

A centrifugação com enriquecimento protéico e a sedimentação gravitacional facilitada na citologia do LCR de paciente com leucemia aguda

JOÃO BAPTISTA DOS REIS-FILHO¹, JOSÉ DE ANCHIETA ALVES²

Unitermos: Líquido cefalorraquidiano. Citologia. Neuroleucemia — Leucemia aguda

Key words: Cerebrospinal fluid. Cytology. Nervous system — Leukemia — Acute leukemia

RESUMO — O diagnóstico de neuroleucemia é feito basicamente pelo achado de células blásticas no líquido cefalorraquidiano, o que obriga a usar um método de concentração de células que, ao mesmo tempo, permita uma recuperação de grande número de células e uma coloração suficientemente boa para uma segura identificação da célula blástica.

O propósito deste trabalho foi o de comparar a recuperação de células blásticas usando o método da centrifugação com enriquecimento protéico e o da sedimentação gravitacional facilitada.

O material para este estudo consistiu em 73 amostras de líquido cefalorraquidiano de 28 pacientes com leucemia aguda.

Os resultados deste estudo mostraram que as células blásticas estiveram presentes em 31 das 73 amostras, quando o método usado foi o da centrifugação, e em 14 das 73, quando o método foi o da sedimentação. A proporção de células blásticas somente foi menor no método da centrifugação em 3 oportunidades.

Estes resultados permitem concluir que o método da centrifugação, como descrito por Reis & Palhano, é melhor do que o da sedimentação para pesquisar células blásticas no líquido cefalorraquidiano.

INTRODUÇÃO

O estudo da citologia diferencial no líquido cefalorraquidiano (LCR) de paciente com leucemia aguda assume papel relevante, não só no diagnóstico, mas também determinando critérios terapêuticos e sugerindo prognóstico^(1,2,17,18,28,30,33,45,46). Este estudo é importante para definir o estágio da leucemia, não só no início do tratamento, quando do diagnóstico, mas também durante o curso da doença, mesmo em remissão hematológica, para sur-

prender precocemente uma infiltração leucêmica do sistema nervoso^(20,31).

Enquanto a contagem global das células do LCR já era feita com precisão satisfatória desde a introdução da câmara de Fuchs-Rosenthal em 1904, a contagem diferencial sempre apresentou problemas devido ao pequeno número de células geralmente presentes no LCR. Deste fato resultou a necessidade de se proceder à concentração dos elementos figurados, como etapa prévia para a posterior confecção do preparado com as células bem distendidas e preservadas. O processo ideal⁽³¹⁾ deve preencher alguns requisitos fundamentais: a) concentração das células sem dano ou perda seletiva de um determinado tipo; b) técnica de concentração sem prejudicar o LCR para os demais exames de rotina; c) preparação rica, com distribuição regular e com definição nítida da estrutura celular; d) coloração por técnica hematológica, tal como a de Leishman, a de May-Grünwald-Giemsa ou similar, que permite fácil

Trabalho realizado no Setor de LCR da Disciplina de Neurologia da Escola Paulista de Medicina. Recebido em 2.9.85. Aprovado para publicação em 4.10.85.

1. Prof. Adjunto, Chefe do Setor e Pesquisador pelo CNPq.

2. Mestre pelo Curso de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

interpretação das alterações patológicas, baseando-se nos conhecimentos adquiridos pelos citologistas com as preparações de sangue, medula óssea, gânglios linfáticos e dos diversos líquidos orgânicos; e) simplicidade de execução para que se possa usá-lo nas pesquisas diárias.

Os principais métodos para a concentração das células são a centrifugação simples, a centrifugação com enriquecimento protéico, a centrifugação padronizada com a citocentrífuga, a sedimentação gravitacional facilitada, a filtração por membrana com poros de tamanho uniforme e a captação de células por um retículo de fibrina^(13,32,37,41,42,48). Em nosso meio, Reis & Palhano⁽³²⁾ difundiram o método da centrifugação com enriquecimento protéico e coloração hematológica que oferece imagens celulares idênticas àquelas que se obtém com os esfregaços do sangue, além de permitir o uso do LCR sobrenadante para provas bioquímicas. Para evitar os efeitos prejudiciais da centrifugação e do atrito por ocasião da confecção do esfregaço, Schönemberg (1949)⁽⁴⁰⁾ idealizou um processo baseado na sedimentação gravitacional natural das células sobre lâmina, onde elas são coradas diretamente por método hematológico. Sayk (1954)⁽³⁷⁾ aperfeiçoou este processo construindo uma câmara de sedimentação gravitacional facilitada, onde as células de uma coluna de LCR descem lentamente sobre uma lâmina, acelerando-se a sedimentação dos elementos figurados com auxílio de papel de filtro colocado sobre esta lâmina. Entre nós este método foi difundido por Spina-França (1970)⁽⁴⁵⁾, utilizando a câmara idealizada por Suta⁽⁴⁷⁾.

