinoma epidermóide 7/27 (26%) e carcinoma de pequenas células 7/27 (26%).

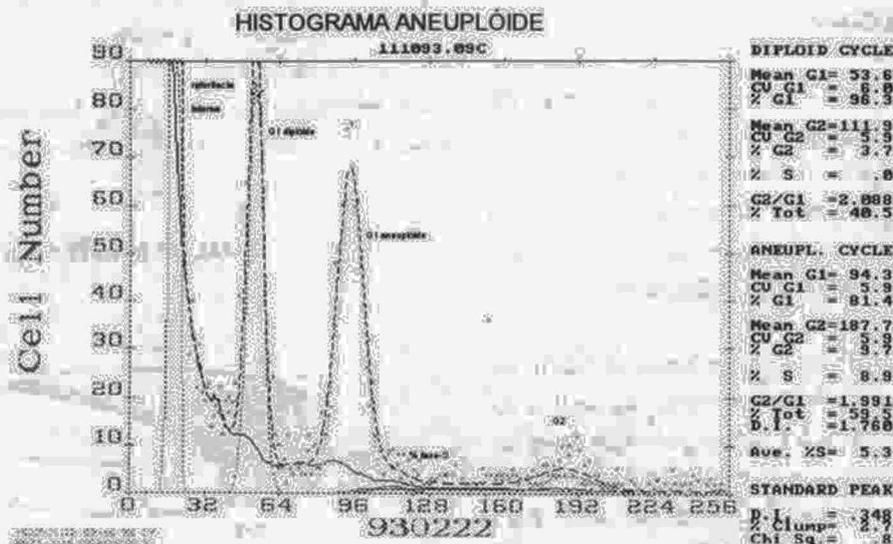


Fig. 4 - Histograma aneuploide.

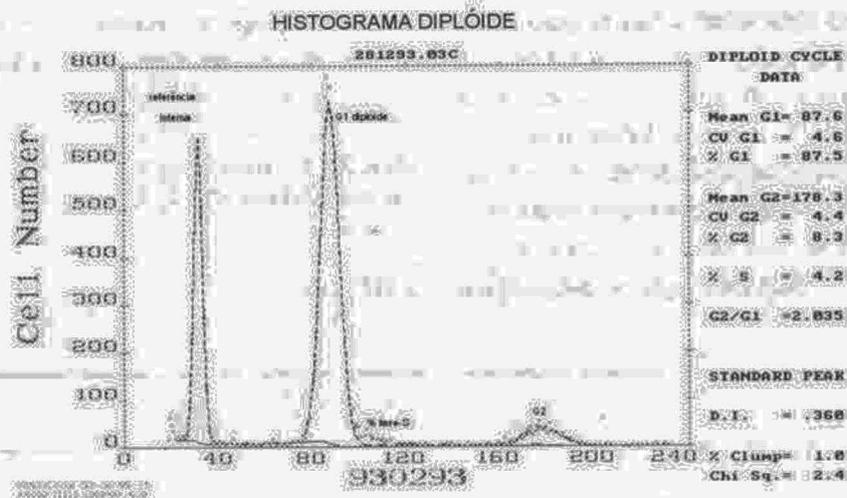


Fig. 5 – Histograma diplóide.



Fig. 6 – Rentabilidade da FCM de acordo com a técnica de colheita – BBR 13/17 (76%), BAT 5/17 (31%), EB 7/7 (100%), OUTROS 2/3 (66%) – Total 27/43 (62%).

Em dois casos encontramos carcinoma sem diferenciação.

A determinação da ploidia do ADN mostrou uma predominância de carcinomas aneuplóides 17/27 (63%). Num caso tratava-se de carcinoma multiplóide, os restantes 9/27 (33%) eram diplóides.

Em 23/27 (85%) dos carcinomas foi possível avaliar a fracção de células em fase-S.

## DISCUSSÃO

Neste estudo pretendíamos avaliar se seria possível, utilizando pequenos fragmentos obtidos para

diagnóstico e já não necessários para este fim, realizar FCM com resultados fiáveis. Por outro lado, avaliar a eficácia da CITOLOGIA como método de controlo de qualidade (10) na avaliação da existência ou não de população neoplásica na amostra a processar por FCM.

