



Análise citológica do líquido cefalorraquidiano

Citological analysis of cerebrospinal fluid

**Samuel Ricardo Comar^[a] Nicolle de Araújo Machado^[b],
Ticiano Grandi Dozza^[c], Patrícia Haas^[d]**

- ^[a] Mestre em Ciências Farmacêuticas (área de concentração: Análises Clínicas) pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), farmacêutico bioquímico da seção de hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil.
- ^[b] Farmacêutica bioquímica, especializada em Citologia Cérvico-Vaginal e Líquidos Corporais, pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC - Brasil, e-mail: ni_machado@hotmail.com
- ^[c] Farmacêutica bioquímica, especializada em Citologia Cérvico-Vaginal e Líquidos Corporais, pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC - Brasil.
- ^[d] Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), professora-adjunta III da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC - Brasil, e-mail: patricia.haas@ufsc.br

Resumo

O líquido cefalorraquidiano é um humor com composição semelhante a um ultrafiltrado de plasma, encontrado nos plexos ventriculares, no canal central da medula e no espaço subaracnoide. Sua homeostasia pode ser danificada na presença de tumores, isquemias, hidrocefalias e infecções, o que pode provocar mudanças na produção e/ou na composição desse fluido. A análise laboratorial do líquor permite a obtenção de informações importantes, para definição de diagnóstico e de conduta terapêutica, e consiste em uma avaliação microbiológica, bioquímica e citológica, a qual engloba desde aspectos físicos da amostra até contagens globais e diferenciais das células presentes. É necessário que todos os profissionais envolvidos tenham conhecimento das técnicas e as executem de forma correta, tanto na coleta como no transporte, no armazenamento e no preparo da amostra e nas análises propriamente ditas, para que possam ser obtidos resultados corretos e confiáveis.

Palavras-chave: Líquido cefalorraquidiano. Análise laboratorial. Citologia.

Abstract

The cerebrospinal fluid is an aqueous fluid with similar composition to the ultrafiltered plasma and it is found in ventricular plexus, central marrow and subarachnoid space. Its balance can be damaged by the presence of tumors,

ischemia, hydrocephalus and infections, wich can make changes on production or composition of this fluid. The laboratorial analysis allow the attainment of important information to define diagnostic and therapeutic conduct, and it consists in microbiological, biochemical and citological evaluation, wich includes physical aspects and global and differential counting from the present cells. It is necessary that all the evolved professionals know and execute the techniques on the right way, including collection, transport, storage, sample preparation and the analysis itself.

Keywords: Cerebrospinal fluid. Laboratorial analysis. Cytology.

Introdução

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido aquoso que circula pelo espaço intracraniano, preenchendo o sistema ventricular, o canal central da medula e os espaços subaracnoides craniano e raquiano, representando a maior parte do fluido extracelular do sistema nervoso central (SNC) (1). Esse líquido apresenta diversas funções, entre elas, o fornecimento de nutrientes essenciais ao cérebro, a remoção de produtos da atividade neuronal do SNC e a proteção mecânica das células cerebrais (2). Estudos demonstram que um mecanismo homeostático eficiente do LCR é essencial para a atividade neuronal (3-5).

O plexo coroide é responsável por dois terços da produção total de LCR. Essa produção ocorre nos ventrículos laterais e no 3º e no 4º ventrículo, por uma combinação de processos de difusão, pinocitose e transporte ativo (3). A formação do líquido ocorre em duas etapas. A primeira consta de uma filtração passiva do sangue pelo endotélio capilar coroidal, a qual é proporcional ao gradiente da pressão hidrostática entre o sangue e o fluido intersticial coroide; a segunda consta de uma secreção ativa pelo epitélio monoestratificado, envolvendo bombas, cotransportadores e antiportadores, canais iônicos e aquaporinas (6), sendo esse um processo submetido à modulação neuroendócrina e hormonal (7). Outra pequena parcela de LCR é produzida por células ependimais, as quais se localizam na região ventricular (3, 8).

O fluxo do LCR é pulsátil e essa pulsação depende da hemodinâmica arterial no plexo (9, 10). Esse fluxo ocorre dos ventrículos laterais para o 3º e o 4º ventrículo, segue até as cisternas basais e, posteriormente, aos espaços subaracnoides espinhal e cortical (3). Além da macrocirculação através do espaço ventricular subaracnoide, há uma limitada microcirculação, que segue do espaço subaracnoide até o espaço subpial de *Virchow-Robin*, que, por sua vez, permite a eliminação de parte do LCR presente no cérebro por vias de drenagem (11, 12).

