# A citometria de fluxo no diagnóstico da carcinomatose peritoneal

# *Flow cytometry in the diagnosis of peritoneal carcinomatosis*

**CRISTIANE TOVO BOTH** – Mestre em Gastroenterologia, Doutora em Hepatologia, Professora do Curso de Pós-Graduação da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) – Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).
**ANGELO ALVES DE MATTOS** – Professor Titular – Doutor – Livre Docente da Disciplina de Gastroenterologia da FFFCMPA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Hepatologia da FFFCMPA – ISCMPA.
**JORGE NEUMANN** – Chefe do Laboratório de Imunologia de Transplantes da ISCMPA.
**MARCIANO REIS** – Chefe do *Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Faculty of Medicine*, do *Sunnybrook and Women's College Health Science Centre.*

✉ Endereço para correspondência:
Rua Aurélio Bitencourt, 115/201
Porto Alegre – RS CEP 90430-080
both@terra.com.br

**SINOPSE**

Os autores realizam uma revisão sobre o papel da citometria de fluxo (CMF) no diagnóstico da carcinomatose peritoneal. Após introduzirem conceitos de citogenética e considerarem os princícpios básicos da CMF, fazem uma revisão de sua utilidade clínica. Entendem que, a despeito de seu uso ser destacado por muitos autores, sua utilidade se restringe aos pacientes com suspeita clínica de derrame neoplásico, em que o exame citopatológico convencional do líquido de ascite foi negativo. Concluem, no entanto, que a CMF multiparamétrica poderá trazer uma nova perspectiva no diagnóstico destas neoplasias.

UNITERMOS: Ascite Neoplásica; Neoplasia Peritoneal, Citometria de Fluxo.

**ABSTRACT**

*The authors review the importance of flow cytometry (FCM) in the diagnosis of peritoneal carcinomatosis. They introduce cythogenetics concepts and comments the basic principles of FCM, reviewing the clinical utility of this method. Despite some authors emphasize its utilization, its importance is restricted to patients with clinical suspiction of neoplastic ascitis when the conventional cythopathological examination is negative. Meanwhile, multiparametric FCM seams to give a new perspective in the diagnosis of this neoplasia.*

KEY WORDS: *Neoplasic Ascitis, Peritoneal Neoplasia, Flow Cytometry.*

Tem sido demonstrado que muitos tumores apresentam alterações cromossômicas (1, 2, 3, 4, 5, 6), embora a presença de anormalidades citogenéticas não seja obrigatória (1). Com a introdução da citometria de fluxo (CMF), a investigação destas anormalidades tornou-se mais precisa e objetiva (1), permitindo então seu uso no diagnóstico das neoplasias. Sendo a carcinomatose peritoneal (CA) a segunda causa mais freqüente de ascite em nosso meio, e sendo seu diagnóstico muitas vezes difícil, torna-se fundamental que o mesmo seja feito de forma ágil e segura (7, 8, 9, 10, 11).

Durante muitos anos, o exame citopatológico (CP) do sedimento das efusões tem sido o método de escolha no propósito de detectar a presença de células malignas no líquido de ascite (12, 13), no entanto, apresenta uma baixa sensibilidade diagnóstica (ao redor de 50%) (5, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 16). A maior sensibilidade observada em diversos estudos da literatura (entre 85 e 95%) (17, 18, 19, 20, 21) é obtida às custas de uma menor especificidade, o que parece preocupante uma vez que estabelecido o diagnóstico de malignidade atribui-se, via de regra, um péssimo prognóstico ao doente. Um dos maiores problemas do exame CP é a diferenciação entre células mesoteliais e malignas, principalmente quando aquelas sofrem metaplasia, sendo particularmente difícil quando as células malignas são escassas no fluido examinado e obscurecidas por células inflamatórias (8, 15, 22, 23).

A CMF é um método capaz de avaliar um grande número de células em um curto período de tempo, surgindo como uma promessa como adjuvante ao diagnóstico citológico das neoplasias (22, 24, 25, 26). Uma de suas aplicações mais divulgadas é a medida do conteúdo de DNA, que identifica populações de células com quantidades anormais de DNA (aneuploidia) e fornece uma estimativa da atividade proliferativa celular, analisando a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, podendo então caracterizar uma população de células neoplásicas (24, 26, 27, 28, 29, 30).