Apesar de todos os progressos realizados, ainda não se pode afirmar que existe um método completamente isento de críticas. As duas principais técnicas à escolha, em nosso meio, são a da centrifugação com enriquecimento protéico⁽³²⁾ e a da sedimentação gravitacional facilitada⁽³⁸⁾. A primeira permite uma coloração das células de forma semelhante àquela do esfregaço de sangue periférico, e o reaproveitamento do LCR centrifugado, porém as células sofrem danos pela centrifugação; a outra, embora preserve as células do efeito prejudicial da centrifugação, não permite coloração ideal, o LCR não pode ser aproveitado para outras provas e há uma perda grande de células, variando entre os autores^(3,5,9,23,24,38), de 10% a 95%. Assim sendo, se por um lado a centrifugação exerce efeito prejudicial sobre as células mais frágeis, por outro lado, no método da sedimentação gravitacional facilitada, há perda de grande número de células, não se sabendo qual o tipo celular mais atingido. Há estudo demonstrando diferenças na proporção dos tipos celulares quando se faz a contagem diferencial por um ou por outro método⁽³⁵⁾.

O propósito do presente trabalho é o de fazer um estudo comparativo das células blásticas presentes no LCR

de pacientes com leucemia aguda usando o método da centrifugação com enriquecimento protéico e o da sedimentação gravitacional facilitada para concentração das células.

MATERIAL E MÉTODOS

O material deste trabalho consiste de 73 amostras de LCR, isentas de sangue acidental, obtidas de 28 pacientes com diagnóstico de leucose aguda. A idade dos pacientes variou de 1 a 79 anos, sendo 17 do sexo masculino e 11 do sexo feminino.

A contagem global das células foi realizada com o auxílio da câmara de Fuchs-Rosenthal; quando a amostra de LCR se apresentava turva, apenas para a contagem global, uma pequena parcela da amostra era diluída em solução salina isotônica. Tanto a contagem global das células como a preparação do sedimento foram feitas logo após a colheita do LCR, para evitar a degeneração celular que pode ocorrer.

A contagem diferencial das células foi realizada em todas as amostras, mesmo naquelas com número global de células dentro da normalidade.

As amostras de LCR foram obtidas através de punção lombar ou cisternal; alguns pacientes, para avaliação terapêutica e acompanhamento, foram submetidos a mais de uma punção.

O estudo citomorfológico foi realizado simultaneamente pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico de Reis & Palhano⁽³²⁾ e pelo método da sedimentação gravitacional facilitada com a câmara de Reis⁽⁹⁾.

Os preparados citológicos foram realizados simultaneamente pelos dois métodos. Após a contagem global, uma parcela da amostra de LCR era separada e colocada em volume apropriado (quadro 1) na câmara de sedimentação; o restante da amostra era centrifugado e se procedia ao preparo das lamínulas pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico.

A busca dos elementos figurados nos preparados foi feita com a objetiva de pequeno aumento (200 vezes) e sua identificação com a objetiva de imersão (800 vezes). Para calcular a proporção das células foram sempre contadas e identificadas, no mínimo, 100 células em cada preparado. A microscopia foi feita em toda a área de sedimentação, num caso, e nas duas lamínulas, em outro caso. Em ambos os casos as células foram enumeradas e sua proporção foi calculada em percentagem.

O estudo estatístico foi realizado com o auxílio do teste de Wilcoxon com aproximação à curva normal e no teste de MacNemar.

