



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**APLICABILIDADE DO *CELL BLOCK* NA PESQUISA DE CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

Valéria Araújo do Nascimento Santos

Brasília - DF  
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Valéria Araújo do Nascimento Santos

**APLICABILIDADE DO *CELL BLOCK* NA PESQUISA DE CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

Dissertação apresentada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro

Brasília - DF  
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Valéria Araújo do Nascimento Santos

**APLICABILIDADE DO *CELL BLOCK* NA PESQUISA DE CÉLULAS  
NEOPLÁSICAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO**

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro (Presidente)  
Universidade de Brasília – UnB

---

Profa. Dra. Leonora Maciel De Sousa Vianna  
Universidade de Brasília - UnB

---

Dra. Telma Carvalho Pereira  
Hospital de Base – HB/IGESDF

---

Profa. Dra. Andrea Barreto Motoyama  
Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho ao meu esposo Zeferino, meus filhos Lorena, Antônio e Gustavo, e minha neta Helena.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por minha vida, minha família, meu trabalho e meus amigos, e por todo o bem que me cerca.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, carinho e pelo exemplo de trabalho e honestidade.

Ao meu esposo e filhos, pelo amor, compreensão, incentivo e apoio moral e técnico, fundamentais nesta caminhada.

À Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, mentora maior desta pesquisa, pela oportunidade de participação na mesma e pelos ensinamentos científicos.

À Tércia Maria Mendes Lousa de Castro e Agnaildes Pereira de Santana Brito, pelo auxílio técnico e companheirismo sem os quais este trabalho não teria sido concluído.

À Monique, Valdirene, Ester e equipe do laboratório do Núcleo de Citologia e Anatomia Patológica do Hospital de Base pelo precioso auxílio técnico.

Aos colegas patologistas Diogo Batista dos Santos Medeiros e Thiago David Alves Pinto pelo apoio técnico-científico.

Aos residentes em Patologia do Hospital de Base, grande estímulo para o contínuo aprendizado.

## RESUMO

Metástase meníngea é uma complicação comum de carcinomas e neoplasias hematológicas. O exame citopatológico do líquido cefalorraquidiano (LCR) é um dos métodos diagnósticos usados na rotina, porém tem sensibilidade baixa por escassez celular. Na maioria dos laboratórios de Patologia, amostras de LCR são preparadas apenas por citocentrifugação. O *cell block* é um método de preparo de amostra citológica, e plasma-tromboplastina é uma técnica de preparo de *cell block* de custo baixo, execução fácil e preservação da morfologia e da celularidade. A imunocitoquímica pode ser aplicada em amostras de citocentrifugação e de *cell block*. A aplicabilidade do *cell block* em amostras de LCR ainda não está bem descrita na literatura. Diante disso os objetivos deste estudo foram analisar a frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos e dos resultados dos exames citopatológicos de LCR; avaliar a concordância nos resultados dos exames citopatológicos de LCR entre as amostras preparadas por citocentrifugação e *cell block* pelo método plasma-tromboplastina; comparar as amostras de LCR preparadas pelos dois métodos com relação à celularidade, aos aspectos morfológicos e à expressão imunocitoquímica de PANCK, e analisar o escore de positividade de marcadores imunocitoquímicos no *cell block*. Trata-se de estudo observacional e transversal com análise de amostras citológicas de LCR enviadas para as Unidades de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital de Base/Instituto de Gestão Estratégica do Distrito Federal (HB/IGESDF). Foram obtidos dados de diagnósticos clínicos/histopatológicos e resultados dos exames citopatológicos de LCR nas requisições de exame, laudos e prontuários médicos de 2013 a 2021. Para as análises de concordância e comparação, foram incluídas amostras de LCR enviadas de 2019 a 2021. No *cell block* avaliou-se a expressão de marcadores imunocitoquímicos, utilizando-se escores de positividade. Em 51,3% (312/608) das requisições de amostras de LCR constava o diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia, com predomínio das neoplasias hematológicas seguidas de carcinoma. Do total de diagnósticos clínicos de carcinomas, a maioria, 54,0% (47/87) era de origem em mama. Com relação aos resultados dos exames citopatológicos de LCR, em 5,9%

(36/608) das amostras obteve-se resultado suspeito/positivo para malignidade. A neoplasia mais frequentemente diagnosticada em LCR foi o carcinoma, 61,6% (22/36), seguido de neoplasia hematológica, 30,6% (11/36). Os sítios primários mais frequentes de carcinomas diagnosticados em LCR foram mama e pulmão. Houve concordância nos resultados dos exames citopatológicos entre as amostras preparadas por citocentrifugação e *cell block* em 97,3% (73/75) (Kappa= 0,84). A maioria das amostras de LCR era acelular, 64,0% (48/75). Na contagem de células não houve diferença estatisticamente significativa e a morfologia celular foi semelhante nos dois métodos. O escore de positividade para PANCK em carcinomas foi elevado em ambos os métodos de preparo. No *cell block* as médias e as medianas dos escores de positividade dos marcadores PANCK, CK7, MOC-31 e claudin-4 foram elevadas. Considerando-se os resultados das análises de concordância e comparativa entre citocentrifugação e o *cell block*, a facilidade de execução e o baixo custo do *cell block*, a facilidade de interpretação na imunocitoquímica e os elevados escores de positividade dos marcadores em amostras de *cell block*, pode-se concluir que o *cell block* pelo método plasma/tromboplastina é uma técnica aplicável em amostras de líquido cefalorraquidiano e pode ser usado de forma complementar à citocentrifugação, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do exame citopatológico.

**Palavras-chave:** carcinoma; linfoma; metástase meníngea; líquido cefalorraquidiano; citologia; *cell block*; método plasma-tromboplastina; citocentrifugado; imunocitoquímica.

## ABSTRACT

Meningeal metastasis is a common complication from carcinomas and hematologic malignancies. The cytological examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is an accessible and minimally invasive diagnostic method but its sensitivity is low due to cell sparsity. In most laboratories the CSF is prepared by cytocentrifugation. *Cell block* is a cytological method commonly used for processing effusion, peritoneal and bronchoalveolar lavage and fine needle aspiration samples, in addition to cytocentrifugation. The plasma-thromboplastin method is one of the most appropriate for *cell block* preparation because of its low cost, easy execution and good cellularity and morphological preservation. The immunocytochemistry can be applied to samples prepared by cytocentrifugation and cell block samples. The applicability of cell block in CSF samples isn't well described in the literature. This study aimed to analyze the clinical/histopathological diagnosis frequency and the cytological CSF exam results, evaluate the results convergence between samples prepared by cytocentrifugation and cell block, compare CSF samples prepared by cytocentrifugation and cell block concerning to cellularity, cell morphology and PANCK immunocytochemical expression, and analyze the positivity score of immunocytochemical markers in cell block. This is a cross-sectional observational study in which CSF fluid samples were sent to Pathology Services of Hospital Universitário de Brasília (HUB) and Hospital de Base/Instituto de Gestão Estratégica em Saúde do Distrito Federal (HB/IGESDF) for cytological analysis. The clinical/histopathological diagnoses and the CSF exam results were obtained from exam forms, hospital archives and cytological reports, including all CSF cytological exams from 2013 to 2021. For concordance and comparison analysis, all CSF samples from 2019 to 2021 were included. In representative sections of cell block, immunocytochemical markers expression was compared using a positivity score. In most CSF samples requests, there were clinical/histopathological diagnosis of neoplasia, 51.31% (312/608); hematological neoplasms predominated followed by carcinoma. Among carcinomas, the majority were from breast, 54.0% (47/87). Regarding the CSF cytological results from all the samples, in 5.9% (36/608) suspicious/positive results were obtained in the cytopathological analysis. The most frequent neoplasm diagnosed in CSF was

carcinoma, 61,6% (22/36) followed by hematological neoplasm, 30,6% (11/36). The most frequent carcinoma primary sites diagnosed in CSF were breast and lung. In the concordance and comparative analyses, there was concordance in 97.3% (73/75) (Kappa= 0.84) of the results between the samples prepared by cytocentrifugation and *cell block*. Regarding cellularity, most of CSF samples were acellular, 64,0% (48/75). There was no statistically significant difference concerning cell number. Morphological cell aspects were similar in samples prepared by both methods. The positivity PANCK score in carcinomas was high in both preparation methods. Cell block positivity score average and medians for diagnostic markers, PANCK, CK7, MOC-31 and claudin-4, were high. Considering the concordance and comparative analyzes results between cytocentrifugation and *cell block*, easy execution, low cost, easy immunocytochemistry interpretation, and high immunocytochemical markers positivity in cell block samples, we concluded that cell block prepared by plasma/thromboplastin method is a technique applicable for CSF samples and can be used in a complementary way to cytocentrifugation in order to increase cytopathological test sensitivity.

**Keywords:** carcinoma; lymphoma; meningeal metastasis; cerebrospinal fluid; cytology; cell block; plasma-thromboplastin method; cytocentrifuged; immunocytochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração esquemática do fluxo do LCR e de sua interrupção por células cancerosas metastáticas para leptomeninges. Fonte: Corbin ZA, Nagpal S. Leptomeningeal Metastases. JAMA Oncol. 2016. ....	14
Figura 2 Desenho ilustrativo da técnica de citocentrifugação. Fonte: Torzewski et al..Integrated cytology of cerebrospinal fluid. Springer. Berlin: 2008. ....	17
Figura 3 Técnica de confecção de cell block pelo método plasma-tromboplastina. Fonte: Chandra A et al. The international system for serous fluid cytopathology. Springer. Switzerland: 2020. ....	20
Figura 4 Delineamento experimental.....	31
Figura 5 Citologia de amostra de LCR com carcinoma escamoso de colo de útero (A e B) 100x, e com plasmocitoma (C e D) 40x. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou. B, cell block, coloração HE. ....	45
Figura 6 Citologia de amostra de LCR com células isoladas e com atipias pouco evidentes (seta) de adenocarcinoma de pulmão. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou.400x B, cell block, coloração HE. 400x. ..	46
Figura 7 Citologia de amostra de LCR de Plasmocitoma. Em A, preparação por citocentrifugação, coloração Papanicolaou, células isoladas e arredondadas.100x. Em B, cell block, coloração HE, células isoladas, com artefatos de retração e contorno nuclear irregular.....	47
Figura 8 Citologia de amostra de LCR com carcinoma escamoso de colo. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou; 400x. B, cell block, coloração HE (B); 400x.....	48
Figura 9 Citologia de amostra de LCR com adenocarcinoma de pulmão, figura A; e com carcinoma de ovário, figura B. Cell blocks, coloração HE, 400x. ....	49
Figura 10 Concentração de células em amostra de LCR com carcinoma de colo de útero; cell block, coloração HE, 200x. ....	50
Figura 11 Imunocitoquímica para PANCK em amostra de LCR preparada por	

citocentrifugação (A) e em cell block (B) com escore de positividade total de 12 em ambos os métodos; 200x. ....	51
Figura 12 Imunocitoquímica para diferentes marcadores diagnósticos em amostra de LCR com carcinoma de diferentes sítios primários. A, mama Claudin-4 (escore total 12), 200x; B, mama, MOC-31 (escore total 12), 200x; C, pulmão, CK-7 (escore total 12), 400x; D, ovário, PANCK (escore total 12), 200x.....	53
Figura 13 Imunocitoquímica de marcadores em carcinoma escamoso de colo de útero em A, p63 (escore total 8); e em B, p16 (escore total 8); adenocarcinoma de pulmão em C, TTF-1 (escore total 8); carcinoma de mama em D, GATA-3 (escore total 5). ...	54
Figura 14 Imunocitoquímica do marcador CD138, plasmocitoma (escore total 3). ...	54
Figura 15 Coágulo e blocos de parafina (cell blocks) de amostras de líquido cefalorraquidiano confeccionados pelo método plasma-tromboplastina.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica .....	34
Tabela 2 Escore de positividade para marcadores imunocitoquímicos de membrana e citoplasmáticos .....	35
Tabela 3 Escore de positividade para marcadores imunocitoquímicos nucleares ....	35
Tabela 4 Frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021 .....	38
Tabela 5 Frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos de neoplasia de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021 .....	38
Tabela 6 Frequência dos sítios primários de carcinomas de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021, de acordo com o gênero.....	39
Tabela 7 Frequência de resultados suspeitos/positivos em amostras de LCR, preparadas por citocentrifugação ou cell block, de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia ma-ligna e neoplasia do SNC nos anos de 2013 a 2021 .....	40
Tabela 8 Frequência de resultados suspeitos/positivos em amostras de LCR, preparadas por citocentrifugação ou cell block, de pacientes com diagnóstico clínico de carcinoma conforme o sítio primário nos anos de 2013 a 2021 .....	41
Tabela 9 Frequência de diagnósticos clínicos/histopatológicos de pacientes cujas amostras foram enviadas para análise citopatológica por citocentrifugação e cell block nos anos de 2019 a 2021.....	42
Tabela 10 Frequência de resultados da análise citopatológica concordantes e discordantes em amostras citológicas preparadas por citocentrifugado e cell block nos anos de 2019 a 2021.....	43
Tabela 11 Contagem de células no material citocentrifugado e no cell block de amostras de LCR com carcinoma, plasmocitoma e células inflamatórias .....	44

Tabela 12 Escores de proporção, intensidade e total da expressão de PANCK, MOC-31, CK7 e Claudin-4 em amostras de LCR com carcinoma, preparadas por cell block ..... 52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK7	do inglês, <i>Cytokeratin 7</i>
dp	Desvio padrão
EpCAM	do inglês <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> ; <i>molécula de adesão de célula epitelial</i>
FS	Faculdade de Saúde
GATA	da sequência do DNA [A/T] GATA [A/G]
GATA3	gene codificador da proteína GATA3
GATA-3	do inglês <i>GATA binding protein 3</i> ; proteína ligante 3 do GATA
HE	Hematoxilina-Eosina
HB	Hospital de Base
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IGESDF	Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mg/dL	Miligrama por decilitro
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
MOC-31	Nome codificado para um clone do EpCAM
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PANCK	do inglês, <i>Pancytokeratin</i>
PAX8	do inglês, <i>Paired Box gene 8</i>
PCR	do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TBS	do inglês, <i>Tris-Buffered Saline</i> ; Tampão salino Tris
TTF-1	do inglês, <i>Thyroid Transcription Factor 1</i> , fator de transcrição tireoidiano
UnB	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	METÁSTASE MENÍNGEA	13
1.2	EXAME CITOPATOLÓGICO DO LCR (CITOLOGIA ONCÓTICA)	16
1.2.1	<b>Citocentrifugação</b>	<b>16</b>
1.2.2	<b>Citologia Em Meio Líquido</b>	<b>18</b>
1.2.3	<b>Cell Block</b>	<b>18</b>
1.2.3.1	Técnica	19
1.2.3.2	Aplicabilidade	20
1.3	IMUNOCITOQUÍMICA E MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS	21
1.3.1	<b>Marcadores Diagnósticos</b>	<b>22</b>
1.3.1.1	PANCK	22
1.3.1.2	CK7	23
1.3.1.3	MOC-31	23
1.3.1.4	Claudin-4	24
1.3.2	<b>Marcadores de Tipo Histológico</b>	<b>25</b>
1.3.2.1	P63	25
1.3.2.4	CD138	25
1.3.3	<b>Marcadores de Sítio Primário</b>	<b>26</b>
1.3.3.1	TTF1	26
1.3.3.2	GATA3	26
1.3.4	<b>Marcador De Malignidade - P16</b>	<b>27</b>
1.3.5	<b>Marcadores de Linhagem Hematopoiética</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>

4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	31
4.2	TIPO DE ESTUDO .....	32
4.3	ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS (HIPÓTESES CLÍNICAS) E DOS RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA EXAME CITOPATOLÓGICO NOS ANOS 2013 A 2021 .....	32
4.4	ESTUDO COMPARATIVO E DE CONCORDÂNCIA ENTRE AMOSTRAS DE LCR PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO E <i>CELL BLOCK</i> E ENVIADAS PARA EXAME CITOPATOLÓGICO NOS ANOS DE 2019 A 2021 .....	33
4.5	ANÁLISE DO ESCORE DE POSITIVIDADE DOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS, DE TIPO HISTOLÓGICO E DE SÍTIO PRIMÁRIO EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS DE 2019 A 2021 .....	34
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA ANÁLISE CITOPATOLÓGICA NOS ANOS 2013 A 2021 .....	37
5.1.1	<b>Sítios Primários De Carcinoma De Pacientes Com Amostras De LCR Enviadas Para Análise Citopatológica De Acordo Com O Gênero .....</b>	<b>38</b>
5.2	RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE LCR, PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO OU <i>CELL BLOCK</i> NOS ANOS DE 2013 A 2021 .....	39
5.2.1	<b>Sítios Primários De Carcinomas Diagnosticados Em Amostras De LCR Preparadas Por Citocentrifugação Ou <i>Cell Block</i>.....</b>	<b>40</b>
5.3	ANÁLISE COMPARATIVA E DE CONCORDÂNCIA ENTRE CITOCENTRIFUGAÇÃO E <i>CELL BLOCK</i> EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS DE 2019 A 2021 .....	41
5.3.1	<b>Concordância Entre Citocentrifugação E <i>Cell Block</i> Em Relação Aos Resultados Da Análise Citopatológica De Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021.....</b>	<b>42</b>
5.3.2	<b>Comparação Entre Citocentrifugação E <i>Cell Block</i> Em Relação À</b>	

<b>Celularidade, À Morfologia E Ao Padrão De Marcação Imunocitoquímica E Escore De Positividade Para PANCK Em Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021 .....</b>	<b>43</b>
5.4 ANÁLISE DO ESCORE DE POSITIVIDADE PARA MARCADORES DIAGNÓSTICOS PANCK, MOC-31, CK-7 E CLAUDIN-4 EM AMOSTRAS DE <i>CELL BLOCK</i> DE LCR.....	51
<b>5.4.1 Comparação Do Escore De Positividade Dos Marcadores Diagnósticos Para Carcinoma (PANCK, MOC-31, CK-7 E Claudin-4) Em Amostras De LCR Preparadas Por <i>Cell Block</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4.2 Expressão De Marcadores De Sítio Primário, De Tipo Histológico E De Malignidade Em Amostras Preparadas Por <i>Cell Block</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
6.1 DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA ANÁLISE CITOPATOLÓGICA NOS ANOS 2013 A 2021 .....	55
<b>6.1.1 Sítios Primários De Carcinoma De Pacientes Com Amostras De LCR Enviadas Para Análise Citopatológica De Acordo Com O Gênero .....</b>	<b>56</b>
6.2 RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE LCR, PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO OU <i>CELL BLOCK</i> NOS ANOS DE 2013 A 2021 .....	57
6.3 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA E COMPARATIVA ENTRE CITOCENTRIFUGAÇÃO E <i>CELL BLOCK</i> EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS 2019 A 2021 .....	58
<b>6.3.1 Concordância Entre Citocentrifugação E <i>Cell Block</i> Em Relação Aos Resultados Da Análise Citopatológica De Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021.....</b>	<b>59</b>
<b>6.3.2 Comparação Entre Citocentrifugação E <i>Cell Block</i> Em Relação À Celularidade, À Morfologia E Ao Padrão De Marcação Imunocitoquímica Para PANCK Em Amostras De LCR.....</b>	<b>60</b>
<b>6.3.3 Análise Do Escore De Positividade Para Marcadores Imunocitoquímicos .....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE A - PREPARO DO CELL BLOCK PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE B - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA (HE) .....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE C - IMUNOCITOQUÍMICA .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE D – PBS.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE E – TAMPÃO DE HEMÓLISE .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE F – HEMATOXILINA DE HARRIS .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE G – CORANTE ORANGE G .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE H – CORANTE EA-65.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE I – SOLUÇÃO DE RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE J – TAMPÃO TBS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP – UNB .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP – IGESDF .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - IGESDF</b>	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 METÁSTASE MENÍNGEA

A meningite neoplásica ou metástase meníngea é a disseminação metastática de células tumorais procedentes de neoplasias sólidas ou hematológicas para as leptomeninges (pia e aracnoide) e espaço subaracnoideo (1). A disseminação das células neoplásicas ocorre por via hematogênica, perineural, linfática, mecanismos perivascularares ou por extensão direta das metástases superficiais do cérebro ou osso do crânio ou medula espinhal (2). O envolvimento do espaço subaracnoideo por células neoplásicas ocorre em 4-15% dos pacientes com tumores sólidos e em 5-15% de pacientes com neoplasias hematológicas (3). Os tipos mais comumente responsáveis por estas metástases são: carcinomas da mama (35%), do pulmão (24%) e malignidades hematológicas (16%) (4).

A incidência e a prevalência da metástase meníngea estão aumentando devido ao desenvolvimento de melhores modalidades de tratamento e consequente aumento da sobrevida dos pacientes com câncer (5).

As manifestações clínicas ocorrem devido ao acometimento dos hemisférios cerebrais nervos cranianos e/ou da medula e raízes nervosas (1). O diagnóstico de metástase meníngea deve sempre ser considerado em pacientes com câncer e sintomas neurológicos (2). Alguns sinais e sintomas resultam de células cancerígenas que obstruem as saídas normais do LCR causando um acúmulo de fluido e aumento da pressão no cérebro (**Figura 1**). Esse aumento da pressão pode causar sintomas incluindo dores de cabeça, náuseas, alterações na visão e dificuldade para caminhar. As células cancerosas também podem afetar nervos que saem do cérebro causando dormência, fraqueza ou dor (6).

