

MANOELA LIRA REIS

INVESTIGAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS PRESENTES
NOS LÍQUIDOS CAVITÁRIOS PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL ENTRE AS EFUSÕES MALIGNAS E AS
BENIGNAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia, Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva

Coorientação: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes

FLORIANÓPOLIS
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

LIRA-REIS, Manoela

INVESTIGAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS PRESENTES NOS LÍQUIDOS CAVITÁRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE EFUSÕES MALIGNAS E AS BENIGNAS / Manoela Lira Reis; orientador, Maria Cláudia Santos da Silva; co-orientador Ana Carolina Rabello de Moraes - Florianópolis, SC, 2015.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Citometria de Fluxo. 3. Cavidades serosas. 4. Efusões malignas. 5. Efusões benignas. I. Santos-Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Aprovação

Dedico este trabalho aos meus pais, às minhas irmãs e ao Lucas,
meus grandes incentivadores e amores.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora, Dr.a Maria Cláudia Santos da Silva, por sua amizade, pela oportunidade e por todos os anos de ensinamentos, além da sua orientação, não somente durante o mestrado, mas em todos os anos de vida acadêmica que me levaram a chegar a esta etapa tão importante da minha vida.

À professora coorientadora, Dr.a Ana Carolina Rabello de Moraes, que foi além da sua amizade e demonstrou grande apoio ao compartilhar seu conhecimento técnico e científico essenciais para a conclusão deste estudo.

À professora Dr.a Maria Luiza Bazzo, que proporcionou apoios de infraestrutura e científico para a realização deste estudo.

À bioquímica Adriana Scotti, pela colaboração nos experimentos que envolviam Citologia.

Ao professor Marcos, pelas orientações estatísticas.

Ao Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), em especial ao médico Fábio May, pela colaboração no estudo.

Ao setor de Patologia Clínica do Hospital Universitário da UFSC, em especial à minha amiga e futura médica Aline Costa e à Dr.a Tereza Figueredo, pela colaboração nos experimentos que envolviam imunocitoquímica.

À aluna de iniciação científica Rafaela Pilon, sua dedicação e suporte técnico foram de grande importância para a realização deste e de outros trabalhos.

Ao mestrando Alisson Bigolin, pelas horas dedicadas às resoluções dos mais variados problemas que naturalmente surgiram no decorrer deste estudo.

À mestranda Mariangeles Aut e à doutoranda Renata Rudolf, por suas contribuições nos experimentos que envolviam citometria de fluxo.

Aos integrantes do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) e do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM), em especial Lorena, Christiane Coelho, Daiane, Amanda Jacques, Camila Matiollo, Íris, Chandra, Taiane, Leticia, Lica e Marcos. Além de uma ótima equipe de trabalho, são amigos que levarei para sempre comigo.

Aos funcionários da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário (DACL/HU-UFSC) Vera, Mari, Angela, Cristina, Hérico, Patrícia e, principalmente, o funcionário Luis Mota, que, além de auxiliar no recebimento das amostras, forneceu bons almoços, lanches e uma boa conversa nos momentos mais corridos da rotina.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e aos demais órgãos (CNPq, Capes, Projeto e Fapeu).

Às amigas com quem tive a honra de trabalhar no decorrer desta jornada e que prosseguiram suas vidas com sucesso Pâmela Gaspar, Michelle Baldoni, Marley Marzarotto e Karina Machado, vocês são exemplos de profissionalismo, competência e diversão.

Ao meu noivo, Lucas Zequinão, que foi mais que um companheiro, foi um grande parceiro que sempre me apoiou nos momentos felizes e nos não tão felizes que sabemos que fazem parte desta caminhada. Seus conselhos e sua paciência foram fatores importantes neste trabalho. Te amo e obrigada por fazer parte da minha história!

Aos meus sogros, Aime e Luis Tadeu (e toda a sua família), que são pessoas por quem tenho imenso carinho e que sempre torceram por mim. Agradeço pelo acolhimento e suporte não somente nesta jornada, mas em todos esses anos de relacionamento.

Às minhas queridas irmãs e cunhados Marcela, Rafaela, Angelo e Martim, pela constante torcida pelo meu sucesso e, principalmente, pela conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Moacir e Fátima, meus grandes guerreiros, meus exemplos de disciplina e persistência que muito se empenharam e dedicaram parte de suas vidas, inclusive acordando de madrugada, felizes e orgulhosos, para que eu pudesse chegar até aqui. Meu amor por vocês é incondicional e não há palavras que expressem o quanto eu sou grata por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. De todos os conhecimentos que adquiri nessa minha jornada, foi com vocês que aprendi os mais valiosos, vocês são meus grandes tesouros!

Por fim, agradeço a todos os familiares, amigos e colegas, que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo.

A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou.

Albert Szent-Györgyi

REIS, Manoela Lira. **Investigação do fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas**. 2015. 84 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

RESUMO

As membranas serosas pleurais, peritoneais e pericárdicas são aquelas que envolvem, respectivamente, as superfícies do pulmão, da cavidade abdominal e do coração. Em condições patológicas, uma quantidade maior de líquido se acumula nessas cavidades formando um processo denominado efusão cavitária. Efusões cavitárias malignas são definidas como a presença de células malignas nas cavidades serosas. Recentes estudos mostram que a análise multiparamétrica por citometria de fluxo é uma metodologia sensível e rápida que permite avaliar um grande número de células com diferentes marcadores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários e analisar a sua importância como marcadores fenotípicos para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas. A primeira etapa deste trabalho consistiu em padronizar a marcação e a análise das amostras de efusões serosas por citometria de fluxo. Após a padronização, a celularidade de 65 amostras de líquidos cavitários foi avaliada por citometria de fluxo e comparada com a avaliação da morfologia por microscopia de luz, a qual é metodologia considerada padrão ouro para análise desses líquidos. A etapa seguinte consistiu em avaliar a eficiência dos marcadores Ber-EP4, TTF-1, Vimentina, GCFPD-15, CK7 e CK20 utilizados na imunocitoquímica para diferenciar as células reacionais das neoplásicas por citometria de fluxo em líquidos pleurais. Apesar do pequeno número de amostras analisadas (n=18), foi possível concluir que o painel de anticorpos padronizado neste estudo é útil para distinguir as células neoplásicas das normais e, com isso, fazer o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas. No entanto, mais estudos com um número maior de amostras serão necessários para o estabelecimento da metodologia na rotina laboratorial de investigação de células neoplásicas.

Palavras-chave: Diagnóstico. Efusões. Citometria de fluxo.

REIS, Manoela Lira. **The investigation of cells phenotype present on the cavity fluid for the differential diagnosis between malignant and benign effusions.** 2015. 84 p. Dissertation (Master's degree in Pharmacy) – Postgraduation Program of Pharmacy, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ABSTRACT

The pleural, pericardial and peritoneal membranes are respectively engaging the lung, abdominal cavity and the heart surfaces. Under pathological conditions, a great quantity of fluid accumulates in these cavities forming a process known as cavity effusions. Malignant effusions are defined as the presence of malignant cells in the serous cavity. Recent studies have shown that the multi-parameter flow cytometric analysis is a sensitive method, which allows quick evaluation of a large number of cells with different markers. Thus, the aim of this study was to assess the phenotype of these cells in the cavity fluids, besides analyzing their importance as phenotypic markers for the differential diagnosis of malignant and benign effusions. The first stage of this work was to standardize the measurement and the analysis of samples of serous effusions by flow cytometry. After standardization, the cellularity from 65 samples of serous fluid was evaluated by flow cytometry and compared with the assessment of morphology by light microscopy, which is considered the gold standard methodology for analysis of liquids. The next step was to evaluate the efficiency of the Ber-EP4, TTF-1, Vimentina, GCFPD-15, CK7 and CK20 markers used in immunocytochemistry to differentiate reactions from neoplastic cells by flow cytometry in pleural fluids. Despite the small number of samples (n = 18), the results showed that the standard antibody panel in this study is useful to distinguish cancer from normal cells and, as a result, it is possible to make the differential diagnosis of malignant and benign effusions. However, further studies with a larger number of samples are needed to establish the methodology in laboratory investigation of cancer cells routine.

Key-words: Flow cytometry. Effusions. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações morfológicas malignas	24
Figura 2 – Dinâmica de funcionamento do citômetro de fluxo	26
Figura 3 – Causas da efusão ascítica	47
Figura 4 – Perfil dos pacientes cirróticos do estudo	47
Figura 5 – Etapa de eliminação dos <i>doublets</i>	48
Figura 6 – <i>Dot plot</i> das subpopulações leucocitárias em amostra de líquido cavitário	49
Figura 7 – <i>Dot plots</i> da amostra de sangue periférico marcada com os anticorpos utilizados para a investigação de células neoplásicas	50
Figura 8 – Expressão positiva do anticorpo TTF-1 conjugado com o fluorocromo FITC em células A549	51
Figura 9 – Expressão do marcador Ber-EP4 (+) em células de um paciente com diagnóstico de carcinoma de Merkel	52
Figura 10 – Figura ilustrativa das subpopulações leucocitárias analisadas por citometria de fluxo em amostras de líquido cavitário	53
Figura 11 – Representação gráfica de Passing-Bablok para as subpopulações leucocitárias	56
Figura 12 – Gráfico de Bland-Altman	57
Figura 13 – Perfil imunofenotípico da amostra de um paciente diagnosticado com efusão pleural maligna	63
Figura 14 – Expressão dos marcadores TTF-1 e CK20 em células de um paciente com diagnóstico de efusão maligna	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais doenças causadoras de ascite	21
Quadro 2 – Marcadores imuno-histoquímicos/imunocitoquímicos utilizados em amostras de efusões malignas	28
Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo	37
Quadro 4 – Anticorpos e fluorocromos utilizados no estudo	39
Quadro 5 – Avaliação das amostras com suspeita maligna	62
Quadro 6 – Painel de marcadores utilizados na imunocitoquímica para detecção de efusão pleural maligna em um dos pacientes com diagnóstico de carcinoma pulmonar	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de referência utilizados pelo Setor de Hematologia no DACL/HU-UFSC.....	42
Tabela 2 – Perfil dos pacientes com efusão pleural segundo o gênero.....	45
Tabela 3 – Perfil dos pacientes com efusão ascítica segundo o gênero.....	46
Tabela 4 – Média \pm DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outras células não hematopoiéticas presentes em amostras de líquidos pleurais, obtidas pelas técnicas de microscopia de luz e de citometria de fluxo	54
Tabela 5 – Média \pm DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outras células não hematopoiéticas presentes em amostras de líquidos ascíticos, obtidas pelas técnicas de microscopia de luz e de citometria de fluxo	54
Tabela 6 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos pleurais reacionais	58
Tabela 7 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos pleurais malignos.....	59
Tabela 8 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos ascíticos	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Contagem de células em líquidos cavitários.....	41
Equação 2 – Cálculo para fator volume	41
Equação 3 – Cálculo da contagem de células.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Cluster Differentiation
Células NK	Células Natural Killers
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CF	Citometria de Fluxo
CK-20	Citoqueratina 20
CK-7	Citoqueratina 7
DACL	Divisão de Análises Clínicas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Efusão Cavitária
FISH	Hibridização <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GCFDP-15	Gross Cystic Disease Fluid Protein 15
HCl	Ácido Clorídrico
HU	Hospital Universitário
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MLPA	Amplificação <i>multiplex</i> por sondas de ligação
SSC	Side Scatter
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTF-1	Fator de Transcrição da Tireoide-1
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CAVIDADES SEROSAS	19
2.2 EFUSÕES CAVITÁRIAS REATIVAS (BENIGNAS).....	20
2.3 EFUSÕES CAVITÁRIAS MALIGNAS	22
2.4 ANÁLISE CITOLÓGICA DAS EFUSÕES CAVITÁRIAS	23
2.5 CITOMETRIA DE FLUXO	24
2.6 MARCADORES UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PRESENTES EM EFUSÕES CAVITÁRIAS.....	26
CAPÍTULO 3 OBJETIVOS	33
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICOS	33
CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	35
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS	36
4.4 CITOMETRIA DE FLUXO	36
4.4.1 Anticorpos monoclonais.....	36
4.4.2 Processamento dos líquidos cavitários para análise por citometria de fluxo	37
4.4.3 Controle de qualidade	39
4.4.4 Células de cultura celular	40
4.4.5 Análise dos dados pelo <i>software</i> Infinicyt®	40
4.5 MORFOLOGIA	40
4.5.1 Citologia.....	40
4.5.2 Citologia quantitativa dos líquidos cavitários	41
4.5.3 Cálculos da análise quantitativa	41
4.5.4 Citologia diferencial dos líquidos cavitários	42
4.6 IMUNOCITOQUÍMICA	43
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
CAPÍTULO 5 RESULTADOS	45
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA	45

5.2 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DOS LÍQUIDOS CAVITÁRIOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	47
5.2.1 Validação dos anticorpos para análise por citometria de fluxo	48
5.2.2 Padronização da determinação da celularidade dos líquidos cavitários por citometria de fluxo	52
5.2.3 Análise das efusões pleurais malignas por citometria de fluxo	61
CAPÍTULO 6 DISCUSSÃO	65
CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES	69
CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	82
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP SH	83
ANEXO B – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA CEP/CEPON	84

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

As membranas serosas (MS) pleurais, peritoneais e pericárdicas são aquelas que envolvem, respectivamente, as superfícies do pulmão, da cavidade abdominal e do coração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essas são delimitadas por dois folhetos contínuos de células mesoteliais justapostos como uma “bolsa”, no interior da qual flui uma pequena quantidade de líquido cavitário (LC), ou líquido seroso, com volume necessário para lubrificar os folhetos que se movem um sobre o outro como resultado dos movimentos de respiração, do peristaltismo intestinal e dos batimentos cardíacos (CIBAS, 2009). Em condições patológicas, uma quantidade maior de líquido se acumula nessas cavidades, formando um processo conhecido como derrame ou efusão cavitária (EC). O espaço, considerado virtual, de 5 a 10 μm , que normalmente separa essas lâminas, amplia-se de acordo com a quantidade de líquido formada anormalmente (GRAY; KOCJAN, 2010; LIBERTI, 2001).