A eliminação ou reabsorção líquórica do SNC ocorre por desvios existentes no espaço subaracnoide, chamados de *vilosidades aracnoides*, que cercam nervos cranianos (8), pela placa cribriforme, pelos vasos linfáticos da região cervical (13, 14) e ao longo dos nervos espinhais (15). O líquido retorna, assim, à circulação venosa. Todo esse trajeto exige aproximadamente 1 hora para ser completado, e o fluxo é mais rápido no sentido da gravidade (8).

A pressão normal de abertura do LCR varia de 10 a 100 mm H₂O em crianças jovens, de 60 a 200 mm H₂O após os 8 anos de idade e fica acima de 250 mm H₂O em pacientes obesos. Valores abaixo de 60 mm H₂O e acima de 250 mm H₂O definem hipotensão e hipertensão intracranial, respectivamente (16).

A pressão intracranial é mantida quando existe um equilíbrio entre a formação e a reabsorção do LCR (3). A composição do líquido é semelhante a um ultrafiltrado de plasma, porém, contém 99% de água e apresenta maior concentração de magnésio e íons clorídricos e menor concentração de glicose, proteínas, aminoácidos, ácido úrico, cálcio, fosfato e íons de magnésio, quando comparado a um ultrafiltrado de plasma (3, 17). Pople (18) relata que o volume ventricular normal é de 20 ml e o volume líquórico total, em um adulto, é de 120 ml a 150 ml. A renovação do líquido é diária e sua constante produção atinge em torno de 500 ml/dia (19, 20). A taxa de renovação é diretamente proporcional à taxa de formação e inversamente proporcional ao volume do LCR (5).

Tanto a produção quanto a composição do LCR podem ser afetadas pela presença de tumores, infecções, traumas, isquemias e hidrocefalias (21, 3, 7). Alterações severas no fluxo líquórico podem causar distúrbios cognitivos e de função motora. A análise laboratorial do LCR permite a obtenção de informações fundamentais para uma conduta clínica eficiente (3).

A meningite é uma das patologias que provoca alterações líquóricas e consiste em um processo

infecioso ou não das meninges, a qual pode ter evolução aguda ou crônica (22, 23) e é considerada um grave problema de saúde pública (24). Essa patologia está relacionada a diversas complicações imediatas e/ou tardias, que podem culminar com danos irreversíveis no SNC ou levar o paciente ao óbito (25). O exame do LCR vem sendo usado como diagnóstico desde o final do século XIX, contribuindo significativamente para a confirmação da patologia (24).

Análise laboratorial do LCR

1. Coleta da amostra: Como o procedimento diagnóstico é invasivo, o exame de LCR só pode ser realizado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pelo paciente ou por seu representante legal, de acordo com a Resolução n. 196 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 10 de outubro de 1996 (26).

A coleta da amostra de líquor é de responsabilidade do médico requisitante e das três vias clássicas para coleta, sendo a lombar a mais utilizada na rotina (27), seguida pela suboccipital ou cisternal e, por último, a via ventricular. A via suboccipital apresenta algumas vantagens em relação à lombar, pois não é descrita a ocorrência de cefaleia pós-punção. Eventuais alterações osteoarticulares de coluna cervical interferem muito pouco no ato da punção, mesmo em pessoas obesas e/ou idosas, além de haver menor risco de herniação de estruturas do sistema nervoso central, em casos de hipertensão intracraniana não comunicante (26). Entretanto, essa via tem algumas restrições de indicação, atualmente tendo como indicação absoluta somente os casos de hipertensão intracraniana ou de infecção dérmica ou epidérmica na região lombar (22, 28).

Um manômetro é colocado antes da remoção do LCR, para indicar a pressão de abertura. A pressão de abertura normal, em adultos, é de 90 mm H₂O a 180 mm H₂O, na posição decúbito lateral, sendo ligeiramente mais elevada em pacientes sentados ou obesos, e essa pressão pode variar entre 4 e 10 mm H₂O, com a respiração, e entre 2 e 5 mm H₂O, com o pulso do paciente (16). Em casos de pressão de abertura normal, podem ser removidos, normalmente, até 20 ml de LCR (29).