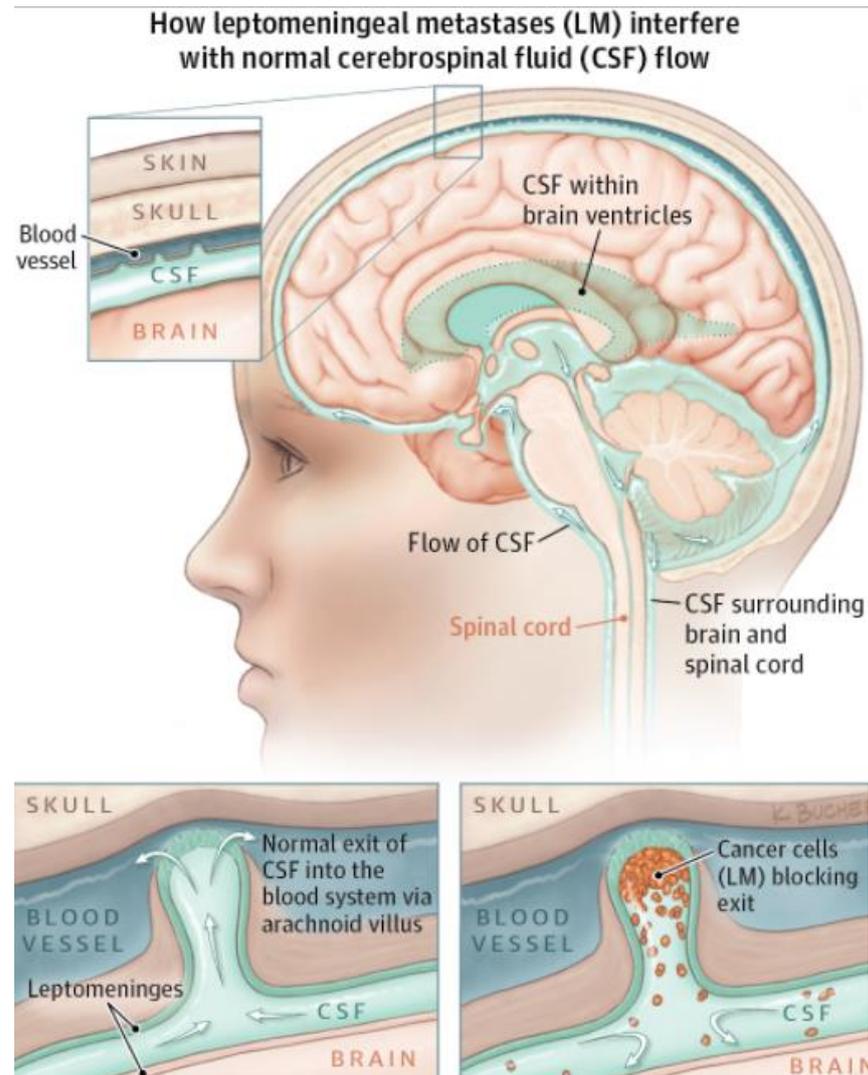


Figura 1 Ilustração esquemática do fluxo do LCR e de sua interrupção por células cancerosas metastáticas para leptomeninges. Fonte: Corbin ZA, Nagpal S. Leptomeningeal Metastases. JAMA Oncol. 2016.

As modalidades terapêuticas para o tratamento da metástase meníngea devem ser individualizadas e consistem na quimioterapia intratecal, radioterapia e quimioterapia sistêmica (1) (2). A quimioterapia intratecal se faz pela administração de fármacos diretamente no espaço subaracnoideo (3) (7). A eficácia da quimioterapia sistêmica no tratamento da metástase meníngea por tumores sólidos é em geral limitada, principalmente pelas baixas concentrações das células tumorais alcançadas no liquor (líquido cefalorraquidiano) e no parênquima cerebral e a falta de eficácia antitumoral em determinadas neoplasias (2). O papel da cirurgia na metástase

meníngea é limitado sendo a indicação restrita à implantação de reservatórios subcutâneos para aplicação da quimioterapia, biópsia em casos selecionados e exame citológico não conclusivo, e derivação ventriculoperitoneal nos casos de hidrocefalia (1). Apesar dos avanços em radioterapia e quimioterapia, o prognóstico destes pacientes é ruim com severo impacto na morbidade e mortalidade, sendo a sobrevida média de 3 a 6 meses após diagnóstico do envolvimento leptomeníngeo (1) (5) (8).

O exame citopatológico do líquido cefalorraquidiano (LCR) ao lado do exame de imagem são os métodos diagnósticos mais utilizados, porém com baixa acurácia (1) (8). Não há um padrão ouro para o diagnóstico de metástase meníngea (1) (8).

O exame de neuroimagem de eleição em pacientes com suspeita de MN é a ressonância magnética com gadolínio do cérebro e medula espinhal (1). As alterações mais frequentes à ressonância magnética, compatíveis com o diagnóstico de metástase meníngea, são: realce focal ou difuso das meninges, nódulos subaracnóides ou intraventriculares e realce localizado no epêndima, nervos cranianos ou em raízes nervosas (1). É importante a realização do exame de neuroimagem antes da punção lombar pois esta pode causar um realce meníngeo transitório e conseqüentemente um resultado falso positivo (1).

A análise laboratorial do LCR pode constatar níveis proteicos acima de 45 mg/dL, pleocitose e níveis de glicose reduzidos (< 60 mg/dL). A pressão liquórica elevada (> 150 mm) pode ser encontrada em 30-57% dos pacientes com metástase meníngea (5).

As diretrizes EANO ESMO propuseram uma classificação de metástases meníngeas de cânceres sólidos com base na apresentação clínica, ressonância magnética e citologia do LCR. A metástase meníngea tipo I é definida por citologia LCR positiva (confirmada), enquanto a do tipo II é definida por sinais clínicos e de ressonância magnética típicos (provável ou possível). Os pacientes com metástase meníngea tipo I tem pior prognóstico que os pacientes do tipo II, mas respondem melhor a quimioterapia intratecal e sistêmica (9).

## 1.2 EXAME CITOPATOLÓGICO DO LCR (CITOLOGIA ONCÓTICA)

O exame clínico do LCR foi possível com a invenção da punção lombar por Heinrich Quincke em 1891, sendo a presença de células malignas no LCR descrita pela primeira vez em 1904 (10).

O exame citopatológico é considerado um dos principais métodos diagnósticos em LCR. É um exame tecnicamente simples, rápido e pouco oneroso (11) (12). É utilizado para confirmação de suspeita clínica de metástase nos casos de tumores primários conhecidos, na presença de mais de um primário e também nos casos de tumores ocultos ou desconhecidos (11). A análise citopatológica do LCR também é útil na avaliação da resposta ao tratamento na metástase meníngea (1). Segundo o grupo de trabalho *Response Assessment in Neuro-Oncology* este exame deve ser feito antes do início do tratamento e durante o tratamento (12). Considera-se resposta ao tratamento quando a citologia passa de positiva a negativa. Considera-se progressão da metástase meníngea quando a citologia previamente negativa se torna positiva ou quando a citologia previamente positiva persiste positiva após a fase de indução do tratamento (12).

As principais técnicas utilizadas em citopatologia são citocentrifugação, citologia em meio líquido e *cell block* (10) (11) (12) (13).

### 1.2.1 Citocentrifugação

Um dos métodos de transferência de amostras citológicas para lâminas é a citocentrifugação, sendo a mais utilizada no processamento do LCR (11) (12). A citocentrifugação permite que as células sejam dispostas em uma lâmina na posição vertical, enquanto o fluido suspenso é absorvido por um papel absorvente circundante (12) (13). Na **Figura 2** encontra-se ilustração desta técnica. Além de ser eficiente em termos de rendimento (aproveitamento) celular, permite o uso de praticamente todos os tipos de fixação e coloração, inclusive imunocitoquímica, imunofluorescência e hibridização *in situ* (12). Contudo, o diagnóstico de metástase meníngea é limitado devido à baixa sensibilidade do exame citológico do LCR, principalmente pela pobreza

de células neoplásicas que é uma constante nestas amostras (11). A realização de imunocitoquímica pode ficar prejudicada devido ao número limitado de lâminas microscópicas realizadas (10) (12) (13).

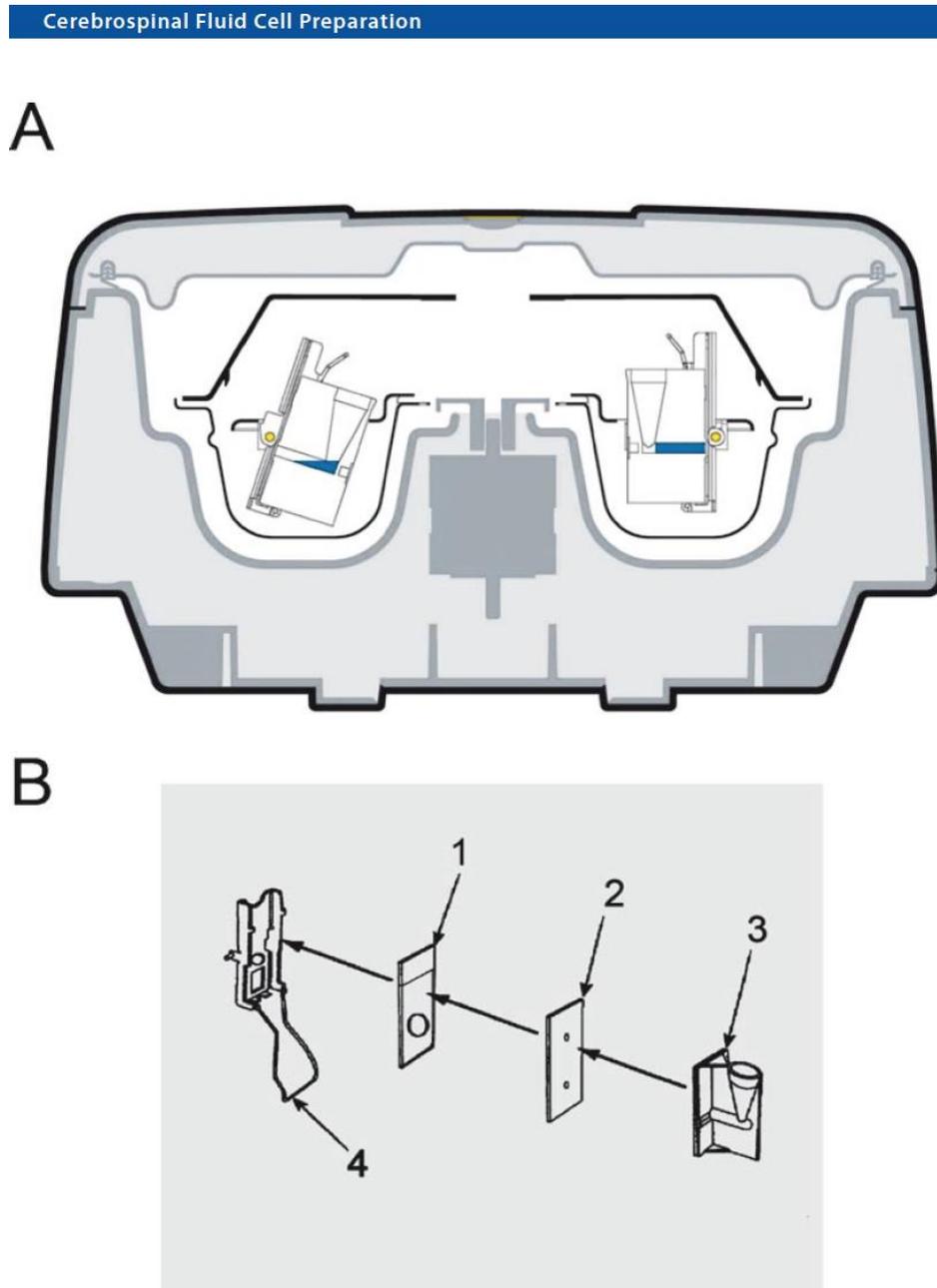


Figura 2 Desenho ilustrativo da técnica de citocentrifugação. Fonte: Torzewski *et al.* Integrated cytology of cerebrospinal fluid. Springer. Berlin: 2008.

### 1.2.2 Citologia Em Meio Líquido

O exame citológico em meio líquido é uma técnica largamente utilizada no preparo da maioria das amostras citológicas. Foi desenvolvida na década de 1990 como uma alternativa à citologia convencional por apresentar maior taxa de aproveitamento celular e melhor preservação celular (14). Publicações utilizando um dos métodos de meio líquido, *ThinPrep*, demonstraram melhor detalhe celular em relação a citocentrifugação, e sensibilidade e especificidade na detecção de anormalidades, comparáveis ou superiores à citocentrifugação (15) (16). Porém citações do preparo em meio líquido em LCR são escassas na literatura (16). Straccia *et al* demonstraram bons resultados da técnica em meio líquido em LCR, com relação a limpeza do fundo do esfregaço, maior riqueza celular, melhores detalhes nucleares e maior celularidade por lâmina, em relação à citocentrifugação. Este método proporciona material residual, útil para técnicas auxiliares como imunocitoquímica e testes moleculares (14).

### 1.2.3 Cell Block

Os primeiros relatos da manufatura do *cell block* ou emblocado celular são de Bahrenburg em 1896, com o diagnóstico de carcinoma em líquido ascítico (17). Ele processou o líquido ascítico por coagulação espontânea, fixação em álcool e embebimento em celoidina. Em 1917 Mandelbaum usou uma técnica de preparação de *cell block* e detectou células malignas após centrifugação de exsudatos (18). Porém a técnica foi consagrada em 1947 com a publicação de Chapman e Whalen, sobre confecção de *cell block* a partir de fluidos serosos (19).

### 1.2.3.1 Técnica

A técnica do *cell block* consiste na concentração do espécime citológico, seja sedimento, coágulo sanguíneo, líquidos de efusões serosas ou lavados peritoneais e broncoalveolares ou ainda fragmentos visíveis macroscopicamente como os oriundos de PAAF (19). A amostra é fixada, processada nos moldes do material histológico habitual, emblocada em parafina e cortada. Os cortes variam de 4 a 5  $\mu\text{m}$  e a coloração utilizada é a Hematoxilina-eosina (HE) (13) (19).

São descritas numerosas técnicas de confecção do *cell block*, algumas disponíveis comercialmente porém a maioria são técnicas modificadas “*in house*” sendo a do plasma-trombina-tromboplastina uma das mais frequentemente utilizadas além da técnica do Ágar, HistoGel e sistema automatizado Cellient (20) (21).

O método plasma-trombina-tromboplastina é simples e rápido ao ser comparado com o método com ágar, tem menos passos metodológicos, dispensa aquecimento do meio de inclusão, podendo ser realizado à temperatura ambiente (22). A formação do coágulo ocorre após adição de plasma humano e tromboplastina ao sedimento do LCR após centrifugação, conforme ilustrado na **Figura 3**, podendo então ser processado de acordo com metodologia idêntica às amostras histológicas – fixação, inclusão em parafina, cortes e repetições necessárias às colorações especiais, e a imunocitoquímica (22) (23).

Fibrinogênio e trombina em pó foram usados pela primeira vez para formação de coágulos a partir de material citológico, em 1948 por Birge *et al* (23). De Girolami em 1977 demonstrou o uso diagnóstico do método em uma variedade de tecidos e órgãos dos tratos genital feminino, urinário, digestório e respiratório, além de mamas e efusões (24) (25). Em 2014 Crapanzano *et al.* descreveram melhor celularidade, interpretação morfológica, distribuição celular e coágulo de maior tamanho, como resultado de uma pesquisa sobre vários métodos de confecção de *cell blocks* (26).

Caso o material enviado ao laboratório não seja fresco e sim fixado, é necessário lavagem completa do mesmo com solução salina isotônica antes de se adicionar plasma e tromboplastina (27).

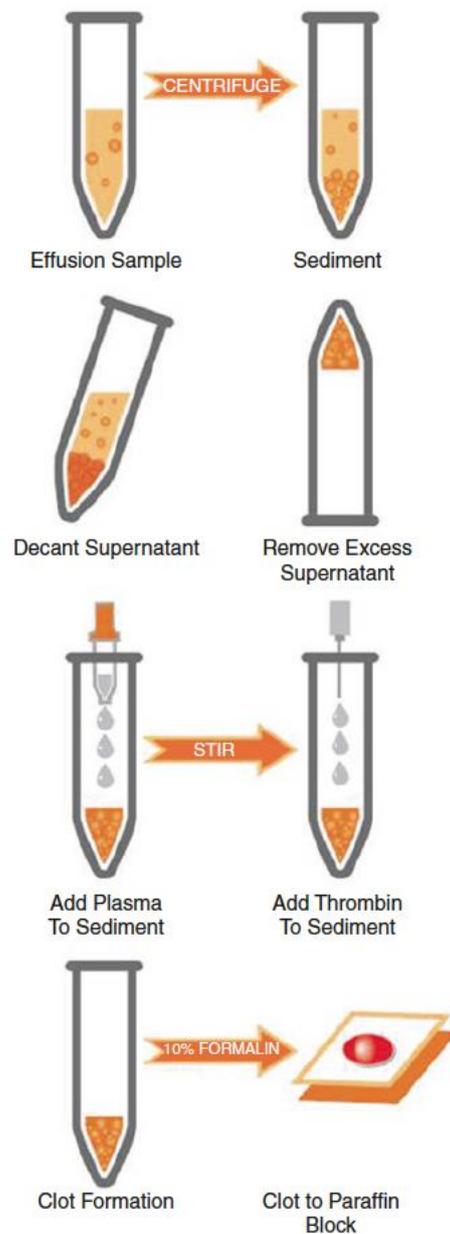


Figura 3 Técnica de confecção de cell block pelo método plasma-tromboplastina. Fonte: Chandra A *et al.* The international system for serous fluid cytopathology. Springer. Switzerland: 2020.

### 1.2.3.2 Aplicabilidade

*Cell block* pode ser usado para colorações especiais como mucicarmin e colorações para microorganismos, em técnicas auxiliares como imunocitoquímica e

técnicas moleculares como reação em cadeia polimerase (PCR), hibridização *in situ*, reação em cadeia polimerase quantitativa para detectar mutações de oncogenes, fusões gênicas, ganhos de cópias gênicas e superexpressão proteica, além de sequenciamento genético de última geração (10) (11) (19).

Citocentrifugado e *cell block* se prestam a imunocitoquímica porém as maiores vantagens do *cell block* em relação ao citocentrifugado é que pelo material ser fixado em formalina e processado nos moldes dos espécimes histológicos, não necessita de validação adicional para testes auxiliares incluindo a imunocitoquímica (28). Também permite a ampliação de painel de marcadores imunocitoquímicos por possibilitar múltiplos cortes histológicos sequenciais além de fornecer detalhes citomorfológicos adicionais e maiores detalhes arquiteturais e excelente material para estudos auxiliares (10) (26) (28).

A tendência atual da medicina de se utilizar procedimentos cada vez menos invasivos, realça a utilidade dos *cell blocks* (26). Em uma pesquisa internacional sobre práticas citológicas em citologia não ginecológica, a maioria dos pesquisadores indicou o *cell block* como uma das técnicas mais utilizadas pelos mesmos e como o mais utilizado para estudos auxiliares (29).

Uma das desvantagens do *cell block* é o atraso no processamento do material em relação ao preparo rápido por citocentrifugação (30).

### 1.3 IMUNOCITOQUÍMICA E MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS

No estudo de líquidos cavitários (efusões) e lavados peritoneais o uso de marcadores e painéis imunocitoquímicos para aprimoramento diagnóstico e classificação das malignidades está bem estabelecido (13). Marcadores para diagnóstico, prognóstico e de resposta terapêutica são usados no seguimento de pacientes com carcinoma metastático obtidos destas amostras (31).

Nos exames citopatológicos de LCR há uma constante preocupação com o pequeno volume das amostras quase sempre acompanhado de oligocitose sendo necessário otimizar o diagnóstico através do exame imunocitoquímico (11). O exame imunocitoquímico auxilia na confirmação da suspeita clínica nos casos de

malignidades primárias já conhecidas; é particularmente importante quando existe mais de um tumor primário (o que não é incomum tendo em vista o efeito carcinogênico de terapias anticâncer), nos casos de suspeição de tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) e nos casos de sítio primário desconhecido (11). É útil na presença de células neoplásicas sem atipias marcantes, em que a diferenciação com monócitos e macrófagos pode ser um desafio (12). Marcadores epiteliais podem definir um diagnóstico de carcinoma, excluindo a possibilidade de linfoma, melanoma e de um primário cerebral (10). Tumores primários do SNC também podem se apresentar com um exame do LCR positivo e a citologia é importante não só no diagnóstico inicial como também na recorrência tumoral (10).

O diagnóstico diferencial do adenocarcinoma metastático do pulmão para o LCR, assim como dos carcinomas ductal e lobular da mama, que são as neoplasias que mais frequentemente metastatizam para as meninges, inclui macrófagos, plasmócitos e células ependimárias/plexo coroide (10) (32).

Marcadores diagnósticos de linhagem celular, tipo histológico, sítio primário e de malignidade, já testados em vários tipos de amostras citológicas (28) (31) (33) (34) podem ser úteis na avaliação imunocitoquímica do LCR.

### **1.3.1 Marcadores Diagnósticos**

#### **1.3.1.1 PANCK**

A maioria das citoqueratinas comercialmente disponíveis são anticorpos monoclonais (ex: MNF16) ou coquetéis de anticorpos monoclonais (ex: AE1/AE3) que reconhecem varias citoqueratinas de baixo e alto peso molecular. (35) Elas podem ser complementadas com anticorpo específico para queratinas de baixo peso molecular como CAM5.2 que reconhece queratinas 8 e 7, ou com anticorpos para queratinas de alto peso molecular como 34 $\beta$ E12 que reconhece queratinas 1, 5, 10 e 14; e D5/16 B4 que reconhece queratinas 5 e 6 (35). Estas citoqueratinas podem ser usadas como marcadores de diferenciação escamosa ou urotelial, apesar da expressão de subtipos de adenocarcinomas ser potencial causa de erro. São também úteis para marcação de células mioepiteliais (mama) e basais (próstata) (35).

Os anticorpos anti-pan-citoqueratina (MNF-116) ou anticorpos específicos anti-citoqueratina são os mais utilizados para confirmar origem epitelial (12) (28), porém não são específicos, não sendo por exemplo, indicados para diferenciação entre células epiteliais e mesoteliais em efusões (28). PANCK (AE1/AE3) tem sido usado como marcador epitelial inicial nos algoritmos para detecção de metástases de carcinomas para o sistema nervoso (36) (37). Entretanto, PANCK e outros marcadores anti-citoqueratina como CAM5.2 podem ser expressos em tumores primários do sistema nervoso tais como meningiomas malignos, ependimomas, glioblastomas, papilomas e carcinomas do plexo coroide (38) (39) (40) (41) (42) (43).

#### 1.3.1.2 CK7

A citoqueratina 7 (CK7) é uma proteína de filamento intermediário predominantemente expressa por células epiteliais ductais do trato pancreatobiliar, ductos coletores renais e trato gastrointestinal proximal (28). Expressa em subtipos de adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas que crescem em epitélios não queratinizados. É frequentemente utilizada em associação à citoqueratina 20 (CK20) para a identificação e classificação de carcinomas de sítio primário desconhecido (44). A citoqueratina 7 tem sido usada para detecção de metástases de adenocarcinoma para sistema nervoso mas pode ser expressa em tumores primários incluindo os ependimomas e glioblastomas (39) (41).