As condições patológicas que levam à ocorrência desse tipo de quadro clínico são multifatoriais e, em geral, são condições secundárias a processos benignos ou malignos (quando no líquido há presença de células malignas) (ROBBINS; COTRAN, 2010; RYU et al., 2014). Nas efusões consideradas benignas, as condições mais comuns observadas são insuficiência cardíaca congestiva, pneumonia, tuberculose, embolia pulmonar, cirrose hepática, síndrome nefrótica, insuficiência renal, inflamações do pericárdio, doenças pancreáticas ou reações à radioterapia e diálise (CASTRO; ROSENBERG, 2005; KOPCINOVIC; CULEJ, 2014). Os tumores sólidos, tais como câncer de mama, pulmão, ovário, órgãos do sistema gástrico e neoplasias hematológicas, como os linfomas, todos em fase de metástase, estão entre as maiores causas de efusões malignas. Na realidade, qualquer neoplasia maligna, como os raros tumores do sistema nervoso central, podem ocasionar uma efusão. Sendo assim, a diferenciação entre as efusões malignas e as benignas, em alguns casos, tornou-se um problema para a conclusão do diagnóstico desses pacientes (LONGATTO FILHO et al., 1999; MARTINEZ-VEA et al., 1982; SHIDHAM; ATKISON, 2007).

Infelizmente, mesmo com o advento de critérios específicos e da aplicação de novas técnicas diagnósticas, cerca de 10% a 20% dos derrames pleurais, por exemplo, ainda permanecem sem diagnóstico etiológico definido depois de esgotados os métodos diagnósticos

atualmente disponíveis e, por isso, são considerados como efusões de origem indeterminada (GENOFRE; CHIBANTE; MACEDO, 2006). Nos casos em que a etiologia é desconhecida ou duvidosa, torna-se necessário realizar a punção do líquido com a finalidade de submetê-lo às análises laboratoriais, tais como avaliações bioquímica, hematológica, citopatológica e microbiológica. Os diversos parâmetros da amostra são avaliados a fim de se investigar a real causa que desencadeou a efusão no paciente (BAMMANN, 2001; GENOFRE; CHIBANTE; MACEDO, 2006; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Os critérios morfológicos têm sido exaustivamente revistos com o objetivo de otimizar a conclusão do diagnóstico e diminuir os índices de resultados falsos, tanto negativos quanto positivos (LONGATTO FILHO, 1999). Na maioria dos casos, apenas esses critérios não são suficientes para a conclusão do diagnóstico; e a realização das análises de imunocitoquímica é indispensável para uma correta identificação diagnóstica. Contudo, essa metodologia inclui diversas etapas, o que gera atraso no diagnóstico e no tratamento dos pacientes oncológicos (AFSHAR-MOGHADDAM; HEIDARPOUR; DASHTI, 2014). Estudos mostram que a análise multiparamétrica por citometria de fluxo é uma metodologia mais sensível, rápida e que permite avaliar um grande número de células em diferentes marcadores (GOLIM et al., 2007). Assim, o foco deste trabalho foi padronizar e implantar um método para avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários e analisar a sua importância como marcadores fenotípicos para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas.

CAPÍTULO 2 REVISÃO DE LITERATURA

As superfícies dos pulmões, do coração e de órgãos localizados na cavidade abdominal são delimitadas por uma fina camada de células denominadas mesoteliais, que, justapostas como uma dupla membrana, constituem as maiores cavidades corporais humanas, são elas: as cavidades pleurais, pericárdica e peritoneal, respectivamente. O espaço formado pelas células mesoteliais são considerados virtuais, estando as membranas formadas por essas células em íntimo contato entre si, deslizando uma sobre a outra nos diversos movimentos das vísceras e das paredes das cavidades em que se situam (CHARALAMPIDIS et al., 2015; KOSS, 2006).

2.1 CAVIDADES SEROSAS

As três cavidades serosas corporais pleurais, pericárdica e peritoneal, além de possuírem a mesma origem embrionária (origem mesodérmica), têm basicamente a mesma constituição. Elas são formadas por uma lâmina de tecido conjuntivo rico em fibras elásticas, no qual se encontram vasos sanguíneos e linfáticos, e ainda por um revestimento mesotelial voltado para a cavidade na qual se encontra a serosa. O revestimento mesotelial é composto de uma fina camada de células planas denominadas células mesoteliais (KOSS, 2006; LIBERTI, 2001).

A camada mesotelial foi descrita pela primeira vez por Bichat, em 1827, e, apesar da sua descoberta e descrição precoce, foi apenas nos últimos anos que sua importância, tanto em indivíduos saudáveis quanto em estados patológicos, tem sido relatada. Atualmente, sabe-se que sua função não se limita apenas a ser uma camada protetora dos órgãos corporais, ela é ainda uma estrutura dinâmica e complexa, relacionada a respostas a lesões, infecções, inflamações e doenças malignas (MUTSAERS, 2002).

Os vasos linfáticos são componentes essenciais do sistema de absorção dos fluidos presentes nessas cavidades e comunicam-se com a superfície da membrana serosa através de aberturas entre as células mesoteliais, o que assegura uma continuidade entre o sistema linfático e as cavidades serosas. Qualquer desequilíbrio na homeostase desse sistema resulta no acúmulo maior de líquido e no aparecimento do derrame ou da efusão cavitária (SHIDHAM; ATKISON, 2007).

As efusões cavitárias são classificadas clinicamente como transudato ou exsudato. Os transudatos surgem como o resultado de um desequilíbrio entre as pressões hidrostática e oncótica. O exsudato é o resultado do aumento da permeabilidade capilar, da diminuição da reabsorção linfática ou de uma injúria do mesotélio. Alguns autores ainda descrevem as efusões quilosas ou pseudoquilosas. As efusões quilosas surgem devido ao extravasamento do ducto torácico, muitas vezes secundário a rupturas, obstruções ou traumas. Em efusões prolongadas, a lise dos lipídeos presentes nos líquidos serosos forma as efusões pseudoquilosas (BAER; SMITH, 2001; ROBBINS; COTRAN, 2010; SHIDHAM; ATKISON, 2007).

Há diversos fatores que podem desencadear uma efusão cavitária, assim, ao analisar um líquido seroso, podemos encontrar diversos processos que vão desde processos inflamatórios simples, com um mesotélio reativo, até um tumor primário das cavidades (mesotelioma), ou ainda, um derrame maligno de origem metastática (COSTA; DE AGUSTIN, 2003). A radiografia simples, a ultrassonografia, o ecocardiograma e a tomografia computadorizada podem confirmar a presença de uma efusão cavitária, porém somente com a análise laboratorial do líquido é que podemos determinar sua etiologia (MAJI et al., 2013).

2.2 EFUSÕES CAVITÁRIAS REATIVAS (BENIGNAS)

O diagnóstico etiológico das efusões pleurais é frequentemente um problema na prática clínica, sobretudo no que diz respeito à diferenciação entre casos malignos e benignos, devido à significativa diferença no tratamento e no prognóstico envolvidos (WAGNER et al., 2007). Define-se o derrame pleural parapneumônico como o acúmulo anormal de líquido na cavidade pleural secundária à pneumonia ou o abscesso pulmonar de etiologia bacteriana (excetuando-se *Mycobacterium tuberculosis*, que configura um derrame tuberculoso). O empiema pleural ocorre quando da presença de pus no espaço pleural, originalmente estéril (LETHEULLE et al., 2015; WAISBERG et al., 2011).

Com relação às efusões ascíticas consideradas benignas, embora a origem do líquido que acumula na cavidade peritoneal possa variar (plasma, bile, sangue, suco pancreático, líquido intestinal, linfa etc.), a grande maioria das ascites não malignas, cerca de 80% a 90% dos casos são atribuídos à cirrose hepática. O desenvolvimento da ascite é a consequência final de uma série de anormalidades anatômicas,

fisiopatológicas e bioquímicas que ocorrem em pacientes com cirrose (ANDRADE JÚNIOR et al., 2009). No Quadro 1 se observam as principais causas de ascites provocadas por processos não malignos, além da cirrose hepática.

Quadro 1 – Principais doenças causadoras de ascite

Doenças com hipertensão portal
Cirrose
Insuficiência hepática fulminante
Retardo/Obstrução ao fluxo de saída do sangue hepático
Insuficiência cardíaca congestiva
Pericardite constrictiva
Miocardiopatia restritiva
Síndrome de Budd-Chiari
Doença veno-oclusiva
Infecções
Tuberculose peritoneal
Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis
AIDS
Renal
Síndrome nefrótica
Nefrogênica em pacientes sob hemodiálise
Endócrina
Hipotireoidismo (mixedema)
Síndrome de Meig
Struma Ovarii
Síndrome de hiperestimulação ovariana
Pancreática
Biliar
Urinária
Lúpus eritematoso sistêmico
Miscelânea

Fonte: Adaptado de: ANDRADE JÚNIOR et al., 2009.

Já os derrames pericárdicos benignos estão relacionados a processos infecciosos (tuberculose, viral, bacteriana e fúngica),

metabólicos (uremia, induzida por drogas, hipotireoidismo e artrite reumatoide), radiação (terapias) (PALMA et al., 2009).

2.3 EFUSÕES CAVITÁRIAS MALIGNAS

Efusões cavitárias malignas são definidas como a presença de células malignas na cavidade serosa (JUNQUEIRA et al., 2007; SANGISETTY; THOMAS, 2012; SOUFEN et al., 1999). Essas células podem ser procedentes de qualquer um dos órgãos presentes no organismo; assim, qualquer neoplasia maligna, como os raros tumores do sistema nervoso central, pode envolver uma cavidade serosa e se manifestar como uma efusão maligna (SHIDHAM; ATKISON, 2007). Esse tipo de efusão é considerada o estágio terminal de diversas doenças malignas, e muitos pacientes nesse estágio raramente sobrevivem a um ano (COSTA; DE AGUSTIN, 2003; GRAY; KOCJAN, 2010; YAMADA; TAKEDA; MATSUMOTO, 1983).

A efusão pleural maligna é uma complicação comum que ocorre em cerca de 50% dos pacientes com neoplasias metastáticas frequentemente associada a carcinoma de pulmão, de mama, de ovário e a linfomas. A detecção de células malignas no líquido pleural ou na biópsia da pleura parietal significa disseminação ou progressão da doença primária, o que implica a redução da expectativa de vida dos pacientes com câncer. A média de sobrevida após o diagnóstico de derrame pleural metastático varia de três a 13 meses, dependendo do estágio e do tipo de tumor primário. O menor tempo de sobrevida é observado em casos de derrame pleural secundário a câncer de pulmão. Em contrapartida, a média de sobrevida maior é observada em pacientes portadores de derrame pleural secundário a câncer de ovário (JUNQUEIRA et al., 2007; TEIXEIRA; PINTO; MARCHI, 2006).

Ascites malignas ocorrem comumente em pacientes com cânceres de ovário, mama, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, linfoma e mesotelioma (ALMEIDA JUNIOR, 2004; SANGISETTY; THOMAS, 2012).

Assim como nas demais cavidades, as efusões malignas pericárdicas também caracterizam uma complicação neoplásica tardia. Os tumores metastáticos para o coração e o pericárdico apresentam incidência maior que os tumores primitivos do músculo cardíaco. Os carcinomas, dentre eles os carcinomas de pulmão, e os sarcomas (de qualquer localização) podem originar metástases para o coração e seus envoltórios. A disseminação por via linfática é responsável pela presença das metástases no pericárdio, no miocárdio, porém raramente

no endocárdio. No entanto, o acometimento do pericárdio representa maior gravidade a esses pacientes e, em geral, resulta na morte de até 83% dos casos (LIMA; CROTTI, 2004; SOUFEN et al., 1999).

Estudos relatam que determinadas substâncias produzidas pelas células neoplásicas parecem induzir danos funcionais e estruturais nas células mesoteliais, rompendo a barreira pleural, pericárdica e/ou peritoneal e provocando o extravasamento de líquido para o interior dessas cavidades. A produção de interleucinas pelas células tumorais também favorece a formação de efusões, como, por exemplo, a interleucina-6, que é tóxica para células mesoteliais. A sua produção aumentada em casos de carcinoma de mama está associada com a progressão da doença e com a frequência de metástases pleurais (COSTA; DE AGUSTIN, 2003; KOSS, 2006; NEGROMONTE FILHO, 2011).

Como visto anteriormente, a presença de células tumorais em líquidos cavitários é imprescindível para o diagnóstico diferencial entre um processo benigno e uma neoplasia. Sendo assim, a sua detecção influencia diretamente na escolha da conduta terapêutica e na avaliação prognóstica. Nessa linha de raciocínio, fica evidente a importância do diagnóstico precoce nessas efusões malignas. Para o diagnóstico, além da análise citológica, outros exames são sugeridos, como a dosagem de marcadores tumorais, as técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas e os marcadores de proliferação celular, a análise da ploidia de DNA por citometria de fluxo ou estática e ainda, mais recentemente, as técnicas de citogenética e de biologia molecular, como, por exemplo, a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e a técnica de amplificação *multiplex* por sondas de ligação – dependentes (MLPA) –, as quais são capazes de detectar alterações em regiões gênicas consideradas “alvo” para o desfecho neoplásico (HAROSKE et al., 2000; POLITI et al., 2005; TANG et al., 2015).

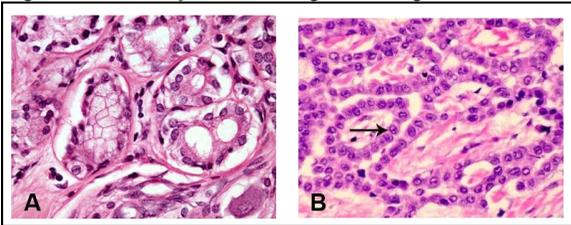
2.4 ANÁLISE CITOLÓGICA DAS EFUSÕES CAVITÁRIAS

A descoberta de células tumorais em líquidos cavitários ou em biópsias de membranas serosas por citologia é considerado o padrão ouro no diagnóstico de efusões malignas (TANG et al., 2015). A avaliação da citologia das efusões cavitárias foi o primeiro exame a ser realizado; no entanto, sua análise apresenta algumas dificuldades, como, por exemplo, nos casos em que o número de células é muito pequeno ou que a toracocentese foi de difícil punção, resultando em células com alterações morfológicas (YAHYA; ALI; HUSSEIN, 2013). Dessa

forma, embora o exame citológico seja altamente específico, sua sensibilidade em alguns estudos é considerada insatisfatória (GU et al., 2015).

