

Citometria de fluxo utilizando-se aspirados da PAAF nos tumores da mama

Flow cytometry using FNAC aspirates in breast tumors

Ruffo de Freitas Júnior
Sandro Ângelo de Souza
Rosemar Macedo Sousa
Rubens José Pereira
Nilceana Maya Aires Freitas

Resumo

A citometria de fluxo (CF) tem sido utilizada como fator prognóstico para o câncer de mama; entretanto a confiabilidade do método utilizando-se aspirados obtidos de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) permanece controversa. Objetivo: Comparar o coeficiente de variação (CV), o índice de DNA (DNA), a fase de síntese (fase S) e a aneuploidia utilizando-se aspirados provenientes de PAAF com o tecido histológico de peças cirúrgicas arquivado em parafina. Material e métodos: Foram utilizadas 44 peças frescas contendo tumores mamários. Em cada peça *ex vivo*, procedeu-se a duas punções por agulha fina. Posteriormente as peças foram fixadas e incluídas em parafina. Tanto os aspirados quanto o material histológico, desparafinado, foram preparados para a citometria de fluxo. O exame foi feito utilizando-se um aparelho BD FACScan, com leitura de 10 mil células por exame. Resultados: A média do CV para os aspirados foi de 6,05 ($\pm 1,60$) e da peça foi de 6,96 ($\pm 2,13$) ($p < 0,05$). A média do índice de DNA foi de 1,6 ($\pm 0,5$) para os aspirados e de 1,49 ($\pm 0,42$) para as peças cirúrgicas (NS). A média da fase-S foi de 7,2 ($\pm 6,34$) e de 5,85 ($\pm 4,73$) para a citologia e para o material histológico, respectivamente (NS). Quanto à aneuploidia, a média nos aspirados foi de 38,2 ($\pm 24,7$) e de 29,8 (± 20) para a peça cirúrgica (NS). Conclusão: Os aspirados da PAAF são bastante confiáveis para a realização da citometria de fluxo, podendo ser ainda melhores que o material desparafinado.

Abstract

The flow cytometry has been used worldwide as a prognostic factor for breast cancer. However, the feasibility of the method using aspirates obtained by fine needle aspiration cytology (FNAC) remains controversa. Objective: Comparing the aspirates generated by FNAC with those from the paraffin embedded specimen, through flow cytometry. Patients and methods: The study was performed in 44 fresh surgical specimens containing breast tumors, with the taps using both methods: autovacuum device and siringe pistol holder. Each specimen was punched twice with a fine needle. At a later date, these specimens were fixated and preserved in paraffin. Both the aspirates and the histology material, without the paraffin coating, were prepared for flow cytometry. A BD FACScan, capable of reading 10,000 cells per test was used. Results: The mean for CV from aspirates was 6.05 (± 1.6) and for the surgical specimen was 6.96 (± 2.13) ($p < 0.05$). The mean for DNA index was 1.6 (± 0.5) from aspirates and 1.49 (± 0.42) of the surgical specimens (NS). The mean for aspirates' S-phase was 7.2 (± 6.34) and 5.85 (± 4.73) for the specimen (NS). For aneuploidy, the mean was 38.2 (± 24.7) and 29.8 (± 20) for aspirates and specimen, respectively (NS). Conclusion: The aspirates generated from FNAC are very reliable for flow cytometry study and they might be better than the paraffin embedded tissue.

Unitermos

Mama
Câncer
Citometria de fluxo
Punção por agulha fina

Key words

Breast
Cancer
Flow cytometry
Fine needle biopsy

Introdução

A citometria de fluxo é, por definição, a medida (metria) das propriedades celulares (cito) feita quando as células dispersas em uma solução, após serem coradas com fluorocromos apropriados, são orientadas em um fluxo tubular e interceptadas, uma a uma, por um feixe de luz, geralmente raio *laser*. A luz dispersada é coletada por um sistema óptico de lentes e espelhos e dividida em vários componentes, caso mais de um corante seja utilizado. Através de detectores os componentes fluorescentes são convertidos em sinais eletrônicos, os quais são processados e transformados em dados para armazenamento e análise, gerados por programas de informática^(2, 14, 16).