Tendo em vista as dificuldades para diagnosticar o comprometimento neoplásico da membrana peritoneal através do exame citopatológico convencional, o nosso objetivo é revisar a importância do uso da CMF no diagnóstico da CA.

## O CICLO CELULAR NORMAL

As células em proliferação passam por quatro estágios designados G0/G1, S, G2 e M, em que o conteúdo de DNA é replicado e dividido. Células com conteúdo diplóide de DNA são consideradas na fase G0/G1. Na fase G0 es-

tão em repouso, mas após um estímulo a célula entra em um período proliferativo (G1). Durante a fase S ou de síntese, as células aumentam o seu conteúdo de DNA continuadamente até atingir um estado tetraplóide com o dobro do conteúdo (G2). Na fase M, a célula se divide gerando duas células diplóides, retornando após à fase G0, onde subseqüente síntese de DNA não ocorre até que haja um novo estímulo para divisão celular e a célula retorne à fase G1, onde a síntese ativa de DNA recomeça (3, 31, 32, 33).

## PLOIDIA DE DNA

A distribuição do conteúdo de DNA de uma população de células produz um padrão conhecido como histograma. Em tecido normais e em muitas neoplasias com baixa proliferação celular aproximadamente 85% da população de células formam um pico nas fases G0/G1 e 15% estão nas fases S, G2 e M (34).

A Figura 1 representa a distribuição do DNA de uma população normal de células. Os picos G0/G1 e G2/M estão claramente definidos pelo seu conteúdo de DNA 2N (diplóide) e 4N (tetraplóide).

As alterações cromossomiais podem ser numéricas (aneuploidia) ou estruturais. A célula normal tem 46 cromossomas (diploidia). Se houver menos, há hipodiploidia, e se houver mais, há hiperdiploidia. As alterações estruturais incluem a translocação, inserção, inversão, deleção e duplicação, entre outras (35).

A ploidia das células tumorais é definida pela quantidade média de DNA de um compartimento G0/G1 de uma população neoplásica em relação à quantidade normal de um controle processado similarmente. Esse índice pode ser definido pela equação a seguir (30, 32, 33, 36):

$$\text{Índice de DNA (IDNA)} = \frac{\text{quantidade de DNA com pico G0/G1 das células em teste}}{\text{quantidade de DNA com pico G0/G1 das células padrão}}$$

Por convenção, um IDNA igual a 1,0 apresenta um pico de DNA diplóide G0/G1, refletindo o conteúdo de 46 cromossomas. O DNA aneuplóide é definido como o conteúdo de DNA de um pico G0/G1 de uma população que varia significantemente do pico médio da população de células diplóides usadas como referência. Alguns utilizam um limite entre 2 e 15% como variações do normal (23, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 42), estabelecendo assim uma margem de segurança. Portanto, se utilizada uma margem de segurança de 10%, o IDNA deve ser considerado aneuplóide quando menor do que 0,9 ou maior do que 1,1 (33).