A boa qualidade de qualquer amostra destinada à análise laboratorial garante a confiabilidade dos resultados. O LCR deve ser coletado sem

anticoagulante, em três tubos ou frascos seguramente estéreis e devidamente identificados com os números 1, 2 e 3, na ordem em que são obtidos (29). A identificação do material deve, também, conter o nome, o número de registro do paciente e a data da coleta (30). A amostra do primeiro tubo deverá ser usada para a realização das análises bioquímicas e sorológicas. O segundo será utilizado para os exames microbiológicos, e o terceiro destina-se às contagens celulares, em virtude da menor probabilidade de conter material, particularmente células sanguíneas, introduzidas acidentalmente no momento da punção (29, 31). Caso a amostra tenha sido coletada apenas em um único frasco, ele deve ser enviado, primeiramente, à seção de bacteriologia; em seguida, à seção de hematologia e, posteriormente, à seção de imunoquímica (29, 30, 32). Amostras coletadas com qualquer tipo de anticoagulante e sem identificação ou envelhecidas devem ser rejeitadas (33).

É de extrema importância que o local da amostragem esteja registrado nos tubos, uma vez que os parâmetros citológicos e bioquímicos variam de acordo com o local da punção (29).

2. Transporte e armazenamento: A amostra coletada deve chegar ao laboratório o mais rápido possível, no máximo em 2 horas, pois, após esse tempo, podem ocorrer degradação e/ou alterações morfológicas de hemácias, leucócitos e outros tipos celulares, diminuição da glicose, aumento de concentração das proteínas e de bactérias (29, 30). Se isso não for possível, pode-se realizar a fixação da amostra com formalina (1:1); entretanto, esse método não deve ser rotineiramente executado. A temperatura de armazenamento do líquor nativo deve estar entre 5 °C e 12 °C, para minimizar danos às células. Temperaturas muito baixas podem conduzir a lise pelo frio, e temperaturas mais altas aceleram mecanismos catabólicos, degenerando as células (8).

Após realizadas as análises, uma pequena porção do LCR centrifugado deve ser devidamente identificada e armazenada na geladeira, durante 30 dias, para eventual necessidade de se realizar outras dosagens (33).

3. Preparo da amostra: No setor de citologia/hematologia, a amostra de LCR deve ser fresca e centrifugada, para a análise visual, e fresca, não centrifugada e devidamente homogeneizada, para a contagem de leucócitos e hemácias em câmaras. Para a confecção da lâmina, deve ser utilizada a amostra total ou o sedimento obtido por centrifugação em baixa rotação (33, 34).

A preparação da lâmina deve ser rápida, já que as células se deterioram rapidamente, em virtude de o LCR ser um meio inapropriado para a manutenção da viabilidade das células. O pH elevado e a baixa pressão oncótica fazem com que algumas células inchem, algumas lisem e, outras, tornem-se irreconhecíveis. Se a amostra apresentar uma elevada celularidade, ela deve ser diluída em solução salina (NaCl 0,9 %), de modo que as células da amostra tenham espaço adequado para se espalharem em uma monocamada, na superfície da câmara, com sobreposição mínima. Em função da metodologia de preparação das lâminas (centrifugação), a adesão artificial entre as células é um fenômeno comum e não deve ser erroneamente interpretado como agrupamentos de células tumorais ou, no caso de um monócito cercado por diversos eritrócitos, como o estágio inicial da eritrofagocitose (8).

4. Exame físico: A observação visual da coloração e do aspecto do LCR é a etapa inicial da análise e pode fornecer importantes informações diagnósticas. O líquido, em condições normais, é incolor (como água de rocha), porém, em condições patológicas, pode apresentar alteração na coloração. A coloração deve ser registrada antes e depois do processo de centrifugação (30). A amostra é considerada xantocrômica quando, após centrifugação, tem tonalidade que varia entre rosa, amarelo ou laranja, o que ocorre pela presença de hemoglobina (hemólise) ou pelas concentrações elevadas de proteínas ou bilirrubina. A possibilidade de existência de outras substâncias, como iodo, caroteno ou melanina, deve ser considerada. Em recém-nascidos, principalmente os prematuros, é comum observar xantocromia, em virtude da imaturidade da função hepática. A intensidade da xantocromia pode ser obtida por métodos espectrofotométricos, porém, na rotina, utiliza-se o método visual, cuja sensibilidade é de 47,3%, o qual é feito pela comparação da cor da amostra com padrões de coloração de bicromato de potássio, em solução de diversas concentrações (35, 36).

No momento da punção, podem ocorrer traumas que provocam sangramento, que, se não for analisado cuidadosamente, pode provocar um erro de diagnóstico, pois a amostra torna-se semelhante a uma amostra com hemorragia subaracnoide. Entre os procedimentos utilizados para distinguir um acidente de punção de uma hemorragia subaracnoide, estão o método dos três tubos, o da pressão inicial e a inspeção visual da amostra após

centrifugação, que, nesse caso, torna-se límpida (37-39, 31).