A importância da citometria de fluxo decorre da habilidade do método de medir vários parâmetros de milhares de células, individualmente, em poucos minutos. Desta maneira, ela pode ser utilizada para definir e enumerar adequadamente subpopulações celulares⁽¹⁶⁾. Outra grande vantagem é o fato de não haver necessidade do uso de marcadores radioativos ou tóxicos⁽²⁾.

A mensuração de DNA foi uma das primeiras aplicações da citometria de fluxo e ainda hoje continua entre as mais usadas. Dois parâmetros principais podem ser extraídos dos histogramas de DNA gerados pelo exame: o conteúdo do DNA e o estudo da cinética celular^(2, 16).

Esse tipo de avaliação possibilita um melhor conhecimento da atividade proliferativa da população celular estudada, permitindo informações a respeito do diagnóstico, do prognóstico e da monitorização da resposta do tumor à terapêutica, uma vez que nem todas as células malignas apresentam-se no mesmo estágio proliferativo no ciclo celular⁽²⁾.

A técnica da citometria de fluxo é rápida: 100 a 10 mil células podem ser estudadas por segundo. Assim, as mensurações obtidas a partir do exame têm uma alta precisão estatística e podem ser produzidas rapidamente. Não obstante, um pré-requisito para a leitura do *laser*, em fluxo, é a suspensão de células isoladas. Dessa forma, no estudo de tumores sólidos, um dos passos mais importantes será a desagregação das células tumorais⁽¹⁶⁾.

Para a realização da citometria de fluxo, utiliza-se material coletado do próprio tumor. Inicialmente, utilizou-se material preparado a partir de tecido tumoral fresco, congelado em nitrogênio líquido^(3, 8). A seguir, uma série de estudos mostrou que era factível a utilização de material arquivado em parafina, o que facilitaria o estudo de sobrevida de pacientes portadores de câncer, uma vez que seria possível examinar peças ressecadas há anos^(6, 10).

Posteriormente, foram iniciadas as tentativas de se estabelecer o uso da citometria de fluxo a partir do emprego de aspirados provenientes de PAAF. Após a tentativa com vários métodos, alguns estudos comparativos entre a utilização de material incluído em parafina e os aspirados provenientes de PAAF mostraram uma boa cor-

relação e concluíram que os resultados obtidos pela citometria de fluxo, utilizando-se aspirados da PAAF, poderiam ser confiáveis tanto para verificação da ploidia quanto para a mensuração da fase S^(11, 12).

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o coeficiente de variação, o índice de DNA, a porcentagem de células na fase S e a porcentagem de células aneuplóides, detectados através de aspirados provenientes da PAAF, em tumores *ex vivo*, com aqueles gerados das peças cirúrgicas emblocadas em parafina.

Sujeitos e métodos

Foram utilizadas para esse estudo 44 peças mamárias frescas (recém-ressecadas) contendo tumor sólido de mama. As peças foram obtidas logo após sua ressecção. Foram excluídas as peças de pacientes que estivessem utilizando terapia de reposição hormonal, ou endocrinoterapia e/ou quimioterapia para o câncer de mama em um período inferior a três meses da data de realização de ressecção da lesão.

Todas as peças, assim que ressecadas, eram submetidas à PAAF pelos dois métodos: dispositivo de autovácuo e pistola, sempre por um mesmo punçador, totalizando 88 punções. Para saber qual o dispositivo a ser utilizado em primeiro lugar, utilizou-se sistema de sorteio prévio, com o intuito de diminuir a chance de erros ou de artefatos que pudessem ser causados pela punção *ex vivo*.

Após as punções, a peça cirúrgica era processada rotineiramente para o diagnóstico da neoplasia mamária e para o estudo dos fatores prognósticos, da maneira convencional, ou seja, cortada adequadamente, fixada em formol, emblocada em parafina, cortada por micrótomo, e as lâminas, coradas por hematoxilina e eosina para estudo microscópico. As características das peças punçoadas que fizeram parte do estudo podem ser vistas na **Tabela 1**, sendo que 39 casos (88,5%) corresponderam a tumores malignos e cinco peças continham lesões benignas. Os tipos pouco frequentes de tumores malignos corresponderam a um caso de carcinoma cribriforme, um de carcinoma tubular e um de carcinoma mucóide. Em relação aos tumores benignos, houve um caso de hamartoma, um fibroadenoma e um lipoma.