#### 1.3.1.3 MOC-31

A molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM) é uma glicoproteína de superfície celular transmembrana, altamente expressa nos cânceres epiteliais e em menores níveis nos epitélios normais (33). EpCAM modula negativamente adesão celular mediada por caderina com um efeito anti-adesivo durante o desenvolvimento das neoplasias além de participar dos mecanismos de proliferação celular. É um

polipeptídeo de 314 aminoácidos e apresenta três domínios: um grande domínio extracelular (ectodomínio) de 242 aminoácidos, um domínio transmembrana de 23 aminoácidos e um domínio intracelular de 26 aminoácidos (33). O domínio maior, extracelular, contém uma primeira configuração com repetições epidermal growth factor (EGF)-símile, uma segunda configuração semelhante a tireoglobulina (TY) tipo 1A e uma terceira configuração que é cisteína-livre, não relacionada a nenhuma molécula conhecida (33) (45).

O clone MOC-31, ao lado de Ber-EP4 são anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos específicos no domínio EGF-símile, domínio extracelular de EpCAM. Ambos são utilizados rotineiramente para o diagnóstico de carcinomas em efusões (33) e podem ser usados como marcadores de adenocarcinoma metastático para o sistema nervoso. Diferentemente dos marcadores anti-citoqueratina, marcação utilizando o anticorpo Ber-EP4 não foi detectada em meningiomas e glioblastomas (38) (41).

#### 1.3.1.4 Claudin-4

Claudin-4 é uma proteína associada a junção celular, expressa na maioria das células epiteliais e ausente nas células mesoteliais (46). Claudin-4 é considerada o marcador mais sensível na distinção entre adenocarcinomas e células mesoteliais malignas em citologia de efusões (33). Por isto tem sido usada como referência para comparação com os resultados da expressão de marcadores como MOC-31 e p16 nestas amostras (31) (33).

Estudo sobre terapia alvo para metástases cerebrais demonstrou que claudin-4 e claudin-3 foram frequentemente expressos em metástases de carcinomas de mama, pulmão e cólon e infreqüentemente em metástases de carcinoma de células renais e melanoma, e que estes marcadores não foram expressos no tecido cerebral normal adjacente (47). Long H *et al* mostraram pequena ou nenhuma expressão de RNAm de claudin3 ou claudin4 em todo o tecido cerebral, consistente com o fato de que estes duas proteínas somente são expressas em células de origem epitelial, enquanto que a maioria das células cerebrais são de origem mesenquimal (48).

## 1.3.2 Marcadores de Tipo Histológico

### 1.3.2.1 P63

P63 é um membro da família p53, expresso em uma variedade de células que incluem células basais do epitélio escamoso, células mioepiteliais da mama e glândulas salivares, e células basais da próstata (28) (49).

Em amostras citológicas de pulmão como as oriundas de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), p63 ao lado do marcador p40 tem aplicabilidade na diferenciação entre carcinoma de células escamosas e outros tipos histológicos (50).

### 1.3.2.4 CD138

Também conhecido como Syndecan 1, CD138 é uma proteoglicana transmembrana envolvida em adesão célula-célula e adesão célula-matriz, faz a mediação da adesão celular no mieloma; a perda desta molécula da superfície celular pode contribuir para a proliferação e disseminação desta neoplasia (51).

É expresso nos estágios tardios da diferenciação de células B para plasmócitos (28). CD138 é um marcador hematopoiético q demonstra reatividade também para neoplasias epiteliais ou seja, não hematopoiéticas, como carcinoma pulmonar e urotelial e colangiocarcinoma; não é um marcador específico para derivação plasmacítica a menos que já se tenha origem hematolinfoide estabelecida (28).

CD138 é um bom marcador para identificar plasmócitos benignos, reativos ou malignos em espécimes de biópsia de medula óssea; marca linfomas plasmocitoides e plasmablásticos (este último é negativo para marcadores B como CD20, PAX5 e CD79a); positivo nos linfomas primários de efusões (28). CD 138 também é frequentemente positivo no carcinoma de células escamosas e pode ser positivo no carcinoma de mama, de ovário, carcinoma cortical adrenal e carcinoma de células renais, e adenocarcinoma de colon. O padrão de coloração é citoplasma e membrana.

Em plasmócitos marca membrana. É negativo na maioria dos linfomas B e negativo nos linfomas T/NK extranodais (28).

### **1.3.3 Marcadores de Sítio Primário**

#### **1.3.3.1 TTF1**

Thyroid Transcription Factor 1 é um fator de transcrição expresso na tireoide, diencéfalo e pulmão (34) (52). Demonstra reatividade nos carcinomas papilar, folicular, insular e medular da tireoide (34). Pequena fração de carcinomas não pulmonares e não tiroideanos expressam positividade para TTF1, como mama, ovário, endométrio, endocérvice e pâncreas, adenocarcinomas colorretais, tumores renais e mesoteliomas malignos (34).

TTF1 é amplamente utilizado na identificação de adenocarcinoma pulmonar nos mais diversos sítios metastáticos e em efusões para distinguir adenocarcinoma pulmonar de adenocarcinoma de outras origens (53) (54). Napsin A é uma alternativa ao TTF1 como marcador de sítio primário de adenocarcinoma pulmonar porém a coloração nuclear de TTF1 é mais fácil de se interpretar (55).

#### **1.3.3.2 GATA3**

GATA3 é um fator de transcrição associado ao zinco, com importante papel na promoção e direcionamento da proliferação celular, desenvolvimento e diferenciação em muitos tecidos e tipos celulares (28). É visto primariamente nos carcinomas de mama e urotelial, e, portanto, útil num painel de anticorpos para o diagnóstico de carcinoma metastático desconhecido, quando mama ou bexiga são uma origem possível (28). Raramente é encontrado em outros tumores como por exemplo o adenocarcinoma endometriode endometrial. Anti-GATA3 marca núcleos de carcinoma de mama primário e metastático com mais alta sensibilidade do que

GCDFP-15 ou mamaglobina Braxton 2015 (56). Não é anticorpo específico para mama, porém estudos mostram que GATA3 tem especificidade comparável a estes anticorpos (28).

#### **1.3.4 Marcador De Malignidade - P16**

O gene supressor tumoral p16 é um membro da classe INK4 (Cyclin-dependent Kinase 4 Inhibitor) de inibidores do ciclo celular (40). A proteína p16 se liga às kinases ciclina-dependentes 4 e 6 mantendo o produto do gene do retinoblastoma (RB) no estado hipofosforilado, que por sua vez se liga ao fator de transcrição E2F impedindo a progressão do ciclo celular (57). Nos tumores associados ao papiloma vírus humano (HPV) a integração do vírus ao genoma do hospedeiro conduz à produção da oncoproteína viral E7 que inativa pRb, impedindo sua ligação com o fator de transcrição E2F. Ocorre então um aumento da expressão do p16, tanto no núcleo, como no citoplasma, detectado por reação imuno-histoquímica (57).

Existem mecanismos de superexpressão de p16 independentes do HPV, podendo-se observar expressão do p16 em tumores que não possuem infecção por HPV, como o carcinoma seroso de alto grau (34). A intensidade e distribuição do p16 é importante na interpretação assim como localização nuclear versus citoplasmática (34).

Superexpressão de p16 foi observada na maioria dos carcinomas metastáticos, de diferentes sítios primários e tipos histológicos, em efusões e lavados peritoneais (31).

#### **1.3.5 Marcadores de Linhagem Hematopoiética**

CD45 (LCA) é marcador de células hematológicas exceto eritrócitos e plasmócitos. (28) É extremamente sensível e específico para células linfoides benignas e malignas. Trata-se de coquetel composto pelos anticorpos PD7/26

(CD45RB) e 2B11 (CD45) (58). Geralmente é fortemente positivo em linfomas não Hodgkin, fracamente positivo nas leucemias agudas e negativo nos linfomas de Hodgkin clássicos, linfomas anaplásicos de grandes células e tumores plasmocitarios (28). Tem importante papel na identificação de tumores linfoides sendo imprescindíveis em painéis imuno-histoquímicos iniciais de investigação de origem de neoplasias pouco diferenciadas primárias e metastáticas (28). Os anticorpos para CD45 são constantemente negativos para neoplasias não hematopoiéticas como carcinomas, melanomas e sarcomas (58).

CD20 é marcador de linfócitos da linhagem B (28). É antígeno de membrana adquirido tardiamente na fase pré-B de maturação, com perda da expressão na fase plasmocitária (58). Com raras exceções, CD20 é positivo em linfócitos B normais, reacionais, e neoplásicos maduros (58). Sua expressão é constante na grande maioria dos linfomas B, e virtualmente negativa nas neoplasias de linfócitos T. Pode ser positivo em até 20% dos linfomas de Hodgkin clássicos (58).

CD3 é o antígeno específico de células T mais utilizado em imuno-histoquímica, podendo ser detectado na membrana celular e/ou citoplasma (58). Marca linfócitos T reativos e neoplasias hematológicas com origem em células T (28). CD3 é expresso em até 80% dos linfomas T e virtualmente negativo em linfomas B (58). É positivo em mais de 90% dos linfomas de células T/NK extranodais (58).

## 2 JUSTIFICATIVA

Metástase meníngea é uma complicação comum de cânceres em estágio avançado e de difícil tratamento. Ocorre em aproximadamente 4% a 15% dos pacientes com tumores sólidos malignos e a confirmação da suspeita clínica tem repercussões na conduta clínica e no prognóstico (59).

O exame citopatológico do LCR é importante parte da rotina diagnóstica destas malignidades que acometem o Sistema Nervoso Central (11) (12). É um método minimamente invasivo, de baixo custo, fácil execução técnica e acessibilidade, capaz de fornecer informação crucial não só em relação a presença de células tumorais no LCR mas também sua identificação. Contudo, é desafiador diante da escassez celular constante nestas amostras e a propensão a rápida degeneração celular (11). A técnica mais comumente utilizada no processamento do LCR é a citocentrifugação sendo também realizada a citologia em meio líquido (11).

O *cell block* é uma importante ferramenta diagnóstica citopatológica. É um método largamente utilizado em amostras de efusões, lavados peritoneais e broncoalveolares e de punções aspirativas por agulha fina (19) (22). O processamento segue os mesmos procedimentos utilizados em tecidos embebidos em parafina, gerando material que pode ser submetido a procedimentos imuno-histoquímicos já validados (22). Os controles para colorações especiais e imuno-histoquímica de amostras de tecidos prestam-se como controles para as amostras de *cell block* com resultados semelhantes (28). O *cell block* gera vários cortes histológicos possibilitando a análise de diversos tipos de marcadores imunocitoquímicos.

Estudos sobre a utilização de *cell block* em LCR são escassos na literatura. Portanto, a avaliação da aplicabilidade do *cell block* e de marcadores imunocitoquímicos neste material pode trazer informações adicionais auxiliando no manejo dos pacientes com metástase meníngea.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade do *cell block* na citologia do líquido cefalorraquidiano (LCR) para pesquisa de células neoplásicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos (hipóteses clínicas) referentes aos exames citopatológicos de LCR;
- Analisar o número de exames citopatológicos de LCR com resultado suspeito/positivo.
- Avaliar a concordância nos resultados dos exames citopatológicos de LCR entre as amostras de LCR preparadas por citocentrifugação e *cell block*;
- Comparar as amostras de LCR preparadas por citocentrifugação e *cell block* com relação à celularidade e aos aspectos morfológicos e à expressão imunocitoquímica de PANCK;
- Analisar o escore de positividade dos marcadores diagnósticos, de tipo histológico e de sítio primário em neoplasias malignas diagnosticadas em *cell block*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na **Figura 4**, encontra-se esquematizado o delineamento experimental do estudo.



Figura 4 Delineamento experimental

## 4.2 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional e transversal no qual foram analisadas amostras citológicas de LCR enviadas para a Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e para o Núcleo de Citologia e Anatomia Patológica do Hospital de Base/Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (HB/IGESDF).

## 4.3 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS (HIPÓTESES CLÍNICAS) E DOS RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA EXAME CITOPATOLÓGICO NOS ANOS 2013 A 2021

Os diagnósticos clínicos/histopatológicos (hipóteses diagnósticas) e os resultados citopatológicos foram obtidos nas requisições de exame, nos prontuários médicos e nos laudos dos respectivos pacientes, sendo incluídos todos os exames citopatológicos de LCR de 2013 a 2021 realizados no HUB e no HB/IGESDF. Os diagnósticos clínicos/histopatológicos foram divididos em não-neoplásicos e neoplásicos, os quais foram classificados de acordo com o tipo histológico. Os exames com mais de um diagnóstico clínico/histopatológico ou nenhuma hipótese foram classificados como indefinidos. Os resultados citopatológicos foram classificados em dois grupos: Negativo para malignidade e suspeito/ positivo para malignidade (10) (13). Os resultados dos exames citopatológicos suspeitos/ positivos para malignidade foram classificados de acordo com o tipo histológico.

#### 4.4 ESTUDO COMPARATIVO E DE CONCORDÂNCIA ENTRE AMOSTRAS DE LCR PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO E *CELL BLOCK* E ENVIADAS PARA EXAME CITOPATOLÓGICO NOS ANOS DE 2019 A 2021

Para esta análise foram incluídas todas as amostras enviadas nos anos de 2019 a 2021, exceto de pacientes menores de 18 anos, indígenas e daqueles que se recusaram em participar do estudo. As amostras de LCR foram enviadas para análise citopatológica em volumes que variaram de 2 a 10 ml e submetidas a centrifugação a 2000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. O sobrenadante foi removido até um volume residual de 400 µl que foi homogeneizado com o precipitado e dividido em volumes iguais para cada método de preparo: 200 µl para citocentrifugação (100 µl para cada lâmina) e 200 µml para *cell block*. O *cell block* foi preparado pelo método plasma-tromboplastina cuja técnica está descrita no **Apêndice A**. As duas lâminas preparadas por citocentrifugação foram coradas pelo método de Papanicolaou e os cortes representativos de *cell block* corados por HE (hematoxilina e eosina).

Para a análise de concordância e comparativa de aspectos morfológicos nos dois métodos de preparo (citocentrifugação e *cell block*), as amostras preparadas por citocentrifugação foram comparadas com as de *cell block* em cortes mais representativos da amostra no *cell block*.

Para a análise comparativa da celularidade nos dois métodos de preparo (citocentrifugação e *cell block*), foram incluídas cinco amostras com maior celularidade. Nas amostras preparadas por ambos os métodos, o número de células foi obtido pela contagem em 10 campos de maior celularidade no aumento microscópico de 400x.

Para a análise comparativa da expressão de PANCK nos dois métodos de preparo (citocentrifugação e *cell block*), nas amostras com resultado positivo para carcinoma utilizou-se cortes do *cell block* e uma das lâminas preparadas por citocentrifugação, que foi descorada.

#### 4.5 ANÁLISE DO ESCORE DE POSITIVIDADE DOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS, DE TIPO HISTOLÓGICO E DE SÍTIO PRIMÁRIO EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS DE 2019 A 2021

Para esta análise, os marcadores foram divididos em de diagnóstico para carcinoma (PANCK, CK7, MOC-31 e claudin-4), de sítio primário (TTF-1 e GATA-3), de tipo histológico (p63 e CD138) e de malignidade (p16). A marca, o clone, a diluição, o controle e o padrão de marcação estão dispostos na **Tabela 1** A técnica da imunocitoquímica está descrita no **Apêndice C**.

Tabela 1 Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica

Anticorpo	Marca do anticorpo	Clone	Diluição	Controle	Padrão
PANCK	DAKO	MNF116	1:100	Pele	C + M
CK7	CELL MARQUE	307M95	1:200	Mama	C + M
Antígeno relacionado a epitélio	DAKO	MOC-31	1:100	Carcinoma Gástrico	C + M
Claudin-4	NOVEX	AB15104	1:200	Carcinoma Gástrico	C + M
TTF1	DAKO	8G7G3/1	1:50	Tireoide	N
GATA-3	CELL MARQUE	L50-823	1:300	Mama	N
p63	Ventana	4A4	1:50	Mama	N
CD138	CELL MARQUE	EP201	1:100	Amígdala	C + M
p16	Ventana	E6H4	1:600	Carcinoma colo útero	C + M

O escore de positividade para os marcadores de membrana e citoplasmáticos, PANCK, CK7, MOC-31 e claudin-4, foi calculado pelo produto de um escore de proporção e um escore de intensidade com escore total variando de 0 a 12 com apenas nove valores possíveis (ou seja, 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 e 12), conforme **Tabela 2** abaixo. Por este sistema de pontuação, quatro subgrupos de escore foram definidos: sem expressão, escore 0; expressão fraca, escores 1 - 4; expressão moderada, escores 6 e 8; expressão intensa, escores 9 e 12. 'Superexpressão' foi definida para escores > 4 (expressão moderada e intensa) (33).

Tabela 2 Escore de positividade para marcadores imunocitoquímicos de membrana e citoplasmáticos

<b>Escore de proporção</b>	<b>Escore de intensidade</b>
1 = <10% das células	0 = sem marcação
2 = 10-50% das células	1 = marcação fraca
3 = 51-80% das células	2 = marcação moderada
4 = > 80% das células	3 = marcação intensa

O escore de positividade utilizado para os marcadores nucleares p63, TTF1 e GATA3 foi "quick score" (60), que é calculado pela soma de um escore de proporção com um escore de intensidade. O escore máximo é de 8, conforme **Tabela 3** abaixo

Tabela 3 Escore de positividade para marcadores imunocitoquímicos nucleares

<b>Escore de proporção</b>	<b>Escore de intensidade</b>
0 = sem marcação nuclear	0 = sem marcação
1 = <1% de marcação nuclear	1 = marcação fraca
2 = 1-10% de marcação nuclear	2 = marcação moderada
3 = 11-33% de marcação nuclear	3 = marcação intensa
4 = 34 a 66% de marcação nuclear	
5 = 67-100% de marcação nuclear	

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, San Diego, CA) foi utilizado nas análises estatísticas considerando-se o nível de significância de  $p < 0,05$ . Nas análises de variáveis categóricas, utilizou-se o teste de Fisher para a comparação de frequências e o teste Kappa para avaliação de concordância entre os métodos de preparo quanto aos resultados dos exames, considerando-se Kappa  $< 0$ : nenhuma concordância, Kappa entre 0 e 0,2: concordância discreta, Kappa entre 0,21 e 0,40: concordância baixa, Kappa entre 0,41 e 0,60: concordância moderada, Kappa entre 0,61 e 0,80: concordância substancial e Kappa entre 0,81 e 1,00: concordância quase perfeita. Nas análises de variáveis contínuas, utilizou-se o teste de Mann Whitney para comparação das medianas dos números de células obtidas nos dois métodos de preparo, e o teste Kruskal Wallis para comparação das medianas dos escores de positividade entre os marcadores.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FACULDADE DE SAÚDE - CEP-FS, CAAE: 51228315.20000.0030, conforme documento em **Anexo A** e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal - CEP-IGESDF, CAAE: 29649120.0.0000.8153 conforme documento em **Anexo B**. O termo de consentimento informado e esclarecido está no **Anexo C**.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA ANÁLISE CITOPATOLÓGICA NOS ANOS 2013 A 2021

Os diagnósticos clínicos/histopatológicos de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021 estão dispostos nas **Tabelas 4 e 5**. Na maioria das requisições de amostras de LCR ou em prontuário médico dos respectivos pacientes constava o diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia, 51,3% (312/608). Dentre os diagnósticos clínico/histopatológicos de neoplasia, predominaram as neoplasias hematológicas, 44,9% (140/312); seguidas de carcinoma, 27,88% (87/312); e de neoplasias do sistema nervoso central (SNC), 25,3% (79/312). As neoplasias hematológicas mais comuns foram os linfomas não Hodgkin, 58,6% (82/140) seguidos das leucemias, 35,0% (49/140). As neoplasias de SNC mais comuns foram as neoplasias gliais, 49,4% (39/79) e os meduloblastomas, 11,4% (9/79). As outras neoplasias encontradas foram melanoma, tumor de Wilms, lipossarcoma renal, tumor maligno de nervo periférico, neoplasia pouco diferenciada da mucosa jugal e neoplasia maligna de amígdala sem outras especificações (SOE).

Os diagnósticos clínicos de doenças não neoplásicas mais frequentes foram tuberculose (9,1%), criptococose (7,8%) e sífilis (6,5%).

Do total de amostras, 13,3% (81/608) foram enviadas sem diagnóstico clínico definido, ou seja, não havia hipótese clínica definida ou várias hipóteses diagnósticas eram consideradas.

Tabela 4 Frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021

<b>Diagnósticos clínicos</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
Neoplásicos	312	51,3
Não Neoplásicos	215	35,4
Indefinidos	81	13,3
<b>Total</b>	<b>608</b>	<b>100</b>

Tabela 5 Frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos de neoplasia de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021

<b>Diagnósticos clínicos</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
Neoplasias Hematológicas	140	44,9
Carcinomas	87	27,9
Neoplasias do SNC	79	25,3
Outras neoplasias	6	1,9
<b>Total</b>	<b>312</b>	<b>100</b>

### **5.1.1 Sítios Primários De Carcinoma De Pacientes Com Amostras De LCR Enviadas Para Análise Citopatológica De Acordo Com O Gênero**

A frequência dos sítios primários de carcinomas de pacientes com amostra de LCR enviada para o laboratório de Anatomia Patológica está disposta na **Tabela 6**. A maioria das amostras com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma era de mulheres, 80,5% (70/87). Do total de carcinomas, a maioria é de origem em mama 54,0% (47/87). Em mulheres, os sítios primários mais frequentes foram mama, 67,1% (47/70); pulmão, 10,0% (7/70); colo do útero, 10,0% (7/70); ovário, 7,1% (5/70); e, em homens, pulmão, 23,5% (4/17); próstata, 17,6% (3/17); cólon, 11,7% (2/17); e estômago, 11,7% (2/17). Em 3,4% dos carcinomas os sítios primários não estavam esclarecidos, sendo que um dos pacientes possuía carcinoma de laringe e próstata, e dois outros pacientes, carcinomas de sítio primário desconhecido.

Tabela 6 Frequência dos sítios primários de carcinomas de pacientes com amostras de LCR enviadas para análise citopatológica nos anos 2013 a 2021, de acordo com o gênero

Sítio primário	homens	mulheres	Total
Mama	0	47	47
Pulmão	4	7	11
Colo do útero	0	7	7
Ovário	0	5	5
Próstata	3	0	3
Cólon	2	1	3
Estômago	2	1	3
Nasofaringe	1	0	1
Pâncreas	1	0	1
Bexiga	1	0	1
Tireoide	1	0	1
Glândula salivar	1	0	1
Indefinido	1	2	3
Total	17	70	87

## 5.2 RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE LCR, PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO OU *CELL BLOCK* NOS ANOS DE 2013 A 2021.