Estudos relatam que, considerando todas as possibilidades de interpretação citomorfológica em uma efusão, em algumas situações torna-se um problema distinguir morfologicamente alguns tipos celulares. Por exemplo, uma das maiores dificuldades entre os citologistas é o diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma envolvendo as cavidades serosas e o mesotelioma (Figura 1). Além disso, há dificuldades na diferenciação entre a hiperplasia mesotelial e o adenocarcinoma; entre a hiperplasia mesotelial e o mesotelioma; entre o adenocarcinoma e o mesotelioma; entre as células linfoides reativas e os linfomas; e entre a histogênese das células neoplásicas e a origem do sítio primário das metástases (ALVES et al., 2001; POLITI et al., 2005; TANG et al., 2015).

Figura 1 – Alterações morfológicas malignas



Fonte: PATHPEDIA, 2015.

Nota: (A) Adenocarcinoma pulmonar; (B) Mesotelioma maligno.

O fato de que células benignas sofrem alterações morfológicas aos vários estímulos reacionais enquanto que células malignas podem parecer citologicamente células benignas (HAE-SEONG et al., 2014) torna a definição do diagnóstico, somente pelos achados morfológicos, muitas vezes inextinguível e, assim, outros exames complementares são necessários, tais como a imunocitoquímica, a citogenética e até a biologia molecular para que seja realizada a conclusão do diagnóstico (YAHYA; ALI; HUSSEIN, 2013).

2.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Por mais de um século, a observação de alterações celulares nas efusões tem sido utilizada como um método de alta especificidade diagnóstica. No entanto, mesmo com a estipulação de critérios

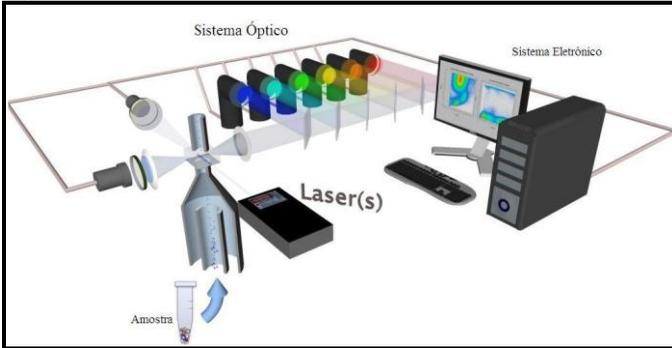
específicos e a aplicação de todos os métodos de diagnóstico disponíveis, cerca de 20% das efusões pleurais ainda permanecem sem diagnóstico etiológico definido e são classificadas como derrame de origem indeterminada. Isso ocorre porque, apesar de as neoplasias envolverem diferentes tipos celulares, muitas vezes, suas apresentações citológicas são semelhantes. Na tentativa de corrigir esse problema de identificação, novas metodologias foram desenvolvidas, dentre essas, pode-se citar a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Essa metodologia trouxe grandes contribuições, pois é capaz de caracterizar e diferenciar fenotipicamente populações de células anormais de normais, mesmo quando estas se encontram em baixo percentual na amostra (GENOFRE; CHIBANTE; MACEDO, 2006; MARTINS; GAGLIANI, 2008; OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

A citometria de fluxo é um método de mensuração em que as células, previamente marcadas com um anticorpo monoclonal ligado a uma substância fluorescente (fluorocromo) e suspensas em um meio líquido (solução salina isotônica), são aspiradas pelo citômetro de fluxo e injetadas em uma câmara de fluxo. Dessa forma, as células passam enfileiradas (Figura 2), uma a uma, por sensores que analisam características celulares, de maneira que, quando as células passam pela câmara de fluxo, o feixe de radiação de excitação, ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão na direção frontal (*forward scattering*) e lateral (*side scattering*). A radiação assim dispersa é detectada diretamente por fotodiodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° através de lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos, sendo focada em fotomultiplicadores. A combinação desses tipos de radiação dispersa revela informações importantes, tais como a dimensão, a granularidade/complexidade, a morfologia e o fenótipo celular. Esses sinais são transformados em números, *dot plots* e histogramas, podendo os dados serem analisados por *software* (GOLIM et al., 2007; VIRGO; GIBBS, 2012).

Essa técnica que originalmente foi desenvolvida no fim dos anos 1950 para a contagem e a análise de células sanguíneas demonstrou ser uma metodologia rápida e prática que permite que um grande número de células seja avaliado multiparametricamente. Com a citometria de fluxo é possível analisar o estágio de maturação de populações celulares, a presença de células com fenótipo significativamente anormal, marcadores associados ao prognóstico, além de alvos terapêuticos. A citometria de fluxo evidencia e caracteriza eventos através da identificação de antígenos fixados na superfície de células ou de partículas suspensas em meio líquido quando essas forem

tratadas com anticorpos monoclonais e conjugadas a um fluorocromo. Essa metodologia revolucionou o ramo da hematologia e trouxe grandes avanços, principalmente, no que diz respeito ao diagnóstico de linfomas e leucemias (GOLIM et al., 2007).

Figura 2 – Dinâmica de funcionamento do citômetro de fluxo



Fonte: Adaptado de: CYTOVAS, 2015.

Em diagnóstico de tumores sólidos, existem poucos relatos devido à necessidade do material de estar em suspensão (FERREIRA-FACIO et al., 2013). Entretanto, considerando a avaliação de fatores prognósticos relacionados ao estudo de subclones intratumorais e da expressão de determinados antígenos celulares específicos, estudos demonstraram crescente interesse na análise de múltiplos parâmetros celulares como expressão antigênica e análise de DNA em tumores sólidos. A análise do imunofenótipo dos tumores sólidos por citometria pode ser útil não só no auxílio à patologia no diagnóstico precoce de tumores de crescimento rápido, como também possibilita a melhora na qualidade do tratamento e na sobrevida dos pacientes (FERREIRA-FACIO et al., 2013; ORFAO et al., 1995).

2.6 MARCADORES UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PRESENTES EM EFUSÕES CAVITÁRIAS

Como descrito anteriormente, as efusões cavitárias são classificadas clinicamente como transudato ou exsudato (BAER; SMITH, 2001). Efusões cavitárias precedentes de processos transudativos apresentam uma celularidade baixa, com presença de células mesoteliais e leucócitos, sendo muito raro encontrar células neoplásicas. Já os líquidos formados a partir de processos exsudativos

aparecem quando existe uma alteração da parede vascular, geralmente de origem inflamatória, e podem indicar uma neoplasia em fase avançada, possuem uma alta celularidade que irá depender da natureza do processo (quadro inflamatório agudo, crônico específico, crônico inespecífico ou neoplásico) (COSTA; DE AGUSTIN, 2003).

No Brasil, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população (17% dos óbitos). As estimativas para o ano de 2014 que será válida também para 2015 apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, dentre os tipos mais incidentes estão o de pulmão e o de mama para os sexos masculinos e femininos, respectivamente. Esses dois tipos de neoplasias são os mais envolvidos nos quadros de derrame pleural maligno, seguidos das leucemias e dos linfomas, para ambos os sexos (INCA, 2011; KOSS, 2006; SWERDLOW et al., 2008; SHIDHAM; ATKINSON, 2007).

Marcadores como CD45, CD3, CD4, CD8, CD19 e CD56 podem fazer a identificação dos leucócitos presentes nos processos reacionais. Além disso, a determinação dos valores dos leucócitos (CD45+) e dos valores relativos de linfócitos T (CD3+) e de suas subpopulações T auxiliar (CD4+), T citotóxico (CD8+), T $\gamma\delta$ (CD3+ CD4- CD8-) e T $\alpha\beta$ (CD3+ CD4+ CD8+), dos linfócitos B (CD19+), das células NK (CD56+ CD3-) e das células NKT (CD56+ CD3+) pode indicar um quadro de leucemia ou linfoma em estágio avançado quando uma clonalidade maligna é observada nas células da amostra analisada (LAU et al., 2004). A análise da expressão da imunoglobulina de cadeia leve tem um papel importante na avaliação por citometria de fluxo no diagnóstico dos pacientes com suspeita de linfoma não Hodgkin (LNH-B). A presença de uma população de células B expressando apenas um único tipo de imunoglobulina de cadeia leve Kappa ou Lambda (κ ou λ) indica um processo clonal de células B, sustentando a hipótese de um diagnóstico de LNH-B (HORNA et al., 2011).

Os marcadores tumorais são utilizados para o acompanhamento da evolução da doença neoplásica e a diferenciação de alguns carcinomas e do mesotelioma, além de estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico (FONSECA, 2011). O mesotelioma é um dos tumores mais intensivamente investigados pelos métodos imunocitoquímicos, estando em estudo os novos marcadores que podem ter uma potencial utilidade no seu diagnóstico. Ainda que o foco principal desses estudos vise ao diagnóstico diferencial entre mesotelioma pleural e adenocarcinomas do pulmão, relatos da literatura sobre a especificidade e a sensibilidade da imunocitoquímica para esse fim parecem ser conflitantes (ORDÓÑEZ,

2006). A imunocitoquímica pode ser aplicada para distinguir células mesoteliais reativas das neoplásicas, além de células originadas de metástase (KRISHAN et al., 2006). Na tentativa de aperfeiçoar a identificação dos casos malignos, estudos mostram a utilidade de alguns marcadores tumorais utilizados na identificação de células malignas (KANAJI et al., 2011; KUNDU; HANDA; MOHAN, 2012; WAGNER et al., 2007).

No Quadro 2 se observam alguns dos marcadores utilizados na imunomarcção para diferenciar carcinomas metastáticos dos mesoteliomas.

Quadro 2 – Marcadores imuno-histoquímicos/imunocitoquímicos utilizados em amostras de efusões malignas

Marcador	Expressão em carcinoma metastático	Expressão no mesotélio/mesotelioma
Queratina	+ citoplasmático/de membrana	+ perinuclear/citoplasmático
CK7	Pulmão, ovário, mama, pâncreas, endométrio, bexiga	+
CK20	Cólon, pâncreas, bexiga, estômago	-
CEA	Pulmão, trato digestivo, pâncreas, mama	-
Ber-EP4	Pulmão	-
TTF-1	Tireoide e reação nuclear em pulmão	-
BRST-2 (GCDFP-15)	Mama	-
HER-2	Mama	-

Fonte: Adaptado de: ATKINSON (2005).

As citoqueratinas (CKs) são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, por isso também são denominadas de queratinas epiteliais ou queratinas moles, e devem ser diferenciadas das tricoqueratinas, as chamadas queratinas duras, as quais formam a haste do cabelo e a unha. O citoesqueleto, uma rede proteica intracelular, é constituído pelos chamados filamentos intermediários, que são os microtúbulos, que estão relacionados com o transporte intracelular de organelas, os filamentos de actina, que participam da motilidade celular, e os filamentos intermediários propriamente ditos, que proporcionam a estrutura tridimensional da célula. Três subclasses de filamentos intermediários são reconhecidas: vimentina e relacionados (vimentina presente nas células mesenquimais, desmina nos miócitos e proteínas

gliais nas células neurogliais); neurofilamentos (presentes nos neurônios); e, por fim, citoqueratinas, encontradas nos epitélios e derivados (ALMEIDA JUNIOR, 2004; YANG; NONAKA, 2010).

Existem 20 subtipos de citoqueratinas com diferentes pesos moleculares e diferentes expressões em células normais ou neoplásicas. Entre as mais utilizadas, estão a citoqueratina 7 (CK7) e a citoqueratina 20 (CK20). A CK7 é uma citoqueratina encontrada em epitélios ductais e glandulares, incluindo pulmão, mama, ovário e endométrio. A CK20 é expressa no epitélio do trato gastrointestinal, no urotélio e em células de Merkel. A expressão combinada da CK7 e da CK20 tem sido extensivamente estudada em vários carcinomas primários e metastáticos. A CK20 é expressa sozinha, na maioria dos adenocarcinomas intestinais e em carcinomas de células de Merkel, enquanto a CK7 está presente nos carcinomas de mama e pulmão e no adenocarcinoma do ovário. No entanto, sua expressão concomitante com CK20 é observada em tumores urotelial e pancreático e em carcinomas gástricos. O padrão de expressão CK7-/CK20+ já é conhecido por ser altamente característico de carcinomas colorretais; porém, esse padrão não necessariamente é observado em todos os subtipos de carcinoma colorretal (BAYRAK; HALTAS; YENIDUNYA, 2012; YANG; NONAKA, 2010).

Com propósito de diferenciação de diagnóstico das efusões pleurais, o Antígeno Carcinoembrionário (CEA) tem sido usado largamente como marcador tumoral. O CEA foi uma das primeiras chamadas proteínas carcinoembrionárias identificadas por Gold Freedman. Esse marcador é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 200 kDa, aparentemente produzida pela célula neoplásica, e costuma estar associado aos carcinomas do tubo digestivo, de mama e de pulmão, que comumente metastatizam para a pleura. Já o mesotelioma pleural raramente cursa com o aumento do CEA no líquido, sendo essa dosagem bastante útil para diferenciá-lo dos adenocarcinomas metastáticos (CASTRO; ROSENBERG, 2005; JIANG et al., 2015).