QUADRO 1

Volume de LCR necessário para sedimentação das células

Número global de células em 1 mm ³	Volume necessário de LCR em ml
0 a 10	1,5
11 a 100	1,0
101 a 500	0,5
além de 500	0,2

QUADRO 2

Resultado do confronto entre os dois métodos estudados

	Células blásticas	
	com	sem
Sedimentação	14	59
Centrifugação	31	42

TABELA 1

Proporção de células blásticas encontradas nos métodos estudados

Amostra n°	Células no LCR p/mm ³	Células blásticas no LCR	
		Sedimentação	Centrifugação
1	0,8	0	3
2	0,8	0	3
3	22,0	0	77
4	7,4	1	20
5	4,4	4	16
6	2,0	7	66
7	0,8	0	2
8	0,8	0	2
9	1,8	0	3
10	13,0	13	32
11	1,8	0	12
12	4,0	26	53
13	20,0	51	48
14	3,0	2	2
15	2,0	0	2
16	4,0	49	47
17	1,0	0	1
18	2,0	0	1
19	0,4	3	1
20	37,0	96	96
21	16,0	0	2
22	12,0	2	4
23	1,8	0	1
24	10,0	0	0,5
25	1,0	3	5
26	0,8	0	1
27	2,0	1	4
28	0,4	3	5
29	1,4	0	3
30	4,8	0	0,5
31	1,4	0	1

RESULTADOS

As células blásticas estiveram presentes em 31 amostras de LCR, numa percentagem que oscilou entre 0,5% e 96%. Deste total de amostras, 19 apresentaram número global de células dentro dos limites da normalidade e as outras 12 revelaram hipercitose. Nas amostras em que foram identificadas células blásticas, constatou-se que em 26 de leucemia linfóide aguda a percentagem foi superior no método da centrifugação, enquanto que em 3, sendo 2 de leucemia monocítica aguda e 1 de leucemia mielóide, o método da sedimentação revelou percentual maior. Nas outras 2 amostras, uma de leucemia mielóide e outra de leucemia linfóide, as percentagens foram idênticas nos dois métodos.

Comparando-se os resultados obtidos pelo método da centrifugação com aqueles do método da sedimentação, no que se refere à presença ou não de células blásticas, foi verificado que, pelo método da centrifugação, as células blásticas foram encontradas em 31 amostras e que, pelo método da sedimentação, este achado ocorreu em 14 amostras. Desta forma, em 17 amostras a célula blástica foi encontrada apenas pelo método da centrifugação; nas 14 oportunidades em que as células blásticas foram encontradas no método da sedimentação, este achado se deu pelo método da centrifugação também. Em 42 amostras não foram encontradas células blásticas em nenhum dos métodos (quadro 2).

A tabela 1 mostra os valores percentuais das células blásticas identificadas no método da centrifugação com enriquecimento protéico e no da sedimentação gravitacional facilitada, bem como o número global de células nestas amostras.

O teste de MacNemar revelou discordância significativa nos resultados obtidos com o método da centrifugação e o da sedimentação, evidenciando que a probabilidade de o método da centrifugação detectar células blásticas é significativamente maior do que aquela observada pelo método da sedimentação; verificaram-se 14 resultados positivos pela sedimentação, enquanto que a centrifugação revelou 31 (quadro 2). Este teste foi realizado com base na presença ou ausência de células blásticas, sem levar em consideração as percentagens. O teste de Wilcoxon, com aproximação à curva normal, realizado com base na diferença entre as percentagens de células presentes em um e outro método, também demonstrou que a quantidade de células blásticas detectadas pelo método da centrifugação é significativamente maior do que a fornecida pelo método da sedimentação.

COMENTÁRIOS

Embora algumas pesquisas^(21,34) mostrem o valor da determinação da taxa de proteínas do LCR, na avaliação do paciente leucêmico, o estudo das células do LCR é fundamental porque é através da identificação das células blásticas que se faz o diagnóstico laboratorial preciso da infiltração leucêmica do sistema nervoso. Desta forma, é necessário um exame citomorfológico minucioso no qual se deve lançar mão de técnicas precisas que forneçam, ao lado de melhor rentabilidade na recuperação das células, imagens citológicas perfeitas, de tal forma que possibilitem o reconhecimento das estruturas com segurança. Embora para o estudo da citologia oncológica alguns autores^(4,12,36) usem o método de coloração descrito por Papanicolaou, neste trabalho optamos para técnica de coloração hematológica de Leishman, que permite fácil interpretação das alterações patológicas, baseando-se nos conhecimentos adquiridos pelos citologistas com as preparações de sangue, medula óssea, gânglios linfáticos e dos diversos líquidos orgânicos.