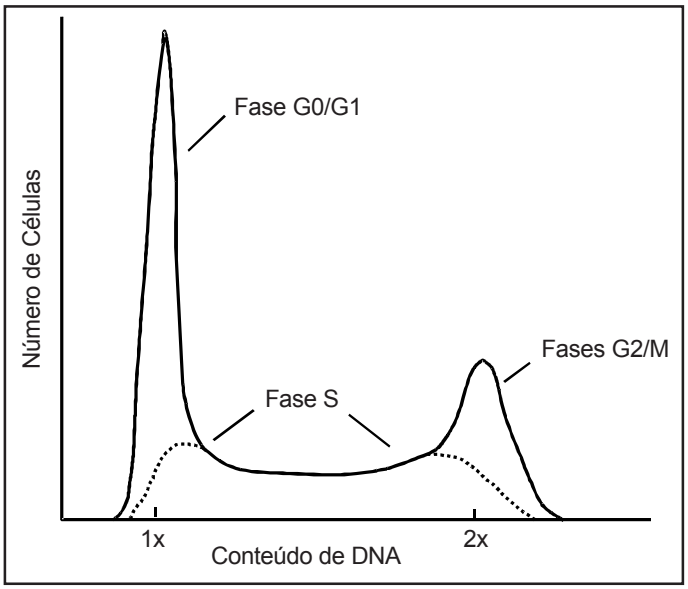



**Figura 1** – Distribuição de DNA de uma população normal de células. Adaptado de Zarbo RJ (34).

## PRINCÍPIOS DA CMF

A CMF utiliza um sistema para observar células individuais obtidas a partir de uma suspensão celular. Assim, uma população de células passa ao longo de tubos capilares, onde um sistema óptico registra o parâmetro que se deseja medir e alimenta um computador com os dados obtidos (32, 36). Corantes fluorescentes específicos para os componentes celulares que se deseja observar são utilizados (29, 32, 36, 43, 44). O sistema óptico empregado registra então como a célula reage após estímulo com laser de argônio em relação à dispersão da luz incidente, bem como sua habilidade em emitir fluorescência. Os fótons de luz dispersados e emitidos pela célula após seu encontro com o laser são separados em vários comprimentos de onda por uma série de filtros e espelhos. Detectores então geram impulsos elétricos que são convertidos em sinais digitais que são acumulados em uma freqüência de distribuição ou histograma (29, 33) (Figura 2).

O conteúdo de DNA é mais comumente estudado corando-se as células com iodeto de propídio, um corante que se liga ao DNA e que pode ser excitado com uma luz de argônio laser. A medida do conteúdo celular de DNA através da CMF correlaciona-se com o número de cromossomas e pode detectar com segurança a presença de aneuploidia (32, 36).

## APEL DA CMF NA PRÁTICA CLÍNICA

Em pouco mais de uma década, a CMF evoluiu de um método de pesquisa altamente especializado para um tes-

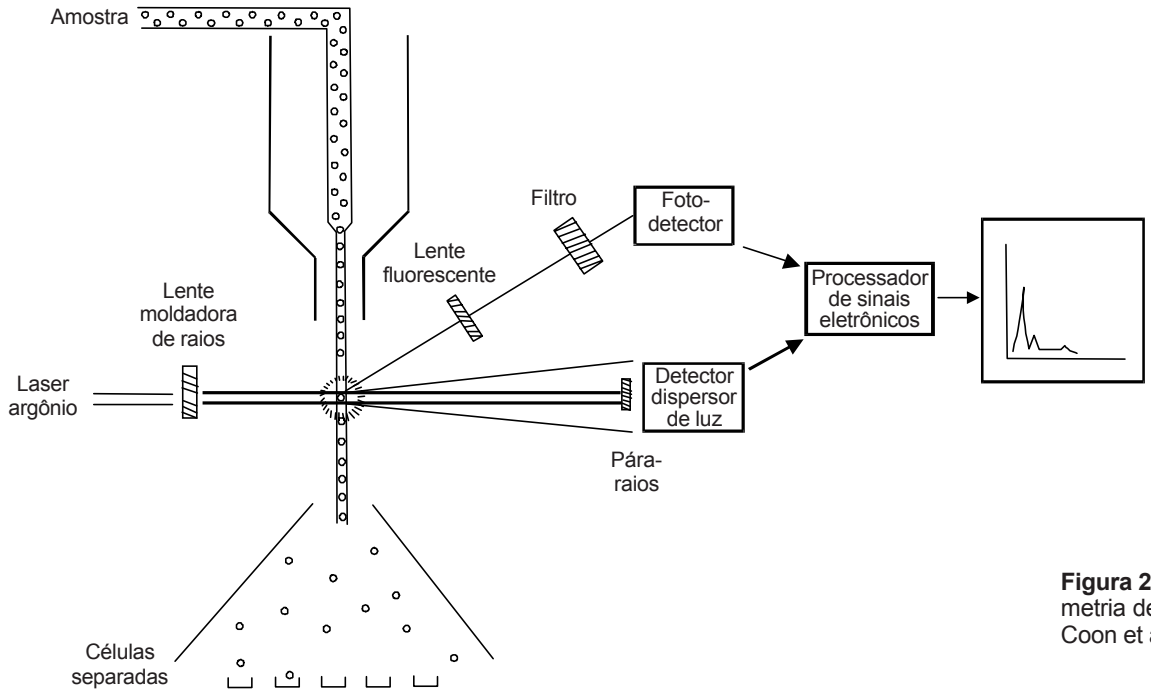



**Figura 2** – Princípios da citometria de fluxo. Adaptado de Coon et al. (44).

te utilizado em várias situações clínicas (27, 30, 33). O examinador não está limitado a verificar apenas um parâmetro celular, proporcionando o exame um entendimento claro da biologia das células individuais e, em última instância, da doença. Apesar de tudo o que oferece, a CMF não é vista como um método altamente difundido para uso no diagnóstico das neoplasias.