Punção aspirativa por agulha fina

A punção foi realizada diretamente sobre o tumor, com a mão não-dominante fixando a peça enquanto a mão dominante manipula o dispositivo. Na punção pelo autovácuo, a mola era comprimida entre o êmbolo e a seringa, até que a ponta da agulha tivesse traspassado a pele. Após a penetração da agulha, a mola era aliviada retirando-se os dedos, permitindo que ela desenvolvesse uma pressão negativa constante no interior da seringa. Segurando-se gentilmente a seringa, foram feitos movimentos de vaivém em leque, objetivando várias áreas do tumor⁽⁹⁾.

A punção com a pistola de Cameco era feita com a retração do êmbolo da seringa, pelo tracionamento da pistola, provocando uma pressão negativa no interior da seringa, tentando-se manter uma aspiração tão constante quanto possível. Simultaneamente, eram realizados movimentos de vaivém em leque, de tal sorte que a agulha pudesse penetrar em vários pontos da área tumoral⁽¹⁷⁾.

Para cada caso foram utilizados 20 passes pela lesão. Assim que era interrompida a punção, a agulha era desconectada da seringa, de forma que fosse desfeita a pressão negativa no interior da seringa, evitando que o material colhido e acomodado no interior da agulha fosse sugado para o interior da seringa. Só então a agulha era retirada do tumor, e o material coletado era imediatamente preparado para fixação.

Fixação dos aspirados

Após a punção da lesão, o aspirado coletado no interior da agulha era expelido por propulsão do êmbolo da seringa dentro de pequenos tubos de silicone do tipo NUNC, contendo 200ml de citrato tampão. Com o intuito de evitar o agregamento celular, todo o material no interior dos tubos, contendo as células, era passado várias vezes por dentro de uma agulha bastante fina (25G), também com a intenção de desfazer pequenos aglomerados celulares.

A seguir, 1ml de etanol frio a 70% era adicionado vagarosamente enquanto o tubo era agitado manualmente em movimentos circulares, evitando a formação de grumos celulares. Todos os aspirados já fixados eram guardados sob a temperatura de 4°C até sua utilização na citometria de fluxo.

Preparo dos aspirados e coloração do DNA

Inicialmente, alíquotas de 4×10^5 células eram colocadas em tubos para centrifugação contendo *medium* ou PBS. Cada espécime era centrifugado a 250g durante 10 minutos à temperatura de 4°C. Após, o sobrenadante era removido e nova suspensão era feita com 2ml de PBS, seguida de nova centrifugação. Cada nova suspensão era passada duas vezes por finas agulhas de 25G, de forma que fosse diminuída a formação de agregados celulares. Posteriormente, eram adicionados 6,6ml de etanol frio a 70%, ao mesmo tempo em que se agitava a solução. Este material era então fixado por 30 minutos à temperatura de 4°C.

Na sequência era realizada nova centrifugação para remover o etanol e as células eram lavadas em PBS. Para finalizar, as células em suspensão eram coradas adicionando-se 250mg de iodine protéico (PI), 1mg/ml de RNase e 1% de triton X-100. A concentração final nas células em suspensão deveria ser de PI: 50mg/ml; RNase: 200mg/ml; triton X-100: 0,2%. As suspensões eram,

Tabela 1 – Característica das peças e dos tumores puncionados

	<i>n</i>	%
Tipo de peça		
Mastectomia	13	30
Tumorectomia ampla	31	70
Tamanho do tumor		
11 a 20mm	21	48
21 a 30mm	10	23
31 a 40mm	9	20
41mm ou mais	4	9
Tipo do tumor		
Ca ductal invasor	29	66
Ca lobular invasor	5	11
Outros Ca invasores	3	7
Ca ductal <i>in situ</i>	2	4,5
Tumores benignos	3	7
AFBM	2	4,5
Total	44	100

então, bem agitadas e deixadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz para que pudessem atingir a coloração adequada.