A molécula de adesão celular epitelial, também denominada Ber-EP4, EpCAM ou CD326, é uma glicoproteína transmembranar originalmente descoberta em carcinomas de cólon. O Ber-EP4 é expresso em células epiteliais de indivíduos saudáveis, exceto em células do epitélio escamoso, e em algumas células epiteliais específicas, tais como hepatócitos e queratinócitos. No entanto, encontra-se superexpresso em níveis variáveis na maioria dos carcinomas (TAKAHASHI et al., 2014). O Ber-EP4 é um marcador (anticorpo monoclonal) que identifica glicoproteínas de 34 kD e 39 kD

presentes nas membranas das células epiteliais humanas, mas não em células mesoteliais malignas, células mesoteliais reativas e células hematopoiéticas (WANG et al., 2014). Por ser expresso em todas as células epiteliais malignas, sua detecção em amostras de uma efusão pode ser usada para indicar uma possível efusão maligna (PILLAI et al., 2013).

O Fator de Transcrição da Tireoide 1 (TTF-1), também conhecido como Nkx2.1 ou proteína de ligação específica para tireoide, é uma proteína nuclear de 38 kDa codificada por um gene localizado no cromossomo 14q13. O TTF-1 é um fator de transcrição regulador de genes específicos do tecido, sendo expresso na tireoide, no pulmão e no diencéfalo durante o desenvolvimento embrionário. No pulmão em indivíduos saudáveis, o TTF1 desempenha um papel decisivo na manutenção das funções das células respiratórias terminais, em que regula a expressão de proteína tensoativa. Embora o papel de TTF1 como um marcador de células respiratórias terminais tem sido bem documentado, seu papel na carcinogênese permanece pouco elucidado. A associação da superexpressão do TTF-1 e da sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão tem sido estudada há mais de uma década. No entanto, nenhum consenso foi alcançado e, assim, resultados contraditórios têm sido relatados em diferentes estudos (ZHAN et al., 2013; YANG; NONAKA, 2010).

O receptor fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2 / erbB2) encontra-se superexpresso em cerca de 20% a 30% dos tumores de mama metastáticos, sendo sua superexpressão associada a um mau prognóstico em pacientes acometidos por esse tipo de neoplasia (JOSHI et al., 2011).

A glicoproteína fluido da proteína de doença cística macroscópica 15 (GCDFP-15, syn. Prolactina induzível, PIP) é uma proteína de 15 kDa que foi originalmente detectada no fluido cístico da mastopatia cística. Essa glicoproteína não é expressa em células do epitélio ductal normal ou lobular, mas está presente em células metaplásicas da apócrina da mama. Além do câncer de mama, poucos tumores, como o câncer de próstata e carcinomas dos anexos da pele, podem expressar o GCDFP-15, por isso é considerado altamente específico para diferenciação de tumores mamários em mulheres, sendo frequentemente utilizado como um marcador imuno-histoquímico para detecção de carcinomas metastáticos de sítio primário desconhecido (DARB-ESFAHANI et al., 2014).

As análises por imunocitoquímica/imuno-histoquímica desses e de outros marcadores tumorais são bem descritas na literatura

(DASGEB et al., 2013; JIANG et al., 2015; TARADA, 2012; YANG; NONAKA, 2010). No entanto, há poucos relatos com avaliações desses marcadores por citometria de fluxo em amostras de efusões serosas.

CAPÍTULO 3 OBJETIVOS

Os objetivos geral e específicos deste estudo são descritos a seguir.

3.1 GERAL

Avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários e analisar a sua importância como marcadores fenotípicos para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas.

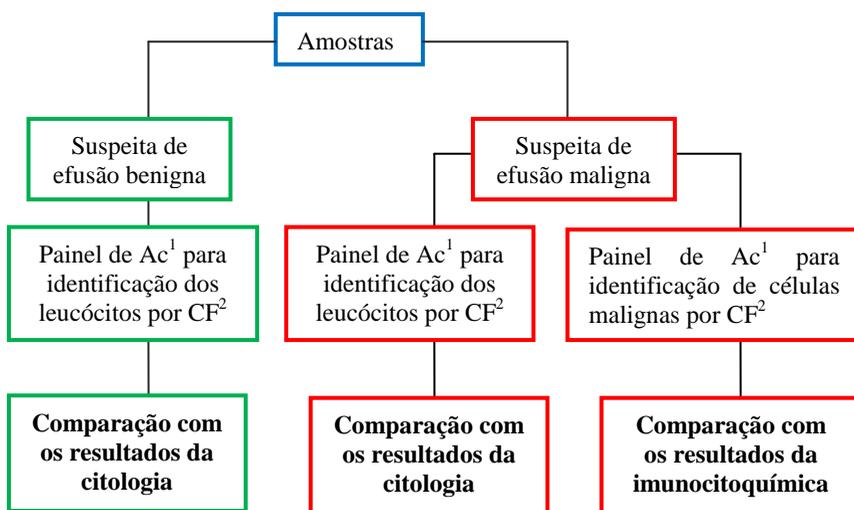
3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de caracterizar as células encontradas nos líquidos cavitários das amostras de pacientes atendidos no HU/UFSC e no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON).
- Padronizar e implementar a metodologia de citometria de fluxo para avaliação do fenótipo das células presentes nas efusões cavitárias.
- Identificar as populações celulares presentes nas efusões cavitárias de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e no Centro de Pesquisas Oncológicas.
- Avaliar a importância da utilização do painel de anticorpos estabelecido para a detecção de marcações fenotípicas de células provenientes de efusões cavitárias para o diagnóstico diferencial entre processos reacionais e malignos.
- Comparar os resultados da avaliação das células presentes nas efusões cavitárias por citometria de fluxo com aqueles obtidos pela avaliação morfológica.
- Verificar se as marcações fenotípicas nas células provenientes de efusões cavitárias estabelecidas neste estudo podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico diferencial entre processos reacionais e proliferações malignas.
- Verificar a aplicabilidade do painel de anticorpos estabelecido neste estudo para a rotina laboratorial na Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC (DACL/HU/UFSC).

CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de líquido cavitário foram processadas conforme as etapas descritas a seguir.

4.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



Legenda: ¹Ac – Anticorpos.

²CF – Citometria de fluxo.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo, realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 18715613.0.0000.0121, Anexo A) e do CEPON (CEP/CEPON n.º 003/2014, Anexo B). Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após receberem as informações necessárias.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Visando garantir a viabilidade das células analisadas por citometria de fluxo, as amostras enviadas para o laboratório após quatro horas da punção do líquido não foram incluídas no estudo. Somente os pacientes que concordaram em assinar o TCLE foram incluídos na pesquisa.

4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo conforme os processos descritos abaixo.

4.4.1 Anticorpos monoclonais

Para determinação dos valores relativos dos linfócitos T (CD3+) e de suas subpopulações T auxiliar (CD4+), T citotóxico (CD8+), T $\gamma\delta$ (CD3+ CD4- CD8-) e T $\alpha\beta$ (CD3+ CD4+ CD8+), dos linfócitos B (CD19+), das células NK (CD56+ CD3-), das células NKT (CD56+ CD3+), e diferenciação dos leucócitos (CD45+) de possíveis células malignas (CK7+/-, CK20+/-, TTF-1+, BerEP-4+/-, VIMENTINA +/-, GCFDP-15+) por citometria de fluxo, foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoroceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina cianina 7 (PE-cy7), complexo proteína piridina de clorofila (PerCP), alofocianina (APC), alofocianina-cianina 7 (APC-H7), V450 e *pacific blue* (PB). Para confirmar a presença de células viáveis nas amostras analisadas, foi utilizada a marcação com o anticorpo 7-aminoactinomycin D (7AAD), conjugado com fluorocromo complexo proteína piridina de clorofila (PerCP). As especificações dos anticorpos monoclonais quanto ao clone, ao fabricante e aos volumes utilizados estão descritas no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo

Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos	Clone	Volume (µL)	Fabricante
CD8 – FITC	B9.11	3µL	Exbio
LAMBDA – FITC	4C2	7 µL	BD
CD56 – PE	N901 (NKH-1)	5 µL	Beckman Coulter
KAPPA – PE	A8B5	15 µL	BD
CD5 – PerCP 5.5	L17F12	0,5 µL	Exbio
CD19 – PeCy 7	SJ25C1	3 µL	Beckman Coulter
CD3 – APC	HIT3a	1 µL	Beckman Coulter
CD38 – APC H7	HIT2	3 µL	BD
CD20 – PB	2H7	0,5 µL	Beckman Coulter
CD4 – PB	13B8.2	1 µL	Exbio
CD45 – V500	HI30	10 µL	BD
7-AAD – PerCP 5.5	SoIn4204	3 µL	BioLegend
Ber-EP4 – FITC	HEA-125	1 µL	Miltenyi Biotec
GCDFP-5 – FITC	A3D2	1 µL	Imuny
TTF-1 – FITC	B3A2	1 µL	Imuny
CK7 – FITC	A5C3	1 µL	Imuny
CK20 – FITC	A5B4	1 µL	Imuny

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: CD: Cluster of Differentiation; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PE-Cy7: ficoeritrina cianina; PerCP: complexo proteína piridina de clorofila; APC: alofococianina; APC-H7: alofococianina-cianina; PB: Pacific Blue.

4.4.2 Processamento dos líquidos cavitários para análise por citometria de fluxo

Antes do processamento das amostras, foi adquirido um tubo controle, o qual continha apenas células sem marcação, com a finalidade de verificar se o citômetro de fluxo estava compensado. Como nesse tubo não foram utilizados anticorpos monoclonais ligados a

fluorocromos, as células não devem mostrar fluorescência para nenhum detector, por isso foi considerado um controle negativo. Esse controle é importante para que a autofluorescência das células não seja considerada um resultado “falso positivo”. Além disso, serve também para ajustar a quantidade de células da amostra, que não pode ultrapassar o limite de 2.000 eventos/segundo na velocidade “*high*” durante a aquisição no citômetro de fluxo. Nos casos de amostras hipercelulares, essas foram diluídas e, se estivessem hipocelulares, seriam centrifugadas e ressuspensas em uma quantidade menor de volume para concentrar o número de células. Esse processo, além de garantir resultados dentro da linearidade do aparelho, permite a otimização da reação antígeno-anticorpo. Para a realização desse tubo, cerca de 2 mL da amostra foram previamente centrifugados e suspensos em 1 mL de PBS; a partir dessa amostra, foram pipetados 100 μ L devidamente homogeneizado do líquido e adicionados 100 μ L de solução lisante (Optlyse B, Beckman Coulter, France) a fim de lisar os eritrócitos que, eventualmente, estivessem presentes na amostra. A mistura foi incubada por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de água MiliQ à suspensão celular com lisante e realizou-se novamente a incubação nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a lise, o tubo foi centrifugado por 5 minutos, a 300 g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi ressuspensionado com 500 μ L de PBS e o tubo foi encaminhado para aquisição estabelecida em 50.000 eventos.

Após a verificação da compensação do citômetro de fluxo e o ajuste do número de células das amostras, 100 μ L da suspensão de células preparadas na etapa do processamento do tubo célula (amostra centrifugada) foram marcados com os anticorpos monoclonais específicos, conjugados com os diferentes fluorocromos e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi processada a etapa de lise como foi descrita para o tubo controle e, finalmente, a aquisição no citômetro de fluxo foi estabelecida em 50.000 eventos.

Para otimização antes da marcação da análise das cadeias leves de imunoglobulinas dos linfócitos B (Kappa e Lambda), as amostras foram incubadas a 37° C por 30 minutos (500 μ L das amostras foram adicionados a 1 mL de PBS) e, em seguida, centrifugadas 3.000 rpm/5 minutos, foi retirado o sobrenadante e suspenso em 300 μ L para, então, ser retirada uma alíquota de 100 μ L dessa suspensão para marcação com os anticorpos descritos no Quadro 3.

Para a marcação celular, foram utilizadas diferentes combinações de anticorpos ligados a fluorocromos, como descrito no Quadro 4. Os tubos 3, 4, 5, 6 e 7 (ver Quadro 4) foram processados somente nos casos de suspeitas de efusões malignas. Como os antígenos reconhecidos pelos anticorpos Ber-EP4, GCFDP-15, VIMENTINA, CK7 e CK20 estão localizados no citoplasma, sua marcação foi intracelular. Para isso, foi utilizado o reagente de fixação e permeabilização (Fix&Perm®), o qual garante que os anticorpos presentes na membrana (CD45) permaneçam marcados enquanto os citoplasmáticos são processados.

Quadro 4 – Anticorpos e fluorocromos utilizados no estudo

ID	FITC	PE	PerCP5.5	PeCy7	APC	APC H7	P B	V500
1	-	-	7AAD	-	-	-	-	CD45
2	CD8/KP ¹	CD56/LB ²	CD5	CD19	CD3	CD38	C D2 0/4	CD45
3	Ber-EP4	-	-	-	-	-	-	CD45
4	CK7	-	-	-	Vim ³	-	-	CD45
5	CK20	-	-	-	-	-	-	CD45
6	TTF-1	-	-	-	-	-	-	CD45
7	GCFPD-15	-	-	-	-	-	-	CD45

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: ID: Identificação dos tubos; ¹KP: Kappa; ²LB: Lambda; ³Vim: Vimentina; - : Indica que não foi utilizado nenhum anticorpo.

4.4.3 Controle de qualidade

A calibração e a compensação do citômetro de fluxo normalmente são diárias, utilizando-se reagentes específicos CS&T – Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, EUA) e IMMUNO-TROL™ Cells (Beckman Coulter®, Florida, USA). O CS&T é um sistema de partículas que otimiza as voltagens e permite a caracterização automática e a emissão de um relatório sobre as medidas do citômetro de fluxo por meio de um *software*. O IMMUNO-TROL™ é um reagente que contém leucócitos estabilizados com uma concentração de antígenos de superfície conhecida. Sua utilização tem por finalidade verificar o desempenho dos anticorpos monoclonais, bem como verificar o processo de marcação de lise e de análise das amostras.

4.4.4 Células de cultura celular

Foram utilizadas células de cultura celular A549 (células de adenocarcinoma pulmonar humana), obtidas da American Type Culture Collection, para a etapa de validação dos anticorpos monoclonais, avaliados por citometria de fluxo na detecção de células malignas. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/MI de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão de ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), pH 7,2, além de terem sido mantidas em estufa úmida a 37° C, com 5% CO₂. O meio de cultura, a penicilina, a estreptomicina, o tampão HEPES e o SBF foram adquiridos da GIBCO[®], Invitrogen Corporation, Brasil. Para essa etapa, as células foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25° C), sendo o sobrenadante descartado, o *pellet* celular lavado três vezes com PBS e o número de células viáveis avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%). Os experimentos foram realizados somente quando a viabilidade das células era de 90% ou mais. Para avaliação dos marcadores, foram utilizadas 3x10⁶ células, as quais foram marcadas conforme descrito na etapa 4.3.2.