O aspecto da amostra deve ser observado em local com boa iluminação e pode ser definido como límpido, em casos de LCR normal ou com celularidade de até 200 leucócitos/ μ l ou 400 hemácias/ μ l, ou como levemente turvo, turvo ou turvo-leitoso, em virtude da presença de células sanguíneas, microrganismos ou taxas elevadas de proteínas ou lipídeos (38, 34, 31). A formação de coágulo também deve ser registrada e é observada em amostras de pacientes com acidente de punção, bloqueio espinhal completo (síndrome de *Froin*) e meningite tuberculosa e supurativa. Esse coágulo formado pode interferir na exatidão das contagens de células, por capturarem células inflamatórias (29).

5. Contagem global de células: A contagem global de leucócitos e hemácias da amostra pode ser realizada em qualquer tipo de câmara de contagem, porém, rotineiramente, utiliza-se a câmara de Fuchs-Rosenthal, a qual tem altura de 0,2 mm, área total de 16,0 mm², volume total de 3,2 mm³ e é dividida em 16 quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores cada um (34), sendo que o procedimento para contagem global de células varia de acordo com a celularidade da amostra (Tabela 1) (33).

Para a diferenciação de hemácias, leucócitos e células teciduais durante a contagem na câmara de Fuchs-Rosenthal, deve-se conhecer as características de cada uma dessas células. Os eritrócitos se apresentam com um contorno regular, com halos e centro da célula limpo. Projeções finas e pontudas podem aparecer nos casos de eritrócitos crenados. Os leucócitos, por sua vez, apresentam um aspecto granular e são levemente refringentes. Pode, também, ocorrer a presença de células teciduais, que são geralmente grandes e granulares e com contorno irregular, as quais não devem ser incluídas na contagem, assim como as células lisadas (33, 38).

Caso tenha ocorrido acidente de punção no momento da coleta, deve ser realizada a correção da contagem celular, a qual é realizada por cálculos. Primeiramente, calcula-se a quantidade de leucócitos introduzidos na amostra em virtude do acidente puncional, multiplicando-se o número de leucócitos do sangue (obtido em hemograma) pelo número de hemácias presente no LCR, dividido pelo número de hemácias presentes no sangue (também obtido em hemograma). O resultado é subtraído do número de leucócitos obtidos na

Tabela 1 - Procedimento de contagem global de células em câmara de Fuchs-Rosenthal, de acordo com a celularidade presente na amostra

Celularidade	Procedimento de contagem
Baixa	Contar os 16 quadrados maiores e dividir por 3,2.
Intermediária	Contar 4 quadrados maiores, multiplicar por 4 e dividir por 3,2.
Alta	Contar um quadrado maior, multiplicar por 16 e dividir por 3,2.
Altíssima (sobreposição de células)	Fazer diluição com salina ou líquido de Türk (para leucócitos) e multiplicar o resultado final pelo fator da diluição.
Alta quantidade de hemácias	Contar um quadrado menor, multiplicar por 256 e dividir por 3,2.

Fonte: COMAR, 2009 (33).

contagem, obtendo-se, assim, o valor corrigido de leucócitos da amostra (30).

O sangue periférico introduzido no LCR após uma punção traumática resulta em um aumento artificial da contagem global de leucócitos, na proporção de um leucócito para cada 500 a 1000 eritrócitos no LCR. Esse fator de correção é acurado, contanto que a contagem de leucócitos oriundos do sangue periférico não seja extremamente baixa ou alta (16).

6. Controle de qualidade das contagens:

É de extrema importância a realização de um controle de qualidade das contagens em câmara, haja vista que elas podem sofrer muitas interferências, que comprometem os resultados. Contagens espúrias podem ser observadas quando ocorrem erros na diluição da amostra, na montagem e no preenchimento da câmara e na observação e identificação das células no microscópio ótico. O controle de qualidade da contagem global de células, em câmara de Fuchs-Rosenthal no LCR, pode ser feito diluindo-se uma amostra de sangue total pré-selecionada e comparando-se os resultados obtidos manualmente na câmara com os obtidos em analisadores hematológicos automatizados.

