

CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO PELO MÉTODO DA SEDIMENTAÇÃO GRAVITACIONAL FACILITADA

2. CONCEITO DE NORMALIDADE.

*CARLOS ALBERTO BRANDÃO **

*JOÃO BAPTISTA DOS REIS FILHO ***

O número de células do líquido cefalorraquiano (LCR) normal²¹, para o homem adulto, está compreendido entre 0 e 3 por mm³, porém admite-se um limite superior de até 5 células por mm³ de LCR²⁴. Para o recém-nascido observam-se valores mais elevados por ocasião do nascimento, os quais tendem a diminuir progressivamente até alcançar o padrão normal do adulto aos 3 meses de idade²⁹. Ao mesmo tempo que se faz a contagem global das células deve-se proceder o estudo citológico diferencial, de grande valia para o diagnóstico, prognóstico e tratamento^{1,7,12,16,22,27,31,33}. Diversos são os métodos de concentração das células, etapa preliminar para a preparação da lâmina para realizar depois a coloração: a centrifugação simples^{25,27,30} ou com auxílio da citocentrífuga^{9,10,11,14,41}, a sedimentação gravitacional facilitada^{2,3,15,17,18,33,37,40} e a filtração^{6,20,36} são as principais. A coloração ideal das células do LCR é aquela derivada do método de Romanowsky^{1,2,5,10,11,14,17,19,20,22,24,30,34}; a técnica de Papanicolau^{6,27,28} tem interesse secundário. Os elementos figurados do LCR normal são as células linfocitárias e as células monocitóides. As células linfocitárias são em sua maioria do tipo pequeno, com diâmetro variando de 8 a 14 micra, redondas ou ligeiramente ovais, com núcleo em geral esférico e cromatina compacta, de que resulta sua coloração intensa. Seu citoplasma é em geral escasso, de modo semelhante aos linfócitos do sangue periférico normal^{19,31}. As células monocitóides, que apresentam alguma semelhança com os monócitos do sangue periférico^{19,31}, por motivo de seu aspecto geral, têm merecido diversas denominações tais como célula reticular e célula mesenquimal², retículo-monócito¹⁷, célula mononuclear²⁴ e célula monocitóide^{31,39}. Estas células apresentam grande variação de sua morfologia, tamanho maior que o das células linfocitárias, com variação de 15 a 30 micra, núcleo com cromatina frouxa e citoplasma em geral abundante. As proporções com que estes elementos figurados são encontrados no LCR variam de acordo com o nível de punção³⁴, com o método empregado para concentrar as células³² e com a idade²⁹. Em geral, o LCR normal não apresenta hemácias, porém uma

Trabalho realizado no Setor de Líquido Cefalorraquiano da Disciplina de Neurologia da Escola Paulista de Medicina. * Pós-Graduando em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; ** Professor Adjunto da Escola Paulista de Medicina e Chefe do Setor de Líquido Cefalorraquiano.

observação mais cuidadosa pode revelar a presença de raros eritrócitos em muitas amostras de LCR³¹. No recém-nascido, na primeira semana de vida, as hemácias podem estar presentes mesmo em condições normais²⁹, em pequeno número.

O propósito deste trabalho é estabelecer o conceito de normalidade da citologia diferencial do LCR para a câmara de sedimentação gravitacional facilitada de Reis⁴, para as idades de 3 a 82 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

As 59 amostras de LCR normal selecionadas para este trabalho foram obtidas de pessoas atendidas em ambulatório, sem doença de ordem geral, porém com perturbação neurológica ou psíquica que não costuma determinar alteração do LCR. A faixa etária variou entre 3 e 82 anos, sendo 27 do sexo masculino e 32 do feminino. Estas amostras de LCR apresentaram resultados normais aos exames de rotina, que consistiram da medida da pressão, observação do aspecto e cor, contagem global das células, determinação das taxas de proteínas totais, das substâncias redutoras e de cloretos, reações de Pandy, Weichbrodt e Nonne, e reações de fixação de complemento para sífilis e cisticercose. As amostras de LCR foram obtidas por punção lombar ou por punção da cisterna cerebelo-medular.