Do total de amostras, em 5,9% (36/608) obteve-se resultado suspeito/positivo para malignidade na análise citopatológica (**Tabela 7**). Em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia, a frequência de resultados suspeitos/positivos foi de 11,5% (36/312). A neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em LCR foi carcinoma, 61,1% (22/36) seguida de neoplasia hematológica 30,6% (11/36). A frequência de resultado positivo ou suspeito para malignidade na análise citopatológica em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma e neoplasia hematopoiética foi, respectivamente, 25,3% (22/87), e 7,9% (11/140). Apenas 1,3% (1/79) das amostras com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasias do SNC foram diagnosticadas em LCR. A

probabilidade de resultados positivos ou suspeitos para malignidade em LCR é significativamente maior quando o diagnóstico clínico/histopatológico é de carcinoma em relação a neoplasia hematopoiética (teste de Fisher,  $p=0,0014$ ).

Em todos os resultados positivos ou suspeitos, os pacientes apresentavam um o diagnóstico clínico/histopatológico definido, ou seja, hipótese clínica prévia de neoplasia.

Tabela 7 Frequência de resultados suspeitos/positivos em amostras de LCR, preparadas por citocentrifugação ou cell block, de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia maligna e neoplasia do SNC nos anos de 2013 a 2021

Diagnóstico clínico/histopatológico	Resultado da análise citopatológica		Total
	Negativo	Suspeito/positivo	
Neoplasia hematológica	129	11	140
Carcinoma	65	22	87
Neoplasia do SNC	78	1	79
Outras neoplasias	4	2	6
Total	276	36	312

### 5.2.1 Sítios Primários De Carcinomas Diagnosticados Em Amostras De LCR Preparadas Por Citocentrifugação Ou *Cell Block*.

A maioria dos carcinomas diagnosticados em LCR são de pacientes do sexo feminino, correspondendo a 80,4% (70/87) dos pacientes. A frequência de resultados suspeitos/positivos em amostras de LCR, de pacientes com diagnóstico clínico de carcinoma conforme o sítio primário está disposta na **Tabela 8**. Os carcinomas mais frequentemente diagnosticados em LCR, são de sítio primário em mama 59,1% (13/22) seguidos dos de pulmão, 18,2% (4/22), colo do útero, 9,1% (2/22), e ovário, 9,1% (2/22). A probabilidade de resultado positivo/suspeito para malignidade em LCR é maior em pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma de pulmão

36,4% (4/11), em relação ao carcinoma mama 27,6% (13/47), mas esta diferença não foi significativa.

Tabela 8 Frequência de resultados suspeitos/positivos em amostras de LCR, preparadas por citocentrifugação ou cell block, de pacientes com diagnóstico clínico de carcinoma conforme o sítio primário nos anos de 2013 a 2021

Sítio primário do carcinoma	Resultado da análise citopatológica		Total
	Negativo	Suspeito/positivo	
Mama	34	13	47
Pulmão	7	4	11
Colo do útero	5	2	7
Ovário	3	2	5
Cólon	3	0	3
Estômago	2	1	3
Próstata	3	0	3
Pâncreas	1	0	1
Nasofaringe	1	0	1
Bexiga	1	0	1
Tireoide	1	0	1
Glândula salivar	1	0	1
Indefinido	3	0	3
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>22</b>	<b>87</b>

### 5.3 ANÁLISE COMPARATIVA E DE CONCORDÂNCIA ENTRE CITOCENTRIFUGAÇÃO E CELL BLOCK EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS DE 2019 A 2021

Para esta análise de concordância e comparativa entre citocentrifugação e cell block foram selecionadas 75 amostras enviadas de 2019 a 2021 cujos diagnósticos clínicos/histopatológicos dos pacientes estão dispostos na **Tabela 9**. As neoplasias foram os diagnósticos clínicos/histopatológicos que predominaram 46,6% (35/75) nas

requisições de amostras de LCR ou em prontuário médico dos respectivos pacientes. Dentre os diagnósticos clínico/histopatológicos de neoplasia, os mais frequentes foram os de neoplasias hematológicas, 51,4% (18/35); seguidas de carcinoma, 48,6% (17/35).

Tabela 9 Frequência de diagnósticos clínicos/histopatológicos de pacientes cujas amostras foram enviadas para análise citopatológica por citocentrifugação e cell block nos anos de 2019 a 2021

<b>Diagnósticos clínicos</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
Não neoplásicos	26	34,7
Neoplasias Hematológicas	18	24
Carcinomas	17	22,7
Indefinidos	13	17,3
Total	75	100

### **5.3.1 Concordância Entre Citocentrifugação E *Cell Block* Em Relação Aos Resultados Da Análise Citopatológica De Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021.**

Do total de amostras, em 9,3% (7/75) obteve-se resultado suspeito/positivo para malignidade na análise citopatológica (**Tabela 10**). Em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia, a frequência de resultados suspeitos/positivos foi de 20,0% (7/35). A neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em LCR foi carcinoma, 71,4% (5/7) seguida de neoplasia hematológica 28,6% (2/7). Nas amostras com resultado suspeito/positivo, os tipos histológicos foram carcinoma epidermoide de colo (n=3), adenocarcinoma de mama (n=1), adenocarcinoma de pulmão (n=1), leucemia linfocítica crônica (n=1) e plasmocitoma (n=1).

Houve concordância nos resultados citopatológicos entre as amostras preparadas por citocentrifugação e *cell block* em 97,3% (73/75) (Kappa= 0,84) de

acordo com os dados da **Tabela 10**. Com relação aos casos discordantes, em 1,3% (1/75), o resultado foi positivo/suspeito para malignidade na amostra preparada por citocentrifugação, mas negativo no *cell block* e em 1,3% (1/75), o resultado foi positivo/suspeito para malignidade no *cell block* mas negativo na amostra preparada por citocentrifugação. O *cell block* aumentou em 16,7% (1/6) a sensibilidade do exame citopatológico quando adicionado à citocentrifugação.

Tabela 10 Frequência de resultados da análise citopatológica concordantes e discordantes em amostras citológicas preparadas por citocentrifugado e cell block nos anos de 2019 a 2021

Citocentrifugação	Cell Block		Total
	Negativo	Suspeito/positivo	
Negativo	68	1	69
Suspeito/positivo	1	5	6
Total	69	6	75

### 5.3.2 Comparação Entre Citocentrifugação E *Cell Block* Em Relação À Celularidade, À Morfologia E Ao Padrão De Marcação Imunocitoquímica E Escore De Positividade Para PANCK Em Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021

Em ambos os métodos de preparação, por citocentrifugação e *cell block*, a maioria, 64,0% (48/75) das amostras foi acelular, inclusive aquelas com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia. Para análise comparativa da celularidade entre os métodos, foram selecionadas as cinco amostras de maior celularidade, quatro com diagnóstico de neoplasia (três carcinomas e um plasmocitoma) e uma com diagnóstico negativo para células neoplásicas, contendo apenas células inflamatórias (**Tabela 11**). Nas amostras com maior celularidade, e considerando-se os 10 campos de maior celularidade para ambos os métodos de preparo, citocentrifugação e *cell block*, a média (dp) do número de células foi, respectivamente, 1361 (2473,87) e 584 (775,98)

e a me-diana do número de células, respectivamente, 235 (17-5770) e 380 (11-1893), e não houve diferença estatisticamente significativa na mediana do número de células.

Tabela 11 Contagem de células no material citocentrifugado e no cell block de amostras de LCR com carcinoma, plasmocitoma e células inflamatórias

Diagnóstico citopatológico	Número de Células	
	Citocentrifugação	Cell block
Adenocarcinoma pulmão	17	11
Carcinoma de colo útero	176	15
Encefalite herpética	235	380
Plasmocitoma	611	621
Carcinoma colo útero	5770	1893

Na **Figura 5**, estão representadas duas das amostras usadas nesta análise de comparação da celularidade: uma amostra de carcinoma de colo de útero e uma amostra de plasmocitoma.

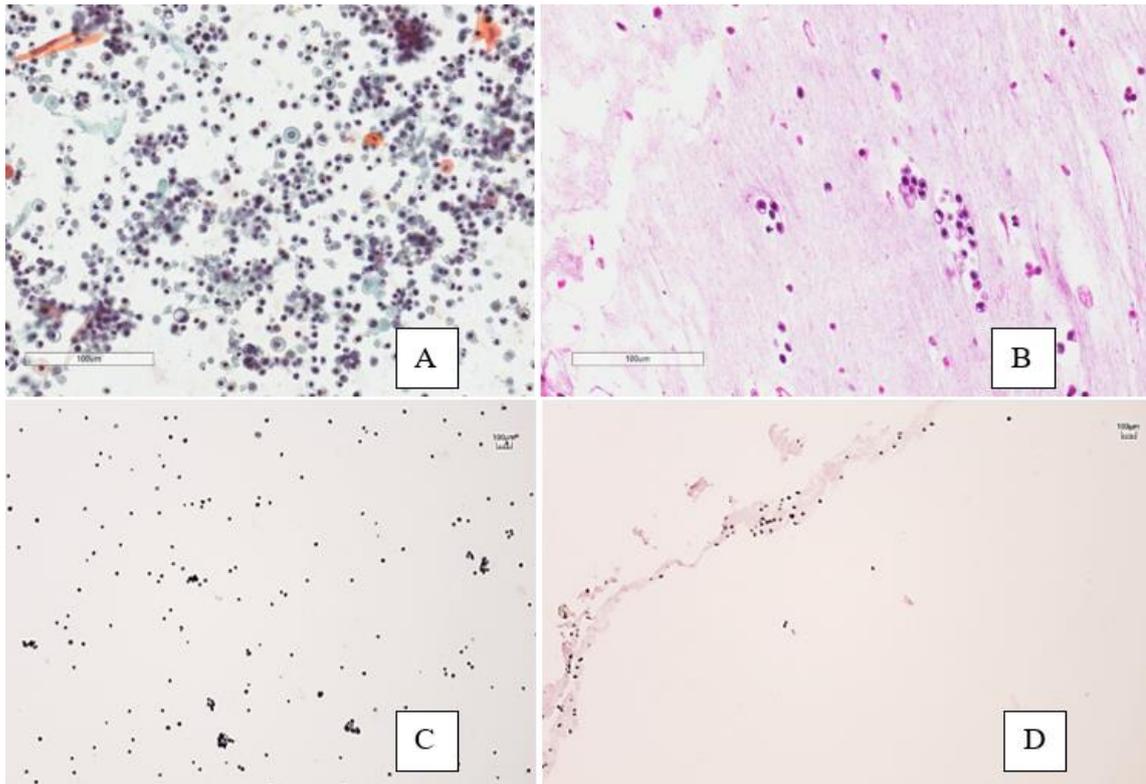


Figura 5 Citologia de amostra de LCR com carcinoma escamoso de colo de útero (A e B) 100x, e com plasmocitoma (C e D) 40x. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou. B, cell block, coloração HE.

Com relação à morfologia, em ambos os métodos de preparo, por citocentrifugação e em *cell block*, as células de carcinoma se apresentaram predominantemente isoladas e com atipias pouco evidentes (cariomegalia discreta e alta relação núcleo/citoplasma). Nas amostras preparadas em *cell block*, as células apresentaram artefatos de retração e contorno nuclear irregular se comparadas com as células nas amostras preparadas por citocentrifugação (**Figuras 6 e 7**).

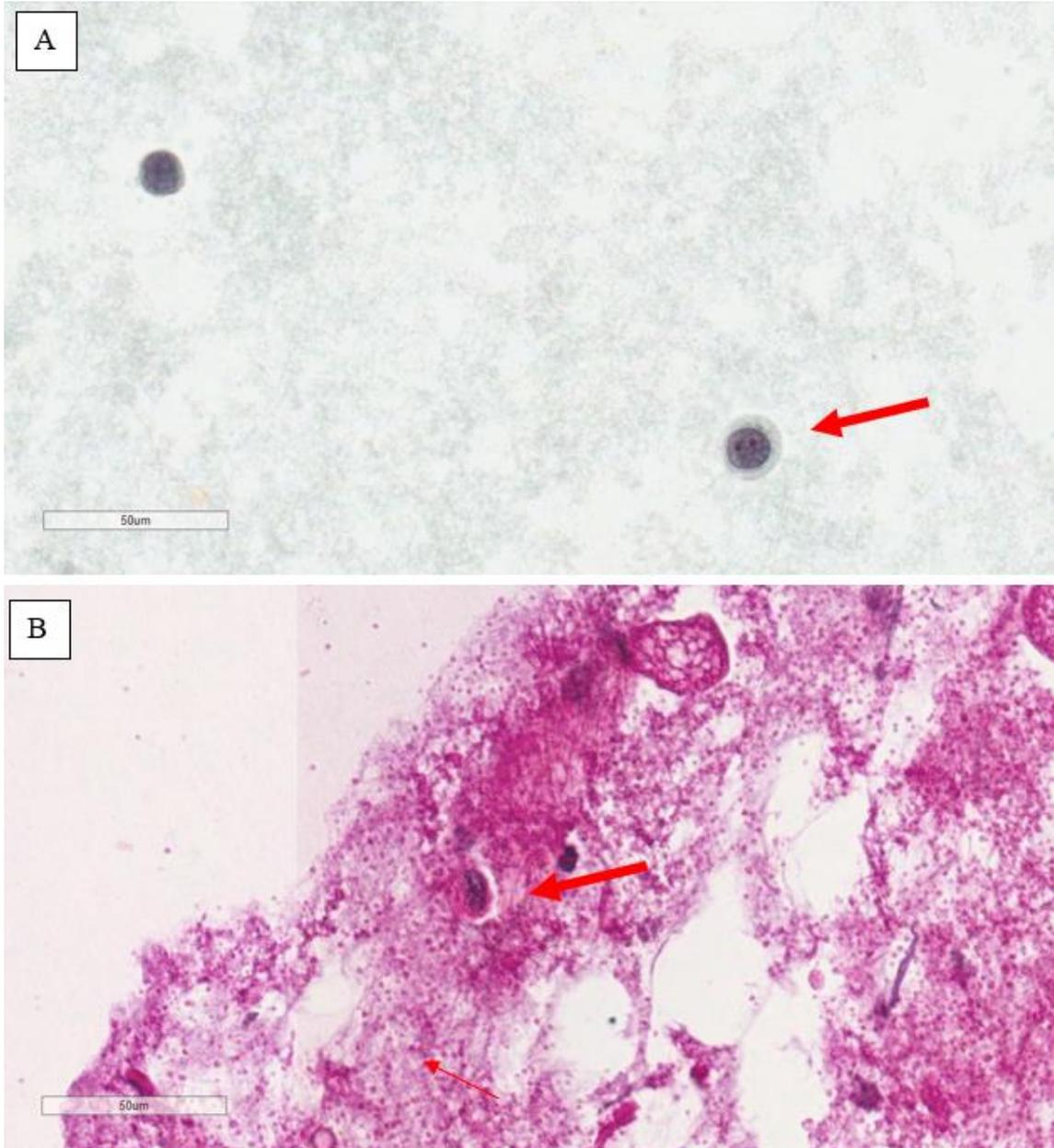


Figura 6 Citologia de amostra de LCR com células isoladas e com atipias pouco evidentes (seta) de adenocarcinoma de pulmão. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou.400x B, cell block, coloração HE. 400x.

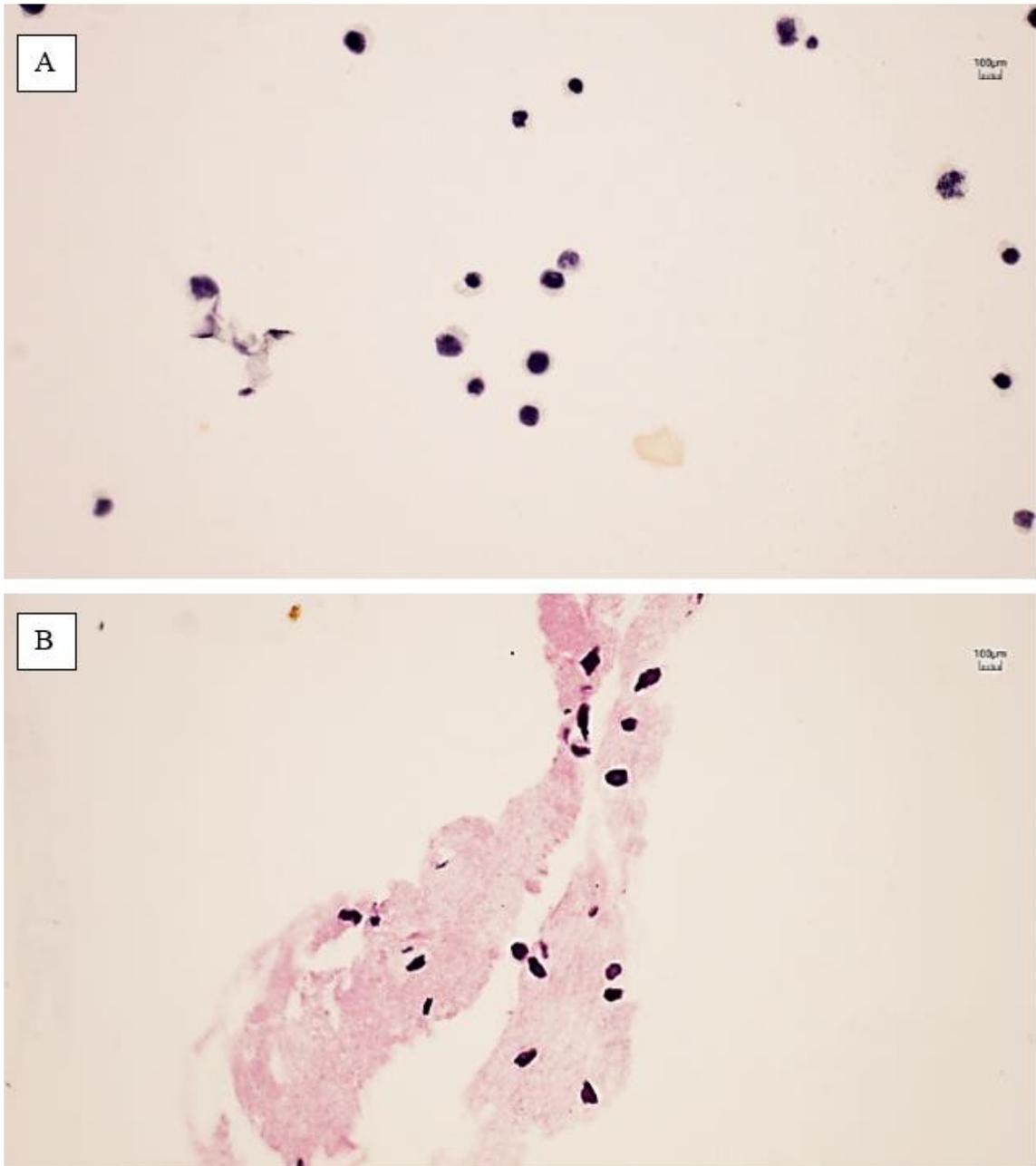


Figura 7 Citologia de amostra de LCR de Plasmocitoma. Em A, preparação por citocentrifugação, coloração Papanicolaou, células isoladas e arredondadas.100x. Em B, cell block, coloração HE, células isoladas, com artefatos de retração e contorno nuclear irregular.

Células alongadas e com queratinização, de carcinoma escamoso, foram identificadas nos dois métodos de preparação (centrifugação e cell block), mas se realçaram na amostra preparada por citocentrifugação devido à queratinização que se torna mais evidente na coloração pelo método de Papanicolaou (**Figura 8**).

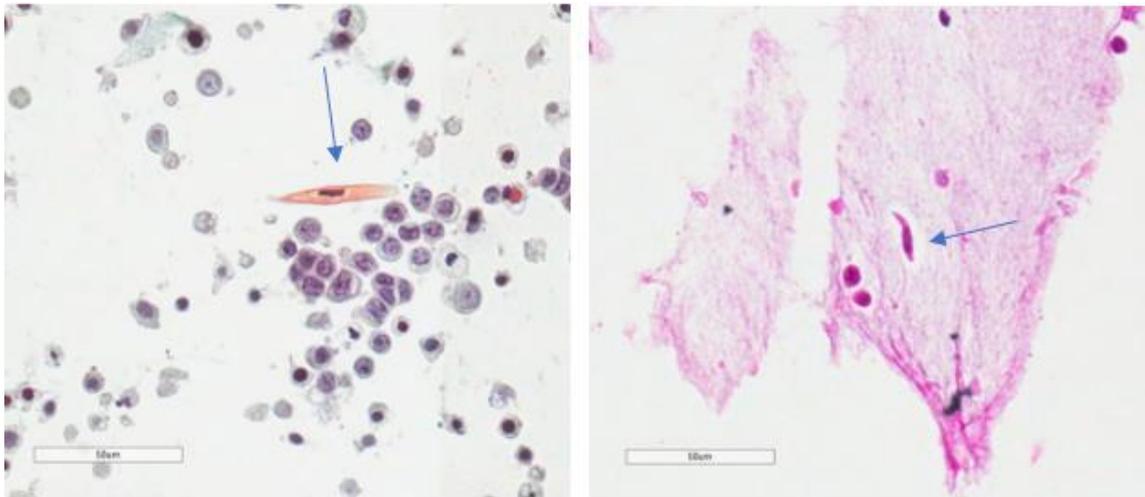


Figura 8 Citologia de amostra de LCR com carcinoma escamoso de colo. A, preparação por citocentrifugação, coloração pelo método de Papanicolaou; 400x. B, cell block, coloração HE (B); 400x.

Em amostras de LCR preparadas por *cell block* e com adenocarcinomas não houve diferenças com relação ao aspecto morfológico entre os diferentes sítio primários. Independentemente do sítio primário, as células se dispõem isoladamente ou em agrupamentos pequenos e com pouca coesão, com atipias nucleares discretas e citoplasma denso sem acúmulo de muco evidente (**Figura 9**).

