

MODIFICAÇÕES NA PROPORÇÃO DAS CÉLULAS DO LCR DECORRENTES DA TÉCNICA UTILIZADA NO PREPARO DO ESFREGAÇO

Changes on CSF's cells proportions due to techniques of its smears preparations

JOÃO BAPTISTA DOS REIS FILHO¹ MARIA DE LOURDES AMUD ALI DOS REIS²

Quando comparados os métodos da centrifugação com enriquecimento protéico e da sedimentação gravitacional facilitada, foram observadas diferenças nas proporções das células presentes. Estas diferenças podem ocorrer em virtude de perda seletiva de células. O propósito deste trabalho é através de um artifício verificar, dentre os métodos da centrifugação com enriquecimento protéico e o da sedimentação gravitacional facilitada, qual espelha com maior precisão a realidade. Para tanto tomou-se 100 amostras de sangue periférico que foram diluídas a 1:200. As amostras assim diluídas foram utilizadas para fazer preparados citológicos pelo método da centrifugação e da sedimentação. Os resultados das contagens diferenciais foram comparados com os do leucograma obtido com a amostra não diluída, considerada padrão. Nesta comparação observou-se que os resultados iguais em relação ao padrão são em maior número no preparado obtido através da centrifugação do que naquele obtido pela sedimentação. O método da centrifugação com enriquecimento protéico provoca menor perda seletiva dos leucócitos, e assim espelha com maior precisão a realidade.

Unitermos: Liquor cefalorraquidiano - esfregaço.

Keywords: C S F - smears.

Trabalho realizado no Setor de Líquido Cefalorraquidiano da Disciplina de Neurologia da Escola Paulista de Medicina.

1 - Professor Adjunto, Pesquisador pelo CNPq e Chefe do Setor.

2 - Biomédica, Pós-Graduanda, Nível Mestrado, do Curso de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de São Paulo.

Introdução

O estudo das células no LCR iniciado na França com trabalhos de *Widal, Sicard e Ravaut* (1900, 1901) (32, 33), nos primórdios deste século, tornou-se, com os resultados das pesquisas e com a experiência alcançada, complemento indispensável ao exame quantitativo, pois define o tipo de reação celular, fornecendo informações de interesse diagnóstico e prognóstico (12, 16, 18, 19, 21, 25, 27, 30).

Para o estudo da citologia diferencial sempre houve dificuldades. Devido ao pequeno número de células, geralmente presentes no LCR, há a necessidade de sua concentração; esta concentração deve ser realizada de modo a permitir coloração sem prejuízo para a definição da textura da célula, de preferência pelos métodos habituais em hematologia (7, 14, 15, 17, 21, 29).

Os diversos métodos propostos tentam preencher requisitos fundamentais de um método ideal, quais sejam:

a) concentração das células sem dano ou perda seletiva de um determinado tipo;

Endereço para correspondência: Setor de L. C. R. - Disciplina de Neurologia - Universidade Federal de São Paulo - R. Borges Lagoa, 802 - CEP 04038-001 - São Paulo - SP.

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 panóptica de Pappenhein, a qual permite fácil interpretação das alterações patológicas, baseando-se nos conhecimentos adquiridos pelos citologistas com as preparações de sangue, medula óssea, gânglio linfático e dos diversos líquidos orgânicos;

e) simplicidade de execução para que se possa usá-lo nas pesquisas diárias.

Dos métodos propostos os mais difundidos são o da sedimentação gravitacional facilitada (26), o da centrifugação (20, 21) e o da citocentrifugação (9, 31), sendo que todos estão sujeitos a críticas.

Um estudo comparativo (10) entre os métodos da sedimentação gravitacional facilitada e o da sedimentação gravitacional acelerada (citocentrífuga) demonstrou que o primeiro método é melhor, tanto na concentração das células como do ponto de vista morfológico.

Em relação ao método da sedimentação gravitacional facilitada há uma perda de 10% a 90% das células, acarretada por diversos fatores (1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 15, 29). No processo da centrifugação também há perda de células pelo efeito da força centrífuga.

Quando comparados os métodos da sedimentação gravitacional facilitada e da centrifugação com enriquecimento protéico foram observadas diferenças nas proporções das células presentes (23, 24). Estas diferenças podem ocorrer em virtude de 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.