Para o controle da contagem de leucócitos, deve-se escolher uma amostra com menos de 1.000 leucócitos/ μ l, valor obtido em contagem automatizada, e fazer a contagem manual em câmara

de Fuchs-Rosenthal, de preferência diluindo-se a amostra em líquido de Türk, para hemolisar os eritrócitos, os quais são muito numerosos em uma amostra de sangue total. Para aferir a contagem de eritrócitos em câmara, deve-se preparar uma mistura de 50 μ l de sangue total e 4,95 ml de solução salina (1: 100). Na sequência, coloca-se essa solução no contador automático, para se obter a contagem de hemácias. Faz-se, então, a contagem manual da solução e, depois, comparam-se os resultados obtidos. Tais resultados devem ser concordantes em cerca de \pm 25% com os obtidos na contagem automatizada. Quinzenalmente, deve-se verificar se houve contaminação dos diluentes (líquido de Türk e solução salina), examinando-os em câmara de contagem com aumento de 40x. Os diluentes contaminados com partículas ou fungos devem ser descartados e novas soluções devem ser preparadas. Semestralmente, deve-se verificar a velocidade e o tempo de citocentrifugação, e, para isso, é preciso chamar o pessoal da manutenção (33).

Conforme for a celularidade da amostra de LCR, ela ainda pode ser analisada em um analisador hematológico e comparada com a contagem manual. Aulesa, Mainar, Prieto, Cobos e Galimany (40) mostraram que contagens de LCR com celularidade igual ou superior a 150/ μ l, em analisador hematológico Bayer Advia 120, obtiveram boa correlação ($r = 0,958$) com a contagem manual em câmara. Nesse mesmo trabalho, os autores também demonstraram que a contagem diferencial de neutrófilos manual e automatizada se correlaciona e pode ser intercambiável. A fim de aumentar a qualidade das análises de LCR, os laboratórios devem se filiar a programas de controle de qualidade externos, que incluam métodos de análise de amostras de líquido cefalorraquidiano.

A confecção da lâmina deve ser repetida, caso não seja encontrado um número razoável de leucócitos na lâmina. Para verificar a qualidade das lâminas confeccionadas, principalmente em amostras com contagens baixas de leucócitos, deve-se correlacionar o número total de leucócitos encontrados na lâmina com a contagem global (Tabela 2).

7. Contagem diferencial de leucócitos: A contagem diferencial de leucócitos é uma etapa fundamental da análise laboratorial, pois, conforme a linhagem celular predominante nessa contagem, estabelece-se uma conduta terapêutica adequada, de acordo com o significado clínico

Tabela 2 - Correlação entre o número de células encontradas na lâmina e a contagem global de leucócitos

Número de leucócitos/ μ l contados na câmara	Número de células que devem estar presentes na lâmina após a citocentrifugação
0	0 - 40
1 - 5	20 - 100
6 - 10	60 - 150
11 - 20	150 - 250
20	250

Fonte: COMAR, 2009 (33).

desse resultado (Tabela 3). Porém, para uma melhor conduta médica, a contagem global e diferencial de leucócitos no LCR não deve ser usada isoladamente, na tentativa de distinguir entre meningite viral, bacteriana, fúngica ou tuberculosa. A condição clínica do paciente, assim como outros parâmetros do LCR, deve ser levada em consideração na formulação do diagnóstico e do tratamento (41).

A confecção da lâmina para leitura pode ser feita de diferentes formas: por centrifugação em tubo, em câmara de Suta ou por citocentrifugação. Quando o método de escolha é a citocentrífuga, utiliza-se o líquido puro ou o sedimento obtido após centrifugação. Para melhorar a adesão das células à lâmina e reduzir sua distorção, pode ser adicionado ao sedimento 50 μ l de albumina bovina a 22% ou

Tabela 3 - Significado clínico de acordo com o predomínio celular obtido em contagem diferencial de leucócitos da amostra de LCR