Tanto o método da centrifugação^(22,27,29,46) como o da sedimentação^(3,6,38,43) têm sido usados com bons resultados pelos pesquisadores. Um único estudo comparativo entre estes dois métodos de concentração de células, relacionado com patologias diversas⁽³⁵⁾, mostrou diferenças significativas nos achados citológicos, e até quanto seja de nosso conhecimento, não há na literatura nenhum confronto destes dois métodos com o intuito de se detectar células blásticas.

Os resultados deste trabalho, confrontando o método da centrifugação com enriquecimento protéico com o da sedimentação gravitacional facilitada em 73 amostras de LCR de 28 pacientes acometidos por leucemia aguda, mostraram que o método da centrifugação de Reis & Palhano⁽³²⁾ detectou células blásticas em maior número de amostras do que o da sedimentação, e que em todas as oportunidades nas quais estas células foram verificadas pelo método da sedimentação também o foram pelo método da centrifugação.

Em 26 amostras, das 31 onde as células blásticas foram encontradas, a percentagem foi superior na centrifugação, em 3 amostras o percentual foi maior no método da sedimentação e em 2 oportunidades os rendimentos foram os mesmos para cada método. Dois casos com percentagem maior de células blásticas no método da sedimentação e um com quantidades iguais nos dois métodos são do caso de leucemia monocítica aguda. Apenas 1 caso com células blásticas pequenas teve percentagem superior no método da sedimentação.

Dyken e col.⁽¹⁵⁾, em 1980, utilizando a citocentrífuga e a sedimentação, fizeram uma classificação das células do LCR em apenas dois tipos: pequenas, onde estariam incluídas as de natureza linfocitária, enquanto que o segundo tipo era constituído por monócitos, macrófagos, plasmócitos e granulócitos. Das 23 amostras analisadas por estes autores a citocentrífuga não captou elementos citológicos em duas, mesmo tendo sido encontrados na câmara de contagem global. Nas outras amostras as células foram detectadas pelos respectivos métodos. A sedimentação revelou proporção maior do tipo grande em 19 casos, além de não provocar distorções das estruturas celulares.

Da mesma forma como Reis-Filho & Bei⁽³⁵⁾ constataram melhor definição das estruturas celulares com o método da centrifugação, observou-se neste trabalho maior facilidade na identificação das células blásticas, quando verificadas nos preparados do método da centrifugação com enriquecimento protéico. Outros autores^(19,39), usando o método da citocentrífuga com adição de albumina bovina, obtiveram bons resultados com a coloração das células.

Os resultados deste trabalho confirmam que existem grandes diferenças quando se faz o estudo citológico do LCR por um ou por outro método. O achado de células monocitóides em maior proporção no método da sedimentação é quase uma constante, não só em patologias⁽³⁵⁾, como também em condições normais^(11,25). Assim, verifica-se que, nos pacientes com leucemia aguda, se esta for do tipo monocítico, pode haver maior proporção de células blásticas, como ocorreu em duas oportunidades, no método da sedimentação, quando comparado ao da centrifugação. Estudo comparativo entre o método da sedimentação e o que utiliza uma citocentrífuga foi realizado por Ducos e col.⁽¹⁴⁾ com base em 37 pacientes, 31 com leucemia aguda e 6 com linfoma não-Hodgkin. Na amostra de apenas 1 paciente foram encontradas células blásticas pelos dois métodos.

As diferenças entre os diversos métodos ocorrem em virtude da perda seletiva de células. Desta forma, quanto maior for a recuperação e, portanto, quanto menor a perda de células, a contagem diferencial irá estar mais próxima da realidade. Alguns fatores são considerados como responsáveis pelas modificações quantitativas que ocorrem quando se põe em prática o método da sedimentação. O tempo gasto para sedimentação é abordado nas publicações de determinados autores^(5,9,16,24) como uma das causas que influenciam no rendimento das células. Também o diâmetro do cilindro tem influência no rendimento celular⁽⁹⁾. Quanto maior o diâmetro, maior a superfície de sedimentação. Isto estaria vinculado ao fenômeno de aderência das estruturas às paredes do tubo de tal forma que,

com maiores diâmetros, haveria menor adesividade, uma vez que se tornaria pequeno o número de células, em relação ao volume de LCR, que impregnariam internamente o cilindro da câmara. Outro aspecto para o qual é chamada a atenção é para o tipo de papel usado para a absorção do LCR^(5,7,24).