O propósito deste trabalho é o de verificar, dentre os métodos da centrifugação com enriquecimento protéico e o da sedimentação gravitacional facilitada, qual espelha com maior precisão a realidade.

Material e métodos

O material consta de 100 amostras de sangue de veia periférica retirado com agulha e seringa estéreis e recolhido em recipiente contendo EDTA para evitar a coagulação. Para este trabalho foram aproveitadas as amostras de sangue de pacientes que por um motivo ou outro se submeteram à coleta de sangue para esclarecimento diagnóstico. O número de leucócitos variou de 6.320 a 8.100 por mm³ e o de hemácias de 4.200.000 a 5.550.000. Do sangue assim obtido foi feito um esfregaço; simultaneamente uma parcela da amostra de sangue foi diluída a 1:200 em solução salina isotônica.

A contagem global dos leucócitos, no material após a di-

lução, variou de 28 a 44 por mm³. A escolha da diluição 1:200 foi feita aleatoriamente, com a finalidade de que o número de leucócitos por mm³ não fosse muito elevado, mas que permitisse uma concentração de elementos suficientes para que a proporção dos diferentes leucócitos fosse feita baseada em no mínimo 200 leucócitos por preparado. Os leucócitos presentes nas amostras de sangue diluído foram concentrados pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico²¹ e pelo

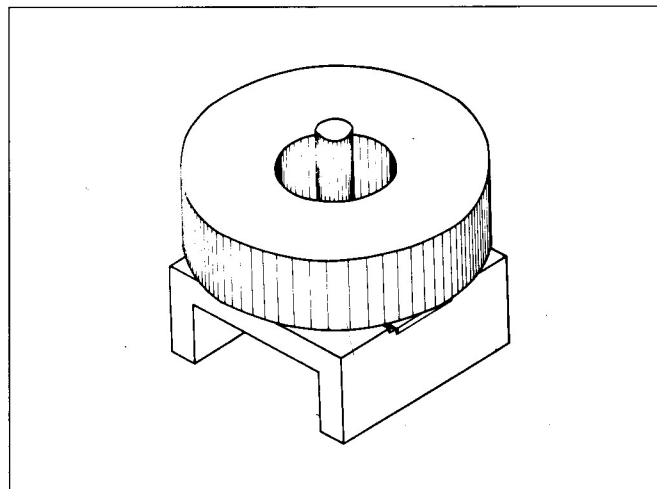
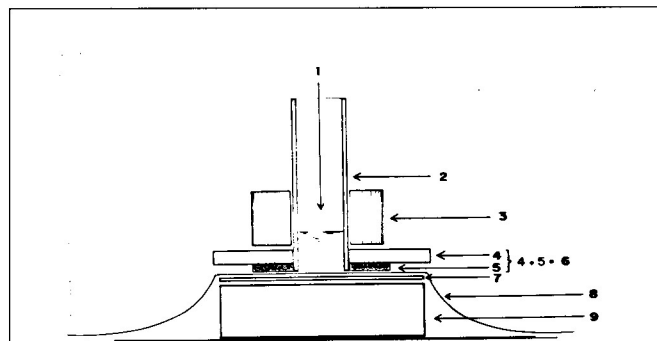


Figura 1 - Câmara de Reis com um peso, montada sem o papel de filtro para melhor visualização.



1 = LCR; 2 = tubo cilíndrico; 3 = peso; 4 = porção superior da base construída em acrílico; 5 = porção inferior da base construída de borracha; 6 = base retangular; 7 = lâmina para microscopia; 8 = papel de filtro e 9 = plataforma.

Figura 2 - Corte esquemático da câmara de Reis.

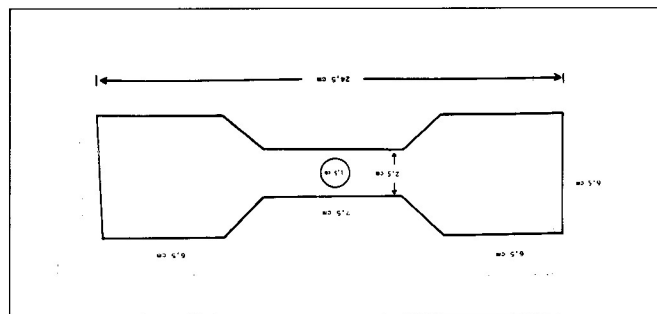


Figura 3 - Modelo do papel de filtro utilizado para absorção da fração líquida.

método da sedimentação gravitacional facilitada descrita por Sayk (26). Para a sedimentação gravitacional das células foi usada a câmara de Reis (5) (figuras 1, 2).