Predomínio celular	Significado clínico
Linfócitos	Meningite viral, tuberculosa e fúngica. Ocasionalmente, em meningite bacteriana. Esclerose múltipla.
Neutrófilos	Meningite bacteriana, fase inicial de meningite viral, tuberculosa e fúngica. Hemorragia subaracnóidea, injeções intratecais, tumores meningeais.
Reação celular mista (linfócitos, neutrófilos e monócitos)	Meningite bacteriana parcialmente tratada, meningite bacteriana crônica, abscesso cerebral, meningite tuberculosa, meningite fúngica e meningite amebiana.
Eosinófilos	Infecções parasitárias, reações alérgicas, derivação ventricular.
Macrófagos	Meningite crônica, meningite bacteriana tratada, injeções intratecais e hemorragia subaracnóidea.
Macrófago eritrófago (contendo hemácias)	Hemorragia subaracnóidea (12 horas a 1 semana).
Macrófago siderófago (contendo hemossiderina)	Hemorragia subaracnóidea (2 dias a 2 meses).
Macrófago hematoidinóforo (contendo cristais de hematoidina)	Hemorragia subaracnóidea (2 a 4 semanas).
Macrófago lipófago (contendo gordura)	Necrose cerebral, infarto, anoxia e traumatismo craniano.
Plasmócitos	Células linfóides malignas.
Células linfóides malignas	Linfoma, leucemia.
Blastos	Linfoma, leucemia.
Outras células malignas	Tumor cerebral primário, tumor metastático.
Células endimais e do plexo coroide	Trauma, cirurgia, derivação ventricular, recém-nascidos e injeções intratecais.
Condrócitos	Punção traumática
Células da medula óssea	Punção traumática.
Agrupamentos de células imaturas, semelhantes a blastos	Hemorragia subaracnóidea em prematuros e recém-nascidos, possivelmente originadas da matriz germinal.

Fonte: KJELDSBERG; KNIGHT, 1992 (38).

mesmo de plasma de uma amostra normal. Coloca-se 100 μ l da amostra no tubo cônico, de acordo com o manual de instrução da citocentrífuga que será utilizada. O líquido sobrenadante é absorvido pelo papel-filtro, concentrando as células presentes na amostra. Após a citocentrifugação, deve-se aguardar a secagem completa da lâmina e, então, realizar a coloração com qualquer corante hematológico, sendo o mais utilizado o corante *May Grünwald-Giemsa* (33).

A confecção da lâmina em câmara de Suta é um processo mais trabalhoso, porém, fornece uma lâmina de boa qualidade. Essa câmara de sedimentação possui um sistema de filtros de papel que absorve a parte líquida do LCR, concentrando as células. A quantidade de líquido a ser colocado na câmara para a confecção da lâmina depende da quantidade de leucócitos presentes na amostra (Tabela 4). A lâmina é introduzida na câmara e, sobre ela, coloca-se um papel absorvente, o qual deve conter um halo de diâmetro discretamente menor do que o diâmetro do tubo conector da câmara. O tubo conector deve ser rosqueado na base até tocar a lâmina. Em seguida, coloca-se na câmara o volume de LCR necessário e espera-se a lâmina secar. Somente após a secagem, retira-se o tubo conector e o papel absorvente de cima da lâmina e realiza-se a coloração com corante hematológico, usualmente a coloração de *May Grünwald-Giemsa* (33).

Após a confecção e a coloração da lâmina, deve-se proceder à contagem diferencial das células em objetiva de imersão (100x). Caso a lâmina contenha muita sobreposição de células, deve-se

confeccionar nova lâmina, utilizando uma diluição apropriada. Pode ocorrer, após citocentrifugação, distorção nas células, as quais podem apresentar formação de vacúolos e projeções citoplasmáticas, fendas nucleares, nucléolos proeminentes e agrupamentos celulares semelhantes à neoplasia (33). É fundamental que todos os profissionais envolvidos no processo tenham conhecimento técnico, responsabilidade e compromisso com a adoção de procedimentos que identifiquem precocemente a existência de quaisquer não conformidades, para que elas sejam imediatamente corrigidas, no sentido de se evitar o erro laboratorial e o consequente erro de conduta terapêutica, que pode causar danos severos ao paciente (30). A Tabela 5 descreve os valores de referência da análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano.

8. Detecção de células malignas no

LCR: A detecção de células malignas por meio da análise citológica do LCR é uma ferramenta muito importante no diagnóstico de tumores cerebrais. Nos últimos 10 anos, tem-se verificado uma elevação na incidência de carcinomas leptomenigeais e, por conseguinte, um aumento na importância clínica do seu correto diagnóstico. Avanços científicos como a imagem de ressonância magnética, os ensaios para marcadores tumorais, a amplificação do DNA, a citometria de fluxo e as técnicas imunohistoquímicas estão, agora, disponíveis para facilitar o diagnóstico. Apesar desses avanços, o método de referência para a detecção desses carcinomas ainda é a identificação citológica de células malignas no LCR (41).

Acredita-se que a taxa de detecção de células malignas por análise citológica é influenciada por alguns fatores, incluindo o volume de LCR obtido, o local da amostragem, a frequência da retirada do LCR e a rapidez com que as amostras chegam ao laboratório. O volume insuficiente é uma possível explicação para análises citológicas falso-negativas. Glantz, Col e Glantz (42) sugeriram que as taxas de resultados falso-negativos diminuiriam de 32% para valores próximos de 3%, enquanto o volume de amostra aumentou de 2,5 ml para 10,5 ml, respectivamente.

