

Cuantificación de ADN en carcinomas de células transicionales de vejiga mediante citometría de imagen en cortes tisulares. Una propuesta metodológica.

I HIERRO, M ALVAREZ, A BLANES, L VICIOSO, I GARCÍA Y A MATILLA.

Dpto. de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga.

SUMMARY

DNA quantification in transitional cell carcinoma of bladder by means of image cytometry on tissue sections. A methodologic proposal.

DNA ploidy has proved to be an objective, reliable and reproducible prognostic factor, most of studies using flow cytometry as method for DNA quantification. However, comparative studies between flow and image cytometry has shown more sensitivity for DNA-aneuploidy detection using the last one. Furthermore, image cytometry on tissue sections is the only method for DNA quantification when the lesion is small or located (small biopsies). In this study, we try to establish the utility of image cytometry on tissue sections of transitional cell carcinoma of bladder and to propose a standardised method of measurement and definition of DNA-aneuploidy. In order to verify reliability, we have compared the results using this method with those flow cytometry of fresh tissue. Of 97 cases, 84,9% of diploids and 90,3% of aneuploids were concordant by both methods. Image cytometry detected more aneuploids cases (12) than flow cytometry. In conclusion, image cytometry on tissue sections and flow cytometry provide similar results in assessment of DNA-ploidy of transitional cell carcinoma of the bladder, but image cytometry has shown more sensitivity for detecting DNA-aneuploid tumours. Furthermore, this method permits to assess ploidy in a consecutive section to be used for diagnostic or staging purpose.

Key words: *Image cytometry. Tissue sections. Standardisation. Transitional cell carcinoma. Bladder.*

INTRODUCCION

La ploidía de ADN ha demostrado ser, un factor pronóstico objetivo, fiable y reproducible, en una amplia gama de tumores humanos (1-7). Aunque la mayoría de los estudios utilizan la citometría de flujo (CF) como técnica de referencia, son cada día más numerosos los investigadores que están poniendo de relieve la mayor capacidad de la citometría de imagen (CI) en la detección

de líneas celulares aneuploides -utilizando improntas o núcleos disgregados de bloques de parafina-aludiendo a las posibilidades de selección y a la menor dilución de la muestra, como los elementos más justificadores. Sin embargo, ninguna de las técnicas mencionadas preserva la arquitectura tisular ni permite mediciones de lesiones, muy localizadas o escasamente representadas (pequeñas biopsias), lo que sólo es posible medir mediante CI en cortes histológicos.

Las principales objeciones a la CI en secciones tisulares -presencia de núcleos seccionados, controles inadecuados, difícil interpretación de los histogramas y tiempo consumido en su realización- se centran en hechos que son controlables con los medios disponibles actualmente (8,9). En estos momentos existe, además, una gran tendencia a la estandarización de los resultados

Correspondencia: Dra. Isabel Hierro Martín. Dpto. de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n. 29071- Málaga.

Trabajo financiado por la DGYCIT (ref. nº PB92-0427).

obtenidos. Por ello, probablemente en un futuro próximo y como consecuencia de la simplificación metodológica y reproducibilidad de valoraciones, la CI retome su pujanza, ahora con más solidez, con la gran ventaja añadida que supone -al menos, para el patólogo- la preservación de la arquitectura tisular (10).

En consecuencia, en el presente estudio se pretende determinar la utilidad de la CI en cortes tisulares de CCT de vejiga, así como proponer un sistema estandarizado de medición y definición de aneuploidía. Para comprobar su efectividad hemos correlacionado los resultados obtenidos mediante CI con la ploidía de ADN determinada por CF en material en fresco (técnica generalmente considerada de referencia).

MATERIAL Y METODOS

Hemos estudiado 100 casos consecutivos de CCT, entre los años 1992 y 1994, obtenidos de los Servicios de Urología y Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Málaga.

Citometría de flujo (CF)

Obtención y tratamiento de las muestras

Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de material en fresco, tras la recepción inmediata -en suero fisiológico- de la lesión extirpada, separada en dos frascos: 1) Lesión y 2) base de la lesión; del primer recipiente se tomaron pequeñas muestras de áreas identificadas macroscópicamente como tumorales. A continuación se procedió a la disgregación mecánica del material (con pinzas) que se depositó en un tubo de ensayo con 5cc. de tampón citrato, y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido a -180° , para su almacenamiento hasta la medición.