O método da centrifugação com enriquecimento protéico foi idealizado de forma a permitir a preparação e a coloração, por método hematológico, de um esfregaço de células de LCR; para a realização desta pesquisa o LCR foi substituído por 7 ml de uma diluição a 1:200 de sangue total.

O método da sedimentação gravitacional facilitada tem como princípio a sedimentação das células numa lâmina de microscopia, com a finalidade de evitar os efeitos nocivos que a centrifugação pode causar às células; no sistema utilizado neste trabalho utilizou-se a câmara de Reis (5), onde a sedimentação das células é acelerada mediante o emprego de papel de filtro que absorve a fração líquida. O papel de filtro utilizado é de procedência nacional, 50 x 50, 80 g, recortado de acordo com o modelo de Sayk (26) (figura 3). O método da sedimentação foi idealizado, para o LCR, de forma a obter um sedimento rico em células que permitisse coloração por método hematológico; para a realização desta tese o LCR foi substituído por uma diluição a 1:200 de sangue total, tendo sido colocado na câmara de sedimentação 1 ml do material diluído.

Os preparados assim obtidos e o esfregaço do sangue total foram corados pelo método de Leishman. A contagem diferencial dos leucócitos foi então realizada nos três preparados corados.

Considerando que a finalidade deste trabalho era comparar o resultado da contagem diferencial dos leucócitos dos três preparados, não houve preocupação de enumerar as indicações clínicas que levaram os pacientes à coleta de sangue, bem como de separar as amostras anormais das normais.

A proporção entre os diversos elementos figurados obtida no sangue não diluído foi utilizada como padrão e será designada no capítulo Resultados como padrão. Para o estudo estatístico comparativo dos resultados do padrão com aqueles dos preparados obtidos após a concentração dos leucócitos pelos dois métodos será utilizado o teste de Wilcoxon com aproximação à curva normal; com o objetivo de comparar, para cada método, as porcentagens de concordância para cada um dos elementos figurados, foi utilizado o teste da partição do quiquadrado (8) e para comparar os dois métodos, para cada um dos elementos figurados, quanto às concordâncias em relação ao padrão, utilizou-se o teste do quiquadrado (28) para tabelas 2x2. Em todos os testes fixou-se em 0,05% ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

Resultados

Os resultados da presente pesquisa estão ilustrados nas tabelas numeradas de 1 a 8.

Na tabela 1 o estudo estatístico comparativo dos dois métodos baseado no teste de Wilcoxon com aproximação à curva normal mostrou que há diferença significativa para os dois métodos, em relação ao padrão, para os linfócitos, granulócitos neutrófilos e granulócitos eosinófilos; para os monócitos e granulócitos basófilos não houve diferença significativa.

O teste do quiquadrado comparando as porcentagens de concordância dos diferentes leucócitos, em cada método de concentração, mostra que na centrifugação o número de resultados concordantes, em torno de 60%, é semelhante significativamente, para os diversos leucócitos (tabela 2); enquanto que na sedimentação observamos resultados concordantes, em torno de 60%, apenas para monócitos e basófilos, para os demais leucócitos estudados, os resultados concordantes são em porcentagens significativamente menores do que aqueles para os monócitos e basófilos (tabela 3).

O teste do quiquadrado comparando os resultados concordantes e discordantes entre centrifugação e padrão e entre

Tabela 1 - Teste de Wilcoxon com aproximação à curva normal. Valor percentual médio das diferenças entre padrão e centrifugação e entre padrão e sedimentação para células linfocitárias.

LEUCÓCITOS	VALORES MÉDIOS			
	Centrifugação @ %	Sedimentação @ %	Z calculado	P
Linfócitos	+3,59	-18,70	-7,93*	<0,001
Monócitos	+11,21	-3,79	-0,2	ns
Neutrófilos	-1,90	+13,76	-7,41*	<0,001
Eosinófilos	+16,33	+39,54	-4,29*	<0,001
Basófilos	-19,08	-21,50	-0,34	ns

Tabela 2 - Teste do quiquadrado comparando os resultados concordantes dos diversos leucócitos para o método da centrifugação.