Como ocorre a perda de células em função do tempo após a coleta, a refrigeração da amostra é recomendada se um atraso na análise citológica é esperado. Porém, deve-se evitar realizar coletas em fins de semana e em feriados. Sugere-se que a obtenção da amostra ocorra durante tempos de processamento usuais (41).

Tabela 4 - Correlação entre o número de células encontradas na lâmina e a contagem global de leucócitos

Contagem global (/ μ l)	Volume a ser utilizado na câmara (ml)
10 - 50	1,5 - 2,0
50 - 100	1,2 - 1,8
100 - 200	1 - 1,5
200 - 500	0,8 - 1,0
500 - 1000	0,5 - 0,8
> 2000	0,2 - 0,3

Fonte: KJELDSBERG; KNIGHT, 1992 (38).

Tabela 5 - Valores de referência do LCR

Parâmetro	Valor de referência
Cor	Incolor
Aspecto	Límpido
Proteínas totais	Adultos: 15 - 45 mg/dl Adultos > 60 anos: 15 - 60 mg/dl Neonatos: 15 - 100 mg/dl
Albumina	10 - 30 mg/dl
Glicose	50 - 80 mg/dl
Ácido láctico	9,0 - 26,0 mg/dl; 1,13 - 3,23 mmol/l
Cloretos	115 - 130 mmol/l
LDH	0 - 25 U/l LDH 1 > LDH 2 > LDH 3 > LDH 4 > LDH 5
Glutamina	15 - 20 mg/dl
Leucócitos	< 1 ano: 0 - 30 / μ l 1 a 4 anos: < 20 / μ l 5 anos até puberdade: < 10 / μ l Adultos: 0 - 5 / μ l
Citologia diferencial	Adultos Linfócitos: 60% \pm 20% Monócitos: 30% \pm 15% Neutrófilos: 2% \pm 4% Neonatos Linfócitos: 20% \pm 15% Monócitos: 70% \pm 20% Neutrófilos: 4% \pm 4%

Fonte: KJELDSBERG; KNIGHT, 1992 (38).

As células malignas são vertidas no LCR periodicamente. Consequentemente, uma única amostragem pode não detectar a malignidade. Na literatura, há muita discussão a respeito do número ideal de amostras de LCR que devem ser analisadas (41).

9. Biossegurança: Em virtude de o LCR se tratar de um material altamente contaminante, torna-se necessária a utilização dos equipamentos de proteção individual (EPIs), como avental ou jaleco longo de mangas compridas e punho retrátil, luvas descartáveis, óculos de proteção, pipetadores manuais ou automáticos e, quando for o caso, protetor facial. O ideal seria que todos os laboratórios possuíssem uma câmara de fluxo laminar vertical, para maior proteção do operador.

Referências

1. Jones HC. Review of "The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier" by Wei Zheng and Adam Chodobski (Editor). *Cerebrospinal Fluid Research*. 2006;3:12.
2. Skipor J, Thierry J. The choroid plexus - cerebrospinal fluid system: undervalued pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(3):414-28.
3. Johanson CE, Duncan III JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008;5:10.
4. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol*. 2005;71:1-52.
5. Silverberg GD, Heit G, Huhn S, Jaffe RA, Chang SD, Bronte-Stewart H, et al. The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. *Neurology*. 2001;57(10):1763-6.
6. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J*. 2005;19(1):76-8.
7. Weaver C, McMillan P, Duncan JA, Stopa E, Johanson C. Hydrocephalus disorders: their biophysical and neuroendocrine impact on the choroid plexus epithelium. *Adv Mol Cell Biol*. 2004;31:269-293.
8. Torzewski M, Lackner KJ, Bohl J, Sommer C. *Integrated cytology of cerebrospinal fluid*. Berlin: Springer; 2008.
9. Egnor M, Zheng L, Rosiello A, Gutman F, Davis R. A model of pulsations in communicating hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg*. 2002;36(6):281-303.
10. Stoquart-Elsankari S, Baledent O, Gondry-Jouet C, Makki M, Godefroy O, Meyer ME. Aging effects on cerebral blood and cerebrospinal fluid flows. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(9):1563-72.