Böyum⁽⁸⁾ (1968), num processo de separação dos leucócitos humanos pela adição de um gradiente ao plasma, relatou que os granulócitos eosinófilos se movem mais rapidamente do que os polimorfonucleares neutrófilos e que os monócitos migram com maior velocidade quando comparados com as células linfocitárias. A explicação do autor sobre este mecanismo é fundamentada no tamanho e densidade das células. Provavelmente o mesmo fenômeno que interfere na separação dos leucócitos é o responsável pelos números divergentes encontrados quando se estuda as células pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico e pelo método da sedimentação gravitacional facilitada.

A centrifugação exerce um efeito prejudicial sobre as células mais frágeis ou em fase de degeneração. Por outro lado, na sedimentação gravitacional facilitada há perda de 80% das células^(7,10). Em trabalho anterior comparativo⁽³⁵⁾ foi verificado que a sedimentação acelerada revela proporção superior de células monocíticas, granulócitos neutrófilos e eosinófilos, enquanto a centrifugação com soro humano mostrou melhor coloração das células, evidenciando minúcias da textura, sendo por este motivo mais eficiente para identificação das células leucêmicas. É possível que as proteínas do soro que é adicionado ao LCR no método da centrifugação se incorporem às células deste meio, que possui baixo teor protéico, permitindo, desta forma, que elas passem a receber as tonalidades cromáticas do corante, exibindo, assim, detalhes morfológicos mais precisos. O método da centrifugação com enriquecimento protéico demonstra, de preferência, as células que dispõem de vitalidade suficiente para suportar as manipulações do processo, ao passo que a sedimentação facilitada revela, ao mesmo tempo, as formas mais frágeis e envelhecidas. A centrifugação detecta o quadro citológico em relação ao estado atual do processo patológico, enquanto que a sedimentação expressa as células atuais providas de vitalidade, associadas com aquelas antigas que restaram da fase inicial do processo. Desta forma, os resultados deste trabalho e os resultados de outras pesquisas mostram sempre que o método da sedimentação recupera proporcionalmente mais células grandes do que o método da centrifugação^(11,15,26). Esta diferença indica-nos que quando se pretende estudar células pequenas, tais como blastos de natureza linfóide e células blastomatosas, deve-se dar preferência ao método da centrifugação com

enriquecimento protéico. Por outro lado, quando o estudo for direcionado para células leucêmicas da linhagem monocítica, o método mais indicado seria o da sedimentação gravitacional facilitada.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem afirmar que o método da centrifugação mostrou-se mais eficiente do que o da sedimentação por apresentar maior número de resultados com presença de células blásticas e, assim sendo, que o estudo da citologia do líquido cefalorraquidiano de pacientes leucêmicos deve ser feito de preferência pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico.

SUMMARY

Both centrifugation techniques with protein enrichment and accelerated gravitational sedimentation technique in the cytomorphology of cerebrospinal fluid of acute leukemia are compared.

The diagnose of nervous system leukemia is helpful for therapeutic and prognosis criteria. This diagnose is done upon the presence of leukaemic cells in the cerebrospinal fluid (CSF). Thus it is necessary to search blastic cell in the CSF using a method of concentration that at the same time allows a good recovery rate of CSF cells and it is able to afford the necessary cytologic definition for the accurate identification of the leukaemic cells.

The purpose of this study was to compare the recovery rate of CSF leukaemic cells using the centrifugation technique with protein enrichment (Reis' method) and accelerated gravitational sedimentation technique. The material for this survey consisted of 73 samples of CSF from 28 patients with acute leukemia. The cytomorphologic study was performed with both techniques in all samples.