LEUCÓCITOS	Nº de resultados concordantes %	nº de resultados discordantes %	% de concordância
Linfócitos	60	40	60
Monócitos	66	34	66
Neutrófilos	61	39	61
Eosinófilos	66	34	66
Basófilos	61	39	61

χ^2 crítico: 3,84

Tabela 3 - Teste do quiquadrado comparando os resultados concordantes dos diversos leucócitos para o método da sedimentação.

LEUCÓ-CITOS	Nº de resultados concordantes %	nº de resultados discordantes %	% de concordância
Linfócito	20	80	20
Monócito	59	41	59
Neutrófilos	33	67	33
Eosinófilos	44	56	44
Basófilos	58	42	58

χ^2 crítico = 3,84

Tabela 4 - Comparação entre os métodos de centrifugação e sedimentação - Linfócitos

	% de resultados		% de concordância
	concordantes %	discordantes %	
Centrifugação	60	40	60
Sedimentação	20	80	20

$\chi^2 = 33,33^*$ χ^2 crítico = 3,841

Tabela 5 - Comparação entre os métodos de centrifugação e sedimentação - Monócitos

	% de resultados		% de concordância
	concordantes %	discordantes %	
Centrifugação	66	34	66
Sedimentação	59	41	59

$\chi^2 = 1,04$ χ^2 crítico = 3,841

sedimentação e padrão mostra que o método da centrifugação mostrou concordância significativamente maior com o padrão do que o método da sedimentação para os leucócitos linfócitos, neutrófilos e eosinófilos; não havendo diferença significativa para os leucócitos monócitos e basófilos (tabelas 4 a 8).

Comentários

A comparação das porcentagens de leucócitos (figura 1), quando se faz o estudo citomorfológico pelo método da

Tabela 6 - Comparação entre os métodos de centrifugação e sedimentação - Neutrófilos

	% de resultados		% de concordância
	concordantes %	discordantes %	
Centrifugação	61	39	61
Sedimentação	33	67	33

$\chi^2 = 15,73^*$ χ^2 crítico = 3,841

Tabela 7 - Comparação entre os métodos de centrifugação e sedimentação - Eosinófilos

	% de resultados		% de concordância
	concordantes %	discordantes %	
Centrifugação	66	34	66
Sedimentação	44	56	44

$\chi^2 = 9,77^*$ χ^2 crítico = 3,841

Tabela 8 - Comparação entre os métodos de centrifugação e sedimentação - Basófilos

	% de resultados		% de concordância
	concordantes %	discordantes %	
Centrifugação	61	39	61
Sedimentação	58	42	58

$\chi^2 = 0,18$ χ^2 crítico = 3,841

centrifugação e da sedimentação, mostra que há diferença significativa entre as porcentagens dos linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Tais divergências já foram relatadas em pesquisa anterior (24), que evidenciou menor porcentagem de células linfocitárias e maior porcentagem de granulócitos neutrófilos no método da sedimentação do que no da centrifugação; em outro estudo de citomorfologia, tendo como parâmetro sedimentos de LCR de pacientes com leucemia aguda, os dois métodos também mostraram recuperação de células em proporções diferentes, o método da centrifugação evidenciou células blásticas em maior número de amostras e quando as células blásticas estavam presentes, estiveram na maioria das vezes em maior porcentagem no método da centrifugação (23). Também o conceito de normalidade é diferente conforme se considera um ou outro método (6, 22,

23, 27). Estes achados caracterizam perda seletiva de células, por um ou ambos os métodos, em maior ou menor quantidade. Como não há ainda um método ideal que permita depositar todas as células no preparado, fica difícil saber qual o método que distorce menos a realidade. Através de um artifício procurou-se com este trabalho chegar mais próximo da verdade, usando-se para tanto o sangue total. Do sangue total, foram feitos três preparados: um, distendendo-se uma gotícula de sangue total entre lamínulas e outros dois realizados, um pelo método da centrifugação com enriquecimento protéico, no qual uma gotícula de sedimento, obtido após dupla centrifugação, é distendida entre lamínulas e outro através da sedimentação gravitacional facilitada, onde as células são depositadas em uma lâmina de microscopia; estes dois últimos sedimentos são obtidos do mesmo sangue, porém após diluição. Assim temos os esfregaços onde houve interferência durante o processo da sedimentação (5, 29) e outro pela interferência durante a centrifugação. Em princípio o primeiro esfregaço obtido do sangue total é que o espelha a realidade, e sendo por isso utilizado como padrão; os outros dois são utilizados para se verificar a influência da sedimentação e da centrifugação sobre as porcentagens dos leucócitos presentes nos preparados.