A contagem global das células foi feita com a câmara de Fuchs-Rosenthal de duplo retículo e, para maior precisão, foram executadas as contagens com aumento microscópico de 100 vezes e repetida a enumeração em 6 retículos sucessivos. Este procedimento foi realizado imediatamente após a punção, para evitar o prejuízo resultante do sofrimento celular com o decorrer do tempo, homogeneizando-se sempre o LCR antes de carregar a câmara de contagem global das células. Para a concentração das células foi usada a câmara de sedimentação gravitacional facilitada segundo Reis⁴ (Figuras 1 e 2), na qual colocaram-se 1,5 ml de LCR recém-retirado e previamente homogeneizado e foram empregados pesos que variaram de 2,6 a 10,5 Kg, tendo o tempo de sedimentação das amostras de LCR variado entre 30 a 55 minutos. As preparações obtidas foram coradas pelo método de Leishman, sendo identificadas e enumeradas todas as células presentes no sedimento, o que foi conseguido através do embricamento dos campos microscópicos.

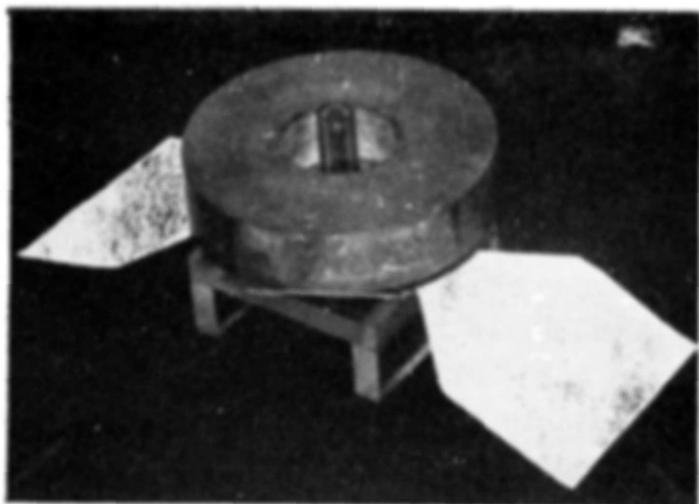
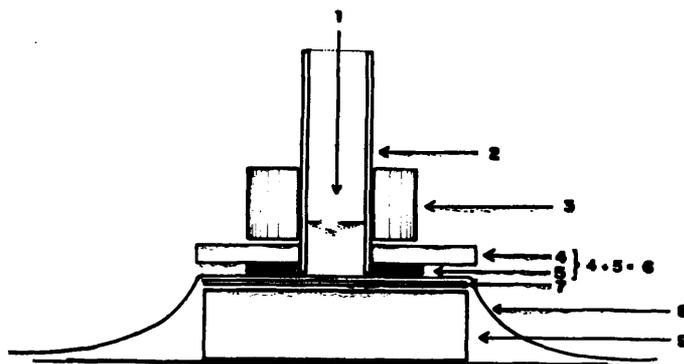


Fig. 1 — Câmara de sedimentação gravitacional facilitada segundo Reis.

Fig. 2 — Corte esquemático da câmara de sedimentação facilitada segundo Reis.



RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentados os valores percentuais médios dos diversos tipos celulares, as variações e o desvio padrão. Foram encontrados granulócitos neutrófilos em 14 das 59 amostras estudadas, sendo 9 de pacientes do sexo masculino e 5 do feminino; a idade oscilou entre 5 e 54 anos e, em relação ao nível de punção, 8 amostras foram colhidas por punção cisternal e 6, por lombar. Nas 59 amostras processadas foram encontradas no sedimento, após coloração, um valor médio de 274 células para uma variação de 21 a 1.408 células.