Desparafinização do material histológico arquivado em parafina

Para a realização da desparafinização, utilizou-se a técnica padrão previamente estabelecida⁽⁶⁾, de acordo com os passos a seguir. Inicialmente era separado um fragmento de cada tumor, de 50mm, sendo colocado isoladamente em um pequeno cassete de biópsia, com poros de 300mm, com identificação a grafite. Em seguida, até 12 cassetes eram colocados em um recipiente para lavagem mecânica dos espécimes em máquina apropriada de processamento tecidual (Histokinette), sendo que os espécimes eram agitados por 15 minutos, seguindo o programa:

- xileno – três trocas;
- álcool a 100% – duas vezes;
- álcool a 90% – duas vezes;
- álcool a 70% – duas vezes;
- álcool a 50% – duas vezes.

Este processo era realizado durante a noite (durando 2h45min). Posteriormente os cassetes eram lavados exaustivamente, sendo submersos por dez minutos em água destilada, que era trocada duas vezes. Na seqüência, permitia-se o escoamento da água, seguido da abertura de cada cassete e, utilizando-se uma pinça delicada, o tecido desparafinado era transferido para um tubo universal contendo solução de pepsina (0,5% de pepsina em 0,9% de solução salina, com pH ajustado para 1,5 usando-se 2M HCL). Os tubos universais eram então levados ao banho-maria a 37°C durante 30 minutos. A seguir eles eram centrifugados usando-se 2.000rpm por três minutos à temperatura ambiente. A partir daí o sobrenadante era removido com a utilização de uma pipeta de Pasteur. Novas suspensões eram feitas com os fragmentos tissulares e liberação nuclear em 2ml de PBS, agitando-os vigorosamente com o auxílio de um misturador. Por fim a suspensão era filtrada através de um filtro de náilon com poros de 35mm e ajustada à concentração de núcleos, conforme desejado.

Realização da citometria de fluxo

Para a realização da citometria de fluxo foi utilizado um aparelho Becton Dickinson FACScan, sendo que para a produção de cada histograma, 10 mil células foram analisadas pelo aparelho.

Imediatamente antes da leitura dos aspirados, já previamente preparados e com a adequada coloração do DNA, cada suspensão era passada por uma agulha de 25G, no sentido de reduzir os aglomerados de células.

Para o material submetido ao processo de desparafinização, a coloração do DNA foi realizada também pela utilização do iodine protídeo (PI), de forma que feixes de 488nm de laser ion-argônico pudessem ler os DNA em suspensão.

Análise do histograma de DNA

Para a análise dos dados gerados no presente estudo foram selecionadas quatro formas, a saber: coeficiente de

variação, índice de DNA, estimativa da porcentagem de células na fase S e porcentagem de aneuploidia.

Cálculo do coeficiente de variação (CV)

O coeficiente de variação, geralmente representado pelo pico G_1 do DNA diplóide, é uma maneira bastante adequada de representar a qualidade dos dados do DNA. O CV foi calculado de acordo com a equação abaixo, com base no fato de o pico do G_1 poder ser representado por uma distribuição normal: $CV = W/(M \times 2,35)$. Onde: W representa toda a extensão do pico de G_1 na metade máxima da altura e M, o número do canal do pico de G_1 .

Cálculo do índice de DNA

Os princípios básicos pelos quais a aneuploidia do DNA é reconhecida e que se usam para o cálculo do índice de DNA são utilizados internacionalmente⁽¹⁶⁾. Em histogramas que exibem dois ou mais picos de G_1 (**Figura 1**), tanto o pico do índice de DNA quanto a aneuploidia do DNA são calculados com referência na posição do pico G_1 de células diplóides. Por exemplo, na Figura 1, o tumor com o pico de G_1 tem duas vezes a quantidade de DNA se comparado com o pico de G_1 de células com DNA diplóide (**Figura 2**) e, assim, tem o índice de DNA (DI) de 2. O índice de DNA de 1,5 pode significar um pico de DNA aneuplóide com 50% a mais de DNA que o normal. A aneuploidia do DNA só pode ser reconhecida nas peças quando dois ou mais picos de G_1 são evidentes. Para os espécimes de tecido fresco, em que os dois picos estão próximos, o DNA padrão pode ser usado para confirmar qual dos picos G_1 é diplóide. Se apenas células com DNA diplóide estão presentes, o DI é descrito como sendo de 1.