De las suspensiones nucleares preparadas, y previa descongelación, se tomaron 400 μ l por caso que fueron procesadas según el protocolo de Vindelov (11), simplificado (Cycletest DNA, Becton Dickinson).

Medición del contenido de ADN

Las mediciones con citometría de flujo (CF) se realizaron con un citómetro de flujo FACScan equipado con láser de argón de 488 nm. La fluorescencia se cuantificó en un mínimo de 10.000 núcleos; tras calibración del canal 2c, utilizando como control diploide linfocitos humanos de ganglio linfático, teñidos con ioduro de propidio (2c).

Con el módulo discriminador de dobletes (DDM), incluido en el software del FACScan, eliminamos dobletes y tripletes mediante la activación adecuada de ventanas o "gates" de selección.

Interpretación de histogramas

La evaluación del ciclo celular fue realizada, preferentemente, siguiendo el modelo matemático RFIT

(12). Aquellos histogramas con fase S elevada, fueron evaluados mediante el modelo SFIT, y en aquellos casos con dos poblaciones perfectamente definidas, se utilizó el modelo polinomial.

Se definió histograma como diploide cuando sólo presentaba un pico en la misma localización que el pico control, con índice de ADN= 1. Se consideraron tetraploides los casos en los que había un pico anormal en la región tetraploide (4c) conteniendo más del 15% del total de las células y como aneuploides aquellos casos que presentaban dos o más poblaciones. Se consideró como población diploide el primer pico definido -más del 10% del total de células medidas- que aparecía en el histograma (que podía ser comprobado añadiendo células control, en casos dudosos); y como población(es) aneuploide(s) el(los) pico(s) restante(s).

Todos aquellos histogramas en los que el coeficiente de variación del pico principal fue superior a 5% se clasificaron como no valorables.

Citometría imagen (CI) en cortes tisulares.

Para la cuantificación de ADN nuclear se realizaron cortes de 4-5 micras, consecutivos a los realizados para el estudio histológico. Los núcleos se tiñeron con Feulgen (13), utilizando el kit para cuantificación de ADN de Becton Dickinson (CAS DNA Staining, Becton Dickinson, Cellular Imaging Systems, Illinois, USA) con azul de tionina como cromógeno.

La medición del ADN se realizó con el sistema de análisis de imagen CAS-200 (Becton Dickinson) utilizando el programa QDA (Quantitative DNA Analysis) versión 3.0, que permite un análisis rápido de las imágenes mediante el uso de filtros preestablecidos y modificaciones de la medición del ADN nuclear en función del espesor del corte, de especial importancia en casos de tumores con grandes núcleos y alta probabilidad de ser seccionados (8).

El principio básico del sistema es simple: la cantidad de tinción es proporcional a la cantidad de ADN presente en la célula. No obstante, el sistema CAS ha de ser calibrado previamente con células que contengan una cantidad conocida de ADN; en nuestro caso, utilizamos hepatocitos de ratas, suministrados con el "kit de ADN", que se incluyeron en el proceso de tinción junto con cada grupo de muestras.

a) Calibración

La calibración consiste en generar una ecuación lineal que relacione el ADN en picogramos con la densidad óptica. Se miden un mínimo de 20 hepatocitos de rata, a partir de los cuales se obtiene un sumatorio de densidad óptica y se calcula el valor modal de dicho sumatorio. Este valor modal, es un parámetro variable que, relacionado con la constante conocida de 13.35 pg de ADN de los núcleos tetraploides de rata permite obtener el punto de calibración (que relacionará la

densidad óptica, en unas condiciones de tinción y ajuste de luz del microscopio dadas, a una masa de ADN en picogramos). Los núcleos medidos se representan en un histograma cuyo coeficiente de variación ha de ser menor del 3%.

b) Control interno y configuración de filtros

Uno de los aspectos más problemáticos de la cuantificación de ADN por citometría de imagen es la utilización de un control interno adecuado. El uso de linfocitos normales fijados (como control interno o externo) constituye, frecuentemente, un estándar diploide inadecuado; esto es debido a que la alta concentración del ADN linfocitario provoca valores de absorción menores de lo esperado. Los linfocitos en preparaciones secadas al aire resultan ser mejor control porque la cromatina está más dispersa. Lo más adecuado es el análisis simultáneo de células normales del mismo origen que la muestra problema, lo que resulta bastante difícil, sobre todo en preparaciones obtenidas de tumores malignos.