Célula	Valores extremos (%)	Média (%)	Desvio padrão (s)
Linfocitária	22,3 — 88,0	58,8	15,7
Monocitóide	12,0 — 77,7	41,0	15,7
Granulócito neutrófilo	0 — 1,6	0,2	0,2

Tabela 1 — Valores percentuais médios dos diferentes tipos celulares, variações e desvio padrão.

COMENTARIOS

Os estudos da citologia diferencial do LCR apresentam por vezes resultados divergentes por motivo da diversidade de métodos de concentração das células do LCR e essas diferenças dizem respeito às proporções relativas das diversas formas celulares. A centrifugação exerce efeito prejudicial sobre as células mais frágeis ou em fase de degeneração. Por outro lado, no método da sedimentação gravitacional facilitada há perda de 80% das células³, não se sabendo se esta perda se processa proporcionalmente ou se há perda seletiva de uma forma celular. Em estudo anterior comparativo³² foi verificado que a sedimentação facilitada revela maior proporção de células monocitóides, granulócitos neutrófilos e eosinófilos, enquanto o método da centrifugação com enriquecimento proteico mostra coloração com maiores minúcias de definição da textura das células e por esse motivo ele é mais eficiente para distinguir e identificar as células plasmocitárias, os granulócitos basófilos, as células leucêmicas e tumorais. O método da centrifugação com enriquecimento proteico demonstra de preferência as células que dispõem de vitalidade suficiente para resistir às manipulações do processo, enquanto o método da sedimentação faci-

litada revela também as formas mais frágeis e envelhecidas. O método da centrifugação com enriquecimento proteico indica o quadro citológico em relação com o estado atual do processo mórbido, enquanto o da sedimentação facilitada revela as células atuais, dotadas de grande vitalidade, juntamente com as células envelhecidas, sobreviventes da fase inicial desse processo. Esta talvez seja a explicação porque no recém-nascido as proporções relativas das células linfocitárias e monocitóides sejam semelhantes em ambos estes processos de concentração dos elementos figurados do LCR. Assim, a conduta ideal é proceder o estudo comparativo por ambos estes métodos, cujas informações se completam.

Os resultados desta investigação concordam com aqueles relatados na literatura médica especializada 2,8,16,17,23,24,26,31,34,35,38,39,42, na parte referente às proporções relativas de células linfocitárias e de células monocitóides, porém revelam um fato raramente assinalado^{13,16}, que é a possibilidade da presença de granulócitos neutrófilos em pequeno número, como componentes normais da citologia do LCR. A distribuição destes neutrófilos não mostra preferência por uma determinada faixa etária, grupo sexual e também não se relaciona com o nível da punção. É possível que o achado desta pesquisa tenha relação com o cuidado técnico na contagem das células, isto é, a enumeração de todas as células presentes no preparado, cuidado este que consistiu no embricamento dos campos microscópicos: desta forma foram consideradas todas as células existentes no sedimento e não simplesmente 100 células ou número menor, expresso em percentagem do número total de células observadas.

RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo citológico diferencial de amostras de LCR sub-aracnóideo cisternal ou lombar foi feito em 59 pessoas sem doença atual e com composição normal deste líquido orgânico. Os preparados com as células foram obtidos com a câmara de sedimentação gravitacional facilitada de Reis. A finalidade deste trabalho foi confrontar estes resultados com aqueles já estabelecidos na literatura especializada. Um cuidado especial foi tomado para obter maior fidelidade de informação, o qual consistiu na enumeração de todas as células existentes no sedimento e não somente 100 células ou número menor, expresso em percentagem do total. O resultado desta pesquisa mostrou que o quadro citológico diferencial normal é constituído, em média, por 58,8% de células linfocitárias, 41,0% de células monocitóides e 0,2% de granulócitos neutrófilos. Estes números concordam com aqueles assinalados na literatura, na parte referente às proporções relativas de células linfocitárias e células monocitóides, porém revelam um fato raramente referido, que é a possibilidade da presença de raros granulócitos neutrófilos no quadro citológico diferencial normal do LCR.

SUMMARY

Normal differential cerebrospinal fluid cell count with the sedimentation technique.