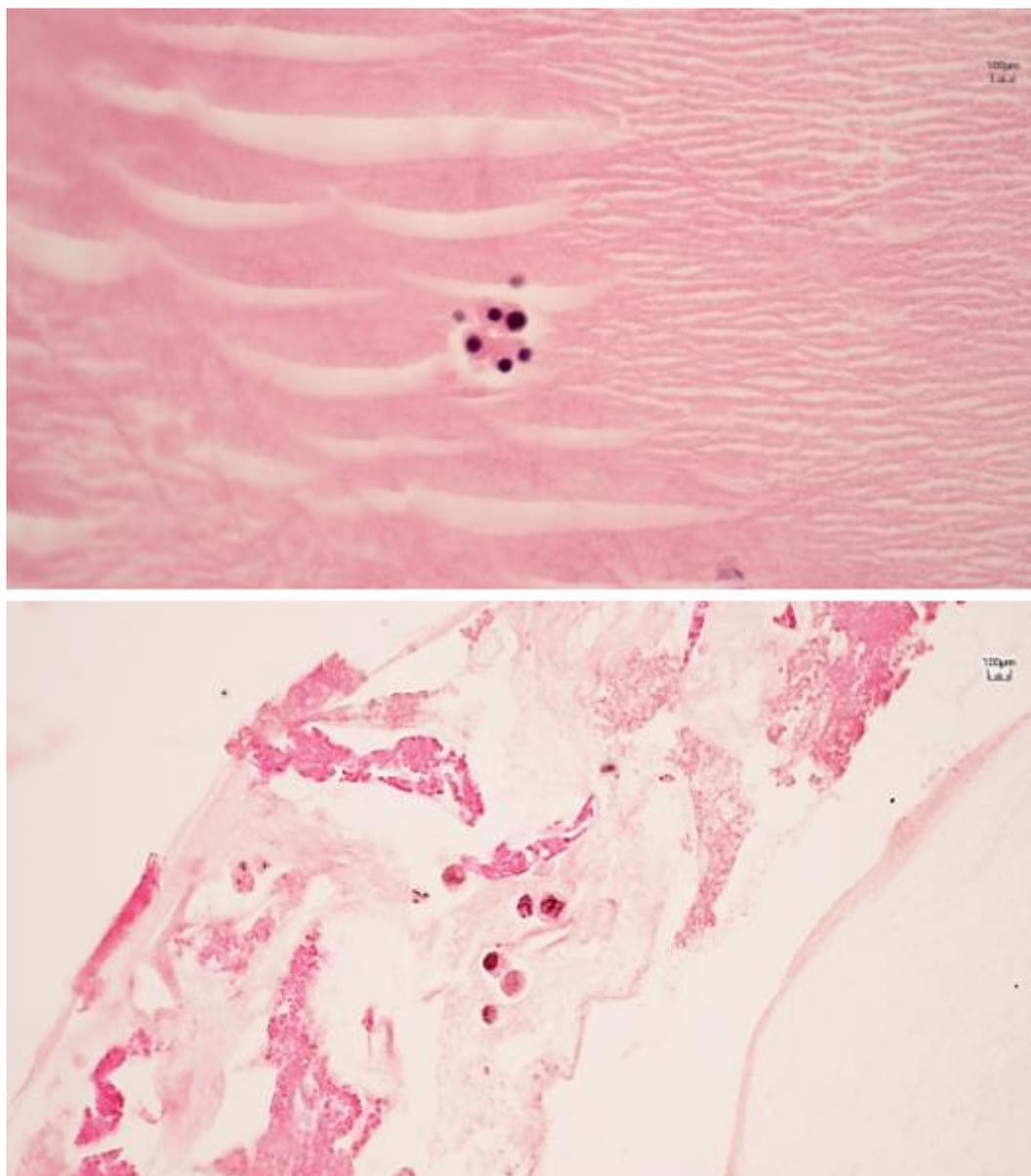


Figura 9 Citologia de amostra de LCR com adenocarcinoma de pulmão, figura A; e com carcinoma de ovário, figura B. Cell blocks, coloração HE, 400x.

Com relação à distribuição celular, nos cortes do *cell block*, a distribuição das células é mais irregular em relação às amostradas preparadas por citocentrifugação devido à formação de áreas de maior concentração de células no *cell block* (**Figura 10**).

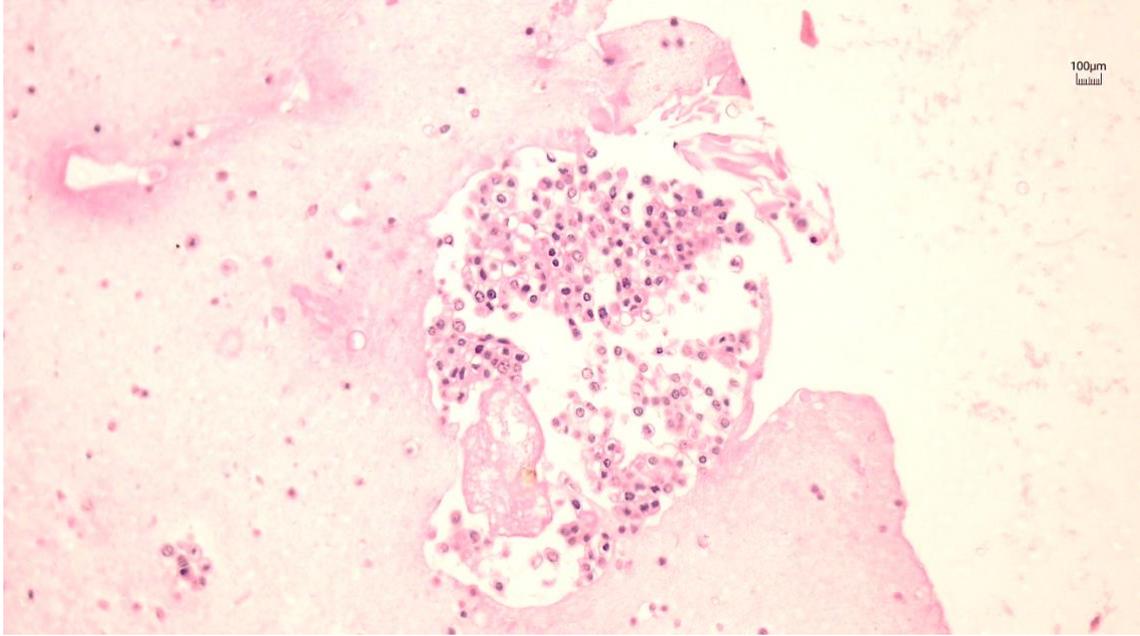


Figura 10 Concentração de células em amostra de LCR com carcinoma de colo de útero; cell block, coloração HE, 200x.

Quanto ao padrão de marcação imunocitoquímica para PANCK, em ambos os métodos de preparação, observou-se o padrão de marcação esperado, de membrana e citoplasmático. Contudo, a marcação citoplasmática de PANCK foi mais evidente no *cell block* (**Figura 11**).

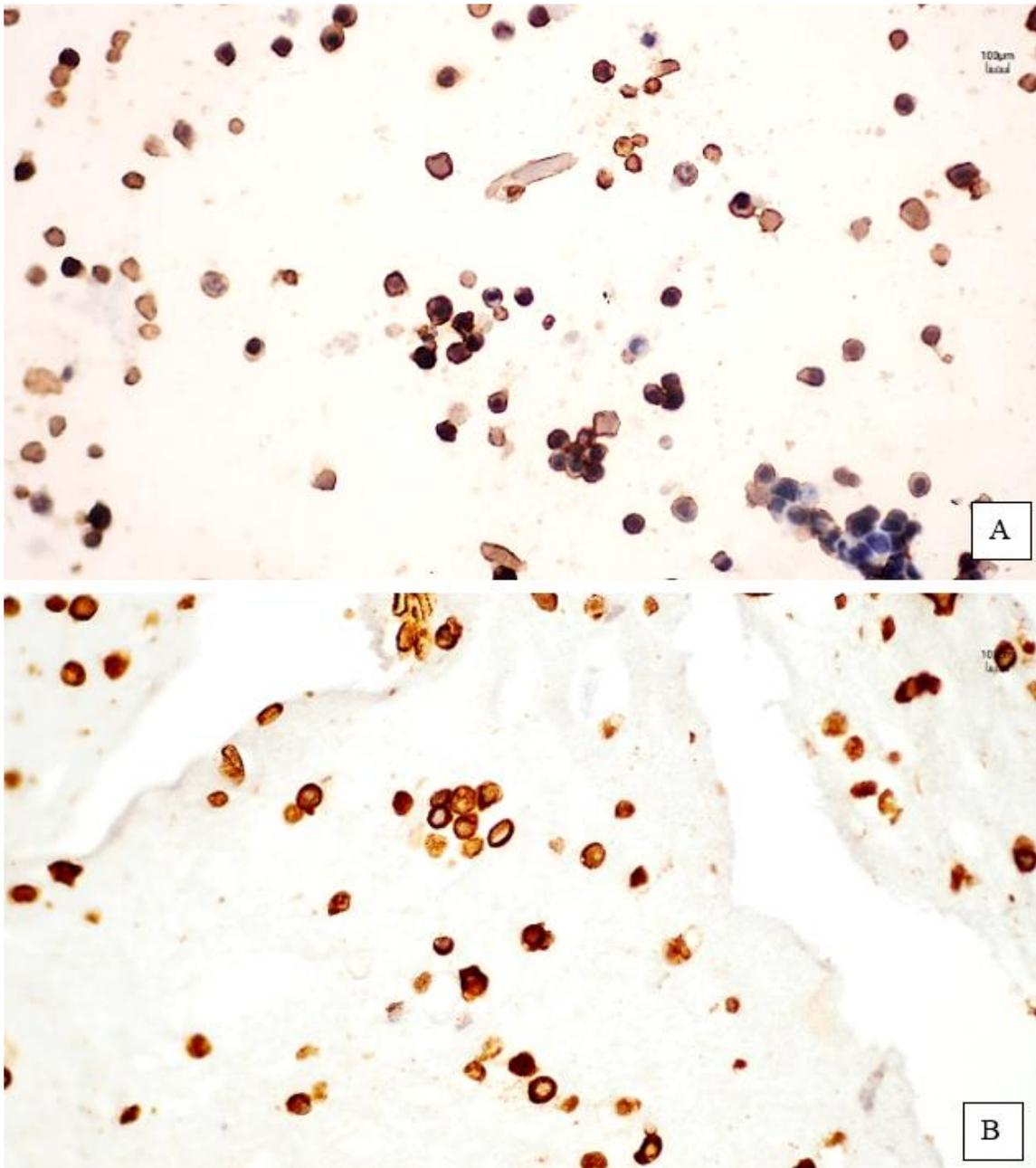


Figura 11 Imunocitoquímica para PANCK em amostra de LCR preparada por citocentrifugação (A) e em cell block (B) com escore de positividade total de 12 em ambos os métodos; 200x.

#### 5.4 ANÁLISE DO ESCORE DE POSITIVIDADE PARA MARCADORES DIAGNÓSTICOS PANCK, MOC-31, CK-7 E CLAUDIN-4 EM AMOSTRAS DE *CELL BLOCK* DE LCR

#### 5.4.1 Comparação Do Escore De Positividade Dos Marcadores Diagnósticos Para Carcinoma (PANCK, MOC-31, CK-7 E Claudin-4) Em Amostras De LCR Preparadas Por *Cell Block*

Os escores de positividade total, de proporção e intensidade para os marcadores diagnósticos PANCK, MOC-31, CK-7 e Claudin-4 em amostras de adenocarcinoma de sítio primário em mama, pulmão e ovário e preparadas por *cell block* estão dispostos na **Tabela 12**. As médias (dp) dos escores de positividade total foram 10,4 (2,19), 11,4 (1,34) e 9 (4,24) e as medianas 12 (8,12), 12 (9,12), 9 (4-12), respectivamente para os marcadores PANCK, MOC-31 e CK-7. Nas duas amostras de Claudin-4 houve superexpressão do marcador. Esses resultados indicam superexpressão de todos os marcadores, e não houve diferença significativa entre as medianas. A expressão dos marcadores diagnósticos foi ilustrada na **Figura 12**.

Tabela 12 Escores de proporção, intensidade e total da expressão de PANCK, MOC-31, CK7 e Claudin-4 em amostras de LCR com carcinoma, preparadas por cell block

Pan-CK				MOC-31			
AMOSTRA	Proporção	Intensidade	Total	ANOSTRA	Proporção	Intensidade	Total
1	4	4	12	1	4	3	12
2	4	3	12	2	4	3	12
3	4	3	12	3	3	3	9
4	4	2	8	4	4	3	12
5	4	3	12	5	4	3	12
6	4	2	8				
7	4	3	12				
8	4	3	12				
9	4	3	12				
Claudin-4				CK7			
AMOSTRAS	Proporção	Intensidade	Total	AMOSTRA	Proporção	Intensidade	Total
1	3	2	6	1	4	3	12
2	4	3	12	2	2	2	4
				3	4	3	12
				4	4	2	8
				5	3	3	9

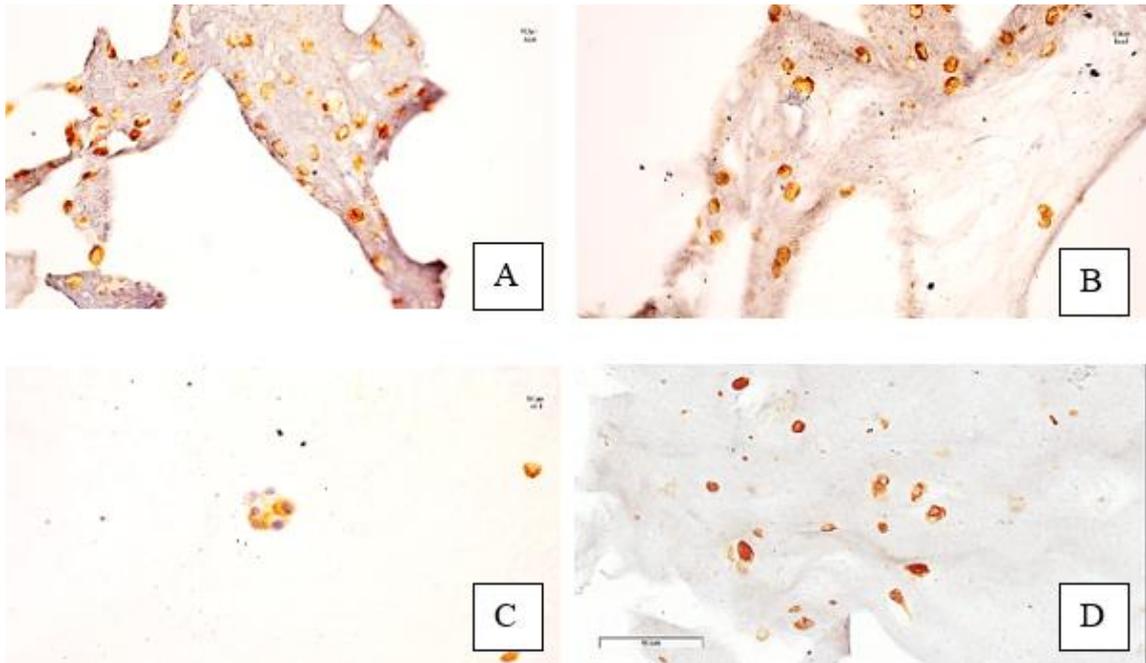


Figura 12 Imunocitoquímica para diferentes marcadores diagnósticos em amostra de LCR com carcinoma de diferentes sítios primários. A, mama Claudin-4 (escore total 12), 200x; B, mama, MOC-31 (escore total 12), 200x; C, pulmão, CK-7 (escore total 12), 400x; D, ovário, PANCK (escore total 12), 200x.

#### 5.4.2 Expressão De Marcadores De Sítio Primário, De Tipo Histológico E De Malignidade Em Amostras Preparadas Por *Cell Block*

Nas **Figuras 13 e 14** estão ilustradas as expressões com os respectivos escores de positividade total de marcadores de tipo histológico (p63), de malignidade (p16) e de sítio primário (TTF-1 e GATA3), usados para carcinomas, e marcador para plasmocitoma (CD138).

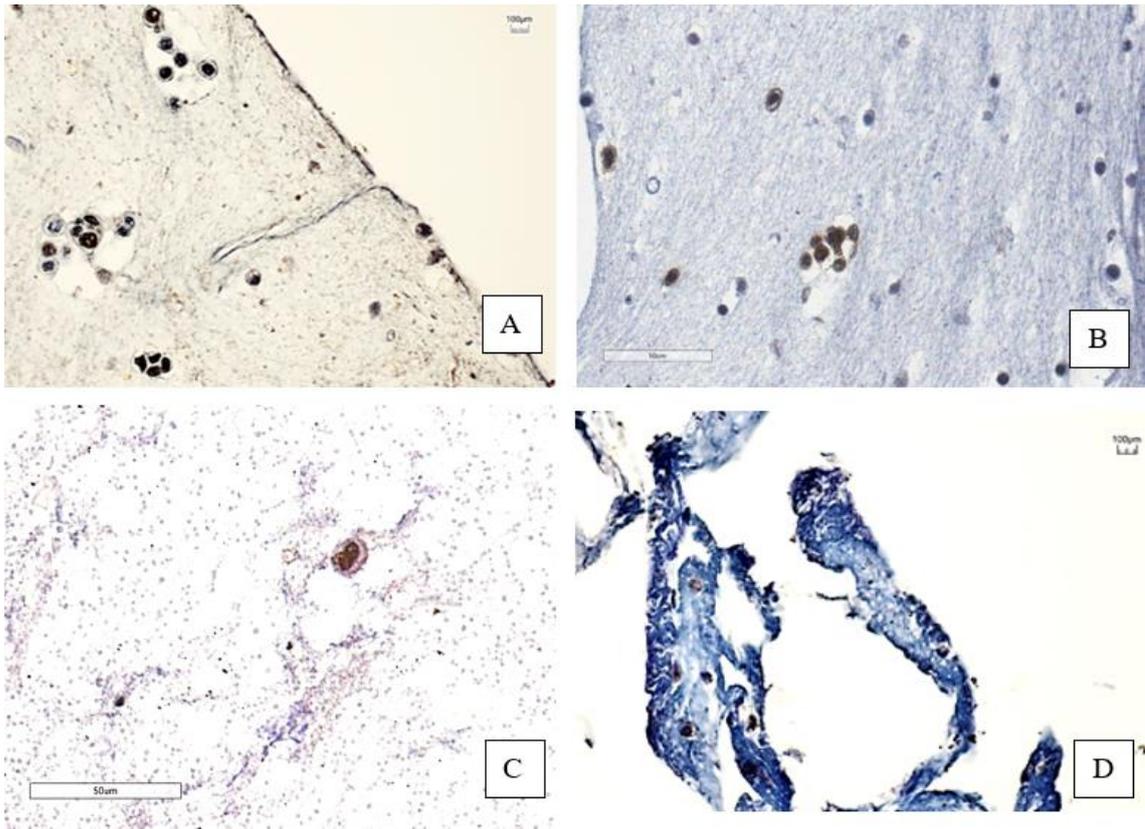


Figura 13 Imunocitoquímica de marcadores em carcinoma escamoso de colo de útero em A, p63 (escore total 8); e em B, p16 (escore total 8); adenocarcinoma de pulmão em C, TTF-1 (escore total 8); carcinoma de mama em D, GATA-3 (escore total 5).

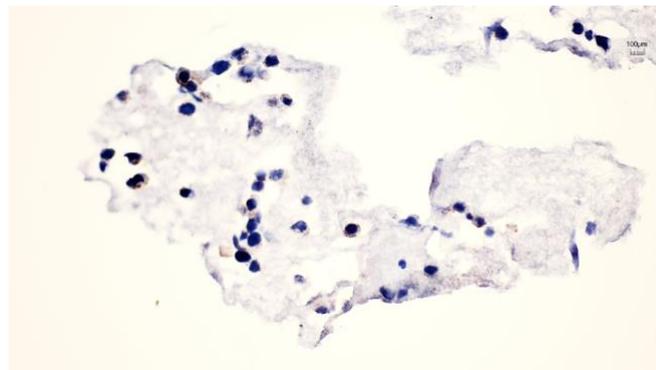


Figura 14 Imunocitoquímica do marcador CD138, plasmocitoma (escore total 3).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS/HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS PARA ANÁLISE CITOPATOLÓGICA NOS ANOS 2013 A 2021

A análise da frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos prévios ou atuais, ou seja, das hipóteses clínicas que constam nas requisições dos exames enviados para a análise citopatológica é importante para que o laboratório de Anatomia Patológica esteja preparado para atender a demanda de material de consumo e de equipamentos para a realização das técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas. Esta frequência pode estar sujeita a variações a depender do tipo de hospital em que a pesquisa é realizada. Em hospitais oncológicos, por exemplo, espera-se uma maior frequência de hipóteses diagnósticas de neoplasia, enquanto em hospitais especializados em doenças infecto-parasitárias as hipóteses mais prováveis são de doenças deste tipo. No presente estudo, as amostras foram obtidas em hospitais de ensino, os quais, geralmente, prestam atendimento em diferentes especialidades médicas, e, conseqüentemente, espera-se que sejam realizados diagnósticos de diferentes tipos de doença.

A análise da frequência dos diagnósticos clínicos/histopatológicos mostrou que a maioria (51,3%) das amostras de LCR são encaminhadas para o laboratório de Anatomia Patológica com hipótese diagnóstica de neoplasia. Nas requisições de exame com hipótese de neoplasia é muito comum a designação do exame como citologia oncótica. Dentre os diagnósticos clínicos/histopatológicos de neoplasia, predominaram as neoplasias metastáticas extracranianas, de origem hematológica (44,9%) e carcinoma (27,9%), enquanto as neoplasias do sistema SNC corresponderam a 25,3% das neoplasias. As neoplasias hematológicas eram predominantemente do tipo linfoma não-Hodgkin (58,6%) e leucemias (35,0%) e as do SNC, do tipo neoplasias gliais (49,4%) e meduloblastomas (11,4%). Constatou-se ainda, hipóteses diagnósticas de neoplasias com elevada capacidade de disseminação sanguínea, como melanoma, sarcomas e neoplasias pouco

diferenciadas. Esta análise de frequência das hipóteses clínicas das neoplasias é fundamental pois indica que os marcadores imunocitoquímicos mais aplicados seriam os marcadores epiteliais e de linfoma não-Hodgkin.