Partiendo de esta premisa y utilizando la opción de elaboración de filtros del QDA, procedimos a realizar un filtro propio, a partir de los valores de área, factor de forma, contenido de ADN en picogramos y densidad óptica, obtenidos en mediciones del urotelio de vejigas normales. Medimos 300 núcleos en 5 casos obtenidos de material de autopsias, sin patología vesical, en el que existe, en condiciones normales, una pequeña proporción de células superficiales tetraploides.

Con ello se establecieron los valores de la población diploide y la tetraploide, y a partir de ellos los valores de poblaciones distintas al 2c y 4c (Tabla I).

c) Medición de las muestras problema

En cada caso se cuantificaron, al menos, 200 núcleos, mediante un criterio selectivo al elegir la muestra: el proceso de medida se inició por las áreas más celulares y con mayor atipia para, posteriormente, completar en campos consecutivos el número total de núcleos.

Una vez concluida la adquisición de imágenes, se procedió a la visualización de los núcleos seleccionados, rechazando las imágenes inadecuadas (núcleos cortados, superpuestos, células picnóticas, etc).

Las mediciones de los núcleos de la muestra se representaron por el programa estadístico en un histograma de escala variable (donde el eje x recoge el contenido de ADN y el eje y el número de células).

d) Parámetros evaluados.

El programa proporcionó un estudio por áreas del histograma (área ABCDEF), donde el área A corresponde a la región diploide, el área B a la hiperdiploide, el área C a la tetraploide, D hipertetraploide, etc. En cada una de ellas, se midieron y recogieron los siguientes parámetros: índice de ADN mínimo y máximo, valor modal, media, desviación típica, coeficiente de variación del pico, porcentaje de células, y número de células medidas.

Un histograma fue considerado como diploide cuando se observaba una población celular cuyo pico principal representaba más del 75% del total de las células medidas y su índice de ADN (I_{ADN}) se encontraba entre los límites 0.90-1.15; se clasificaron como aneuploides aquellos histogramas con dos poblaciones celulares distintas, una diploide y una aneuploide que representaba más del 40% de las células y un $I_{ADN} > 1.15$. En aquellos histogramas en los que el coeficiente de variación excedía de 10% se estableció la aneuploidía cuando más del 55% de las células se encontraban en el área aneuploide.

Estudio estadístico

Para determinar la validez de la cuantificación ADN por CI en cortes tisulares, se utilizaron métodos estadísticos univariantes tipo tablas de contingencia, aplicando el test de la Chi-cuadrado y considerando siempre un nivel de significación estadística del 95% ($p < 0.005$).

RESULTADOS

El estudio de ADN, mediante citometría de flujo se realizó prospectivamente en 106 tumores. Cinco casos, tipificados en el estudio histológico posterior como procesos inflamatorios, fueron diploides y sirvieron como control interno de la técnica y un caso, etiquetado como adenocarcinoma, resultó ser aneuploide. En los

	Linfocitos	Diploide	Tetraploide	Hiperdipl.	Hipertetrapl.
Area (μm^2)	10-20	25-60	50-300	25-300	25-400
Forma	10-16	13-25	15-30	13-30	10-50
pg ADN	6.47-7.96	6.5-7.96	13.5-15.5	7.97-13.4	15.5-50
Densidad	0.15-0.50	0-1000	0-1000	0-1000	0-1000

Tabla 1. CCT de vejiga: Filtro utilizado para la cuantificación de ADN en cortes tisulares.

Variable	Media	DT	Rango
Primer pico (100 casos)			
Moda	0.99	0.08	0.92-1.18
Media	1.02	0.04	0.95-1.09
CV	7.06	1.70	0.93-10.03
% céls	55.74	23.79	4.96-99.03
Segundo pico (69 casos)			
Moda	1.29	0.11	1.11-1.61
Media	1.41	0.08	1.15-1.54
CV	11.62	2.06	3.03-15.68
% céls	45.52	11.70	9.65-69.68

Tabla 2. CCT de vejiga: Resultados de las variables de CI.