Cisternal or lumbar cerebrospinal fluid (CSF) specimens of 59 healthy persons were examined for differential cell count with a new improved sedimentation chamber, similar to that one of Sayk. The purpose of this study was to compare our results to those already described in the literature. Technical care was taken in order to increase the accuracy of this investigation and it consisted mainly of counting all the existing cells in the preparation, and not only 100 cells or a lesser number, recorded in percentage. The results of this survey have shown that the normal mean values for the CSF cytomorphology are 58.8 per cent lymphocytic cells, 41.0 per cent monocytoïd cells, and 0.2 per cent neutrophilic granulocytes. These figures are in good agreement with those already reported by numerous authors, when we consider the lymphocytic and monocytoïd cells, but they revealed a fact seldom seen reported: the possibility of a few neutrophilic granulocytes as a constituent of the normal CSF cytomorphology.

REFERÊNCIAS

1. BALHUIZEN, J. C.; BOTS, G. T. A. M., SCHABERG, A. & BOSMAN, F. T. — Value of cerebrospinal fluid cytology for the diagnosis of malignancies in the central nervous system. *J. Neurosurg.* 48:747, 1978.
2. 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, 1963.
5. BOTS, G. T. A. M.; WENT, L. N. & SCHABERG, A. — Results of a sedimentation technique for cytology of cerebrospinal fluid. *Acta cytol. (Philadelphia)* 8:234, 1964.
4. BRANDÃO, C. A. — Recuperação das células do líquido cefalorraquiano pelo método da sedimentação gravitacional facilitada. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1983.
5. CARDOSO, P. L. — Clinical Cytology using the May-Grunwald-Giemsa stained Smear. Stafleu, Leyden, 1954, vol. I.
6. DELL VECCHIO, P. R.; DEWITT, S. H.; BORELLI, J. I.; WARD, J. B.; WOOD JR., T. A. & MALMGREN, R. A. — Application of Millipore filtration technique to cytologic material. *J. nat. Cancer Inst.* 22:427, 1959.
7. DEN HARTOG JAGER, W. A. — Cytopathology of the cerebrospinal fluid examined with the sedimentation technique after Sayk. *J. neurol. Sci.* 9:155, 1969.
8. DOMMASCH, D. & MERTENS, H. G. — Cerebrospinaflüssigkeit. G. Thieme, Stuttgart, 1980.
9. DORÉ, C. F. & BALFOUR, B. M. — A device for preparing cell spreads. *Immunology* 9:403, 1965.
10. DREWINKO, B.; SULLIVAN, M. P. & MARTIN, T. — Use of the cytocentrifuge in the diagnosis of meningeal leukemia. *Cancer* 31:1331, 1973.
11. DUCOS, R.; DONOSO, J.; WEICKHARDT, U. & VIETTI, T. J. — Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer* 43:1479, 1979.
12. DUFFRESNE, J. J. — Citología Práctica del Líquido Cefalorraquídeo. Ciba-Geigy, Basel, 1972.
13. DYKEN, P. R. — Cerebrospinal fluid cytology: practical clinical usefulness. *Neurol. (Minneapolis)* 25:210, 1975.
14. DYKEN, P. R.; SHIRLEY, S.; TREFZ, J. & EL GAMMAL, T. — Comparison of cytocentrifugation and sedimentation techniques for CSF cytomorphology. *Acta cytol. (Baltimore)* 24:167, 1980.
15. ENESTRÖM, S. — Suction technique for sedimentation of body fluid cells. *Acta pathol. microbiol. scand.* 59:473, 1963.
16. FISHMAN, R. A. — Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System. W. B. Saunders, London, 1980.