Diversos estudos, que utilizam a CMF para análise do DNA, detectando anormalidades cromossomiais em neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas, mielomas) e em tumores sólidos têm sido publicados (1, 30, 43, 45, 46, 47, 48). Esses trabalhos demonstram que a aneuploidia é vista freqüentemente nas células malignas, detectando-se conteúdo anormal de DNA em até 92% dos tumores sólidos (45).

A análise da ploidia de DNA através da CMF tem sido utilizada na tentativa de aumentar a acurácia diagnóstica do exame citopatológico das efusões (pleural, pericárdica e peritoneal) (12, 14, 37, 39, 41, 42, 49,50, 51, 52, 53, 54, 55), sendo capaz de identificar populações de células anormais não reconhecidas pelo exame citológico convencional (4, 39, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56).

Por outro lado, a aneuploidia de DNA tem sido relatada também em tecidos normais, em uma variedade de neoplasias benignas e em condições não neoplásicas. Assim, pode ser observado em liomiomas, adenomas colônicos, adenomas de tireóide, de pituitária, de paratireóide e de adrenal, schwanomas, fibromatose, granulomas de corpo estranho e tumores benignos com alto conteúdo de linfócitos. Tecido hepático normal, órgãos endócrinos, urotélio e mesotélio podem apresentar picos poliplóides de DNA em posições tetraplóides e octaplóides sem a presença de malignidade (33).

Deve-se ressaltar que a CMF parece ter também importância prognóstica (57). Friedlander et al. (58) relataram ser a ploidia um bom determinante da sobrevida em pacientes com neoplasia de ovário em estágio avançado. Neste estudo, embora muitas das neoplasias em estágio inicial fossem diplóides, todas as em estágio terminal eram aneuplóides. Posteriormente, o mesmo grupo (46) demonstrou que 31% dos tumores de ovário eram diplóides e 69% aneuplóides, sendo que os pacientes com tumores diplóides viveram significativamente mais tempo do que aqueles com tumores aneuplóides. No entanto, Sahni et al. (42) não demonstraram correlação entre o tempo de sobrevida e ploidia, em contraste com os estudos de Friedlander et al. (30, 31).

No entanto, o sucesso relatado tem sido variado. Resultados falso-negativos têm sido observados em até 38% dos casos e falso-positivos em até 14% (12, 59). Assim, efusões serosas malignas podem apresentar um histograma diplóide (falso-negativo) e, ocasionalmente, células mesotelias reativas podem desenvolver aneuploidia de DNA (falso-positivo). No entanto, a presença de aneuploidia é altamente sugestiva de neoplasia (60).

Tendo em vista os resultados desses estudos, seus autores recomendam seu uso de forma seletiva, ou seja, apenas nos casos onde a citologia resulte suspeita ou negativa, não recomendando sua utilização de forma rotineira.

Quando avaliamos as efusões de pacientes com e sem CA, observamos que o IDNA apresentou baixa sensibilidade diagnóstica (57,1%), com resultados falso-positivos em 6,5%, não havendo vantagem no uso associado do

IDNA com o exame CP convencional. No entanto, a CMF foi capaz de detectar 50% dos casos de ascite carcinomatosa cujo exame CP era negativo, sendo então de grande auxílio nesta situação (55, 56). Este achado reforça a opinião de alguns autores (5, 38, 39, 40, 61), que entendem ser a CMF de importância somente naquela população de pacientes com exame CP negativo no derrame peritoneal.