4.4.5 Análise dos dados pelo *software* Infinicyt[®]

Para a análise dos dados, foi utilizado o *software* Infinicyt[®] versão 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha).

4.5 MORFOLOGIA

A análise morfológica foi realizada conforme o protocolo (POP HMG01 versão 05/03/2013), estabelecido pelo Setor de Hematologia do DACL/HU-UFSC.

4.5.1 Citologia

No setor, a análise citológica dos líquidos serosos é realizada em duas etapas:

- **citologia quantitativa:** realizada pela contagem das células por microscopia ótica comum, utilizando-se a câmara de Neubauer para contagem global; e
- **citologia diferencial:** realizada pela centrifugação da amostra e posterior coloração da lâmina para diferenciação das células por microscopia ótica.

4.5.2 Citologia quantitativa dos líquidos cavitários

Os líquidos foram diluídos numa proporção de 1:20 com salina (20 uL do líquido + q.s.p. 400 uL de salina) e 1:20 com HCl 0,1 N (20 uL do líquido + 400 uL de HCl). O líquido diluído com salina e com HCl 0,1 N foi homogeneizado e analisado em câmara de Neubauer.

A leitura foi realizada em microscópio de luz e a contagem foi realizada nos 4 quadrantes externos da câmara, divididos em 16 quadrados cada, o que totalizou 64 retículos. O número total de células contadas nesses retículos foi multiplicado por 50 (detalhado no cálculo abaixo) e liberado como número de células/mm³.

Na diluição com salina contaram-se todas as células (X) e na diluição com HCl, somente as células nucleadas (Y). Para encontrar o número de hemácias, diminuiu-se o valor encontrado para todas as células do número de células nucleadas (X – Y).

4.5.3 Cálculos da análise quantitativa

Conforme descrito no Procedimento Operacional Padrão para Líquidos Cavitários do Setor de Hematologia do DACL/HU-UFSC (POP HMG01 versão 05/03/2013), o cálculo para contagem de células dos líquidos cavitários é descrito na

a seguir.

Equação 1 – Contagem de células em líquidos cavitários

$\frac{\text{N.º de células contadas nos 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer}}{\text{FD} * \text{x FV} * \dots\dots\dots} / \text{mm}^3$
--

* FD = Fator diluição; FV = Fator volume

Para o cálculo do fator volume, temos a **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Equação 2 – Cálculo para fator volume

$$FV = A \times h$$

Onde A representa a área de contagem envolvendo quatro quadrantes externos com 1 mm^2 cada, totalizando 4 mm^2 , h a altura entre lamínula e câmara de $0,1 \text{ mm}$. Logo, se $V = 4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,4 \text{ mm}^3$ e FV é $1/V$, então FV é igual a $2,5$.

Também foi realizado um cálculo para ajustar a diluição da amostra, uma vez que foi realizada uma diluição 1:20 com salina e outra com HCl $0,1 \text{ N}$. Assim, como o FD é $1/D$ e o FD é igual a 20 , o cálculo para contagem das células encontra-se na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Equação 3 – Cálculo da contagem de células

$$N.^{\circ} \text{ de células contadas nos 4 quadrantes externos} \times 50 = \dots\dots\dots /\text{mm}^3$$

Onde:

Leitura com solução salina: $x \cdot 50 = \text{número de células totais}/\text{mm}^3$

Leitura com solução HCl $0,1 \text{ N}$: $x \cdot 50 = \text{número de células nucleadas}/\text{mm}^3$

Hemácias = Células totais (salina) – Células nucleadas (HCl)/ mm^3

4.5.4 Citologia diferencial dos líquidos cavitários

As células presentes nos líquidos cavitários foram concentradas na lâmina por cytospin (CYTOPROTM – Wescor) e coradas pelo método de May-Grumwald – Giemsa pelo aparelho SYSMEX SP-1000i. Em seguida, foi realizada uma contagem de 100 células, diferenciando-as em linfomononucleares, polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos e células mesoteliais. O resultado foi expresso em porcentagem e os valores de referência seguem na Tabela 1 Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de referência utilizados pelo Setor de Hematologia no DACL/HU-UFSC

Amostra

Citologia
quantitativa

Citologia diferencial

Amostra		Citologia quantitativa	Citologia diferencial
Líquido Peritoneal		<500 leucócitos/mm ³ 0 hemácias/mm ³	Polimorfonucleares <25%
Líquido Pleural	TRASUDATOS	<1.000 leucócitos/mm ³ 0 hemácias/mm ³	Polimorfonucleares 25% Mononucleares 80%
	EXSUDATOS	<1.000 leucócitos/mm ³ 0 hemácias/mm ³	Predomínio de Polimorfonucleares

Fonte: DASA, 2015.

4.6 IMUNOCITOQUÍMICA

A análise morfológica dos casos suspeitos de malignidade foi feita de acordo com o método de Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942). No entanto, para identificar qual o tipo de malignidade, o padrão ouro é a imunocitoquímica (para os líquidos) ou a imuno-histoquímica (para as biópsias das membranas serosas); para isso, o método utilizado é a estreptoavidina-biotina-peroxidase.

A imunocitoquímica e a imuno-histoquímica, assim como a citometria de fluxo são métodos que utilizam anticorpos conjugados com fluorocromos para identificar os antígenos *in situ* nas células investigadas. Devido à ampla possibilidade de tumores que podem atingir as cavidades, direcionou-se o estudo para a cavidade pleural e, por isso, avaliou-se a expressão de antígenos presentes em células neoplásicas de carcinomas de pulmão, mama e linfomas, pois são as principais neoplasias que acometem essa cavidade. As amostras normalmente já são avaliadas pela Patologia Clínica do HU/UFSC; dessa forma, tentamos utilizar os anticorpos normalmente avaliados no painel da imunocitoquímica para citometria de fluxo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de concordância entre os dois métodos analíticos quantitativos (citometria de fluxo e citologia) foi realizada pela regressão de Passing-Bablok e pelo gráfico de Bland-Altman.

CAPÍTULO 5 RESULTADOS

Foram analisadas 65 amostras de líquidos cavitários provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (n=38) e no Centro de Pesquisas Oncológicas (n=4).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

As Tabelas 2 e 3 detalham o perfil desses pacientes de acordo com o tipo de amostra (pleural ou ascítica). Não tivemos registros de líquido pericárdico.

Dois pacientes (um do gênero masculino e outro do gênero feminino) apresentaram tanto efusão pleural quanto efusão ascítica e, por isso, foram incluídos nas duas tabelas.

Tabela 2 – Perfil dos pacientes com efusão pleural segundo o gênero

	masculino (n=8)	feminino (n=10)
Média de idade ± DP* (anos)	68,25	55,20
Óbito	5	1
Suspeita de efusão benigna	5	4
Suspeita de efusão maligna	3	6

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: * DP: Desvio padrão.

Foi observada uma maior idade média nos homens (68,25 anos) com efusão pleural do que nas mulheres (55,20 anos) incluídos no estudo. Do total das amostras de efusões pleurais de origem benigna analisadas, três foram associadas à cirrose hepática e duas a complicações de um quadro de pneumonia, no gênero masculino. No grupo de mulheres, dois casos ocorreram devido à cirrose hepática, um devido à insuficiência cardíaca congestiva e um devido a causas não esclarecidas.

Efusões malignas são aquelas que apresentam células neoplásicas, geralmente procedentes de processos metastáticos (TEIXEIRA; PINTO; MARCHI, 2006). Assim, foram consideradas como amostras com suspeita de malignidade aquelas provenientes de pacientes que apresentavam algum tipo de neoplasia maligna já

diagnosticada. Os pacientes do gênero masculino apresentaram como diagnóstico prévio as seguintes malignidades: carcinoma pulmonar (n=1), câncer orofaringe (n=1) e mieloma múltiplo (n=1), enquanto as mulheres tinham os seguintes diagnósticos prévios: câncer de mama (n=2) e de pulmão (n=2), câncer nas vias biliares (n=1) e leucemia mieloide aguda (n=1). Do total de efusões pleurais com suspeita de malignidade, três tiveram o diagnóstico confirmado por análises morfológicas e imunocitoquímicas.

Do total de indivíduos que foram a óbito no decorrer deste estudo, três homens e uma mulher tinham suspeita de efusão maligna, e dois homens tinham diagnóstico de cirrose hepática.

No grupo de amostras de líquidos ascíticos (ver Tabela 3), também foi observado que os homens (59,3) apresentavam uma média de idade superior à das mulheres (55,5 anos). Das suspeitas malignas para os homens, um paciente apresentava diagnóstico de tumor de Klatskin (carcinomas de vias biliares) e o outro hepatocarcinoma. Com relação às amostras coletadas de pacientes mulheres, somente uma foi considerada exsudativa. Essa paciente apresentava suspeita de efusão maligna decorrente de um tumor no pâncreas.

No estudo dos líquidos ascíticos, a cirrose hepática foi a maior causa desse tipo de efusão em ambos os sexos (ver Figura 3), sendo responsável por 95,6 % (n=22) do total de casos de efusão ascítica benigna (n=23).

Dos pacientes acometidos por efusão ascítica benigna (n=23), 95,6% dos casos (n=22) ocorreram por complicações da cirrose hepática. (A) Do total de amostras de pacientes do gênero masculino analisadas (n= 22) e (B) do gênero feminino, 86% (n=19) e 75 % (n=3), respectivamente, eram pacientes cirróticos.

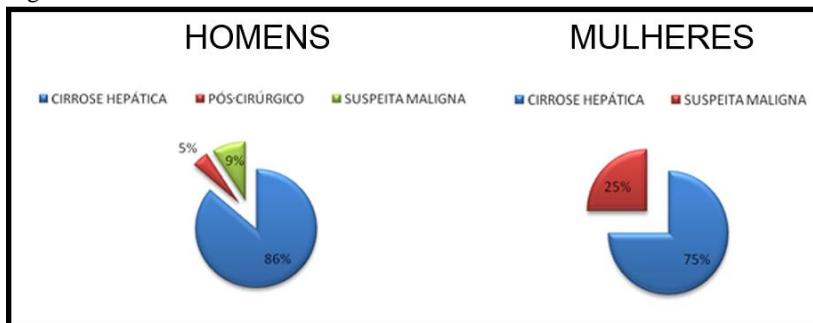
Tabela 3 – Perfil dos pacientes com efusão ascítica segundo o gênero

	masculino (n=22)	feminino (n=4)
Média de idade ± DP* (anos)	59,3	55,5
Óbito	5	0
Suspeita de efusão benigna	20	3
Suspeita de efusão maligna	2	1

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: *DP: Desvio padrão.

Figura 3 – Causas da efusão ascítica

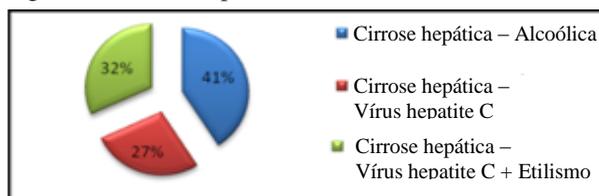


Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Dos pacientes acometidos por efusão ascítica benigna (n=23), 95,6% dos casos (n=22) ocorreram por complicações da cirrose hepática. (A) Do total de amostras de pacientes do gênero masculino analisadas (n= 22) e (B) do gênero feminino, 86% (n=19) e 75% (n=3), respectivamente, eram pacientes cirróticos.

A cirrose hepática alcoólica (n=9) foi a maior causa de efusão ascítica benigna, seguida da cirrose provocada pelo vírus da hepatite C em associação ao etilismo (n=7), e da cirrose apenas causada pelo vírus (n=6) (ver Figura 4).

Figura 4 – Perfil dos pacientes cirróticos do estudo



Fonte: Elaborada pela autora.

Até o final do presente estudo, não houve registros de óbito no grupo de pacientes do gênero feminino; no entanto, cinco homens foram a óbito por complicações da cirrose hepática.

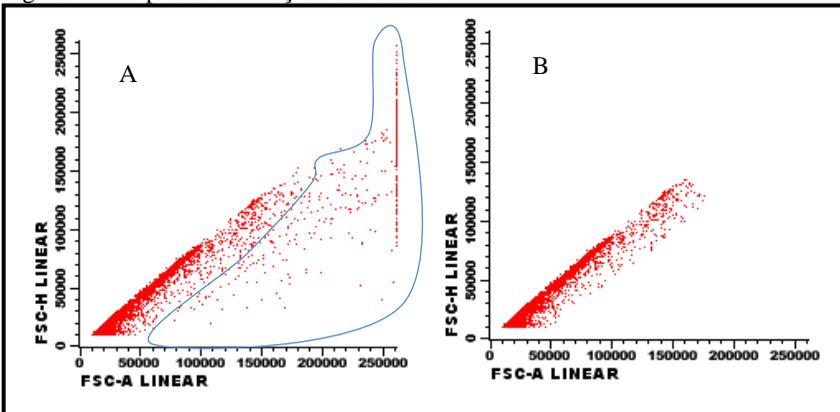
5.2 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DOS LÍQUIDOS CAVITÁRIOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A primeira etapa deste estudo foi padronizar a análise dos líquidos cavitários por citometria de fluxo.

5.2.1 Validação dos anticorpos para análise por citometria de fluxo

Inicialmente, os dados foram analisados em um *dot plot*, o qual mostra os eventos de acordo com o tamanho celular, os quais são identificados pelo detector frontal da dispersão de luz do *laser* que incide sobre os eventos, denominado Forward Scatter (FSC), para parâmetros altura (H) *versus* área (A) (FSC-H X FSC-A). Tal estratégia tem por finalidade a eliminação dos *doublets*, ou seja, células que ficam agrupadas, provavelmente devido às centrifugações realizadas durante o processamento da amostra (ver Figura 5).