17. KOLAR, O. & ZEMAN, W. — Spinal fluid cytomorphology: description of apparatus, technique, and findings. *Arch. Neurol. (Chicago)* 18:44, 1968.
18. KÖLMEL, H. W. — A method for concentrating cerebrospinal fluid cells. *Acta cytol. (Baltimore)* 21:154, 1977.
19. KÖLMEL, H. W. — *Citologia del Líquido Cefalorraquídeo*. Salvat, Barcelona, 1981.
20. KRENTZ, M. J. & DYKEN, P. R. — Cerebrospinal fluid cytomorphology: sedimentation versus filtration. *Arch. Neurol. (Chicago)* 26:253, 1972.
21. LIMA, A. T.; TANCREDI, F. & REIS, J. B. — O líquido cefalorraquidiano cisternal e lombar: conceito de normalidade. *Arch. Dep. Assist. psicop. S. Paulo* 5:391, 1940.
22. LOCOGE, M. & CUMINGS, J. N. — Cerebrospinal fluid in various diseases. *Brit. med. J.* 1:618, 1958.
23. LUPS, S. & HAAN, A. — *The Cerebrospinal Fluid*. Elsevier, Amsterdam, 1954.
24. MARKS, V. & MARRACK, D. — A technique for the staining of cells from the CSF. *Confin. neurol.* 20:310, 1960.
25. McMENEMEY, W. H. & CUMINGS, J. N. — The value of the examination of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of intracranial tumours. *J. clin. Pathol.* 12:310, 1960.
26. MERRITT, H. H. & FREMONT-SMITH, F. — *The Cerebrospinal Fluid*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1938.
27. NAYLOR, B. — The cytologic diagnosis of cerebrospinal fluid. *Acta cytol. (Baltimore)* 8:141, 1964.
28. NUOVO, V. & LE BEAU, J. — Intérêt de la méthode de Papanicolaou dans le cyto-diagnostic des affections neuro-chirurgicales. *Neurochirurgie* 9:43, 1963.
29. REIS, J. B.; DINIZ, H. B. & WOISKI, J. R. — Conceito de normalidade do líquido cefalorraquiano no primeiro ano de vida. *O Hospital (Rio)* 78:1457, 1970.
30. REIS, J. B. & PALHANO, D. P. — Técnica da concentração, preparação do esfregaço e coloração das células do líquido cefalo-raqueano. *O Hospital (Rio)* 73:113, 1968.
31. REIS, J. B.; BEI, A. & REIS-FILHO, J. B. — *Líquido Cefalorraquiano*. Sarvier, São Paulo, 1980.
32. REIS-FILHO, J. B. & BEI, A. — Confronto entre o método da sedimentação gravitacional facilitada e o da centrifugação com enriquecimento proteico para o estudo da citologia diferencial do líquido cefalorraquiano. *Neurobiologia (Recife)* 42:283, 1979.
33. SAYK, J. — Ergebnisse neuer liquor-cytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentierkammer-verfahren. *Ärztl. Wochschr.* 9:1042, 1954.
34. SAYK, J. — *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*. Fischer, Jena, 1960.
35. SCHMIDT, R. M. — *Der Liquor Cerebrospinalis*. Volk und Gesundheit, Berlin, 1968.
36. SEAL, S. H. — A method for concentrating cancer cells suspended in large quantities of fluid. *Cancer* 9:866, 1956.
37. SÖRNÄS, R. — A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 30:568, 1967.
38. SÖRNÄS, R. — The cytology of normal cerebrospinal fluid. *Acta neurol. scand.* 48:313, 1972.
39. SPRIGGS, A. I. & BODDINGTON, M. M. — *The Cytology of Effusions and of Cerebrospinal Fluid*. Ed. 2. W. Heinemann, London, 1968.
40. SUTA, M. — Jednoduche zarizeni ke kvalitativnimu cytologichemu vysetrovani moku mozkomisniho a vypoťkau. *Cesk. Neurol.* 29:101, 1966.
41. WATSON, P. — A slide centrifuge: an apparatus for concentrating cells in suspension onto a microscope slide. *J. Lab. clin. Med.* 68:494, 1966.
42. WIECZOREK, V. GREGER, J. — Erfahrungen mit der Liquorzell Diagnostik. *Psychiatr. Neurol. (Basel)* 150:42, 1965.