A CMF pode ser utilizada também para realizar a estimativa da porcentagem de células que se encontram na fase S do ciclo celular. Essa reflete a proliferação celular, mas não necessariamente a presença de células malignas. No entanto, o achado de uma porção significativamente elevada de células em fase S é uma forte indicação da presença de câncer e de mau prognóstico (28, 61). Nos ciclos celulares em humanos normais, a porcentagem dos núcleos que se encontram na fase S e G2/M pode atingir até 15%. No entanto, os pontos de corte para determinar a presença de baixa, intermediária ou alta taxa de proliferação celular não são universalmente aceitos (33). Um número elevado de células em proliferação (porcentagem de células na fase S ou na fase S+G2/M) parece ocorrer mais em efusões malignas do que nas benignas (28, 50, 52, 57, 61). Em nossa experiência (55, 62), apesar da porcentagem de células que se encontram na fase S ter sido significativamente maior nos pacientes com CA do que naqueles com ascite de origem não-carcinomatosa, este parâmetro apresentou baixa sensibilidade e especificidade de diagnósticos, indo ao encontro das idéias de outros autores (23, 42, 63).

Pode-se concluir que, na atualidade, embora alguns estudos mostrem que a CMF possa detectar casos de efusões malignas que não são diagnosticados inicialmente pelo CP isoladamente, a baixa sensibilidade do método impede sua padronização para o "screening" de efusões. Deve então ser utilizada, com cautela, somente naqueles casos em que a despeito de uma forte evidência clínica de neoplasia peritoneal, o exame CP do líquido de ascite é negativo.

Tendo em vista estes resultados, entende-se que a procura de novos métodos no diagnóstico da CA deve ser continuada. Embora a CMF convencional não tenha oferecido a resposta aos anseios em diagnosticar o comprometimento neoplásico do peritônio, certamente reforça a abertura de uma nova perspectiva. Assim, hoje podemos contar com a CMF multiparamétrica, que é uma técnica que permite a seleção de uma determinada população de pacientes, utilizando marcadores específicos e uma análise mais acurada do ciclo celular e da ploidia das células tumorais (23, 24, 61). A combinação da determinação do conteúdo de DNA e a utilização de anticorpos monoclonais fornece informações não apenas em relação ao crescimento da célula tumoral, mas também em relação a parâmetros dinâmicos, como o tempo do ciclo celular (28). O uso combinado da CMF com a determinação de proteínas relacionadas ao ciclo celular (PCNA, Ki67, estatina, p105, p34), oncoproteínas (bc12, p53, cerb/NEU, c-myc), hormônios (progesterona) e receptores de fatores de crescimento (CD25, CD117, CD122, CD126) podem fornecer informações relevantes em subtipos específicos de câncer (22, 28, 64), e espera-se em breve possam ser utilizados de forma mais rotineira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. BARLOGIE B, DREWINKO B, SCHUMANN J et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980; 69:195-203.
2. DEWALD G, DINES DE, WEILAND LH et al. Usefulness of chromossome examination in the diagnosis of malignant pleural effusions. *N Engl J Med* 1976; 295:1494-1500.
3. GIVAN AL. Cells from within: DNA and molecular biology. In: Givan AL. *Flow cytometry*: *First principles* .New York: Wiley-Liss, 1992.
4. HEDLEY D W, SHANKEY TV, WHEELESS LL. DNA cytometry consensus conference. *Cytometry* 1993; 14:471.
5. JONES MA, HITCHCOX S, D'ASCANIO P et al. Flow cytometric DNA analysis versus cytology in the evaluation of peritoneal fluids. *Gynecol Oncol* 1991; 43:226-232.
6. SHANKEY TV, RABINOVITCH PS, BAGWELL B et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993; 14:472-477.
7. MATTOS AA. *Estudo do líquido de ascite, contribuição da biópsia peritoneal às cegas*. Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1981. 104 p. (Dissertação, Mestrado em Gastroenterologia).
8. _____. *Diagnóstico da ascite. Propostas propedêuticas e contribuição do exame citopatológico do peritôneo*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1985. 121 p. (Tese, Doutorado em Gastroenterologia).
9. MATTOS AA, LIMA JP. Estudo do líquido de ascite. *Rev AMRIGS* 1983; 27:294-301.
10. RUNYON BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Sleisenger MH, Fordtran JS. *Gastrointestinal Disease.* 6. ed. Philadelphia: WBSC, 1998.
11. BOTH CT, SUWA E, RODRIGUES D. Avaliação do líquido de ascite em um Hospital Geral. Apresentado no XXXV Congresso Brasileiro de Gastroenterologia em Salvador, 1998.
12. SCHNELLER J, EPPICH E, GREENEBAUM E et al. Flow cytometry and feulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 1987; 59:1307-1313.
13. TAVEL ME. Ascites: Etiologic considerations with emphasis on the value of several laboratory findings in diagnosis. *Am J Med Sci* 1959; 237:727-733.
14. GHILAIN JM, HENRION J, SCHAPIRA M et al. Le liquid d'ascite: intérêt de divers tests biologiques dans le diagnostic différential entre ascite cirrhotique et néoplasique. *Acta Gastroenterol Belg* 1990; 53:168-179.
15. MATTOS AA. A*scite.* Porto Alegre: Byk, 1994.
16. MCGUCKIN WF, SOULE EH, CAIN JC et al. The value of glycoprotein determination and cytology in the study of ascitic fluid. *Gastroenterology* 1959; 37:332-338.
17. CEELEN GH. The cytologic diagnosis of ascitic fluid. Symposium on diagnostic accuracy of cytologic technics. *Acta Cytol* 1964; 8:165-185.
18. LUSE SA. A hystocytologic and electron microscopie study of effusions associated with malignant disease. *Ann N Y Acad Sci* 1956; 63:1331-1347.
19. LUSE AS, REAGAN JW. A histocytological study of effusions. Effusions associated with malignant tumors. *Cancer* 1954; 7:1167-1181.
20. VON HAAM E. A comparative study of the accuracy of cancer cell detection by cytological methods. *Acta Cyto*, 1962; 6:508-518.