Figura 5 – Etapa de eliminação dos *doublets*



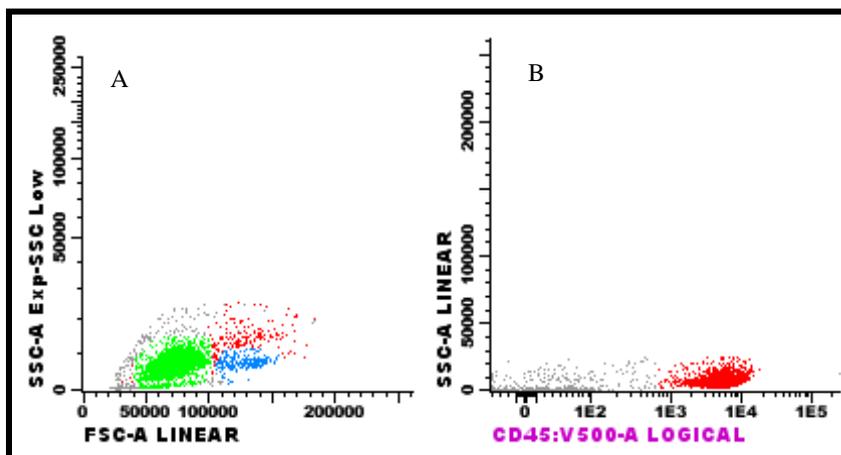
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Delineamento em azul indica a região dos *doublets*. (A) *Dot plot* com os *doublets*; (B) *Dot plot* sem os *doublets*.

Posteriormente, para a identificação dos neutrófilos, dos monócitos/macrófagos e dos linfócitos, foi considerada a granulidade celular, a qual é identificada pelo detector lateral de dispersão de luz do raio *laser* que incide sobre os eventos, denominado Side Scatter (SSC) *versus* FSC, e, dessa forma, realizaram-se novos *gates* (janelas) (ver Figura 6, Painel A). Para complementar o *gate* anterior, as populações dos subtipos celulares também foram delimitadas em outro *gate* definido por SSC *versus* positividade para anti-CD45. Esse anticorpo monoclonal foi escolhido porque o CD45 é um marcador panleucocitário, ou seja, está presente na membrana de todos os leucócitos, porém em concentrações diferentes entre os subtipos celulares, o que gera intensidades de positividade distintas e, assim, permite a identificação

das subpopulações. A combinação desses dois *gates* (SSC x FSC e SSC x Anti-CD45) tem como objetivo delimitar as subpopulações leucocitárias e, com isso, aumentar a pureza das populações celulares com a eliminação do máximo possível de células mortas, restos celulares, hemácias e outros tipos de células que não correspondem aos leucócitos (ver Figura 6, Paineil B). E, por fim, a partir dos 100% de células consideradas de interesse, as subpopulações leucocitárias foram determinadas de acordo com a positividade para os marcadores selecionados no estudo.

Figura 6 – *Dot plot* das subpopulações leucocitárias em amostra de líquido cavitário



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: (A) *Dot plot* das subpopulações celulares separadas de acordo com tamanho e granulosidade; (B) *Dot plot* das subpopulações celulares separadas de acordo com a expressão do anticorpo CD45.

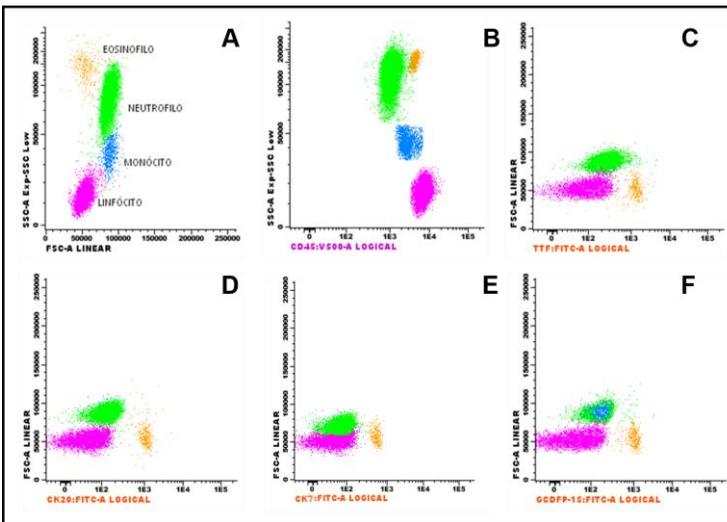
Para verificar a expressão das células CD45+ (leucócitos) diante da marcação com os anticorpos utilizados para a detecção de células malignas (Ber-EP4, CK7, CK20 e GCFDP-15), uma amostra de sangue periférico foi processada seguindo o passo 4.4.2 (ver Figura 7). Dessa forma, foi confirmado que os leucócitos normais não expressam os antígenos reconhecidos pelos marcadores malignos estudados.

Segundo alguns estudos, as células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar humano apresentam o fenótipo TTF-1 +, CK18 +, CK19+, CK7-/, CK20- (JAGIRDAR, 2008; KANAJI et al., 2011). Assim, as células de cultura A549 (células de adenocarcinoma pulmonar) foram

utilizadas como um controle positivo para avaliar a expressão dos anticorpos propostos neste estudo para pesquisa de células neoplásicas. Como pode ser observado na Figura 8, as células A549 expressam os antígenos reconhecidos pelo anticorpo TTF-1.

Diante disso, as células foram avaliadas em todos os fluorocromos para garantir que não havia interferência nas demais análises e, dessa forma, garantir a qualidade dos resultados para esse marcador quando analisado com outros anticorpos.

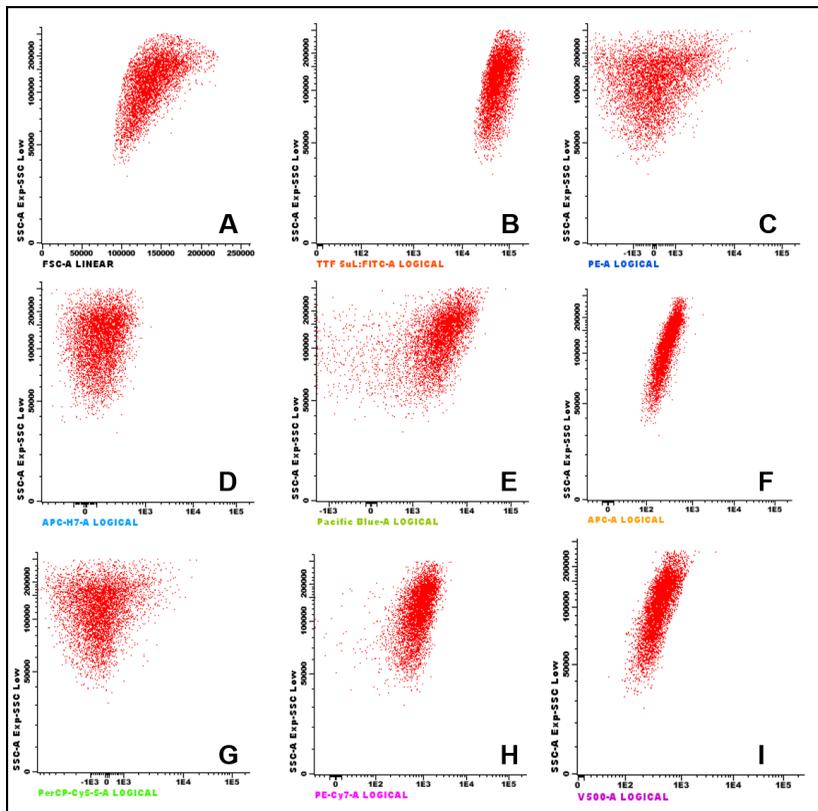
Figura 7 – *Dot plots* da amostra de sangue periférico marcada com os anticorpos utilizados para a investigação de células neoplásicas



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) *Dot plot* das subpopulações celulares separadas de acordo com tamanho e granulosidade; (B) *Dot plot* das subpopulações celulares separadas de acordo com a expressão do anticorpo CD45; (C) *Dot plot* das subpopulações celulares com expressão negativa para o anticorpo TTF-1; (D) *Dot plot* das subpopulações celulares com expressão negativa para o anticorpo CK20; (E) *Dot plot* das subpopulações celulares com expressão negativa para o anticorpo CK7; (F) *Dot plot* das subpopulações celulares com expressão negativa para o anticorpo GCFPD-15.

Figura 8 – Expressão positiva do anticorpo TTF-1 conjugado com o fluorocromo FITC em células A549



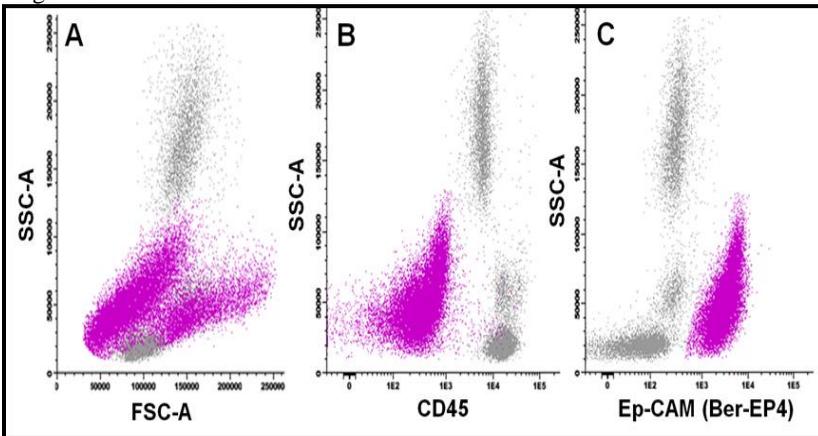
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) *Dot plot* das células A549 separadas de acordo com tamanho e granulicidade; (B) *Dot plot* das células A549 positivas para expressão do TTF-1 conjugado com o FITC; (C) *Dot plot* das células A549 negativas em PE; (D) *Dot plot* das células A549 negativas em APC-H7; (E) *Dot plot* das células A549 negativas em PB; (F) *Dot plot* das células A549 negativas em APC; (G) *Dot plot* das células A549 negativas em PerCP-Cy5.5; (H) *Dot plot* das células A549 negativas em Pe-Cy7; (I) *Dot plot* das células A549 negativas em V500.

Assim como o TTF-1, o Ber-EP4 também é um marcador utilizado no diagnóstico diferencial entre carcinoma (Ber-EP4+) e mesotelioma (Ber-EP4-). Como não foi possível ter acesso a amostras de líquido pleural que contivessem células malignas conhecidamente positivas para Ber-EP4, utilizou-se como controle positivo uma amostra

de aspirado de linfonodo cervical de um paciente diagnosticado com linfoma de células B com suspeita de carcinoma de Merkel. Como pode ser visto na Figura 9, a amostra de linfonodo continha células CD45(-) que eram positivas para Ber-EP4 e, correlacionado com outros dados clínicos, foi confirmando que esse paciente era portador de carcinoma de Merkel e de neoplasia de células linfoides B maduras.

Figura 9 – Expressão do marcador Ber-EP4 (+) em células de um paciente com diagnóstico de carcinoma de Merkel



Fonte: Elaborada pela autora.

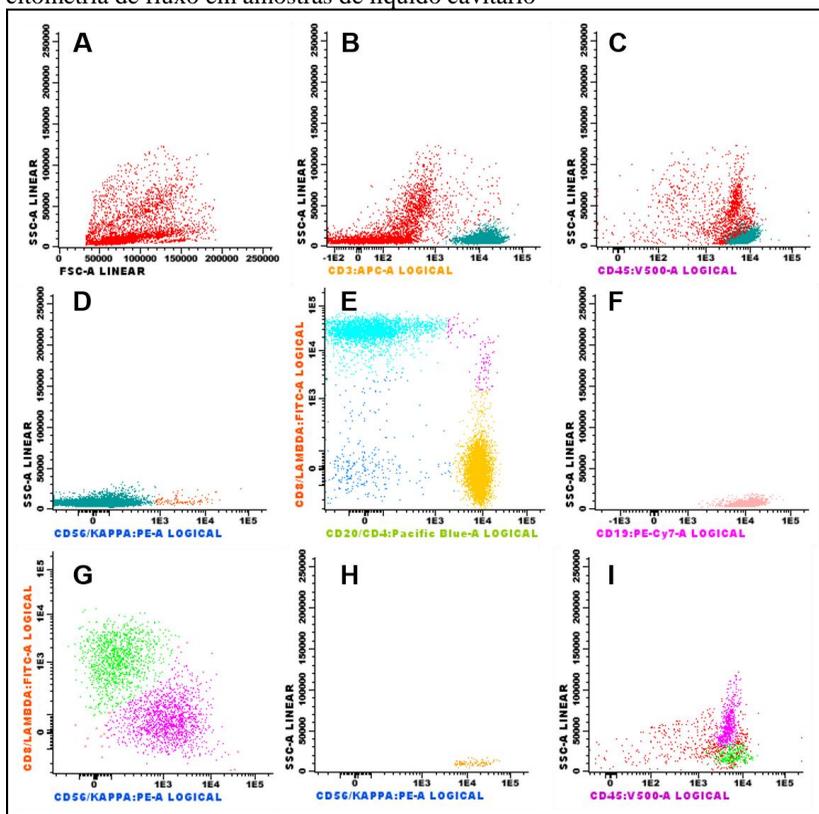
Nota: *Dot plots* representativos da imunofenotipagem da amostra de aspirado de linfonodo cervical demonstrando as células não hematopoiéticas. (A) Células de médio a grande tamanho evidenciado pelas características de dispersão de luz (SSC x FSC); (B) Células não hematopoiéticas (CD45 negativas); (C) Expressão de Ber-EP4 (Ep-CAM).