Cálculo da fase de síntese celular (fase S)

Para estimativa da fração da fase S foram utilizados o método de Baisch, Göhde, Linden para os histogramas com DNA diplóides e uma modificação deste método para os histogramas com DNA aneuplóides. Em resumo, isto envolve a colocação dos canais de pico de G_1 e G_2 em um retângulo (Figura 1). A altura do retângulo é determinada olhando-se os números de células nos dez canais centrais da região da fase S e usando-se isto para calcular o número médio de células por canal. Para histogramas com DNA aneuplóide, a porcentagem de células aneuplóides na fase S pôde ser estimada de uma maneira semelhante, desde que a altura do retângulo (Figura 2) fosse calculada usando-se uma parte do histograma não-sobreposto à distribuição do DNA diplóide⁽¹⁾.

Porcentagem de células aneuplóides

Foram considerados os valores percentuais das células com histogramas característicos de aneuploidia, em relação ao total dos demais histogramas encontrados pelos diversos canais da citometria de fluxo.

Análise estatística

As médias do coeficiente de variação, do índice de DNA, da porcentagem de células na fase S e da porcentagem de

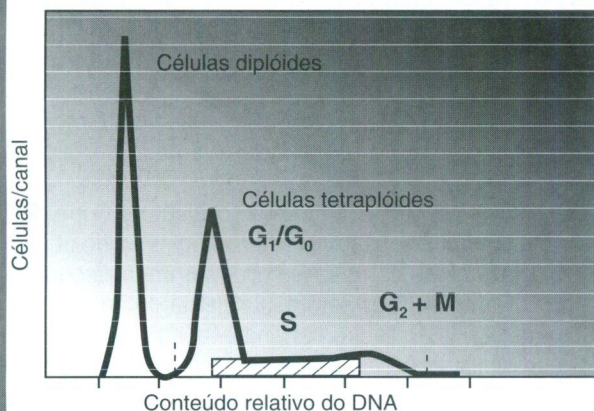


Figura 1: Histograma do DNA de um tumor tetraplóide no qual o pico de G_1 tem duas vezes a quantidade normal de DNA ($DI = 2$)

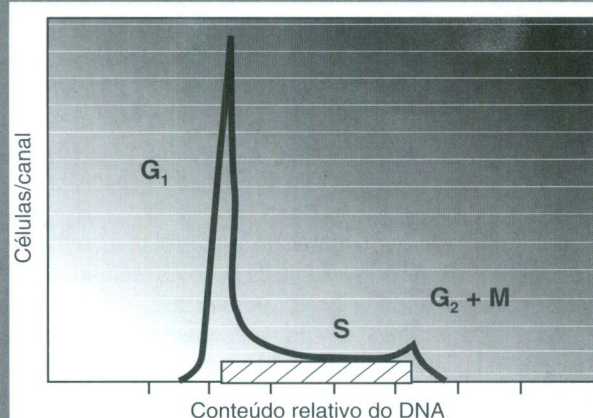


Figura 2: Histograma do DNA de um tumor diplóide. A fase S foi calculada encaixando-se um retângulo para representar a fase S (parte hachurada)

células aneuplóides foram comparadas entre os grupos de aspirados citológicos com os achados produzidos pela citometria para o material obtido com a desparafinização das peças histológicas, através do teste t de Student para amostras pareadas. Estabeleceu-se o nível de significância em 5%.

Resultados

Para o coeficiente de variação (CV) observou-se que a média foi de 6,05 ($\pm 1,6$ com variação de 3,2 a 9,3) para os aspirados da PAAF e de 6,96 ($\pm 2,13$ com variação de 3,9 a 11) para os da peça cirúrgica.

Em relação ao índice de DNA a média para o material obtido com os aspirados citológicos foi de 1,6 ($\pm 0,5$ com variação de 1 a 2,5) e de 1,49 ($\pm 0,42$ com variação de 1 a 2) para os provenientes da peça cirúrgica.

Na análise da porcentagem de células na fase S observou-se uma média de 7,2 ($\pm 6,34$ com variação de 1,1 a 16,7) e de 5,85 ($\pm 4,73$ com variação de 0 a 14) para o material produzido da peça cirúrgica.

Quanto à porcentagem de células aneuplóides a média produzida pelos aspirados do dispositivo de autovácuo foi de 38,2 ($\pm 24,7$ com variação de 6 a 83), e para a

peça cirúrgica, a média foi de 29,8 (± 20 com variação de 6 a 75). Usando o teste t pareado, comparando as médias das variáveis estudadas pela citometria de fluxo, de acordo com o material utilizado, observamos uma diferença significativa entre as médias do coeficiente de variação (Tabela 2).