21. ZARBO RJ. Flow cytometric DNA analysis of effusion (editorial). *Am J Clin Pathol* 1991; 95:2-4.
22. GREEN LK, GRIFFIN J. Increased natural killer cells in fluids. A new, sensitive means of detecting carcinoma. *Acta Cytol* 1996; 40:1240-1245.
23. JOSEPH MG, BANERJEE D, HARRIS P et al. Multiparameter flow cytometric DNA analysis of effusions: a prospective study of 36 cases compared with routine cytology and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 1995; 8:686-693.
24. CIBAS ES. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol* 1995; 13:166-171.
25. FUHR JE, KATTINE AA, SULLIVAN TA et al. Flow cytrometric analysis of pulmonary fluids and cells for the detection of malignancies. *Am J Pathol* 1992; 141:211-215
26. O'LEARY TJ. Flow cytometry in diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol* 1998; 18:41-46.
27. KEREN DF. History and evolution of surface marker assays. In: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. *Flow cytometry and clinical diagnosis.* Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994.
28. ORFAO A, CIUDAD J, GONZALEZ M et al. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995; 221:145-152.
29. SHAPIRO HM. Overture. In: Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.
30. _____. Using flow cytometers. In: Shapiro HM. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.
31. PROLLA G. A citometria de fluxo. In: Fleck J. *Câncer: Integração clínico– biológica.* Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.
32 RILEY RS, MAHIN EJ, ROSS W. DNA ploidy and cell cycle analysis. In:Riley RS, Mahin EJ, Ross W. *Clinical applications of flow cytometry*. New York: Igaku Shoin Medical Publication, 1993.
33. ROSS JS. *DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology.* New York: Igaku Shoin Medical Publication, 1996.
34 –ZARBO RJ. Quality control issues and technical considerations in flow cytometric DNA and cell cycle analysis of solid tumors. In: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. *Flow cytometry and clinical diagnosis.* Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994.
35. BITTENCOURT R, PASKULIN G. Alterações cromossômicas nas neoplasias. In: Fleck J. *Câncer: Integração clínico-biológica.* Porto Alegre: MEDSI, 1992.
36. PROLLA G, PREGER R, FLECK J. A cinética celular. In: Fleck J. *Câncer: Integração clínico-biológica*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.
37. BANKS ER, JENNINGS CD, JACOBS S et al. Comparative assessment of DNA analysis in effusions by image analysis and flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 1994; 10:62-67.
38. BARDALES RH, STANLEY MW, SCHAEFER RF et al. Secondary pericardial malignancies. A critical appraisal of the role of cytology, pericardial biopsy and DNA ploidy analysis. *Am J Clin Patho,* 1996; 106:29-34.
39. CEYHAN BB, DEMIRALP E, CELIKEL T. Analysis of pleural effusions using flow cytometry. *Respiration* 1996; 63:17-24.
40. CLARK GM, MATHIEU MC, OWENS MA et al. Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1992; 10:428-432.
41. RIJKEN A, DEKKER A, TAYLOR S et al. Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow cytometry and image analysis. *Am J Clin Pathol* 1991; 95:6-12.
42. SAHNI K, TRIBUKAIT B, EINHARN N. Flow cytometric measurement of ploidy and proliferation in effusions of ovarian carcinoma and their possible prognostic significance. *Gynecol Oncol* 1989; 35:240-245.