5.2.2 Padronização da determinação da celularidade dos líquidos cavitários por citometria de fluxo

Após a padronização, a celularidade de 65 amostras de líquidos cavitários foi avaliada por citometria de fluxo (ver Figura 10) e comparada com a avaliação da morfologia por microscopia de luz, a qual é metodologia considerada padrão ouro para análise desses líquidos (BELDA et al., 2000; PIZZICHINI et al., 1996). Devido às limitações de diferenciação dos leucócitos pela técnica de microscopia de luz, para essa análise foram comparados apenas os percentuais médios em subtipos: mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outras células, as

quais poderiam ser mesoteliais ou outras não reconhecidas morfológicamente, como, por exemplo, células malignas.

Figura 10 – Figura ilustrativa das subpopulações leucocitárias analisadas por citometria de fluxo em amostras de líquido cavitário



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: *Dot plots* representativos da imunofenotipagem da amostra de líquido pleural demonstrando as células hematopoiéticas. (A) Células de médio a grande tamanho evidenciado pelas características de dispersão de luz (SSC x FSC); (B) Células T (CD3+); (C) Células T (CD3+) evidenciando marcação CD45+; (D) Células NKT; (E) Células T (C4+/CD8+); (F) Linfócitos B (CD19+); (G) Linfócitos B separados pela expressão das imunoglobulinas Kappa e Lambda; (H) Células NK (CD56+); (I) Células CD45+ na região dos neutrófilos (em roxo) e monócitos (em verde).

As Tabelas 4 e 5 a seguir detalham a média e o desvio padrão das porcentagens das células encontradas em líquidos pleurais e ascíticos para ambas as metodologias.

Tabela 4 – Média \pm DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outras células não hematopoiéticas presentes em amostras de líquidos pleurais, obtidas pelas técnicas de microscopia de luz e de citometria de fluxo

	Mononucleares	Neutrófilos	Eosinófilos	Outras células ¹
Microscopia de luz	66,44 \pm 26,27	22,66 \pm 25,04	1,38 \pm 5,41	9,50 \pm 16,32
Citometria de fluxo	64,54 \pm 27,65	25,42 \pm 25,94	2,08 \pm 5,31	7,94 \pm 10,49

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: ¹Para microscopia de luz, outras células foram consideradas as células mesoteliais; e, para citometria de fluxo, foram consideradas as células CD45-.

Tabela 5 – Média \pm DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e outras células não hematopoiéticas presentes em amostras de líquidos ascíticos, obtidas pelas técnicas de microscopia de luz e de citometria de fluxo

	Mononucleares	Neutrófilos	Eosinófilos	Outras células ¹
Microscopia de luz	83,32 \pm 20,29	11,55 \pm 19,77	0,19 \pm 0,45	4,94 \pm 6,60
Citometria de fluxo	78,87 \pm 18,04	11,41 \pm 15,26	0,84 \pm 2,29	8,86 \pm 8,97

Fonte: Elaborada pela autora.

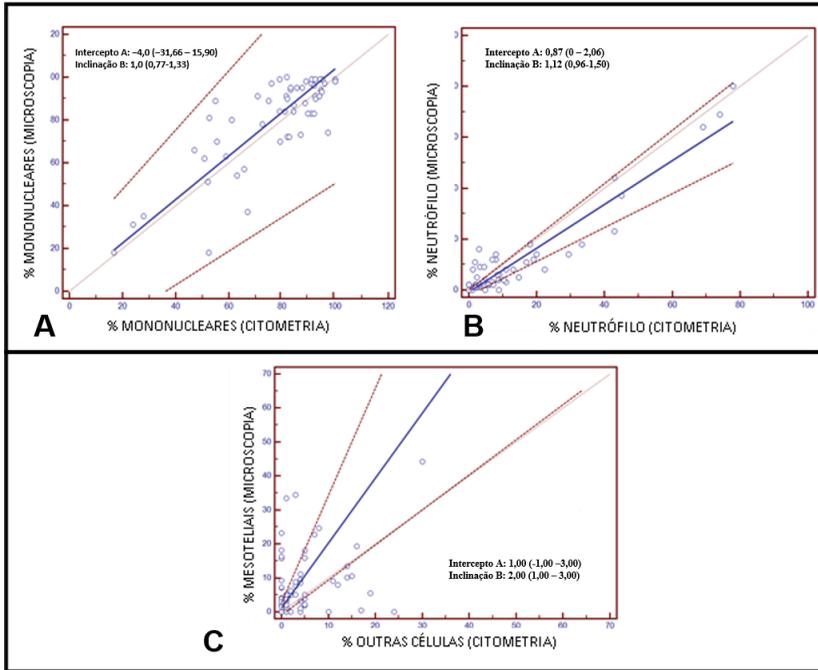
Nota: ¹Para microscopia de luz, outras células foram consideradas as células mesoteliais, enquanto para citometria de fluxo foram consideradas as células CD45-.

Para análise de concordância entre os métodos, foi realizada a regressão de Passing-Bablok, a qual estima as diferenças sistêmicas entre os métodos (constante e proporcional). Nessa análise, além da fórmula da regressão, dois valores de interesse também foram calculados com os seus respectivos intervalos de confiança. A intercepção no eixo A é uma medida das diferenças sistemáticas entre os dois métodos. O intervalo de confiança de 95% para a intercepção A pode ser utilizado para testar a hipótese de que A é igual a zero. Essa hipótese é aceita se o intervalo de confiança para “A” contém o valor zero. Se a hipótese é rejeitada, conclui-se que “A” é significativamente

diferente de zero e que ambos os métodos diferem, pelo menos, por um valor constante. O outro valor calculado é o da inclinação “B”, o qual é uma medida das diferenças de proporções entre os dois métodos. O intervalo de confiança de 95% para a inclinação B pode ser utilizado para testar a hipótese de que “B” é igual a um. Essa hipótese é aceita se o intervalo de confiança para “B” contém o valor um. Se a hipótese é rejeitada, conclui-se que “B” é significativamente diferente de um e que, portanto, há pelo menos uma diferença proporcional entre os dois métodos. O Passing-Bablok também é apresentado por uma representação gráfica (diagrama de dispersão) que contém a linha de regressão (linha contínua), o intervalo de confiança para a linha de regressão (linhas tracejadas) e uma linha de identidade ($x = y$, linha pontilhada) (BILIĆ-ZULLE, 2011; PASSING; BABLOK, 1983).

Na Figura 11 a seguir, estão descritos os valores de intercepto e de inclinação para cada população, juntamente com a representação gráfica. Devido à pouca celularidade de eosinófilos nas amostras avaliadas, a análise de concordância entre os métodos para esse tipo celular não foi realizada. Observa-se pelo valor de A e B que ambas as metodologias não diferem entre si para nenhuma das populações avaliadas.

Figura 11 – Representação gráfica de Passing-Bablok para as subpopulações leucocitárias



Fonte: Elaborada pela autora.

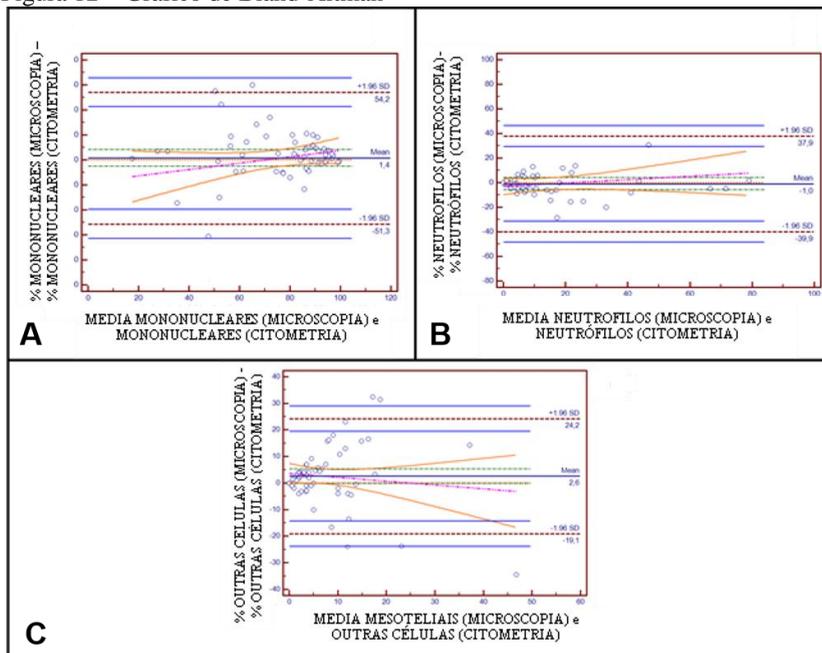
Nota: Diagrama de dispersão para comparação das porcentagens das subpopulações celulares mononucleares (A), neutrófilos (B) e outras células (C) obtidas pelas técnicas de citometria de fluxo e de microscopia de luz.

Para a verificação da concordância entre as duas metodologias, também foi realizado o teste de Bland-Altman, no qual a concordância entre duas variáveis, uma obtida pelo método X e a outra obtida pelo método Y, é verificada a partir de uma visualização gráfica que representa a dispersão entre a diferença das duas variáveis ($X - Y$) e a média das duas $(X + Y)/2$. Nesse gráfico, é possível visualizar o quanto as diferenças se afastam do valor de zero, denominado como viés, além do erro, que é a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média, e de tendências (ALTMAN; BLAND, 1983).

A avaliação da concordância dos valores obtidos pelas técnicas de microscopia e de citometria de fluxo mostrou um viés de 1,4% com limites de concordância de 54,2% a 51,3% para as células mononucleares, um viés de -1,0% com limites de concordância de -

39,9% a 37,9% para os neutrófilos, um viés de 2,6% com limites de concordância de -19,1% a 24,2% para outros tipos celulares (ver Figura 12).

Figura 12 – Gráfico de Bland-Altman



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Comparação entre as porcentagens de mononucleares (A), neutrófilos (B), e outros tipos celulares (c) obtidos pela metodologia de microscopia de luz e de citometria de fluxo.

Ao contrário da microscopia de luz, que não permite diferenciar subpopulações linfocitárias, a citometria de fluxo permite, por meio de anticorpos conjugados com fluorocromos, diferenciar as subpopulações linfocíticas. As Tabelas 6, 7 e 8 a seguir descrevem as médias e o desvio padrão dos líquidos pleurais com suspeitas reacionais, dos líquidos pleurais com suspeitas malignas e dos líquidos ascíticos, respectivamente. Para um melhor entendimento dos dados obtidos, mediana, valores mínimos, valores máximos e intervalo interquartil também foram descritos.

Tabela 6 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos pleurais reacionais

SUBPOPULAÇÕES CELULARES	(MÉDIAS \pm DP)	MEDIANA	MÍN.	MÁX.	INTERVALO INTERQUARTIL
Linfócitos Total (CD45hi)	60,58 \pm 29,64	56,12	14,20	93,90	39,8
Linfócitos T Total (CD3+)	48,03 \pm 24,12	46,78	9,04	74,12	29,87
Linfócitos B (CD5+ CD45+)	6,92 \pm 6,92	2,24	0,09	18,79	3,92
Linfócitos T Auxiliar* (CD3+CD4+)	34,32 \pm 16,91	24,17	5,04	51,79	36,93
Linfócito T Citotóxico* (CD3+CD8+)	21,92 \pm 17,95	11,54	1,62	52,14	11,74
Linfócitos T Alfa/Beta* (CD3+CD4+CD8+)	1,15 \pm 1,06	0,32	0,00	2,85	0,52
Linfócitos T Gama/Delta* (CD3+CD4-CD8-)	1,67 \pm 0,95	1,16	0,00	2,88	1,64
NK (CD56+ CD3-)	5,46 \pm 2,88	3,60	0,69	8,45	5,01
NKT (CD56+ CD3+)	5,24 \pm 4,03	2,81	0,23	11,67	2,63
Eosinófilos (CD45+ CD16-)	4,20 \pm 5,46	0,00	0,00	13,44	0,57
Monócitos (CD45+ CD38+)	15,69 \pm 9,82	11,39	2,09	30,94	10,47
Neutrófilos (CD45+ CD16+)	35,19 \pm 27,23	13,36	0,00	78,02	23,63
Outras células (CD45-)	15,73 \pm 13,28	4,02	0,00	36,45	11,05

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos pleurais malignos

SUBPOPULAÇÕES CELULARES	(MÉDIAS \pm DP)	MEDIANA	MÍN.	MÁX.	INTERVALO INTERQUARTIL
Linfócitos Total (CD45hi)	71,15 \pm 29,97	82,63	37,13	93,68	56,55
Linfócitos T Total (CD3+)	57,65 \pm 27,08	68,08	26,91	77,96	51,05
Linfócitos B (CD5+) CD45+	7,72 \pm 1,83	8,70	5,60	8,85	3,25
Linfócitos T Auxiliar* (CD3+CD4+)	30,54 \pm 15,59	8,95	12,55	40,11	27,56
Linfócito T Citotóxico* (CD3+CD8+)	25,07 \pm 11,42	25,76	13,32	36,13	22,81
Linfócitos T Alfa/Beta* (CD3+CD4+CD8+)	0,87 \pm 0,12	0,83	0,78	1,00	0,22
Linfócitos T Gama/Delta* (CD3+CD4- CD8-)	1,17 \pm 1,10	0,94	0,21	2,37	2,16
NK (CD56+ CD3-)	3,10 \pm 1,97	4,16	0,82	4,31	3,49
NKT (CD56+ CD3+)	2,68 \pm 2,21	2,71	0,46	4,88	4,42
Eosinófilos (CD45+ CD16-)	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00	0,00	0
Monócitos (CD45+ CD38+)	6,58 \pm 6,15	5,66	0,94	13,14	12,2
Neutrófilos (CD45+ CD16)	19,03 \pm 20,87	10,02	4,18	42,90	38,72

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Descrição de médias \pm DP, medianas, valores mínimos, máximos e intervalo interquartis dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de líquidos ascíticos

SUBPOPULAÇÕES CELULARES	(MÉDIAS \pm DP)	MEDIANA	MÍN.	MÁX.	INTERVALO INTERQUARTIL
Linfócitos Total (CD45hi)	63,17 \pm 22,26	67,95	2,76	98,60	32,01
Linfócitos T Total (CD3+)	39,22 \pm 21,86	39,48	0,52	86,00	32,82
Linfócitos B (CD5+ CD45+)	4,34 \pm 3,26	3,39	0,01	15,56	4,24
Linfócitos T Auxiliar* (CD3+CD4+)	27,76 \pm 17,65	29,49	0,00	64,11	25,83
Linfócito T Citotóxico* (CD3+CD8+)	9,31 \pm 6,01	8,39	0,00	26,80	7,64
Linfócitos T Alfa/Beta* (CD3+CD4+CD8+)	0,86 \pm 0,70	0,70	0,00	3,15	0,84
Linfócitos T Gama/Delta* (CD3+CD4-CD8-)	0,94 \pm 0,85	0,75	0,00	7,31	0,87
NK (CD56+ CD3-)	10,26 \pm 6,91	9,09	0,28	30,00	8,74
NKT (CD56+ CD3+)	7,06 \pm 7,96	4,67	0,57	65,39	5,87
Eosinófilos (CD45+ CD16-)	1,13 \pm 2,26	0,00	0,00	21,13	1,90
Monócitos (CD45+ CD38+)	10,02 \pm 8,12	7,75	0,00	56,30	11,13
Neutrófilos (CD45+ CD+16)	11,49 \pm 11,64	8,33	0,00	76,83	11,58
Outras células (CD45-)	9,60 \pm 7,81	8,49	0,00	44,26	11,90

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Análise das efusões pleurais malignas por citometria de fluxo

Nesta etapa do estudo foi verificado se era possível identificar células malignas por citometria de fluxo. Sendo assim, inicialmente analisamos se os marcadores utilizados em análises imunocitoquímicas para caracterizar as células neoplásicas também poderiam ser utilizados na citometria de fluxo. Para isso, foi selecionado um painel de anticorpos semelhante àqueles utilizados pelo Serviço de Patologia Clínica do HU/UFSC, pois, dessa forma, seria possível a comparação da positividade dos marcadores pelas duas metodologias. Vale ressaltar que os anticorpos utilizados eram apropriados para citometria de fluxo.