Dentre os diagnósticos clínicos/histopatológicos não neoplásicos predominaram os de doenças inflamatórias de origem infecciosa, principalmente as bacterianas (tuberculose e sífilis) e fúngicas (criptococose). A citologia do LCR no diagnóstico destas infecções é de sensibilidade baixa se comparada com outros métodos diagnósticos moleculares aplicados em laboratórios de análises clínicas para identificação do agente etiológico no LCR (32). Dessa forma, muitas vezes, a citologia do LCR é solicitada, em um provável quadro de infecção, para descartar neoplasia e não com o objetivo de diagnosticar a etiologia da infecção. Muitos dos diagnósticos clínicos/histopatológicos indefinidos nas requisições de citologia se devem a estas situações em que não se sabe se trata-se de doença infecciosa ou neoplásica. Na análise da citologia de LCR com hipótese de doenças infecciosas, além do achado de número elevado de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos, o que depende do agente infeccioso, o próprio microorganismo pode ser identificado com colorações especiais para BAAR e fungos (10) (32), as quais devem estar disponíveis no laboratório.

Estudos relatam alta frequência de infecções meníngeas principalmente em pacientes imunossuprimidos (32) (61) (62). Apesar das infecções bacterianas terem predominado nos diagnósticos clínicos levantados neste estudo, a criptococose é a mais diagnosticada por exame citopatológico (10) (32) (61).

### **6.1.1 Sítios Primários De Carcinoma De Pacientes Com Amostras De LCR Enviadas Para Análise Citopatológica De Acordo Com O Gênero**

A maioria das amostras de LCR com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma (80,5%) era de mulheres. A elevada frequência de diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma em requisição de exame citopatológico de LCR de mulheres se explica porque a maioria (54,0%) dos carcinomas era de origem em mama, o que ocorre de acordo com dados da literatura (5) (63) (64) (65). Nas requisições de exame citopatológico de LCR de mulheres com carcinoma, os sítios primários mais frequentes foram mama, 67,1%; pulmão, 10,0%; colo de útero, 10,0%;

ovário, 7,1%; cólon e estômago, 1,4%; e, nas de homens, pulmão, 23,5% ; próstata, 17,6%; cólon e estômago, 11,7%. Essa análise da frequência dos sítios primários de carcinomas é de extrema relevância já que os marcadores imunocitoquímicos para identificação destes sítios são diferentes. Pode-se concluir, com os resultados do presente estudo que os marcadores de sítio primário para mama e pulmão seriam os de maior demanda quando se trata de carcinoma em LCR e, portanto, estes devem estar disponíveis em maior quantidade, em relação aos outros marcadores de sítio primário.

## 6.2 RESULTADOS CITOPATOLÓGICOS EM AMOSTRAS DE LCR, PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO OU *CELL BLOCK* NOS ANOS DE 2013 A 2021

Com relação aos resultados dos exames citopatológicos, o resultado foi suspeito/positivo em 5,9% do total de amostras. A maioria (61,1%) das neoplasias malignas diagnosticadas em LCR foram do tipo carcinoma, seguido de neoplasia hematológica, 30,6%. A frequência de resultado positivo ou suspeito para malignidade na análise citopatológica em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma e neoplasia hematológica foi, respectivamente, 25,3%, e 7,9%. Esse resultado indica que a probabilidade de resultados positivos ou suspeitos para malignidade em LCR é significativamente maior quando o diagnóstico clínico/histopatológico é de carcinoma em relação a neoplasia hematológica. Quando o diagnóstico clínico é de neoplasia hematológica, diante da suspeita clínica de acometimento leptomeníngeo, o método diagnóstico de escolha é a imunofenotipagem por citometria de fluxo (66) (67).

A frequência dos tipos histológicos de neoplasia maligna em amostras com resultado suspeito/positivo para malignidade em citologia de LCR do presente estudo é similar à observada em estudos prévios (4) (64) (68) (69). Em amostras de efusões (líquidos pleural, peritoneal e pericárdico) com resultado suspeito/positivo para malignidade na citologia, os carcinomas metastáticos também são as neoplasias malignas mais frequentes (70) (71). Os carcinomas metastáticos para efusões

também são mais frequentes em mulheres devido ao elevado número de metástase de carcinomas de mama em líquido pleural e de ovário em líquido peritoneal (72) (73).

Deve-se destacar que, quando se trata de carcinoma, a maioria das metástases são metacrônicas, ou seja, são detectadas meses ou anos após seu surgimento no sítio primário, enquanto para linfomas/leucemias e doenças infecciosas, o acometimento das meninges é mais frequentemente sincrônico, ou seja, pode ser detectado simultaneamente ao diagnóstico destas doenças (65) (74) (75). Ressalta-se que, no presente estudo, todos os resultados dos exames citopatológicos de LCR compatíveis com carcinoma foram provenientes de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico prévio de carcinoma.

### 6.3 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA E COMPARATIVA ENTRE CITOCENTRIFUGAÇÃO E *CELL BLOCK* EM AMOSTRAS DE LCR ENVIADAS NOS ANOS 2019 A 2021

As amostras de LCR para exame citopatológico são, geralmente, preparadas por citocentrifugação na rotina diagnóstica (11). O *cell block* é um método complementar de preparo em que a amostra citológica é incluída em parafina; pode ser preparado de amostra sem sedimento e de amostras com pequena ou grande quantidade de sedimento, assim como de fragmentos de tecido presentes no líquido ou de coágulos que se formam espontaneamente na amostra (19) (76). É amplamente utilizado em amostras citológicas de efusões, lavados peritoneais e PAAF (31) (77). A imunocitoquímica pode ser aplicada em amostras preparadas por citocentrifugação e em *cell block*. Em relação às amostras preparadas por citocentrifugação, o *cell block* apresenta vantagens na aplicação da imunocitoquímica tais como facilidade de interpretação morfológica, menor relação custo-benefício, possibilidade de realização de maior número reações imunocitoquímicas e de arquivamento do bloco de parafina (22). Uma das vantagens dos preparados citológicos por citocentrifugação é a possibilidade de descorar a lâmina para realização da imunocitoquímica (11). No presente estudo, avaliou-se a possibilidade de aplicação da imunocitoquímica em lâminas obtidas de *cell block* e descoradas e observou-se tanto a expressão de

marcadores de membrana/citoplasmáticos quanto de marcadores nucleares. Esse resultado é de fundamental importância porque a lâmina corada com HE pode ser aquela com maior celularidade e, diante desses resultados, conclui-se que pode ser descorada e utilizada para imunocitoquímica.

A maioria das amostras de LCR se apresenta sem ou com pequena quantidade de sedimento, sendo o *cell block* destas amostras preparado adicionando-se ao sedimento substâncias como Histogel, ágar, albumina ou plasma com tromboplastina-trombina. Dentre estas, as mais usadas são ágar e plasma-tromboplastina-trombina (19) (22) (76). No presente estudo, optou-se pelo método com plasma-tromboplastina porque, dentre os métodos de preparação de *cell block*, este tem sido considerado de fácil execução, melhor celularidade, melhor distribuição celular e melhores resultados da imunocitoquímica. Além disso, o *cell block*, preparado pelo método plasma tromboplastina, já tem sido descrito em vários estudos prévios de efusões para aplicação da imunocitoquímica utilizando marcadores diagnósticos, de sítio primário de carcinoma, de tipo histológico e de resposta terapêutica (22) (31) (34) (76). Vale ressaltar que para o uso do método plasma-tromboplastina, a amostra não deve ser encaminhada com agente fixador tais como álcool ou formol, já que essas substâncias dificultam a formação do coágulo. Se as amostras forem encaminhadas com estes fixadores, elas devem ser lavadas com salina ou PBS (phosphate buffered saline) para não prejudicar a formação do coágulo (22).

### **6.3.1 Concordância Entre Citocentrifugação E *Cell Block* Em Relação Aos Resultados Da Análise Citopatológica De Amostras De LCR Enviadas Nos Anos De 2019 A 2021**

Para esta análise de concordância e comparativa entre citocentrifugação e *cell block* foram selecionadas 75 amostras enviadas de 2019 a 2021. As neoplasias foram os diagnósticos clínicos/histopatológicos que predominaram (46,7%) nas requisições de amostras de LCR ou em prontuário médico dos respectivos pacientes. Dentre os diagnósticos clínico/histopatológicos de neoplasia, as mais frequentes foram as neoplasias hematológicas, 51,4%; seguidas de carcinoma, 48,6%.

O resultado citopatológico foi suspeito/positivo para malignidade em 9,3% e 20,0%, respectivamente, do total de amostras e das amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia. A maioria (71,4%) das neoplasias diagnosticadas no exame citopatológico foi do tipo carcinoma seguido de neoplasias hematológicas (28,6%).

A concordância nos resultados citopatológicos entre as amostras preparadas por citocentrifugação e *cell block* foi quase perfeita (97,3%, Kappa= 0,84). A discordância entre os métodos foi decorrente da baixa celularidade das amostras que resultou em uma amostra com resultado suspeito/positivo para malignidade quando preparada por citocentrifugação, mas negativa no *cell block*; e em outra amostra com o resultado suspeito/positivo para malignidade no *cell block* mas negativa quando preparada por citocentrifugação. O aumento em 16,7% da sensibilidade do exame citológico quando o *cell block* foi adicionado à citocentrifugação, comprova sua aplicabilidade como método complementar à citocentrifugação em amostras de LCR. Em efusões, a concordância entre estes métodos de preparação já está bem estabelecida na literatura (78) (79).

### **6.3.2 Comparação Entre Citocentrifugação E *Cell Block* Em Relação À Celularidade, À Morfologia E Ao Padrão De Marcação Imunocitoquímica Para PANCK Em Amostras De LCR**

As amostras de LCR geralmente apresentam celularidade baixa devido à lise rápida das células (9) (80); daí a importância do processamento imediato da amostra de LCR para se evitar a morte celular “in vitro” (81) (82). A celularidade é, dessa forma, um aspecto crucial a ser considerado na escolha do método de preparo deste tipo de amostra citológica. No presente estudo, em ambos os métodos de preparação (por citocentrifugação e *cell block*), a maioria (64,0%) das amostras foi acelular, inclusive aquelas com diagnóstico clínico/histopatológico de neoplasia. Para a análise comparativa da celularidade entre citocentrifugação e *cell block*, quantidades iguais da amostra foram usadas para cada método e foram selecionadas as amostras de

maior celularidade. O número de células foi obtido em 10 campos microscópicos de 400X e de maior celularidade, considerando-se as duas lâminas preparadas por citocentrifugação e cortes histopatológicos mais representativos do *cell block*. A média (dp) do número de células para citocentrifugação e *cell block* foi, respectivamente, 1361 (2473,87) e 584 (775,98) e a mediana (máx-min) do número de células, respectivamente, 235 (17-5770) e 380 (11-1893), e não houve diferença estatisticamente significativa na mediana do número de células. A menor celularidade no *cell block* já era esperada porque o número total de células na parte da amostra preparada por citocentrifugação foi concentrado em duas lâminas enquanto o número total de células na parte amostra destinada para *cell block* foi distribuído ao longo do coágulo e, conseqüentemente, as células estão distribuídas nos vários cortes que podem ser obtidos do *cell block*. A análise comparativa ideal da celularidade entre os métodos seria comparar o número total de células nas duas lâminas obtidas da citocentrifugação com o número total de células em todos os cortes seriados de todo o *cell block*. Na rotina diagnóstica, para estudo imunocitoquímico em corte de *cell block* de efusões geralmente não são realizados cortes histológicos do *cell block*, apenas os cortes mais representativos são destinados para coloração e imunocitoquímica, ou seja, o procedimento realizado no presente estudo é similar ao realizado na rotina. As médias dos números de células obtidas na análise comparativa foram elevadas e não são representativas do total de amostras, as quais foram predominantemente acelulares. Este número elevado de células pode ser explicado pela escolha, para ambos os métodos de preparo, de amostras com maior número de células e de campos com maior número de células. Os elevados valores do desvio padrão 2473,87 e 775,98, indicam uma heterogeneidade no número de células entre as amostras selecionadas.

Uma das vantagens do *cell block* em relação à citocentrifugação é a possibilidade de obtenção de mais de um corte da mesma célula, considerando que os cortes apresentam espessura média de 4µm. A presença da mesma célula em mais de um corte aumenta a representatividade das células para análise imunocitoquímica.

Com relação à celularidade, independentemente do método de preparo da amostra (por citocentrifugação ou *cell block*), o número de células neoplásicas é baixo em comparação com as efusões (10) (83).

Com relação aos aspectos morfológicos das células neoplásicas malignas de carcinomas e neoplasia hematológica, em ambos os tipos de câncer, as células apresentaram atipias pouco evidentes e estavam dispostas de forma isolada ou em pequenos agrupamentos com pouca coesão celular. Estes aspectos morfológicos, principalmente para o diagnóstico de carcinoma, dificultam a diferenciação entre as células malignas e células benignas que eventualmente são encontradas nas amostras de LCR, tais como macrófagos e leucócitos (10) (12).

Nas amostras preparadas em *cell block*, as células apresentaram artefatos de retração e contorno nuclear irregular se comparadas com as células nas amostras preparadas por citocentrifugação.

Em ambos os métodos diagnósticos, foram observados aspectos morfológicos indicativos de diferenciação escamosa do carcinoma tais como células alongadas e com queratinização. Entretanto, estes aspectos foram mais evidentes nas amostras preparadas por citocentrifugação devido à queratinização que é realçada na coloração pelo método de Papanicolaou.

Em amostras de LCR preparadas por *cell block* e com adenocarcinomas não houve diferença quanto ao aspecto morfológico entre os diferentes sítios primários. Essa diferença de aspectos citomorfológicos entre as amostras de sítios primários também não é observada em amostras de efusões e ressalta a necessidade de marcadores imunocitoquímicos para esta definição (13) (29) (83) (84).

Quanto ao padrão de marcação imunocitoquímica para PANCK, em ambos os métodos de preparação, observou-se o padrão de marcação esperado, ou seja, de membrana e citoplasmático. Contudo, a marcação citoplasmática de PANCK foi mais evidente no *cell block*, o que facilita a interpretação dos achados imunocitoquímicos.

### **6.3.3 Análise Do Escore De Positividade Para Marcadores Imunocitoquímicos**

A imunocitoquímica é usada como método complementar à citologia para definição diagnóstica em amostras como efusões e lavados peritoneal e broncoalveolar quando os aspectos morfológicos não são suficientes. Marcadores epiteliais e de linhagem hematológica são indicados como marcadores diagnósticos

para carcinoma metastático e linfoma, respectivamente. Marcadores como p63 e p40 que sugerem diferenciação escamosa do carcinoma, e marcadores de sítio primário de carcinoma, podem ser aplicados principalmente quando o paciente apresenta carcinomas em dois sítios primários ou quando o carcinoma metastático é de sítio primário desconhecido (34).

De uma maneira geral, os marcadores imunocitoquímicos analisados no presente estudo são habitualmente usados em exames histopatológicos e citopatológicos da rotina do laboratório de Anatomia Patológica devido à sua elevada sensibilidade.

Além da sensibilidade, um dos critérios para a escolha dos marcadores é o escore de positividade, principalmente em amostras com baixa celularidade como as de LCR. Foram utilizados escores de positividade que levam em consideração a proporção de células coradas e a intensidade da reação. Para os marcadores de membrana e citoplasmáticos, PANCK, CK7, MOC-31 e claudin-4, os escores de positividade foram calculados pelo produto dos escore de proporção e intensidade (33). O escore de positividade utilizado para os marcadores nucleares, TTF-1, GATA3 e p63, é baseado em testes com receptores de estrógeno (60), e foi calculado pela soma dos escores de proporção e intensidade.

O PANCK é marcador utilizado para detecção imunocitoquímica de carcinoma metastático em LCR devido a sua elevada sensibilidade, com expressão em qualquer tipo histológico (adenocarcinoma e epidermoide), elevado escore de positividade, e maior disponibilidade nos laboratórios (12). Importante ressaltar que AE1/AE3, coquetel de anticorpos monoclonais que reconhecem varias citoqueratinas de baixo e alto peso moléculas, é frequentemente usado como marcador em painel imunohistoquímico e imunocitoquímico inicial (28) (34). As citoqueratinas CK7 e CK20 são particularmente úteis quando utilizadas em conjunto como ponto inicial de uma investigação imunocitoquímica de sítio primário (28) (44) (85).

A desvantagem das pancitoqueratinas é a possibilidade de expressão em neoplasias do SNC como meningiomas malignos, ependimomas, glioblastomas, papilomas e carcinomas do plexo coroide (38) (39) (40) (41) (42) (43).

Para detecção de carcinoma em efusões, o marcador PANCK não é indicado devido a sua positividade em células mesoteliais benignas (28). Em efusões os marcadores considerados de maior sensibilidade e especificidade para a identificação

de adenocarcinomas, diferenciando-os de células mesoteliais, são o MOC-31, anticorpo monoclonal que se liga à molécula de EpCAM, e anti-claudin-4 (84) (86). A expressão da molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) foi utilizada por outros autores como critério de identificação de células epiteliais no LCR (65). Marcação utilizando o anticorpo Ber-EP4, anticorpo monoclonal que como o MOC-31, também se liga à molécula de EpCAM, não foi detectada em meningiomas e glioblastomas (38) (41), ao contrário dos marcadores anti-citoqueratina.

Uma das desvantagens do MOC-31 em relação a claudin-4 é a menor sensibilidade em carcinomas escamosos (27). Vale ressaltar que uma marcação inespecífica, citoplasmática, difusa e fraca do Claudin-4 tem sido descrita em macrófagos nas amostras de efusões (84). Os macrófagos também são células frequentemente observadas em LCR, e, dessa forma, na utilização desses marcadores, o padrão (predominantemente de membrana) e a intensidade (moderada a forte) são indicativos da presença de célula epitelial, mesmo em cortes de *cell block* com escassa celularidade, o que também é descrito em amostras esparsamente celulares de efusões (84). CD68, marcador imunocitoquímico de macrófagos rotineiramente utilizado em efusões, poderá também ser útil em amostras de LCR para diferenciação entre os macrófagos e células epiteliais (87).

Além da sensibilidade e especificidade, o escore de positividade é um critério fundamental para a escolha de marcadores, principalmente em se tratando de amostras com baixa celularidade (33) (60) (88).

Neste estudo, as medianas elevadas dos escores de positividade em adenocarcinomas indicaram superexpressão e não houve diferenças entre marcadores os diagnósticos, PANCK, MOC-31 e CK7. Houve superexpressão também nas amostras testadas com claudin-4. Esse resultado mostra que qualquer um dos marcadores poderia ser utilizado em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico prévio de adenocarcinoma que são os que mais frequentemente evoluem com metástase para meninges, principalmente os de sítio em mama e pulmão. Dessa forma, a escolha de marcadores diagnósticos para carcinoma vai depender da disponibilidade do marcador no laboratório e considerando-se as particularidades de sensibilidade e especificidade de cada marcador e do tipo de carcinoma no diagnóstico clínico/histopatológico prévio.

As maiores limitações deste estudo foram o período de tempo prolongado entre a coleta e o processamento do LCR, por dificuldades técnicas e logísticas, uma vez que os laboratórios de Patologia onde foram processadas as amostras não funcionam de forma ininterrupta, e a pequena amostragem para comparação e avaliação da concordância/discordância diagnóstica entre o citocentrifugado e o *cell block*. A pequena percentagem de casos positivos aliada a escassa celularidade foi fator impeditivo para a expansão de painéis de marcadores imunocitoquímicos e comparação entre os resultados; o que também é relatado por outros autores (11) (80) (89).

Há várias tentativas de se aprimorar a eficácia diagnóstica na investigação de metástases leptomenígeas. Técnicas como citometria de fluxo, disponível em vários centros e utilizada diante da suspeita de infiltração leptomenígea por malignidades hematológicas, também podem melhorar a sensibilidade do exame citopatológico do LCR no diagnóstico de metástases por neoplasias epiteliais (67) (90). A biópsia líquida é promissora com a identificação de células tumorais circulantes no sangue e também no LCR de pacientes com tumores epiteliais (1). Alguns autores relatam o papel da expressão da molécula de adesão epitelial (EpCAM) como critério para identificação destas células em líquidos corporais e no LCR (65) (91) (92) (93) (94). Contudo, técnicas de baixo custo, como o *cell block* com plasma-tromboplastina, devem ser consideradas principalmente em países com recursos escassos.

## 7 CONCLUSÃO

A maioria das amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) são encaminhadas para o laboratório de Anatomia Patológica com a hipótese de neoplasia, predominando as hipóteses de neoplasias hematológicas e carcinomas. Os carcinomas são as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas, principalmente as de sítio primário em mama e pulmão, e predominam em mulheres. A frequência de resultado suspeito/positivo para malignidade na análise citopatológica em amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma e de neoplasia hematopoiética foi baixa, respectivamente, 25,3% e 7,9%. Estes resultados indicam a necessidade de estudos sobre o aprimoramento das técnicas moleculares a serem aplicadas em amostras de LCR.

Os métodos de preparo, citocentrifugação e *cell block* pelo método plasma-tromboplastina, quando aplicados em amostras de LCR, foram concordantes quanto aos resultados do exame citopatológico e não foram diferentes quanto a celularidade e quanto ao padrão de expressão e escore de positividade de PANCK. O *cell block* aumentou em 16,7% a sensibilidade do exame citopatológico quando adicionado à citocentrifugação.

As análises dos escores de positividade dos marcadores PANCK, CK-7, MOC-31 e Claudin-4 em *cell block* indicam superexpressão e sugerem que qualquer um destes marcadores pode ser aplicado em amostras de LCR diante da hipótese clínica de adenocarcinoma.