O resultado deste estudo mostrou que o menor número de

divergência com o padrão, número este significativamente menor, foi observado no método da centrifugação para linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (tabelas 4, 5 e 6). Em relação aos monócitos e basófilos ambos os métodos diferiram igualmente do padrão (tabelas 7 e 8).

Os resultados da presente pesquisa vêm demonstrar que há perda seletiva de células maior ou menor conforme o método de concentração de células utilizado. Este estudo demonstra também que quando se estuda sangue total diluído o método da sedimentação tem uma maior perda seletiva de células, e o método da centrifugação preserva melhor a proporção original das células em maior número de preparados. Por analogia podemos supor que o mesmo fenômeno ocorra quando se concentra as células de amostras de LCR. Assim não só pela coloração, mas também por ter menor desvio, espelhando melhor a realidade, o método da centrifugação é provavelmente superior ao da sedimentação para o estudo das células do LCR.

Conclusão

O método da centrifugação com enriquecimento protéico provoca menor perda seletiva dos leucócitos do que o método da sedimentação gravitacional facilitada, espelhando com maior precisão a realidade.

Summary

A previous comparative study using the spontaneous sedimentation technique and the centrifugation technique with protein enrichment for concentrations of the CSF cells showed differences between the percentage of cells presents in the smears. This findings might be due to the loss of cells that can occur in both methods. However it is not clear which one of the techniques used had more influency in modifying the proportion of the differents cells.

The purpose of this survey is to compare the spontaneous sedimentation technique and the centrifugation technique with protein enrichment trying to discover which one shows better the real percentage of the cells in CSF.

In order of that 100 samples of peripheral blood were examined. Three smears of each sample was performed: one by the traditional way used to do leucograms; the others two smears were done by concentrating the blood samples cells previously diluted in a saline isotonic solution up to 1:200. To perform the concentration and the smears it was used the spontaneous sedimentation technique and the centrifugation technique with protein enrichment, and the diluted blood sample used as it was CSF. All the smears were stained in the same way as a blood film (Leishman stain) and examined. Using the leucogram as standard, a comparative study of the percentage of the cells presents in the smears was performed with statistical methods. The results allows to conclude that the centrifugation technique with protein enrichment is better than the spontaneous sedimentation technique because its cells percentage shows less differences with the percentage of the cells on the leucogram.

Referências bibliográficas

1. ARONSON, A. S.; GARWICZ, S. SORNAS, R. - Cytology of cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia. J. Pediat., 85:222-4, 1974.
2. BAMMER, H. - Zur tomorzelldiagnostik im liquor cerebrospinalis. Dtsch Z Nervenheilk., 185:89-109, 1963.
3. BATTIFORA, H. & HIDVEGI, D. - Improved apparatus for spinal fluid cytology. Acta Cytol., 22:170-1, 1978.
4. BOTS, G. T. A. M.; WENT, L. N.; SCHABERG, A. - Results of a sedimentation technique for cytology of cerebrospinal fluid. Acta Cytol., 8:234-41, 1964.
5. BRANDÃO, C. A. & REIS-FILHO, J. B. - Contagem diferencial das células do líquido cefalorraquiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. 1. Proporção de recuperação das células. Neurobiologia, 46:325-40, 1983.
6. BRANDÃO, C. A. & REIS-FILHO, J. B. - Contagem diferencial das células do líquido cefalorraquiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. 2. Conceito de normalidade. Arq. Neuro-Psiquiat., 42:140-145, 1984.
7. CARDOZO, P. L. - Clinical cytology using the May-Grunwald-Giemsa stained smear. Leyden, Stafleu, 1954. 128 p.
8. COCHRAN, W. G. - Some methods for strenghtning the comman X^2 test. Biometrics, 10:417-51, 1954.
9. DORÉ, C. F. & BALFOUR, B. M. - A device for preparing cell spreads.