43. BARLOGIE B, SPITZER G, HART JS et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. *Bloo,* 1976; 48:246-258.
44. COON JS, WEINSTEIN RS. *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore: Williams &Wilkins, 1990.
45. BARLOGIE B, GOHDE W, JOHNSTON A et al. Determinations of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res* 1978; 38:3333-3339.
46. FRIEDLANDER ML, HEDLEY DW, TAYLOR IW et al. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 1984; 44:397– 400.
47. LATREILLE J, BARLOGIE B, HITELMAN W et al. Flow cytometry of DNA content for detection of aneuploidy in bone marrow cells of patients with multiple mieloma. *Blood* 1978; 52:259.
48. O'HARA MF, BEDRASSIAN CWM, JOHNSON TS et al. Flow cytometry in cancer diagnosis. *Prog Clin Pathol* 1984; 9:135-153.
49. HEDLEY DW, PHILIPS J, RUGG CA et al. Measurement of cellular DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20:749-752.
50. HOSTMARK J, VIGANDER T, SKAARLAND E. Characterization of pleural effusions by flow-cytometric DNA analysis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66:315-319.
51. KAPUSTA L, ZBIERANOWSKI I, DEMIANIUK C et al. The role of DNA flow and image cytometry in the evaluation of body cavity fluids. *Anal Quant Cytol Histol* 1991; 13:187-192.
52. KATZ RL, JOHNSON TS, WILLIAMSON KD. Comparision of cytologic and acridine-orange flow-cytometric detection of malignant cells in human body cavity fluids. *Anal Quant Cytol Histol* 1985; 7:227-235.
53. UNGER K, RABER M, BEDROSAIN CWM et al. Analysis of pleural effusions using automated flow cytometry. *Cancer* 1983; 52:873-877.
54. WEISSMAN GS, MCKINLEY MJ, BUDMANN DR et al. Flow cytometry-a new technique in the diagnosis of malignant ascites. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9:599-602.
55. BOTH CT. A citometria de fluxo no diagnóstico da carcinomatose peritoneal. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 1998. 116 p. (Tese, Doutorado em Hepatologia).
56. BOTH CT, MATTOS AA, NEUMANN J, REIS M. Flow cytometry in the diagnosis of peritoneal carcinomatosis. *Can J Gastroenterol* 1999; 13( suppl B):219 (resumo).
57. ZARBO RJ, LINDEN MD. DNA analysis of gastrointestinal and genitourinary tract neoplasms. In: Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE. *Flow cytometry and clinical diagnosis.* Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994.
58. FRIEDLANDER ML, TAYLOR IW, RUSSEL P et al. Ploidy as a prognostic factor in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1983; 2:55-63.
59. EVANS DA, THORNTHWAITE JT, NG ABP et al. DNA flow cytometry of pleural effusions. Comparision with pathology for the diagnosis of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol 1983; 5:19-27.*
60. VINDELOV L, CHRISTENSEN I. An integrated set of methods for routine flow cytometric DNA analysis. *Methods Cell Biol* 1990; 33:127-137.
61. SIKORA J, DWORACKI G, ZEROMNSKI J. DNA ploidy, S-phase and Ki-67 antigen expression in the evaluation of cell content of pleural effusions. *Lung* 1996; 174:303-313.
62. BOTH CT, MATTOS AA, NEUMANN F, REIS M. A fase S do ciclo celular determinada através da citometria de fluxo no diagnóstico da carcinomatose peritoneal. GED 1999, 18:243-249.
63. KEHOE S, WARD K, LUESLEY D et al. The application of flow cytometric DNA analysis in detecting the presence of malignant cells in ovarian carcinoma peritoneal fluids. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:656-659.
64. SHAPIRO HM. History. In:Shapiro HM. 3 ed. New York:Willey-Liss, 1995.