The results of this study showed that blastic cell was present in 31 of 73 samples when the method used was centrifugation technique and in 14 of the same 73 samples when the method used was sedimentation technique. In these 14 samples the blastic cells was present in both techniques and the blastic cell ratio was greater 9 times in centrifugation than in sedimentation technique; in 2 times it was equal and in 3 the ratio was in smaller amount in the centrifugation technique.

These results allow to conclude that the centrifugation technique as described by Reis & Palhano is better than the sedimentation technique to search blastic cells in CSF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUR, RJA; SIMONE, J; HUSTU, HO; VERZOSA, MS Comparative study of central nervous system irradiation and intensive chemotherapy early in remission of childhood acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 29: 381-392, 1972.
2. BALHUIZEN, JC; BOTS, GTAM; SCHABERG, A; BOSMAN, F T Value of cerebrospinal fluid cytology for the diagnosis of malignancies in the central nervous system. *J. Neurosurg.* 48: 747-753, 1978.
3. BRAMMER, H Zur tumorzelldiagnostik in liquor cerebrospinalis. *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* 185: 89-109, 1963.
4. BARRETT, DL & KING, EB Comparison of cellular recovery rates and morphologic detail obtained using membrane filter and cytocentrifuge techniques. *Acta Cytol.* (Baltimore) 20: 174-180, 1976.
5. BATTIFORA, H & HIDVEGI, D Improved apparatus for spinal fluid cytomorphology. *Acta Cytol.* (Baltimore) 22: 170-171, 1978.
6. BISCHOFF, A L'examen cytologique du liquide céphalo-rachidien par la méthode de sédimentation et de filtration: étude de 5.000 cas. *Rev. Neurol.* (Paris) 108: 567-575, 1963.
7. BOTS, GTAM; WENT, LN; SCHABERG, A Results of a sedimentation technique for cytologie of cerebrospinal fluid. *Acta Cytol.* (Baltimore) 8: 234-241, 1964.
8. BÖYUM, A A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 [Suppl.]: 51-76, 1968.
9. BRANDÃO, CA Recuperação das células do líquido cefalorraquidiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1983. (Dissertação — Mestrado).
10. BRANDÃO, CA & REIS-FILHO, JB Contagem diferencial das células do líquido cefalorraquidiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. I — Proporção de recuperação das células. *Neurobiologia*, 46: 325-340, 1983.
11. BRANDÃO, CA & REIS-FILHO, JB Contagem diferencial das células do líquido cefalorraquidiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. II — Conceito de normalidade. *Arq. Neuropsiquiatr.* 42: 140-145, 1984.
12. DEL VECCHIO, PR; DeWITT, SH; BORELLI, JI; WARD, JB; WOOD Jr, TA; MALMGREN, RA Application of millipore filtration technique to cytologic material. *J. Natl. Cancer Inst.* 22: 427-431, 1959.
13. DORÉ, CF & BALFOUR, BM A device for preparing cell spreads. *Immunology*, 9: 403-405, 1965.
14. DUCOS, R; DONOSO, J; WEICKHARDT, U; VIETTI, TJ Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer*, 43: 1.479-1.482, 1979.
15. DYKEN, PR; SHIRLEY, S; TREFZ, J; EL GAMMAL, T Comparison of cytocentrifugation and sedimentation techniques for CSF cytomorphology. *Acta Cytol.* (Baltimore) 24: 167-170, 1980.
16. ENESTRÖM, S Suction technique for sedimentation of body fluid cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 59: 473-480, 1963.
17. FRIGUGLIETTI, DJ; ZORLINI, G; BRAGA, F; REIS-FILHO, I; BEI, A; RAMOS Jr, J; SILVA, MP; REIS, JB Neuroleucemias. *Hospital*, 67: 745-759, 1965.
18. HENDERSON, ES Acute lymphocytic leukemia. In: WILLIAMS, WJ; BEUTLER, E; ERSLEV, AJ; LICHTMAN, MA *Haematology*. New York, McGraw-Hill, 1983. p. 970.
19. HOELTGE, GA; FURLAN, A; HOFFMAN, GC The differential cytology of cerebrospinal fluids prepared by cytocentrifugation. *Cleve. Clin. Q.* 43: 237-246, 1976.
20. JAMRA, M & LORENZI, TF Neuroleucemias. In: Leucócitos, leucemias e linfomas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p. 144-145.
21. JIMENEZ, RA; APESTEGUI, A; JIMENEZ, E; TREJOS, R; MORRA, LA; LOBO, JF Protein changes in cerebrospinal fluid of children with meningeal leukemia. *Acta Haematol.* (Basel) 65: 48-53, 1981.
22. KLINE, TS Cytological examination of the cerebrospinal fluid. *Cancer*, 15: 591-597, 1962.
23. KOLAR, O & ZEMAN, W Spinal fluid cytomorphology: description of apparatus, technique and findings. *Arch. Neurol.* 18: 44-51, 1968.
24. KRENTZ, MJ & DYKEN, PR Cerebrospinal fluid cytomorphology: sedimentation vs. filtration. *Arch. Neurol.* 26: 253-257, 1972.
25. LIVRAMENTO, JA; LUZ, BR; HAUSSEN, SR; SPINA-FRANÇA, A Citomorfologia do líquido cefalorraquidiano do recém-nascido normal. *Arq. Neuropsiquiatr.* 32: 207-211, 1974.
26. MACHADO, LR Imunidade celular e líquido cefalorraquidiano. In: MELARAGNO-FILHO, R & NASPITZ, CK *Neuroimunologia*. São Paulo, Sarvier, 1982. p. 81-87.
27. MARKS, V & MARRACK, D A technique for the staining of cells from the C.S.F. *Confin. Neurol.* 20: 310-315, 1960.
28. MEDICAL RESEARCH COUNCIL Treatment of acute lymphoblastic leukaemia, effect of "prophylactic" therapy against central nervous system leukaemia: report of the medical research council by the leukaemia committee and the working party on leukaemia in childhood. *Br. Med. J.* 2: 381-384, 1973.
29. McMENEMEY, WH & CUMINGS, JN The value of the examination of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of intracranial tumours. *J. Clin. Pathol.* 12: 400-411, 1959.
30. NAYLOR, B The cytologic diagnosis of cerebrospinal fluid. *Acta Cytol.* (Baltimore) 8: 141-149, 1964.
31. REIS, JB; BEI, A; REIS-FILHO, JB Líquido cefalorraquidiano. São Paulo, Sarvier, 1980.
32. REIS, JB & PALHANO, DP Técnica da concentração, preparação do esfregaço e coloração das células do líquido cefalorraquidiano. *Hospital*, 73: 113-119, 1968.
33. REIS, JB; ZUKERMAN, E; KERBAUY, J; SILVA, MP Neuroleucemias: tratamento da meningopatia leucêmica. *Hospital*, 78: 1.397-1.405, 1970.
34. REIS-FILHO, JB; ADAMS, JG; NOVO, NF Estudo das variações da taxa de proteínas totais no líquido cefalorraquidiano de pacientes com leucose aguda. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 29: 37-47, 1983.
35. REIS-FILHO, JB & BEI, A Confronto entre o método da sedimentação gravitacional facilitada e o da centrifugação com enriquecimento protéico para o estudo da citologia diferencial do líquido cefalorraquidiano. *Neurobiologia*, 42: 283-290, 1979.