100 casos restantes, que fueron finalmente el objeto de estudio, se identificaron poblaciones clonales diploides en 53 casos, aneuploides en 31, tetraploides en 13 y en tres casos, los histogramas resultantes no fueron valorables. La fase S y el índice de proliferación se ajustaron a los modelos matemáticos mencionados en 85 casos, siendo la media de células en fase S de 6.99 y el índice de proliferación de 10.93.

El estudio de estos mismos casos, mediante citometría de imagen en cortes histológicos, identificó un pico diploide en 100 casos y en 69 casos demostró un segundo pico (Tabla II). Con este criterio se clasificaron como ADN-diploide 49 casos (49%) y ADN-aneuploide 51 casos (51%).

Al comparar los datos de ploidía de ADN obtenidos mediante CF en material fresco y CI en cortes tisulares, correspondientes a 97 casos (en CF, 3 casos fueron no valorables) observamos que el grado de concordancia en la frecuencia de diploides obtenidos con ambas técnicas fue del 84.9% y en los aneuploides del 90.3%. Mediante CI se detectaron mayor número de casos aneuploides, en concreto 12 casos (20.3%), de los cuáles, tras el estudio mediante CF, 8 (16.1%) fueron diploides (Tabla 3) y 3 no valorables.

En cuanto a los 13 casos tetraploides obtenidos por CF, 3 de ellos fueron diploides en CI y los 10 restantes fueron dados como aneuploides (Tabla III).

DISCUSION

Aunque la CF es la técnica más utilizada en el momento actual y la más estandarizada son cada día más los trabajos que ponen de manifiesto la validez de la CI (10, 14-16). Esta técnica ha demostrado su utilidad al permitir la realización de estudios retrospectivos en material de archivo de pacientes con una evolución clínica conocida. Cuando se realiza en cortes tisulares, presenta la indudable ventaja de preservar la arquitectura global, y por tanto la confirmación y selección visual de los tipos celulares sujetos a evaluación (8). Así, la

cuantificación de ADN es posible en aquellos casos concretos donde la arquitectura tisular es importante para la identificación de las zonas a medir (lesiones displásicas o carcinoma "in situ"), en muestras con escasa celularidad, o en aquellos casos en que el tejido no es apropiado para disgregación (17).

Sin embargo, la realización de estudios de cuantificación de ADN en secciones de tejido plantea ciertas consideraciones. Es preciso establecer el grosor del corte adecuado y rechazar histogramas con coeficientes de variación superiores al 20% (18). En cortes finos (menos de 5 µm) existe el riesgo de seccionar los núcleos, con lo que el valor relativo del contenido de ADN obtenido es menor que el real, por lo que se precisa medir un número elevado de núcleos (200-500) para obtener un valor medio de ADN adecuado. En cortes gruesos, se obtienen imágenes de núcleos solapados que dificultan la medición. Aunque las opiniones al respecto son controvertidas, autores como Dorman (19) y Montironi (17) proponen como alternativa utilizar un grosor estándar de 5 µm asumiendo que, de esta forma, se puede obtener información útil sobre el ADN en ciertos tumores, especialmente en aquellos que muestren clara separación histológica de sus núcleos como es el caso de la vejiga. En un intento de corregir el efecto del grosor de corte se han establecido algoritmos destinados a compensar la pérdida nuclear producida por la sección. Sin embargo, su utilidad se reduce prácticamente a tejidos con núcleos esféricos y pequeños, ya que en los histogramas de cortes tisulares de neoplasias pleomórficas el efecto del grosor del corte entero no suele ser bien corregido (20).

El tejido incluido en parafina puede ser también procesado para la obtención de preparaciones citológicas, utilizando una modificación del método propuesto por Hedley (21). Desde que Hedley publicara en 1983 el método original para la obtención de suspensiones nucleares a partir de tejidos incluidos en parafina, esta técnica ha sido ampliamente difundida y aplicada. El método, permite estudios retrospectivos, examen microscópico y selección del tejido tumoral con

Variable	Ploidía CF			p
	Diploide Nº casos (%)	Aneuploide Nº casos (%)	Tetraploide Nº casos (%)	
Ploidía CI				
Diploide	45 (84.9)	3 (9.7)	3 (23.1)	0.000
Aneuploide	8 (16.1)	28 (90.3)	10 (76.9)	

Tabla 3. CCT de vejiga: Comparación de la ploidía de ADN en CF con la ploidía de ADN por CI.