Discussão

A citometria de fluxo, por mais de uma década, tem sido reconhecida como um poderoso método no estudo do prognóstico do câncer de mama. Com a utilização de tecido arquivado em parafina, ou mesmo de fragmentos congelados, vários estudos mostram que tanto o estudo do DNA quanto a proliferação celular (fase S) correlacionam-se independentemente com o comportamento dos carcinomas mamários^(3, 4, 15).

Há de se ressaltar que houve uma diferença significativa observada nas médias do coeficiente de variação entre os aspirados de PAAF e o grupo de peças cirúrgicas. A menor média de CV para os aspirados pode indicar que esse material seja ainda melhor para a obtenção dos histogramas que aquele proveniente de peças cirúrgicas arquivadas em para-

Tabela 2 – Análise das médias das variáveis estudadas pela citometria de fluxo comparando-se os aspirados da PAAF com a peça cirúrgica

Material (A) / Variável	Aspirados de PAAF X (DP)	Peça cirúrgica X (DP)	valor de p Teste t pareado
CV	6,05 (1,6)	6,96 (2,13)	0,05
Índice de DNA	1,6 (0,5)	1,49 (0,4)	0,1
Fase S	7,2 (6,34)	5,85 (4,73)	0,2
% aneuploidia	38,2 (24,7)	29,8 (20)	0,4

final. Histogramas mostrando alta qualidade do DNA costumam ter um baixo CV e um pico de G_1 aproximadamente muito perto da distribuição normal. Isto permite o julgamento da qualidade dos dados apresentados.

Outros autores, estudando aspirados de PAAF para uso na citometria de fluxo, também conseguiram bons resultados e salientaram a possibilidade do seu uso na prática clínica^(7, 11-13, 19).

Deve-se notar que o material aspirado para a citometria, na presente série, foi proveniente de punções realizadas após a ressecção do tumor (*ex vivo*), em que o número de hemácias é bem menor se comparado às punções quando realizadas na paciente (*in vivo*). Ratificando a boa qualidade do material obtido através de aspirados, Klemi e Joensuu fizeram uma comparação direta entre os aspirados e a peça cirúrgica arquivada em parafina. Eles observaram (*in vivo*) que o coeficiente de variação do material proveniente das punções foi menor que os obtidos com a suspensão desparafinizada⁽¹¹⁾.

Na última década, novas perspectivas têm surgido para os aspirados da PAAF. Assim, Bozzetti *et al.* (1997), após estudarem a associação da dosagem do KI-67 com a fração de células na fase S, utilizando aspirados de PAAF, passaram a recomendar que esta associação fosse utiliza-

da na abordagem pré-operatória de pacientes que serão submetidas a quimioterapia neo-adjuvante⁽⁵⁾. A realização de punções seriadas durante a quimioterapia neo-adjuvante, com o intuito de verificar o comportamento tumoral através da cinética celular e conseqüente monitorização de resposta, também já foi aventada por alguns pesquisadores^(12, 19).

Em outro trabalho, conduzido no Instituto Curie (Paris), os autores observaram que o mesmo aspirado utilizado para determinação dos receptores por imunistoquímica pode ser aproveitado para a citometria de fluxo⁽²⁰⁾. Na Universidade de São Paulo, Pestana *et al.* (1991) observaram a possibilidade de se utilizar o mesmo esfregaço para determinação de receptores de estrogênio e da ploidia nos carcinomas ductais⁽¹⁸⁾.

Conclusão

Os aspirados da PAAF são bastante confiáveis para a realização da citometria de fluxo, apresentando um coeficiente de variação menor que o da peça cirúrgica, mostrando que pode ser ainda melhor para a análise que um fragmento histológico desparafinado.