11. Rennels ML, Blaumanis OR, Grady PA. Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. *Adv Neurol.* 1990;52:431-9.
12. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, Herkenhan M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience.* 2000;95(2):577-92.
13. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 2):R818-23.
14. Zakharov A, Papaiconomou C, Koh L, Djenic J, Bozanovic-Sosic R, Johnston M. Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. *Microvasc Res.* 2004;67(1):96-104.
15. Luedemann W, Kondziella D, Tienken K, Klinge P, Brinker T, Berens Von Rautenfeld D. Spinal cerebrospinal fluid pathways and their significance for the compensation of kaolin-hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl.* 2002;81:271-3.
16. Sechusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *American Family Physician.* 2003;68(6):1103-8.
17. Pinto JRC. Simulação hidrodinâmica e caracterização experimental de mecanismos anti-sifão em sistemas de drenagem externa de líquido cefalorraquidiano. [acesso em 19 fev. 2009]. Disponível em: http://www.dem.feis.unesp.br/posgraduacao/tesespdf/joseriocardocamilopinto/capitulo_1.pdf.
18. Pople IK. Hydrocephalus and shunts: what the neurologist should know. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73(Suppl 1):i17-22.
19. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, Mcguire D. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. *Lancet Neurol.* 2003;2(8):506-11.
20. Sotelo J, Izurieta M, Arriada N. Treatment of hydrocephalus in adults by placement of an open ventricular shunt. *J Neurosurg.* 2001;94(6):873-9.
21. Ennis SR, Keep RF. The effects of cerebral ischemia on the rat choroid plexus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(5):675-83.
22. Almeida SM, Nogueira MB, Raboni SM, Vidal LC. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(5):489-95.
23. Ferreira WF, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2001.
24. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. 2a ed. Rev. Ampl. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2006.
25. Vieira JFS. Incidência de meningite em pacientes de 0-12 anos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus. *Arquivo de Neuropsiquiatria.* 2001;59(2A):249-55.
26. Puccioni-Sohler M, Machado LR, Canuto R, Takayanagui OM, Almeida SM, Livramento JA. Coleta do líquido cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa. *Arquivo de Neuropsiquiatria.* 2002;60(3-A):681-4.
27. American Academy of Neurology. Report of the Quality Standards Subcommittee. Practice parameters: lumbar puncture. *Neurology.* 2005;65:510-2.
28. Portela LA, Souza V, Pahl FH, Cardoso AC, Vellutini Ede A, Mutarelli EG, et al. Laceration of the posterior inferior cerebellar artery by suboccipital puncture of the cisterna magna: case report. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62(3B):882-4.
29. Henry, J. Diagnósticos clínicos e tratamento por método laboratorial. 20a ed. São Paulo: Manole; 2008.
30. Melo CL, Martins AMC, Martins RD, Queiroz MGR. Análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano. *RBAC.* 2003;35(3):109-12.

31. Strasinger SK. Uroanálise e fluidos biológicos. 3a ed. São Paulo: Premier; 2000.
32. Moura RAA. Colheita de material para exams de laboratório. São Paulo: Atheneu; 1998.
33. Comar SR. Procedimento operacional padrão: roteiro para análise de líquido cefalorraquidiano. Curitiba: Hospital das clínicas – Universidade Federal do Paraná; 2009.
34. Lima AO. Método de laboratório aplicado a clínica: técnica e interpretação. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
35. Arora S, Swadron SP, Dissanayake V. Evaluating the sensitivity of visual xanthochromia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Emerg Med.* 2008.
36. Reis JB, Bei A, Reis Filho JB. Líquido Cefalorraquiano. São Paulo: Sarvier; 1980.
37. Edlow JA. Diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2005;2(2):99-109.
38. Kjeldsberg C, Knight J. Body Fluids: laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & synovial fluids. 3a ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1992.
39. Shah KH, Edlow JA. Distinguishing traumatic lumbar puncture from true subarachnoid hemorrhage. *J Emerg Med.* 2002;23(1):67-74.
40. Aulesa C, Mainar I, Prieto M, Cobos N, Galimany R. Use of the advia 120 hematology analyzer in the differential cytologic analysis of biological fluids (Cerebrospinal, Peritoneal, Pleural, Pericardial, Synovial, and Others). *Laboratory Hematology.* 2003;9(4):214-224.
41. Jerrard DA, Hanna JR, Schindelheim GL. Cerebrospinal fluid. *J Emerg Med.* 2001;21(2):171-8.
42. Glantz M, Cole B, Glantz L. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer.* 1998;82(4):733-9.

Recebido: 04/09/2009

Received: 09/04/2009

Aprovado: 15/12/2009

Approved: 12/15/2009