- Immunology, 9:403-5, 1965.
10. DYKEN, P. R. et al. - Comparison of cytocentrifugation and sedimentation techniques for CSF cytology. *Acta Cytol.*, 24:167-70, 1980.
11. ENESTROM, S. - *Suctino technique for sedimentation of body fluid cells.* *Acta Path Microbiol Scand.*, 59:473-80, 1963.
12. KAFKA, V. - *Eigenschaften der zerebrospinal-flussigkeit im ganzen.* In: _____ - *Die zerebrospinalflüssigkeit.* Leipzig, Deuticke, 1930. p. 6-172.
13. KOLAR, O. & ZEMAN, W. - *Spinal fluid cytology: description of apparatus, technique and findings.* *Arch Neurol.*, 18:44-51, 1968.
14. KOLMEL, H. W. - *A method for concentrating cerebrospinal fluid cells.* *Acta Cytol.*, 21:154-7, 1977.
15. KRENTZ, M. J. & DYKEN, P. R. - *Cerebrospinal fluid cytology: sedimentation vs filtration.* *Arch Neurol.*, 26:253-7, 1972.
16. LANGE, O. - *Sobre as células eosinófilas do líquido cefalorraquidiano.* *Rev Neurol Psiquiat S. Paulo*, 1:421-34, 1935.
17. MARKS, V. & MARRACK, D. - *A technique for the staining of cells from C.S.F.* *Confin Neurol.*, 20:310-5, 1960.
18. McMENEMEY, W. H. & CUMINGS, J. N. - *The value of the examination of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of intracranial tumours.* *J Clin Pathol.*, 12:400-11, 1959.
19. RAVAUT, P. & BOULIN, R. - *La cytologie du liquide céphalo-rachidien des syphilitiques: étudiée par l'imprégnation vitale.* *Presse Méd.* 2:881-4, 1928.
20. REIS, J. B. - *Valor da presença de granulócitos neutrófilos sem aumento do número de células do líquido cefalorraquidiano.* *Arch Neuropsiquiat.*, 5:225-34, 1947.
21. REIS, J. B. & PALHANO, D. P. - *Técnica da concentração, preparação do esfregaço e coloração das células do líquido cefalorraquidiano.* *Hospital*, 73:113-9, 1968.
22. REIS, J. B.; BEI, A.; REIS-FILHO, J. B. - *Semiologia do LCR.* In: _____ - *Líquido cefalorraquidiano.* São Paulo, Sarvier, 1980. p. 63-166.
23. REIS-FILHO, J. B. & ALVES, J. A. - *A centrifugação com enriquecimento protéico e a sedimentação gravitacional facilitada na citologia do LCR de paciente com leucemia aguda.* *Acta Oncol Bras.*, 6:38-44, 1986.
24. REIS-FILHO, J. B. & 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*, 42:283-90, 1979.
25. RISER, R. - *Examen du liquide céphalo-rachidien.* In: _____ - *Le liquide céphalo-rachidien.* Paris, Masson, 1929. p. 33-55.
26. SAYK, J. - *Ergebnisse neuer liquor-cytologischer untersuchungen mit dem sedimentierkammer-verfahren.* *Arztl Wochenschr.*, 9:1042-6, 1954.
27. SAYK, J. - *Cytologie der cerebrospinalflüssigkeit.* Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1960. 175 p.
28. SIEGEL, S. - *Estatística no paramétrica.* Ed. Trillas, Mexico, 1975. 346 pg.
29. SORNAS, R. - *A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid.* *J Neurol Neurosurg Psychiat.*, 30:568-77, 1967.
30. SPRIGGS, A. I. & BODDINGTON, M. M. - *Leukaemic cells in cerebrospinal fluid.* *Br J Haematol.*, 5:83-91, 1959.
31. WATSON, P. - *A slide centrifuge: an apparatus for concentrating cells in suspension onto a microscope slide.* *J Lab Clin Med.*, 28:494-501, 1966.
32. WIDAL, I.; SICARD, L.; RAVAUT, G. - *Cytodiagnostic de la méningite tuberculeuse: recherches cliniques.* *C R Soc Biol.*, 52:838-40, 1900.
33. WIDAL, I.; SICARD, L. & RAVAUT, G. - *Cytologie du liquide céphalo-rachidien au cours de quelques processus méningés chroniques.* *Bull Soc Méd Hôp Paris* 18:31-3, 1901.