36. REYNAUD, AJ & KING, EB A new filter for diagnostic cytology. *Acta Cytol.* (Baltimore) 11: 289-294, 1967.
37. SAYK, J Ergebnisse neuer liquor-cytologischer untersuchungen mit dem sedimentierkammer-verfahren. *Ärzt. Wochenschr.* 9: 1.042-1.046, 1954.
38. SAYK, J Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. Jena, Veb Gustav Fischer Verlag, 1960. 175 p.
39. SCELSI, R; BASSI, P; POLONI, M; NAPPI, G Cytomorphologic changes in the cerebrospinal fluid sediment. A comparative study by cytocentrifugation and cytosedimentation technique. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 52: 1.229-1.233, 1976.
40. SCHÖNENBERG, H Eine einfache methode zur herstellung gut differenzierbarer liquorzellpreparate. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 74: 881, 1949.
41. SEAL, SH A method for concentrating cancer cells suspended in large quantities of fluid. *Cancer*, 9: 866-868, 1956.
42. SIMON, G & SCHRÖER, H The cell-catch procedure: a new method which preserves all cellular elements of spinal-fluid samples. *J. Neurosurg. Nurs.* 20: 787-792, 1963.
43. SÖRNAS, R A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 30: 568-577, 1967.
44. SPINA-FRANÇA, A Câmaras de sedimentação no estudo citológico do líquido cefalorraquiano. *Arq. Neuropsiquiatr.* 28: 84-86, 1970.
45. SPINA-FRANÇA, A; MACHADO, ABB; PASQUALIN, JR Técnica de Suta e identificação de células neoplásicas no líquido cefalorraquiano. *Arq. Neuropsiquiatr.* 29: 463-466, 1971.
46. SPRIGGS, AI & BODDINGTON, MM Leukaemic cells in cerebrospinal fluid. *Br. J. Haematol.* 5: 83-90, 1959.
47. SUTA, M Jednoduché zařízení Ke Kvalitativnímu cytologickému vyšetřování moku mozkomíšního a výpotku. *Cesk. Neurol. Neurochir.* 29: 101-106, 1966.
48. WATSON, P A slide centrifuge: an apparatus for concentrating cells in suspension onto a microscope slide. *J. Lab. Clin. Med.* 68: 494-501, 1966.