Referências bibliográficas

1. BAISCH H, GÖHDE W, LINDEN WA. Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle. *Radiat Environ Biophys* 1975; 12: 31-9.
2. BARBOSA EM. Análise da DNA ploidia e porcentagem de células em fase S, determinada por citometria de fluxo e de outras variáveis prognósticas em carcinomas primários de mama. São Paulo: 1995. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo.
3. BARBOSA EM. Análise da porcentagem da DNA ploidia e de células em fase S, determinada por citometria de fluxo e por outras variáveis prognósticas em carcinomas primários da mama. *Rev Bras Cancerol*. 1998; 44: 25-34.
4. BERGERS E, VAN DIEST PJ, BAAK JPA. Cell cycle analysis of 932 flow cytometry DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material. Correlations between flow cytometry, clinical, and pathologic variables. *Cancer* 1996; 77: 2258-66.
5. BOZZETTI C, NIZZOLI R, CAMISA R *et al.* Comparison between Ki-67 index and S-phase fraction on fine-needle aspiration samples from breast carcinoma. *Cancer Cytopathol* 1997; 81: 287-92.
6. CAMPLEJOHN RS, MACARTNEY JC, MORRIS RW. Measurement of S-phase fractions in lymphoid tissue comparing fresh versus paraffin-embedded tissue and 4' 6' -diamidino-2 phenylindole dihydrochloride versus propidium iodide staining. *Cytometry* 1989; 10: 410-6.
7. DAVEY DD, BANKS ER, JENNINGS D, POWELL DE. Comparison of nuclear grade and DNA cytometry in breast carcinoma aspirates to histologic grade in excised cancers. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 708-13.
8. EWERS SB, ATTEWELL R, BALDETORP B, BORG A, LANGSTROM E, KILLANDER D. Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy prospectively determined in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 20: 93-108.
9. FREITAS Jr. R, GIRALDO PC, RETTORI O, VIEIRA-MATOS AN, TAMBASCIA JK. Fine needle aspiration biopsy of solid tumors by auto-vacuum system: a study in rats. *Eur J Surg Oncol* 1992; 18: 605-7.
10. HEDLEY DW, FRIEDLANDER ML, TAYLOR IW, RUGG C, MUSGROVE EA. DNA flow cytometry of paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1984; 5: 660-1.
11. KLEMI PJ, JOENSUU H. Comparison of DNA ploidy in routine fine needle aspiration biopsy samples and paraffin-embedded tissue samples. *Anal Quant Cytol Histol* 1988; 10: 195-9.
12. LEVACK PA, MULLEN P, ANDERSON TJ, MILLER WR, FORREST APM. DNA analysis of breast tumour fine needle aspirates using flow cytometry. *Br J Cancer* 1987; 56: 643-6.
13. MARTELLI G, DAIDONE MG, MASTORE M *et al.* Combined analysis of ploidy and cell kinetics on fine-needle aspirates from breast tumors. *Cancer* 1993; 71: 2522-7.
14. MELAMED MR, LINDMO T, MENDELSON ML. *Flow cytometry & sorting*. 2ª ed. New York: Wiley-Liss. 1990.
15. O'REILLY SM, CAMPLEJOHN RS, BARNES DM. DNA index, s-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 1990; 61: 671-4.
16. ORMEROD MG. *Flow cytometry*. Oxford: Bios. 1994.
17. PAULINELLI RR, FREITAS Jr. R, MOREIRA MAR. Punção por agulha fina no diagnóstico de nódulos mamários palpáveis: descrição das diferentes técnicas e sua importância. *Rev Bras Mastol* 1998; 8: 157-63.
18. PESTANA CB, DONOZO N, PINTO AJ, ALMEIDA PCC, MACHADO-SANTELLI GM. Sequential determination of immunocytochemical estrogen receptor and nuclear DNA content in fine needle biopsies from breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 19: 39-46.
19. SPYRATOS F, BRIFFOD M, TULIANA-HULIN M *et al.* Sequential cytopunctures during preoperative chemotherapy for primary breast carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 470-5.
20. VIELH P, MAGDELENAT H, MOSSERI V, REMVIKOSY, BONITO L. Immunocytochemical determination of estrogen and progesterone receptors on 50 fine-needle samples of breast cancer: a prospective study including biochemical correlation and DNA flow cytometric. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 254-61.

Endereço para correspondência

Ruffo de Freitas Júnior
Av. T-4 835/901 - Setor Bueno
CEP 74230-030 - Goiânia-GO
Tel: (62) 243-7244
e-mail: ruffo@medicina.ufg.br