Considerando-se os resultados das análises de concordância e comparativa entre citocentrifugação e o *cell block* com plasma-tromboplastina, a facilidade de execução e o baixo custo para o preparo do *cell block*, e a facilidade de interpretação da expressão imunocitoquímica em amostras de *cell block*, pode-se concluir que o *cell block* pelo método plasma-tromboplastina é uma técnica aplicável em amostras de LCR e pode ser usado, de forma complementar à citocentrifugação, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do exame citopatológico de LCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Molina EG, Penas-Prado M. Neoplastic meningitis in solid tumours: Updated review of diagnosis, prognosis, therapeutic management, and future directions. *Neurologia (Engl. Ed)*. 2020;18:S0213-4853(19)30141-0.
- 2 Chamberlain MC. Neoplastic meningitis in neuro-oncology. In: Grisold W, Soffiotti R, eds. *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: Elsevier; 2012;105:757–766.
- 3 Mack F, Baumert BG, Schäfer N, Hattingen E, Scheffler B, Herrlinger U, Glas M. Therapy of leptomeningeal metastasis in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2016;43:83-91.
- 4 National Cancer Institute. Adult Central Nervous System Tumors Treatment – Health Professional Version [Internet]. Bethesda (MD): PDQ Adult Treatment Editorial Board; Atualizado em 18 jan. de 2022 [acesso em 24 fev. 2022]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/brain/hp/adult-brain-treatment-pdq>.
- 5 Nayar G, Ejikeme T, Chongsathidkiet P, Elsamadicy AA, Blackwell KL, Clarke JM et al. Leptomeningeal disease: Current diagnostic and therapeutic strategies. *Oncotarget*. 2017;8(42):73312-73328.
- 6 Corbin ZA, Nagpal S. Leptomeningeal Metastases. *JAMA Oncol*. 2016; 1;2(6):839.
- 7 Beauchesne P. Intrathecal chemotherapy for treatment of leptomeningeal dissemination of metastatic tumours. *Lancet Oncol*. 2010;11(9):871-9.
- 8 Mollica L, Leli C, Puglisi S, Sardi S, Sottotetti F. Leptomeningeal carcinomatosis and breast cancer: A systematic review of current evidence on diagnosis, treatment and prognosis. *Drugs Context*. 2021;26;10:2021-6-6.

- 9 Le Rhun E, Devos P, Weller J, Seystahl K, Mo F, Compter A et al. Prognostic validation and clinical implications of the EANO ESMO classification of leptomeningeal metastasis from solid tumors. *Neuro Oncol.* 2021;1;23(7):1100-1112.
- 10 Ali SZ, Cibas ES. Serous cavity fluid and cerebrospinal fluid cytopathology. *Essentials in cytopathology.* New York: Springer; 2012.
- 11 Dušková J, Sobek O. Assisting the neurologist in diagnosis of CNS malignancies - Current possibilities and limits of cerebrospinal fluid cytology and immunocytochemistry. *Brain Behav.* 2017;7(10):e00805.
- 12 Torzewski M, Lackner KJ, Bohl J, Sommer C. *Integrated cytology of cerebrospinal fluid.* Berlin: Springer; 2008.
- 13 Chandra A, Crothers B, Kurtycz D, Schmitt F. *The international system for serous fluid cytopathology.* Switzerland: Springer; 2020.
- 14 Straccia P, Fadda G, Pierconti F. Comparison between cytospin and liquid-based cytology in cerebrospinal fluid diagnosis of neoplastic diseases: A single institution experience. *Cytopathology.* 2019;30(2):236-240.
- 15 Wright RG, Halford JA. Evaluation of thin-layer methods in urine cytology. *Cytopathology.* 2001;12:306-313
- 16 Straccia P, Bizzarro T, Fadda G, Pierconti F Comparison between cytospin and liquid-based cytology in urine specimens classified according to the Paris System for Reporting Urinary Cytology Cancer *Cytopathol.* 2016; 124(7):519-23.
- 17 Bahrenburg LPH. On the diagnostic results of the microscopical examination of the ascitic fluid in two cases of carcinoma involving the peritoneum. *Cleveland Med Gaz.* 1896;11:274-278.
- 18 Mandelbaum FS. The diagnosis of malignant tumors by paraffin sections of

centrifuged exudates. *J Lab Clin Med.* 1917;2:580.

19 Krogerus L, Kholová I. Cell block in cytological diagnostics: Review of preparatory techniques. *Acta Cytol.* 2018; 62(4):237-243.

20 Jing X, Li QK, Bedrossian U, Michael CW. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion cell blocks prepared using 3 different methods. *Am J Clin Pathol.* 2013; 139(2):177-82. 54

21 Shukla P, Kaur S, Gulwani HV. Diagnostic utility of Plasma Thromboplastin cell block preparation in cytological evaluation of serous effusions. *International Journal of Biomedical Research.* 2015; 6(11): 890-896.

22 Castro TMML, Carneiro MV, Ferreira VM, Motoyama AB, Carneiro FP. Aplicação do método “plasma-tromboplastina/trombina” no preparo de amostras citológicas para pesquisa de câncer no laboratório de anatomia patológica. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde.* 2016;20(1):85-90.

23 Birge RF, McMullen T, Davis SK. A rapid method for paraffin section study of exfoliated neoplastic cells in bodily fluids. *Am J Clin Pathol.* 1948;18(9):754.

24 De Girolami E. Applications of plasma-thrombin cell block in diagnostic cytology. Part 1: Female genital and urinary tracts. *Pathol Annu.* 1977;12(1):251-75.

25 De Girolami E. Applications of plasma-thrombin cell block in diagnostic cytology, Part II: Digestive and respiratory tracts, breast and effusions. *Pathol Annu.* 1977;12(2):91-110.

26 Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal.* 2014;20;11:7.

27 Kulkarni MB, Desai SB, Ajit D, Chinoy RF. Utility of the thromboplastin-plasma cell-

block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. *Diagn Cytopathol.* 2009;37(2):86-90.

28 Lin F, Prichard J. *Handbook of practical immunohistochemistry.* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer; 2015.

29 Kurtcys DFI, Crothers BA, Schmitt F, Chandra A. International system for reporting serous fluid cytopathology: Initial project survey. *Acta Cytol.* 2019;63(Suppl):13.

30 Nambirajan A, Jain D. Cell blocks in cytopathology: An update. *Cytopathology.* 2018;29(6):505-524.

31 Carneiro FP, Amorim RF, de Vasconcelos Carneiro M, de Castro TMML, de Souza Vianna LM, Takano GHS et al. P16 as a marker of carcinoma in effusions and peritoneal washing. *BMC Cancer.* 2020;20(1):225.

32 DeMay MR. *The art and science of cytopathology.* 2<sup>nd</sup> ed. Chicago: ASCP Press; 2012.

33 Carneiro FP, Muniz-Junqueira MI, De Vasconcelos Carneiro M, De Araújo Oliveira Í, Soares AC, De Vargas Haar N et al. Anti-EpCAM antibodies for detection of metastatic carcinoma in effusions and peritoneal wash. *Oncol Lett.* 2019;18(2):2019-2024.

34 Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic applications.* Philadelphia: Elsevier; 2019.

35 Bellizzi AM. An Algorithmic Immunohistochemical Approach to Define Tumor Type and Assign Site of Origin. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(3):114-163.

36 Bekaert L, Emery E, Levallet G, Lechapt-Zalcman E. Histopathologic diagnosis of brain metastases: current trends in management and future considerations. *Brain Tumor Pathol.* 2017;34(1):8-19.

37 Stoyanov GS, Petkova L, Dzhenkov DL. A Practical Approach to the Differential Diagnosis of Intracranial Tumors: Gross, Histology, and Immunoprofile-based Algorithm. *Cureus*. 2019;15;11(12):e6384.

38 Liu Y, Sturgis CD, Bunker M, Saad RS, Tung M, Raab SS, Silverman JF. Expression of cytokeratin by malignant meningiomas: diagnostic pitfall of cytokeratin to separate malignant meningiomas from metastatic carcinoma. *Mod Pathol*. 2004;17(9):1129-33.

39 Vege KD, Giannini C, Scheithauer BW. The immunophenotype of ependymomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000;8(1):25-31.

40 Terada T. Expression of cytokeratins in glioblastoma multiforme. *Pathol Oncol Res*. 2015 Jul;21(3):817-9.

41 Oh D, Prayson RA. Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(10):917-20.

42 Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Hughes JT, Coakham HB, Figols J, Eynaud PM. Choroid plexus papillomas: an immunohistological study of 16 cases. *Histopathology*. 1989;15(1):61-9.

43 Barreto AS, Vassallo J, Queiroz Lde S. Papillomas and carcinomas of the choroid plexus: histological and immunohistochemical studies and comparison with normal fetal choroid plexus. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(3A):600-7.

44 Selves J, Long-Mira E, Mathieu MC, Rochaix P, Ilié M. Immunohistochemistry for diagnosis of metastatic carcinomas of unknown primary site. *Cancers (Basel)*. 2018;10(4):108.

45 Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH,

Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res.* 2003;15;285(1):50-8.

46 Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol.* 2009;10:235.

47 Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D et al. Clostridium perfringens enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res.* 2007;1;67(17):7977-82.

48 Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* 2001;61:7878–81.

49 Guo S, Wang Y, Rohr J, Shang L, Ma J. p63 expression is associated with high histological grade, aberrant p53 expression and TP53 mutation in HER2-positive breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2021;74(10):641-645.

50 Lilo MT, Allison D, Wang Y, Ao M, Gabrielson E, Geddes S, Zhang H, Askin F, Li QK. Expression of P40 and P63 in lung cancers using fine needle aspiration cases. Understanding clinical pitfalls and limitations. *J Am Soc Cytopathol.* 2016;5(3):123-132.

51 Garner IB et al. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol.* 2001;14:1052-8.

52 Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN. Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10(2):97-102.

53 Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, Jirström K, Planck M, Mattsson JSM, Botling J, Micke P, Jönsson P, Brunnström H. Comparison of Three Different TTF-1 Clones in Resected Primary Lung Cancer and Epithelial Pulmonary Metastases. *Am J Clin Pathol.* 2018;24;150(6):533-544.

54 Wang B, Jiang Y, Li SY, Niu RL, Blasberg JD, Kaifi JT et al. Breast metastases from primary lung cancer: a retrospective case series on clinical, ultrasonographic, and immunohistochemical features. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(7):3226-3235.

55 El Hag M, Schmidt L, Roh M, Michael CW. Utility of TTF-1 and Napsin-A in the work-up of malignant effusions. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(4):299-304.

56 Braxton DR, Cohen C, Siddiqui MT. Utility of GATA3 immunohistochemistry for diagnosis of metastatic breast carcinoma in cytology specimens. *Diagn Cytopathol.* 2015; 43(4):271-7.

57 Mahajan A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. *Hum Pathol.* 2016 May;51:64-74.

58 Bacchi CE, Lopes LF. *Imuno-histoquímica dos linfomas.* Maringá: Dental Press; 2013.

59 Rinehardt H, Kassem M, Morgan E, Palettas M, Stephens JA, Suresh A et al. Assessment of leptomeningeal carcinomatosis diagnosis, management and outcomes in patients with solid tumors over a decade of experience. *Eur J Breast Health.* 2021;4;17(4):371-377.

60 Leake R, Barnes D, Pinder S, Ellis I, Anderson L, Anderson T et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group of the EORTC. *J Clin Pathol.* 2000;53(8):634-5.

61 Choi J, Kim SH. Liquid-based cytology of the cerebrospinal fluid in a case of cryptococcal meningitis. *J Pathol Transl Med.* 2018;52(1):61-63.

62 Shahan B, Choi EY, Nieves G. Cerebrospinal Fluid Analysis. *Am Fam Physician.* 2021;103(7):422-428. Erratum in: *Am Fam Physician.* 2021;15;103(12):713.

63 Wooster M, McGuinness JE, Fenn KM, Singh VM, Franks LE, Lee S et al. Diagnosis of leptomeningeal metastasis in women with breast cancer through identification of tumor cells in cerebrospinal fluid using the CNside™ assay. *Clin Breast Cancer*. 2021;14:S1526-8209(21)00318-9.

64 Bönig L, Möhn N, Ahlbrecht J, Wurster U, Raab P, Puppe W et al. Leptomeningeal Metastasis: The Role of Cerebrospinal Fluid Diagnostics. *Front Neurol*. 2019;20;10:839.

65 Subirá D, Simó M, Illán J, Serrano C, Castañón S, Gonzalo R et al. Diagnostic and prognostic significance of flow cytometry immunophenotyping in patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(4):383-91.

66 Benevolo G, Stacchini A, Spina M, Ferreri AJ, Arras M, Bellio L et al. Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood*. 2012;120:3222–3228.

67 Alvarez R, Dupuis J, Plonquet A, Christov C, Copie-Bergman C, Hemery F et al. Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2012;23:1274–1279

68 Hendriks LEL, Subramaniam DS, Dingemans AC. Editorial: Central nervous system metastases in lung cancer patients: From prevention to diagnosis and treatment. *Front Oncol*. 2018;6;8:511.

69 Chamberlain M, Soffiatti R, Raizer J, Rudà R, Brandsma D, Boogerd W et al. Leptomeningeal metastasis: A Response Assessment in Neuro-oncology critical review of endpoints and response criteria of published randomized clinical trials. *Neuro Oncol*. 2014;16(9):1176–85.

70 Kalogeraki A, Tamiolakis D, Datseri G, Lazopoulos G, Karvelas-Kalogerakis M, Segredakis J et al. Pleural effusion cytology due to malignancy. A combined

cytomorphological-immunocytochemical study of 500 cases. *Rev Port Pneumol* (2006). 2016;22(5):290-1.

71 Skok K, Hladnik G, Grm A, Crnjac A. Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug 15;55(8):490.

72 Francis IM, Alath P, George SS, Jaragh M, Al Jassar A, Kapila K. Metastatic breast carcinoma in pleural fluid: Correlation of receptor and HER2 status with the primary carcinoma - a pilot study. *Diagn Cytopathol*. 2016;44: 980-986.

73 Sahu S, Sharma S, Gupta P, Dey P. MOC31 Immunostaining in the Diagnosis of Metastatic Adenocarcinoma in Serous Fluid: Special Emphasis on Atypical Cytological Cases. *Acta Cytol*. 2021;65(3):242-249.

74 Guo JW, Zhang XT, Chen XS, Zhang XC, Zheng GJ, Zhang BP et al. Leptomeningeal carcinomatosis as the initial manifestation of gastric adenocarcinoma: a case report. *World J Gastroenterol*. 2014;28;20(8):2120-6.

75 Porcel JM, Solé C, Salud A, Bielsa S. Prognosis of Cancer with Synchronous or Metachronous Malignant Pleural Effusion. *Lung*. 2017;195(6):775-779.

76 Newman M, Walsh M, Jeffrey R, Hiscock R. Cell Block Optimization: A comparative study of quality variables in 4 different cell block methods. *Acta Cytol*. 2021;65(5):417-423.

77 Hallikeri K, Babu B, Sudhakaran A, Monteiro R. Cell Block and Its Impact in the Diagnosis of Jaw Lesions over Fine Needle Aspiration Cytology. *Acta Cytol*. 2021;65(5):361-367

78 Porcel JM. Diagnosis and characterization of malignant effusions through pleural fluid cytological examination. *Curr Opin Pulm Med*. 2019;25(4):362-368.

79 Fetsch PA, Simsir A, Brosky K and Abati A. Comparison of three commonly used

cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 2002; 26: 61-66.

80 Shim B, Koh J, Moon JH, Park IA, Ryu HS. Cytologic Diagnosis of Metastatic Alveolar Rhabdomyosarcoma in Cerebrospinal Fluid: A Case Report. *J Pathol Transl Med.* 2018;52(4):262-266.

81 Lardinois B, Miller L, Randazzo A, Laurent T, Debois R, Henry S. Leptomeningeal Carcinomatosis: A Call for Optimizing Diagnostic Sensitivity by the Hematology Laboratory. *Case Rep Oncol.* 2021;18;14(2):1248-1253.

82 Bae YS, Cheong JW, Chang WS, Kim S, Oh EJ, Kim SH. Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid (CSF) Cytology in Metastatic Tumors: An Analysis of Consecutive CSF Samples. *Korean J Pathol.* 2013;47(6):563-8.

83 Shidham VB, Layfield LJ. Approach to Diagnostic Cytopathology of Serous Effusions. *Cytojournal.* 2021; 6;18:32.

84 Jo VY, Cibas ES, Pinkus GS. Claudin-4 immunohistochemistry is highly effective in distinguishing adenocarcinoma from malignant mesothelioma in effusion cytology. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(4):299-306.

85 Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer.* 2002;38:758-763.

86 Oda T, Ogata S, Kawaguchi S, Minabe S, Dokyu M, Takahashi H et al. Immunocytochemical utility of claudin-4 versus those of Ber-EP4 and MOC-31 in effusion cytology. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(6):499-504.

87 Carneiro FP, Muniz-Junqueira MI, Pittella-Silva F, Carneiro MV, Takano GHS, Vianna LMS et al. A panel of markers for identification of malignant and non-malignant cells in culture from effusions. *Oncol Rep.* 2017;38(6):3538-3544.

88 Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet*. 2000;9;356(9246):1981-2.

89 Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*. 2005;105:496–502

90 Subirá D, Serrano C, Castañón S, Gonzalo R, Illán J, Pardo J et al. Role of flow cytometry immunophenotyping in the diagnosis of leptomeningeal carcinomatosis. *Neuro Oncol*. 2012;14(1):43–52.

91 Krishan A, Ganjei-Azar P, Hamelik R, Sharma D, Reis I, Nadji M. Flow immunocytochemistry of marker expression in cells from body cavity fluids. *Cytometry A*. 2010;77(2):132–43.

92 Pillai V, Cibas ES, Dorfman DM. A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(5):672–81.

93 Patel AS, Allen JE, Dicker DT, Peters KL, Sheehan JM, Glantz MJ et al. Identification and enumeration of circulating tumor cells in the cerebrospinal fluid of breast cancer patients with central nervous system metastases. *Oncotarget*. 2011; 2(10):752–60.

94 Nayak L, Fleisher M, Gonzalez-Espinoza R, Lin O, Panageas K, Reiner A et al. Rare cell capture technology for the diagnosis of leptomeningeal metastasis , in solid tumors. *Neurology*. 2013;80(17):1598–1605.

## APÊNDICE A - PREPARO DO CELL BLOCK PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA

Para o preparo do *cell block* foi utilizado o método plasma-tromboplastina seguindo as seguintes etapas:

1. Centrifugação 2000 rpm por 5 minutos
2. Remoção do sobrenadante
3. Adição de 100 µl de plasma ao precipitado seguida de homogeneização
4. Adição de 100 µl de tromboplastina (Stago®, Asnières sur Seine, França) seguida de homogeneização.
5. Após a formação do coágulo, adição de 2 mL de formol a 10% para promover o deslocamento do coágulo do fundo do frasco e a fixação da amostra.
6. Inserção do coágulo (envolvido por papel manteiga) em cassete.
7. Fixação do coágulo em cassete em formol a 10%.
8. Processamento histológico habitual.
9. Inclusão em parafina.
10. Secção dos blocos de parafina em cortes de 4-5 µm que foram dispostos em lâminas não silanizadas, para coloração por hematoxilina e eosina, e em lâminas silanizadas para imunocitoquímica.



Figura 15 Coágulo e blocos de parafina (cell blocks) de amostras de líquido cefalorraquidiano confeccionados pelo método plasma-tromboplastina

## **APÊNDICE B - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA (HE)**

A coloração HE foi realizada nas seguintes etapas:

1. Desparafinização com xilol
2. Hidratação em banhos com soluções de concentrações decrescente de etanol (em sequência) e água.
3. Coloração com Hematoxilina de Harris por 3 minutos,
4. Lavagem em água corrente
5. Coloração com eosina
6. Lavagem em água
7. Desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol (em sequência)
8. Diafanização com xilol
9. Montagem da lamínula sobre a lâmina utilizando resina sintética.

## APÊNDICE C - IMUNOCITOQUÍMICA

A imunocitoquímica foi realizada através das seguintes etapas:

1. Desparafinização em xilol
2. Hidratação em soluções com concentrações decrescentes de etanol (em sequência).
3. Recuperação antigênica com tampão citrato e monolaurato de polietileno glicol sorbitano (Tween 20, Sigma-Aldrich®, San Luis, Estados Unidos da América) dentro de um vaporizador previamente aquecido à 95°C, em temperatura controlada de 95° a 99°C por 20 min
4. Resfriamento em temperatura ambiente por 20 min.
5. Lavagem em 10 cubas contendo água destilada.
6. Bloqueio de peroxidases endógenas em 2 cubas contendo água destilada e peróxido de hidrogênio na proporção 1:3 ( 2 banhos de 15 min cada)
7. Lavagem em 5 cubas contendo água destilada
8. Bloqueio de proteínas inespecíficas com a utilização do bloqueador do kit REVEAL - Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience®, Califórnia, Estados Unidos) por 10 min.
9. Lavagem em 5 cubas contendo água destilada.
10. Lavagem com TBS-tween 20 (0,1%), por 5 min.
11. Diluição dos anticorpos em albumina humana 1%, conforme diluição em Tabela 1.
12. Incubação com os anticorpos primários em câmara úmida “overnight” sob refrigeração (2 a 8 °C).

## APÊNDICE D – PBS

O PBS foi realizado com a utilização dos seguintes componentes:

- NaCl (137mM)
- KCl (2,7mM)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10mM)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2mM)
- Ajustar o pH para 7,4
- Completar o volume com água destilada para 1 L e autoclavar

## APÊNDICE E – TAMPÃO DE HEMÓLISE

O tampão de hemólise foi assim preparado:

- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (145 mM)
- $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (10 mM)
- Completar o volume com água destilada para 2 L e autoclavar

## APÊNDICE F – HEMATOXILINA DE HARRIS

A Hematoxilina de Harris foi assim preparada:

- Hematoxilina. 0,48% (p/v)
- Etanol absoluto 4,8% (v/v)
- $KAl(SO_4)_2$  (384 mM)
- HgO (11mM)
- Completar o volume com água destilada para 1.050 mL

Protocolo: Dissolver o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético. Misturar a hematoxilina no etanol à temperatura ambiente em outro recipiente separado. Lentamente, combinar as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retirar da fonte de calor e acrescentar lentamente o óxido mercúrio. Retornar a solução para a fonte de calor até que tome a tonalidade púrpuro-escura. Aguardar esfriar.