O que acontece quando você disca (011) 270-1233, de segunda a sexta-feira, das 8 às 18 horas.

Na hora que você liga, uma voluntária da **Rede Feminina de Combate ao Câncer** atende e pede o número da informação que você escolheu (de 1 a 60, lembre-se).

A resposta à sua consulta é uma gravação que dura até 2 1/2 minutos e que, no final, desliga o seu telefone, automaticamente.

- | | | |
|---|--|---|
| 01 — O que é câncer? | 21 — Os efeitos do fumo em não-fumantes e os direitos que estes têm. | 42 — O que é "Teste Papanicolau", que toda mulher deve fazer uma vez por ano? |
| 02 — Palavras do capelão de um hospital. | 22 — O fumo e os problemas dentários. | 43 — Câncer da vagina e doenças venéreas. |
| 03 — Câncer no adulto. | 23 — O perigo do fumo na gravidez. | 44 — Câncer da mama no homem. |
| 04 — Câncer no cérebro. | 24 — Diálogo sobre fumar e ter saúde. | 45 — Câncer da próstata. |
| 05 — Câncer da boca. | 25 — Câncer e álcool. | 46 — Câncer do pênis e doenças venéreas. |
| 06 — Câncer da garganta. | 26 — Tumores dos olhos. | 47 — Quimioterapia. |
| 07 — Câncer da tireóide. | 27 — Leucemia na criança. | 48 — Métodos não aprovados para o tratamento do câncer. |
| 08 — Câncer da tireóide após tratamento radioativo de cabeça e pescoço. | 28 — Linfomas da criança. | 49 — Perguntas que o povo faz sobre o câncer — I. |
| 09 — Câncer da laringe. | 29 — Tumor do rim da criança. | 50 — Perguntas que o povo faz sobre o câncer — II. |
| 10 — Reabilitação da fala após o câncer da laringe. | 30 — Neuroblastoma da criança. | 51 — Câncer do baço. |
| 11 — Câncer do esôfago. | 31 — Aumento do baço na criança. | 52 — Mieloma. |
| 12 — Câncer do estômago. | 32 — Doença de Hodgkin. | 53 — Leucemia do adulto. |
| 13 — Câncer do fígado. | 33 — Câncer dos ossos e na coluna vertebral. | 54 — Novos tratamentos. |
| 14 — Câncer do pâncreas. | 34 — Câncer da pele. | 55 — Imunologia. |
| 15 — Câncer do rim. | 35 — Melanoma maligno (verrugas, pintas, etc.). | 56 — AIDS. |
| 16 — Câncer da bexiga. | 36 — Linfomas e melanomas múltiplos. | 57 — Câncer do sistema nervoso. |
| 17 — Descoberta precoce do câncer no intestino. | 37 — Câncer da mama. | 58 — Infecção na criança com câncer. |
| 18 — Câncer no intestino e no ânus. | 38 — Câncer do seio — Aprenda a examinar os seios. | 59 — Raios laser e câncer. |
| 19 — Que é câncer do pulmão? | 39 — Mamografia. | 60 — Tomografia computadorizada. |
| 20 — Sintomas e tratamento do câncer no pulmão. | 40 — Câncer do ovário. | |
| | 41 — Câncer do útero. | |