histomorfología definida y facilita estudios de control y comparaciones inter e intrainstitucionales. En material disgregado los núcleos representan predominantemente núcleos completos; sin embargo, los núcleos de pequeños focos tumorales, pueden ser difíciles de identificar tras la tinción con Feulgen. Además, aún en el más adecuado de los protocolos de disgregación, es inevitable una pequeña pérdida de material debido a lo agresivo del método en sí mismo. Entre los factores críticos del proceso de disgregación enzimática cabe destacar el tipo de enzima utilizado, concentración del enzima y tiempo de incubación. Estos tres parámetros modifican la calidad de la suspensión celular obtenida y difieren según el tipo de tejido. A pesar de lo anteriormente expuesto, el mayor inconveniente de los métodos de disgregación es el tiempo necesario para el procesamiento de cada muestra (3-4 horas), lo que hace lenta y engorrosa la preparación de una extensión adecuada para aplicar citometría de imagen de ADN.

Trabajos recientes (9) demuestran que, la CI en cortes de tejido (de 5-7 µm), puede considerarse un método fiable y reproducible para la determinación de la ploidía de ADN siempre y cuando se controlen de manera estricta procesos decisivos como la tinción y ajustes del sistema de análisis de imagen para evaluación de la muestra. Sin embargo, los estudios comparativos que evalúan la correlación existente entre la ploidía de ADN determinada mediante CF y CI difieren en sus conclusiones. En nuestro estudio, el grado de concordancia en la frecuencia de casos ADN- diploides obtenidos con ambas técnicas fue del 84.9% y en los ADN-aneuploides del 90.3%.

Las discordancias surgen en el grado de sensibilidad para la detección de aneuploidía. Así, algunos trabajos muestran mayor grado aneuploidía en CI (22, 23) mientras que otros autores observan, con mayor frecuencia, patrones ADN-aneuploides en CF (24).

Mediante CF, la presencia de abundantes células inflamatorias o no neoplásicas diluye e impide la detección de posibles poblaciones aneuploides

peridiploides, así como pequeñas clonas celulares aneuploides; en cambio, con la CI, las células inflamatorias se excluyen visualmente y el observador mide, por lo general, las zonas con mayor grado de atipia nuclear. Además, está demostrado que las células con contenidos de ADN-aneuploides próximos a 4n son más frágiles y soportan mal los tratamientos mecánico-enzimáticos necesarios para CF (25).

La incapacidad de la CI para detectar, en algunos casos, poblaciones aneuploides se explica por el reducido tamaño de la muestra (200-400 células) y por la obtención de histogramas de baja resolución y altos CV, que impiden distinguir las poblaciones ADN-peridiploides y ADN-aneuploides de las estrictamente diploides. En nuestra serie, mediante CI en cortes tisulares se detectaron mayor número de casos aneuploides que con CF, debido sobre todo a que las muestras fueron cuantificadas siempre de manera rigurosa, por un mismo observador (experimentado), seleccionando un mínimo de 200 núcleos celulares hasta la obtención de un histograma adecuado con CV siempre inferior al 15%.

RESUMEN

La ploidía de ADN ha demostrado, ser un factor pronóstico objetivo, fiable y reproducible. Aunque la mayoría de los estudios utilizan la citometría de flujo (CF) como técnica de referencia, son cada día más numerosos los investigadores que están poniendo de relieve la mayor capacidad de la citometría de imagen (CI) en la detección de líneas celulares aneuploides. Además, la CI en cortes histológicos es la única que permite medir lesiones, muy localizadas o escasamente representadas (pequeñas biopsias). El presente estudio pretende determinar la utilidad de la CI en cortes tisulares de carcinomas de células transicionales de vejiga, así como proponer un sistema estandarizado de medición y definición de aneuploidía. Para comprobar su efectividad hemos correlacionado los resultados obtenidos mediante CI con la ploidía de ADN

determinada por CF en material en fresco. Al comparar los datos de ploidía de ADN obtenidos mediante CF en material fresco y CI en cortes tisulares, correspondientes a 97 casos (en CF, 3 casos fueron no valorables) observamos que el grado de concordancia en la frecuencia de diploides obtenidos con ambas técnicas fue del 84.9% y en los aneuploides del 90.3%. Mediante CI se detectaron mayor número de casos aneuploides, en concreto 12 casos (20.3%), de los cuáles, tras el estudio mediante CF, 8 (16.1%) fueron diploides y 3 no valorables. En conclusión, la CI de los carcinomas de células transicionales de vejiga (en secciones de tejido) ha obtenido unos resultados similares a la CF, mostrando incluso mayor capacidad para detectar aneuploidía en los casos que presentaron carcinoma "in situ" asociado o displasia de la mucosa adyacente, con la ventaja añadida de valorar la misma muestra que es utilizada para el microestadaje habitual.