O uso de pequenas amostras colhidas por métodos de diagnóstico permitiu estudar doentes independentemente do envolvimento tumoral e da histologia, ao contrário de outras investigações já publicadas (6,7,10) onde a utilização de amostras retiradas de peças cirúrgicas, circunscreve a população seleccionável para o estudo.

Apesar do número diminuto de casos estudados, verificámos que a CITOLOGIA foi um bom método de selecção para os espécimes colhidos por escovagem brônquica e fragmentos de biópsia. Utilizando estes dois métodos obtivemos histogramas de qualidade em 100% dos produtos obtidos por escovagem brônquica e em 76% dos obtidos por biópsia brônquica. A adequação da técnica utilizada na BAT para colheita de espécimes para FCM ainda necessita de reavaliação. Só 5 das 17 amostras (31%) processadas possuíam grupos celulares em qualidade e quantidade suficiente para realizar FCM.

Na globalidade os resultados foram aceitáveis com 27/43 (62%) das amostras processadas a produzirem histogramas avaliáveis. A relevância deste resultado

afigura-se-nos ainda mais significativa se pensarmos que as amostras utilizadas foram o restante dos exames histológicos e citológicos realizados para atingir o diagnóstico e que não foram realizadas quaisquer técnicas invasivas unicamente para colheita de espécimes para FCM. Baseados nestes resultados, pensamos ser possível desenvolver o estudo global que permitirá uma melhor avaliação do prognóstico

dos doentes com carcinomas do pulmão assim como uma orientação terapêutica mais adequada.

VENCESLAU HESPANHOL  
Rua Augusto Lessa 473, 4.º E  
4200 Porto  
596111 (H)  
527151-1365 (W)

---

### BIBLIOGRAFIA

---

1. European School of Oncology. EEC Book on Lung Cancer, 1990.
2. ANDREW T. TURRESI, MD, Inovations in Multimodality Therapy of Lung Cancer, Chest, vol. 103, n.º 1, pp 56s-59s, 1993.
3. DAVID W. HEDLEY, T. VINCENT SHANKEY AND LEON L. Wheelless, DNA Cytometry Consensus Conference, Cytometry, vol. 14, pp 471, 1993.
4. H. QUEIROGA, V. HESPANHOL, M. COELHO, A. MARQUES. Survival analysis in 411 patients With Non Small Cell Lung Cancer, Eur. Resp. Journal, vol. 6, sup. 17, pp 397s, 1993.
5. FONTANA R. and et al. Results of The Initial (prevalence) Radiologic and Cytological Screening in Mayo Clinic Study, Am Rev. Resp. Dis, vol. 130, pp 561-584, 1984.
6. VOLM MANFRED, PHD, DRINGS PETER, MD, MATTERN JURGEN, MD, SONKA JAROSLAV, PHD, VOGT-MOYKOPF I., MD AND WAYSS K., PHD. Prognostic significance of DNA paterns and Resistance-predictive tests in Non Small Cell Lung Cancer, cancer, vol. 56, pp 1396-1403, 1985.
7. GUBER A., M.D.; RAZIA COHEN, M. SC.; RONAH R.; ZAN-BAR I., PH.D.; GEIGER B, PH.D.; AND BRUDERMAN I, MD., F.C.C.P. Flow Cytometric Analysis and Cytokeratin Typing of Human Lung Tumors, Chest, 105, vol 1, pp 138-143, 1994.
8. SHANKEY V.T., RABINOVITCH P.S., BAGWELL B., BAUER K.D., DUKE R.E., HEDLEY D.W., MAYALL B.H., WHEELLESS L. Guidelines for Implementation of clinical DNA Cytometry, Cytometry, vol. 14, pp 472-477, 1993.
9. VINDELOV L.L., CHRISTENSEN L.J. 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, n.º 11, vol. 7, pp 753-770, 1990.
10. ARIYOSHI I. Characteristics and Problems of Flow Cytometric nuclear DNA Content Analysis in Lung Cancer Using Bronchoscopically obtained Specimens, Nippon-Kyobu-Shikkan-Gakkai-Zasshi, n.º 30, vol. 9, pp 1704-1710, 1992.