## APÊNDICE G – CORANTE ORANGE G

O preparo do Corante orange G foi efetuado da seguinte forma:

I- Solução estoque de orange G 10%

- Orange G - 10% (m/v)
- Completar o volume com água destilada para 100 mL

II- Solução de uso do orange G :

- Solução estoque 2% (v/v)
- $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$  (0,0624 mM)
- Etanol 95% - 98%(v/v)

## APÊNDICE H – CORANTE EA-65

O Corante EA-65 foi preparado da seguinte maneira:

I- Soluções estoque eosina Y a 20%:

- Eosina Y 20% (m/v) em água destilada

II- Solução estoque *light-green* SF a 3%:

- Light-green SF 3% (p/v) em água destilada

III- Solução de uso do EA-65:

- Solução estoque de eosina Y - 2% (v/v)
- Solução estoque de *light-green* SF- 1% (v/v)
- $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$  – 0,832 mM
- Etanol 95% - 70% (v/v)
- Metanol absoluto- 25% (v/v)
- Ácido acético glacial- 2% (v/v)

## APÊNDICE I – SOLUÇÃO DE RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

O preparo da solução de recuperação antigênica foi realizado da seguinte forma:

### I- Tampão citrato

- $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  (12mM) em água destilada
- Completar o volume com água destilada para 1L
- Ajustar o pH para 6 e armazenar em geladeira

### II- Solução de recuperação

- Tampão citrato - 250 mL
- Tween 20 – 0,0002% v/v

## APÊNDICE J – TAMPÃO TBS

O preparo do tampão TBS foi realizado da seguinte forma:

### I- Preparo do Tris pH 7,3

- Tris (0,2 M)
- HCl (N/10)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

### II- Preparo do tampão TBS

- Tris pH 7,3 – 11% v/v
- NaCl (146,5 mM)
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP – UNB



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA EM LIQUOR

**Pesquisador:** FABIANA PIRANI CARNEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 51228315.2.0000.0030

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE SAÚDE - FS

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.795.517

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de primeira emenda a projeto já aprovado pelo Parecer Consubstanciado no. 1.346.509 de 02 de dezembro de 2015.

#### "Resumo:

Metástase meníngea clinicamente diagnosticada ocorre em 5-10% dos pacientes com cânceres sólidos, mas a incidência em pacientes assintomáticos pode ser de até 20% de acordo com estudos de autópsia. Cânceres de mama, pulmão, melanoma, gastrointestinal, ovariano e de origem desconhecida são os mais comumente associados a metástase meníngea. Há uma tendência de aumento na incidência devido a melhora na sobrevida de pacientes com câncer. A sobrevida varia de 4-6 semanas em pacientes sem tratamento e aumenta para 2-3 meses nos tratados. O tratamento inclui radioterapia, quimioterapia intratecal e sistêmica. O método diagnóstico considerado padrão ouro é a citologia do líquor (fluido cerebrospinal) apresentando alta especificidade (>95%), mas baixa sensibilidade (<50%). A imunocitoquímica associada a citologia aumenta a possibilidade de diagnóstico, já que a avaliação usando apenas o critério morfológico pode não ser suficiente para conclusão diagnóstica. Além disso, a maioria dos ensaios clínicos tem utilizado uma combinação do resultado da citologia (conversão de positivo para negativo) e resposta clínica (melhora ou estável) para determinar o sucesso do tratamento. Dessa forma, a

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900

**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.795.517

análise do líquor em pacientes com suspeita de metástase meníngea tem importantes implicações prognósticas e terapêuticas e há necessidade de métodos diagnósticos aplicáveis na rotina clínica com elevada sensibilidade e especificidade. Testes imunocromatogênicos estão sendo amplamente aplicados em diferentes tipos de amostras para diagnóstico de doenças metabólicas, inflamatórias e infecciosas, por permitir resultado rápido, baixo custo, facilidade de aplicação e leitura dos resultados. Considerando estas propriedades, este tipo de teste pode ser empregado em locais de baixa renda e poucos recursos laboratoriais. Busca-se, portanto, com este projeto desenvolver um método para detecção de células de carcinoma em líquor humano, que independa de aparelhos sofisticados e caros, bem como de profissionais altamente treinados. O objetivo deste projeto é desenvolver e validar um método rápido, simples e de baixo custo para detecção de células malignas em amostra de líquor humano.

**Método:**

Pacientes com suspeita clínica de metástases e que aceitaram participar do estudo prévio CAAE: 34150314.9.00005558 doaram pelo menos 5mL de líquor, que já teria que ser obtido necessariamente para definição diagnóstica. Para o presente estudo, pretende-se estudar 50 amostras obtidas de pacientes com suspeita diagnóstica clínica de metástase meníngea.

As amostras foram coletadas por neurocirurgião treinado, com procedimento próprio e armazenadas em tubos estéreis para transporte. Metade do volume coletado (2,5mL) de cada amostra será utilizada para teste da metodologia proposta acima já otimizada, enquanto que a outra metade será utilizada para análise imunocitoquímica como usualmente realizada como procedimento de diagnóstico. Nesta técnica as células em suspensão, se depositam na lâmina de vidro, perfazendo um diâmetro de 5 mm, enquanto o meio de suspensão é absorvido por papel absorvente próprio.

As reações imunocitoquímicas serão realizadas nos centrífugos e em emblocados preparados das amostras. Serão empregados anticorpos habitualmente usados na rotina: anticorpos contra citoqueratina. O método utilizado para amplificação da reação será o da Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB) e sua revelação será realizada com utilização do 3-4, Diaminobenzidina (DAB).

A análise será realizada por patologista treinado. Além da positividade, será observada a quantidade de células presentes na amostra.

Serão incluídas amostras de líquor, provenientes do Hospital Universitário de Brasília coletadas em projeto anterior nos anos de 2014 e 2015 CAAE ( 34150314.9.00005558).

Serão excluídas do estudo as amostras de pacientes menores do que 18 anos, indígenas, incapazes, e casos de negativa na participação do estudo.

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.795.517

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral:

Desenvolver um método colorimétrico, rápido, simples e de baixo custo, para detecção de células malignas em liquor humano, pela marcação de antígenos comuns aos tumores.

Objetivos Específicos:

1. Verificar a sensibilidade do método, pela marcação de citoceratina em um numero conhecido de células em meio liquido.
2. Averiguar a possibilidade de detecção a olho nu, e comparar qualitativamente os resultados com os obtidos por espectrometria.
3. Averiguar a possibilidade de contagem das células malignas no liquor.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

As amostras ja foram coletadas em projeto anterior aprovado pelo comitê de ética CAAE ( 34150314.9.00005558) e, portanto, não haverá nenhum risco adicional ao paciente.

O desenvolvimento dessa uma nova técnica proposta, simples e de fácil execução, para a detecção de metástase para meninge de câncer sólido poderá resultar em maior facilidade diagnostica, aumento da sensibilidade da técnica e facilitar o diagnostico na rotina do

laboratório e, conseqüentemente, melhorar o estabelecimento da conduta, estadiamento e prognostico do paciente com câncer. Além disso, trata-se de proposta de desenvolvimento de uma técnica acessível e de custo baixo e que poderia ser utilizada em todos os laboratórios dos serviços públicos de saúde. O diagnostico de câncer metastático atualmente e um procedimento limitado pelo custo, pela disponibilidade de um profissional patologista treinado e experiente, e e/ou da existência de aparelhos caros e relativamente sofisticados. Mesmo assim, a taxa de diagnósticos inconclusivos permanece bastante alta. Por isso, e urgente e importante o desenvolvimento de uma técnica que possa facilmente ser capaz de detectar a presença de células tumorais no liquor. Esse diagnostico primário poderá ser inicialmente apenas qualitativo, detectado pela mudança de cor, visualmente perceptível. Contudo, como a celularidade no liquor costuma ser baixa, pretende-se também utilizar da propriedade da mudança de cor durante o teste de forma analítica, de modo a ser quantificada em espectrofotometro. Esse aparelho, que não e caro e e de fácil manipulação, esta frequentemente presente em laboratórios de análises clinicas rotineiros. Dessa forma, mesmo hospitais e clinicas que não possuam muitos recursos e nem pessoal especializado poderão realizar o teste para detectar a presença de células malignas no liquor.

Cabe lembrar que a presença dessas células nas meninges esta associada com um pior

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.795.517

prognóstico para o paciente, com uma taxa de sobrevida de 4-6 semanas. Dessa forma, o desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido e barato poderá representar uma chance de maior sobrevida a esses pacientes, sobretudo aqueles que vivem distantes dos grandes centros urbanos e que não podem esperar para que suas amostras sejam enviadas e analisadas em centros hospitalares maiores.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto foi aprovado no Edital da FAP-DF conforme documento "Resultado Final. O projeto já foi aprovado pelo Parecer Consubstanciado no. 1.346.509 de 02 de dezembro de 2015. Essa primeira emenda solicita aumentar o número da amostra utilizando pacientes da Secretaria de Saúde do DF e por isso deverá ser encaminhado para o CEP da FEPECS. Foi acrescido a instituição co-participante no projeto da plataforma Brasil. Foi apresentado novo cronograma prevendo início da coleta em janeiro de 2017. orçamento detalhado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram analisados os seguintes documentos:

Informações Básicas do Projeto - "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_807034\_E1.pdf" de 21/10/2016, não apresenta explicitamente as alterações na metodologia, as solicitações estão listadas na justificativa de emenda.

TCLE - "ModTCLE09072012SES.pdf" de 21/10/2016 que está de acordo com o referencial da FEPECS.

"termodeanuenciadecoparticipacaoSES.pdf" de 21/10/2016 - termo de anuência da FEPECS devidamente preenchido e assinado.

"cartadeencaminhamentoemenda.pdf" de 21/10/2016, carta solicitando as alterações propostas.

Cronograma - "cronogramaSES.pdf" de 21/10/2016, que está atualizado.

Projeto Detalhado- "projeto comite fepecs.pdf" de 21/10/2016

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram observados óbices éticos.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Resolução CNS 466/2012 e Complementares.

Este projeto foi aprovado para financiamento pela FEPECS conforme documento da plataforma Brasil "Resultado final" de 27/10/2017.

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.795.517

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A realização das atividades do projeto na instituição coparticipante está condicionada à aprovação pelo CEP responsável, o CEP FEPECS.

De acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_807034_E1.pdf	21/10/2016 22:03:26		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ModTCLE09072012SES.pdf	21/10/2016 21:57:18	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	termodeanuenciadecoparticipacaoSES.pdf	21/10/2016 05:04:37	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	cartadeencaminhamentoemenda.pdf	21/10/2016 04:59:20	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Cronograma	cronogramaSES.pdf	21/10/2016 04:56:23	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoecomitefepecs.pdf	21/10/2016 04:52:10	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	EDITAL_03_2015_FAIXA_C_FINAL.pdf	30/11/2015 14:51:04	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	encaminhamento.pdf	30/11/2015 14:49:18	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	responsabilidade.pdf	30/11/2015 14:48:35	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ConsentimentoCOMITe.pdf	30/11/2015 14:47:18	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoomite.pdf	30/11/2015 14:46:06	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTOomite.pdf	30/11/2015 14:44:57	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	18/11/2015 20:33:12	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.795.517

Outros	CURRICULO.pdf	18/11/2015 18:22:08	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo.pdf	17/11/2015 08:29:36	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	17/11/2015 08:28:18	FABIANA PIRANI CARNEIRO	Aceito
Outros	Resultadofinal.pdf	27/10/2016 13:11:11	Keila Elizabeth Fontana	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 27 de Outubro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Keila Elizabeth Fontana**  
(Coordenador)

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900

**UF:** DF **Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com

## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP – IGESDF

INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL e IGESDF



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM LIQUOR - IMUNOCITOQUÍMICA EM AMOSTRAS PREPARADAS PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA

**Pesquisador:** VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 29649120.0.0000.8153

**Instituição Proponente:** INSTITUTO HOSPITAL DE BASE DO DISTRITO FEDERAL -IHBDF

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.001.990

#### Apresentação do Projeto:

A análise de amostras citológicas de líquor é um procedimento de rotina em casos de suspeita de metástase meníngea e é usada tanto no diagnóstico como no seguimento dos pacientes. O método utilizado é a citocentrifugação que apresenta alta especificidade mas baixa sensibilidade. "Cell block" é uma das técnicas citológicas de preparação na qual resíduos sólidos e precipitados da amostra centrifugada, coágulos sanguíneos ou diminutos fragmentos de tecido são incluídos em blocos de parafina seguindo o processamento histológico habitual. Vários tipos de material citológico podem ser submetidos a preparação de "cell block": fluidos corporais, oriundos de punção aspirativa por agulha fina ou de preparações em meio líquido, dentre outros. Porém a aplicabilidade desta técnica em líquor ainda não foi demonstrada em número significativo de amostras.

O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional e transversal no qual serão analisadas amostras citológicas de líquor enviadas rotineiramente ao laboratório do NUCAN/HB.

#### Processamento/armazenamento do material

O líquor enviado rotineiramente ao laboratório do NUCAN/HB será processado conforme a rotina do laboratório: uma parte será citocentrifugada e o restante será armazenado em geladeira até a liberação do laudo citopatológico, o que deve ocorrer dentro de três a cinco dias. Uma vez concluído e liberado o laudo citopatológico, o restante do material (resíduo) seria rotineiramente

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL & IGESDF



Continuação do Parecer: 4.001.990

desprezado.

O que propomos em nosso estudo é que este resíduo seja utilizado para a confecção do “cell block” (emblocado em parafina).

Portanto não haverá armazenamento do liquor por tempo adicional neste estudo.

Esta técnica de confecção de “cell block” já é conhecida e rotineiramente utilizada em laboratórios de anatomia patológica e citopatologia, inclusive no laboratório do NUCAN/HB com outros tipos de amostras biológicas.

A partir de cortes histológicos do “cell block” serão confeccionadas lâminas que serão examinadas ao microscópio óptico.

Após análise citopatológica, as lâminas do citocentrifugado, as lâminas oriundas do cell block e o cell block propriamente dito, serão arquivados no arquivo próprio do NUCAN/HB segundo Resolução CFM (Conselho Federal de Medicina) nº 2.169/2017 e recomendação das SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia). O arquivamento deverá ocorrer por no mínimo 05 (cinco) anos e é realizado de forma rotineira pelos laboratórios de anatomia patológica e citopatologia de todo o país. Lâminas e “cell block” pertencem ao paciente e ficam a disposição do mesmo para ser retirado a qualquer momento se assim o desejar, segundo Resolução CFM nº 2.169/2017, artigo 9 – parágrafo único. Portanto não haverá alteração nas condições e nem no tempo de arquivamento das lâminas e “cell block” (bloco de parafina) em decorrência da atual pesquisa.

#### Coleta de dados/Metodologia da Análise

Os dados da pesquisa serão coletados a partir do exame microscópico das lâminas oriundas da citocentrifugação do liquor (rotina) e das lâminas oriundas dos cortes histológicos do “cell block”. A análise será descritiva e comparativa: o exame microscópico das lâminas oriundas da citocentrifugação deverá conter informações sobre a celularidade, tipos de arranjos celulares, a presença ou não de células neoplásicas e a presença ou não de artefatos técnicos. O exame microscópico das lâminas dos cortes histológicos do “cell block” também deve descrever estes aspectos morfológicos.

Caso sejam detectadas células neoplásicas, será observado se foi ou não possível a realização de colorações imunocitoquímicas e computados quais os reagentes imunocitoquímicos utilizados e os resultados.

Finalmente serão comparados os achados do exame microscópico do citocentrifugado com os

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL & IGESDF



Continuação do Parecer: 4.001.990

achados do exame microscópico dos cortes histológicos do "cell block" de cada paciente.

**AMOSTRA**

Serão estudadas 40 amostras de liquor de pacientes com e sem história prévia de neoplasia. Somente serão utilizadas amostras já colhidas rotineiramente no Hospital de Base e já enviadas rotineiramente para análise citopatológica no NUCAN/HB. Além da citocentrifugação (já rotineiramente realizada) para a qual serão utilizados 100 L da amostra, com os resíduos de cada amostra será também confeccionado "cell block". E no caso de detecção de células malignas ou suspeitas de malignidade será ainda realizada coloração imunocitoquímica para confirmação da malignidade e definição da origem/sítio primário.

**Crêterios de Inclusão** - Serão incluídas amostras de liquor de pacientes com e sem antecedente de neoplasia.

**Crêterios de Exclusão** - Serão excluídas do estudo as amostras de pacientes menores do que 18 anos, indígenas e incapazes.

**Abordagem estatística**

O programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) será utilizado nas análises estatísticas considerando-se o nível de significância de  $p < 0,05$ . A sensibilidade e a especificidade serão calculadas para os marcadores de malignidade e de sítio primário.

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO GERAL**

O estudo tem por objetivo avaliar a aplicabilidade do "cell block" preparado pelo método plasma-tromboplastina no diagnóstico de neoplasias malignas em amostras de liquor.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Comparar o citocentrifugado das amostras de liquor com o "cell block" preparado pelo método plasma-tromboplastina quanto aos aspectos morfológicos (celularidade, arranjos celulares, artefatos técnicos). Comparar o citocentrifugado com o "cell block" preparado pelo método plasma-tromboplastina quanto aos aspectos imunocitoquímicos (porcentagem de células malignas expressando os marcadores de malignidade e de sítio primário, presença de reação de fundo, facilidade de

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL e IGESDF



Continuação do Parecer: 4.001.990

interpretação dos resultados).

Identificar a sensibilidade e especificidade dos marcadores de malignidade e de sítio primário no citocentrifugado e no "cell block".

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos**

Os riscos para os pacientes são os da coleta rotineira de líquor que já ocorre independentemente de nossa pesquisa pois para a confecção do "cell block", serão usados os resíduos das amostras (material que seria descartado) já colhidas rotineiramente para a citocentrifugação que é o exame de rotina atualmente utilizado para pesquisa de células neoplásicas em líquor no laboratório do NUCAN/HB. Não haverá coleta adicional de líquor. O projeto não oferece desconforto ou risco adicional aos pacientes uma vez que os procedimentos de coleta de amostras são procedimentos já usados de forma rotineira (não sofrerão nenhuma alteração em decorrência desta pesquisa), e a identidade dos pacientes será preservada.

**Benefícios**

A análise citopatológica do líquor para pesquisa de células oncóticas será realizada não somente através do citocentrifugado como já é feito rotineiramente mas também com a confecção do "cell block" pelo método plasma-tromboplastina, além de avaliação imunocitoquímica no citocentrifugado e no "cell block" com marcadores de malignidade e de linhagem celular. Isto deverá aumentar a sensibilidade e especificidade do método de detecção de células neoplásicas no líquor, o que terá implicações clínicas importantes com relação a estadiamento de neoplasias, e conseqüentemente, conduta e prognóstico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância para a assistência e academia.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados adequadamente.

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

**INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL & IGESDF**



Continuação do Parecer: 4.001.990

**Recomendações:**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (CEP/IGESDF) ressalta a necessidade do desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernente às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto.

XI.1 – A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 – Cabe ao pesquisador:

[...]

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentalmente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Protocolo de pesquisa APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (CEP/IGESDF), de acordo com as atribuições definidas pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) na resolução do 466/2012 e na norma operacional 001/2013, em reunião realizada no dia 30/04/2020, deliberou pela "APROVAÇÃO" do presente protocolo de pesquisa. O pesquisador deve seguir o disposto no item recomendações e demais aspectos éticos vigentes, emitindo relatórios parciais semestrais e final sucinto quando da conclusão do projeto, por meio de notificação, via Plataforma Brasil. Além disso, deve seguir o protocolo como apresentado e aprovado. Qualquer alteração que seja feita, inclusive se houver necessidade de interrupção da pesquisa, também deve ser imediatamente comunicada ao CEP/IGESDF, via Plataforma Brasil.

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

**INSTITUTO DE GESTÃO  
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO  
DISTRITO FEDERAL & IGESDF**



Continuação do Parecer: 4.001.990

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1439720.pdf	27/04/2020 15:58:21		Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	26/04/2020 19:17:27	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	26/04/2020 19:08:16	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	26/04/2020 18:57:11	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Valeria.pdf	26/02/2020 09:41:12	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	26/02/2020 08:33:22	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Outros	Termo_Compromisso.pdf	26/02/2020 08:30:16	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Declaração de concordância	Termo_anuencia.pdf	07/02/2020 11:37:56	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	07/02/2020 11:27:04	VALERIA ARAUJO DO NASCIMENTO SANTOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 30 de Abril de 2020

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Katryne Holanda Silva**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** SMHS Quadra 101 - Área Especial - Hospital de Base do DF  
**Bairro:** ASA SUL **CEP:** 70.335-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-1675 **E-mail:** cep.hbdf@gmail.com

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - IGESDF



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Pesquisa de células neoplásicas em liquor – Imunocitoquímica em amostras preparadas pelo método plasma-tromboplastina” sob responsabilidade da pesquisadora Valéria Araújo do Nascimento Santos, do Núcleo de Citopatologia e Anatomia Patológica do Hospital de Base (NUCAN/HB), Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (IGESDF). Esse estudo tem como objetivo avaliar a utilidade do “cell block” a partir de amostras de liquor.

Não haverá alteração na coleta do liquor; será colhido conforme a rotina. Os procedimentos que serão realizados na amostra já são rotineiramente realizados no laboratório do NUCAN/HB. Parte da amostra será usada no preparo de lâminas por citocentrifugação e o restante na confecção do “cell block”. Os benefícios do estudo serão: 1- emprego de marcadores imunocitoquímicos adicionais para confirmação de malignidade e identificação de sítio primário do câncer; 2- análise comparativa dos resultados obtidos por citocentrifugação e pelo “cell block”.

Não haverá danos adicionais decorrentes da pesquisa pois não haverá coleta adicional de liquor; utilizaremos o liquor que de qualquer forma seria colhido independente da atual pesquisa.

Sua participação é voluntária; você tem direito a se recusar a participar ou se retirar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo. Não haverá pagamento ou recompensa financeira pela sua participação e você não terá nenhuma despesa.

Garantimos que o liquor enviado ao laboratório será utilizado somente para o fim proposto ou seja, confecção de “cell block” e coloração imunocitoquímica, além do exame de rotina (citocentrifugação). Seu nome e dados não serão divulgados, sendo mantidos em sigilo pelos pesquisadores. Os resultados desse estudo poderão ser divulgados nessa instituição, revistas e/ou encontros científicos, garantindo a sua privacidade.

Caso tenha dúvidas ou considerações relacionadas a esta pesquisa, entre em contato com a pesquisadora responsável Valéria Araújo do Nascimento Santos por meio do telefone (61) 3550-8854 e-mail vans@ambr.org.br e/ou endereço NUCAN/HB Setor Médico Hospitalar Sul – Asa Sul – Brasília/DF – CEP: 70335-900.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do IGESDF (e-mail: cep@igesdf.org.br, telefone: (61) 3550-8837, Endereço: Setor Médico Hospitalar Sul – Asa Sul – Brasília/DF – CEP: 70335-900). Entre em contato caso tenha ou queira alguma informação a respeito dos aspectos éticos envolvendo este estudo.

Se concordar em participar, você receberá uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a outra via será arquivada pelo pesquisador.

Brasília, [dia] de [mês] de [ano].

Eu [nome do participante], [telefone] [endereço] aceito participar desse estudo.

Assinatura do participante

Assinatura e carimbo do pesquisador

Valéria Araújo do Nascimento Santos, 3350-8854 e vans@ambr.org.br