Palabras clave: Citometría de imagen. Cortes tisulares. Estandarización. Carcinoma de células transicionales. Vejiga.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a Ingrid Valero (Técnico del Dpto. de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina) su colaboración en el procesamiento de las muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. Tribukait B, Gustafson H, Esposti P: Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow cytofluorometric DNA analysis and its relation to histopathology and cytology. *Cancer* 1979; 43: 1742-1751.
2. Blomjous C, Schipper N, Baak J et al. Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol* 1988; 41: 21-25.
3. Blomjous C, Schipper N, Baak J, Vos W, DE Voogt H, Meijer C. The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 243-248.
4. Caratero C, Hijazi A, Caratero A et al. Flow cytometry analysis of urothelial cell DNA content according to pathological and clinical data on 100 bladder tumors. *Eur Urol* 1990; 18: 145-149.
5. de Vita R, Forte D, Maggi F et al. Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by flow cytometry versus histopathological and staging classifications in human bladder tumors. *Eur Urol* 1991; 19: 65-73.
6. Shapers FM, Ploem-Zaaijer JJ, Pauwels R et al. Image cytometric DNA analysis in transitional carcinoma of the bladder. *Cancer* 1993; 72: 182-189.

7. Hedley DV, Shankey TV, Wheelless LL. DNA cytometry consensus conference. *Cytometry* 1993; 14: 471-474.
8. Bacus JW y Bacus JV. *Mod Pathol* 1994; 7: 652-664.
9. Smith PS, Parkinson IH, Leong A SY. Principles of ploidy analysis by static cytometry. *J Clin Pathol* 1996; 49: 104-107.
10. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the european society for analytical cellular pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1995; 17: 1-7.
11. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983 c; 3: 323-327.
12. Baisch H, Gohde W, Linden W. Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in the various phases of the cell cycle. *Radiat Environ Biophys* 1975; 12: 31-39.
13. Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von typus der thymonukleinsäure preparaten. *Hoppe Zeyler Z Phys Chem* 1924; 135: 203-248.
14. Cope C, Rowe D, L Delbridge, Philips J, Friedlander M. Comparison of image analysis and flow cytometric determination of cellular DNA content. *J Clin Pathol* 1991; 44: 147-151.
15. Elsheikh TM, Silverman JF, McCool JW, Riley RS. Comparative DNA analysis of solid tumors by flow cytometric and image analyses of touch imprints and flow cell suspensions. *Am J Clin Pathol* 1992; 3: 296-304.
16. Lanigan D, Mc Lean PA, Curran B, Leader M. Comparison of flow and static image cytometry in the determination of ploidy. *J Clin Pathol* 1993; 46: 135-139.
17. Montironi R, Diamanti L, Galluzi C, Giannulis I. Optimization of DNA static cytometry. *Arq Patol* 1992; 24: 16-35.
18. Danque POV, Chen H-B, Patil J, Jagirdar J, Orsatti G, Paronetto F. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors. A comparison of six methods of sample preparation. *Mod Pathol* 1993; 6: 270-275.
19. Dorman AM, Walsh TN, Droogan O, et al. DNA quantification of squamous cell carcinoma of the esophagus by flow cytometry and cytophotometric image analysis using formalin fixed paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1992; 13: 886-882.
20. Sapi Z, Hendricks JB, Pharis PG, Wilkinson EJ. Tissue section image analysis of breast neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 714-720.
21. Hedley D. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five years on cytometry 1989; 10: 229-241.
22. Sapi Z, Hendricks JB, Pharis PG, Wilkinson EJ. Tissue section image analysis of breast neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 714-720.
23. Koss LG, Wersto RP, Simmons DA, Deitch D, Herz F, Free SZ. Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors. *Cancer* 1989 b; 64: 916.
24. Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MD, Suit PF, Gephardt

- GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-326.
25. Claud RD III, Weinstein RS, Howedy A, Straus AK, Coon JS. Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Mod Pathol* 1989; 2: 463.