Do total de 65 amostras de líquidos cavitários analisadas no estudo, três de líquido ascítico e nove de efusão pleural apresentavam suspeita de malignidade. Como descrito anteriormente, devido à ampla possibilidade de diferentes tumores atingirem as cavidades serosas por metástase, direcionamos o estudo para a investigação da presença de células malignas na cavidade pleural, por isso avaliou-se a expressão de antígenos presentes em células neoplásicas de carcinomas de pulmão, mama, leucemias/linfomas, pois são as principais neoplasias que acometem essa cavidade. As efusões pleurais com suspeita maligna provinham de pacientes com diagnóstico de carcinoma pulmonar (n=3), câncer de mama (n=2), leucemia mieloide aguda (LMA) (n=1), mieloma múltiplo (n=1), câncer orofaringe (n=1) e câncer nas vias biliares (n=1).

Sendo assim, foi possível analisar as amostras de efusões pleurais dos casos de carcinoma pulmonar e câncer de mama por citometria de fluxo e imunocitoquímica. Devido ao pequeno volume de amostra coletada, os casos de LMA e mieloma múltiplo foram analisados somente por citometria de fluxo. As amostras provenientes dos pacientes com diagnóstico de câncer orofaringe e câncer nas vias biliares foram desconsideradas da análise por citometria de fluxo, pois no laboratório não havia anticorpos monoclonais específicos para análise por citometria de fluxo. Um resumo do fluxo de análise das amostras com suspeita maligna pode ser visto no Quadro 5 a seguir.

As amostras de líquido pleural provenientes dos casos de LMA e mieloma múltiplo não apresentaram, na análise por citometria de fluxo, células blásticas ou outros tipos celulares com fenótipo semelhante aos encontrados no momento do diagnóstico ou da recidiva. Dessa forma, apesar de não haver confirmação por imunocitoquímica, considerou-se que não se tratava de amostras de efusão maligna.

Quadro 5 – Avaliação das amostras com suspeita maligna

Diagnóstico	Análise citometria de fluxo	Análise imunocitoquímica
Mama (n=2)	Sim	Sim
Pulmão (n=3)	Sim	Sim
Leucemia (n=1)	Sim	Não
Mieloma Múltiplo (n=1)	Sim	Não

Fonte: Elaborado pela autora.

Nas amostras dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão (n=3), em um dos três casos, não foi detectada a presença de células com fenótipo maligno em ambas as metodologias, citometria de fluxo e imunocitoquímica. Porém, nos outros dois casos, foi observada a presença de células com fenótipo compatível com câncer de pulmão, tanto na imunocitoquímica quanto na citometria de fluxo, o que confirmou que os casos eram de efusão pleural maligna metastática de câncer de pulmão. De forma ilustrativa, em um dos casos de efusão pleural maligna metastática de câncer de pulmão, pode-se observar que a expressão dos marcadores utilizados na imunocitoquímica (ver Quadro 6) é semelhante àquelas observadas na citometria de fluxo (ver Figura 13).

Quadro 6 – Painel de marcadores utilizados na imunocitoquímica para detecção de efusão pleural maligna em um dos pacientes com diagnóstico de carcinoma pulmonar

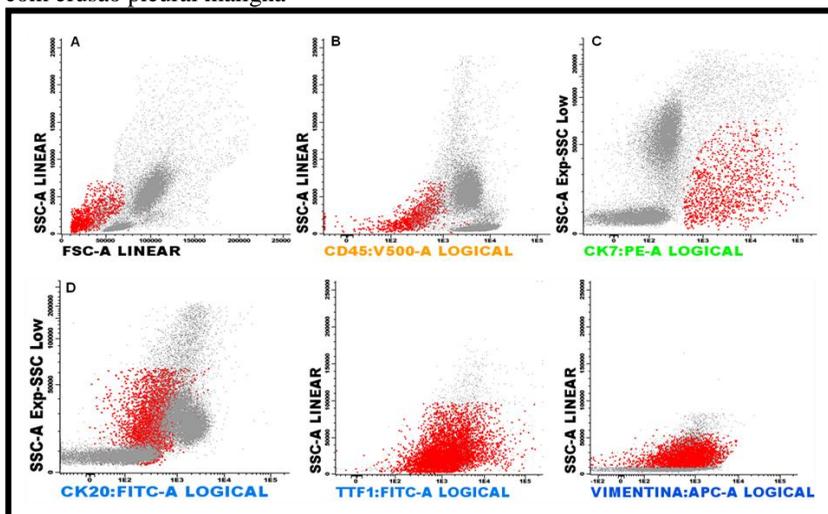
Antígenos	Expressão
CK7	+
CK20	+
CK POOL	+
TTF-1	+
NAPSINA A	-
VIMENTINA	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Resultado da análise do líquido pleural do paciente com diagnóstico de carcinoma pulmonar por imunocitoquímica.

Para esse paciente, a citometria de fluxo mostrou os mesmos resultados da imunocitoquímica para CK7 (+), Vimentina (-) e TTF-1 (+) (ver Figura 13). Porém, não foram obtidos os mesmos resultados para o CK20, que foi positivo para imunocitoquímica e negativo na análise por citometria de fluxo. Os marcadores Napsina A e Pool de citoqueratinas não foram analisados por citometria de fluxo.

Figura 13 – Perfil imunofenotípico da amostra de um paciente diagnosticado com efusão pleural maligna

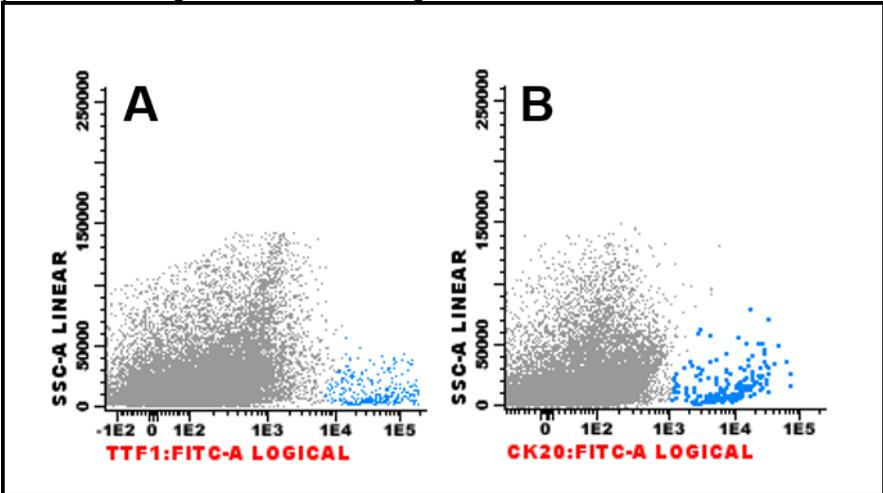


Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Células tumorais foram destacadas em vermelho e células hematopoiéticas em cinza. (A) Observam-se os parâmetros tamanho e granulosidade das células tumorais; (B) CD45⁺; (C) CK7⁺; (D) CK20⁻; (E) TTF-1⁺; (F) Vimentina⁻.

A Figura 14 a seguir mostra a expressão dos marcadores TTF-1 e CK20 em células de um paciente com diagnóstico de efusão maligna por citometria de fluxo, as quais foram confirmadas pela análise imunocitoquímica.

Figura 14 – Expressão dos marcadores TTF-1 e CK20 em células de um paciente com diagnóstico de efusão maligna



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Células tumorais foram destacadas em azul (A) TTF-1+ e (B) CK20+.

Para pesquisa de células malignas em efusões cavitárias com suspeita de metástase de tumor primário mamário, utilizamos o marcador GCDFP-15. No entanto, sobre as duas amostras de efusão pleural com suspeita de malignidade provenientes das pacientes com diagnóstico de câncer de mama, uma foi confirmada com a presença de células malignas apenas por imunocitoquímica, enquanto na outra, em ambas as metodologias, não foram detectadas células malignas.

CAPÍTULO 6 DISCUSSÃO

Como o objetivo principal deste estudo foi avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários e analisar a sua importância como marcadores fenotípicos para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas, este trabalho foi realizado em etapas, pois a citometria de fluxo ainda não é uma metodologia utilizada na rotina laboratorial para avaliação dessas amostras. Assim, o trabalho foi iniciado com a etapa de padronização. A princípio, foi verificado se as células presentes nos líquidos mantinham sua integridade diante das diversas etapas que constituem o preparo e a marcação da amostra para a análise por citometria de fluxo. Como observado nas Figuras 6 e 10, as etapas de preparação da amostra não interferiram na análise e as células se mantiveram íntegras após o processamento amostral. Além disso, as amostras procedentes de processos considerados benignos foram marcadas com os anticorpos monoclonais capazes de caracterizar células que são normalmente identificadas por microscopia de luz, a qual é uma metodologia bem estabelecida para contagem e diferenciação dos leucócitos das amostras nos fluidos cavitários (leucócitos e suas subpopulações, mononucleares, eosinófilos e neutrófilos). Os resultados das porcentagens de células mononucleares, neutrófilos e outros tipos celulares não hematológicos foram avaliados concomitantemente pelas duas metodologias (ver Tabelas 4 e 5). Dessa forma, podemos concluir que, pela análise do teste de Bland-Altman, pelo viés próximo de zero para as células mononucleares (viés = 1,4) e para os neutrófilos (viés = -1,0) houve uma boa concordância entre as metodologias para esses tipos celulares. No entanto, um viés maior foi observado na avaliação de outros tipos celulares (viés = 2,6). Isso pode ser justificado pelo fato de que, apesar de as células mesoteliais também estarem presentes nos fluidos serosos, não foi possível identificá-las com precisão, pois não havia no painel utilizado um marcador específico para esse tipo celular por citometria de fluxo. Dessa forma, com o intuito de comparar os resultados de citometria de fluxo com microscopia de luz, considerou-se que as células CD45(-) observadas na citometria de fluxo seriam as células mesoteliais. Contudo, devido ao fato de que os líquidos contêm uma ampla quantidade de células não hematopoiéticas que também são CD45(-), inclusive as células neoplásicas, a comparação dos dois métodos na identificação desse tipo celular ficou prejudicada.

Uma das vantagens da utilização da citometria de fluxo é permitir diferenciar subpopulações celulares através de anticorpos conjugados com fluorocromos (GOLIM et al., 2007). Assim, o painel utilizado para a caracterização das células possibilitou a identificação de leucócitos totais (CD45+), linfócitos T (CD3+) e suas subpopulações, T auxiliar (CD4+), T citotóxico (CD8+), T $\gamma\delta$ (CD3+/CD4-/CD8-), T $\alpha\beta$ (CD3+/CD4+/CD8+), linfócitos B (CD19+), células NK (CD56+/CD3-) e células NKT (CD56+/CD3+), além de neutrófilos (CD45+ CD16+) e eosinófilos (CD45+/CD16-), os quais podem ser observados na Tabela 6 para os líquidos pleurais considerados reacionais; na Tabela 7 para os líquidos considerados malignos; e na Tabela 8 para os líquidos ascíticos. Os resultados mostram elevados valores para o desvio padrão em relação à média em todas as análises, o que indica grande variabilidade amostral, o que já era esperado devido aos diferentes quadros clínicos apresentados por paciente analisado. Além disso, também foi observada, em todos os líquidos, uma frequência maior de células Linfócitos T Auxiliar (CD3+CD4+) e Linfócito T Citotóxico (CD3+CD8+). Embora morfologicamente os linfócitos pareçam entre si, na realidade são notavelmente heterogêneos e especializados em propriedades moleculares e funções. Os linfócitos CD4+ expressam-se em aproximadamente 60% dos linfócitos T CD3+ maduros e funcionam como linfócitos T auxiliares secretores de citocinas, estimulando os macrófagos e os linfócitos B a combaterem infecções, enquanto o CD8+ se expressa em cerca de 30% dos linfócitos T, os quais funcionam com os linfócitos T citotóxicos (*killers*) para destruir células do hospedeiro que possam ser consideradas uma ameaça (KOSS, 2006). Como os linfócitos e outras células envolvidas nos processos reacionais não estão localizados em um único tecido em particular (como a maioria dos órgãos do corpo), mas são capazes de migrar entre tecidos linfoides e outros, e pelas circulações vasculares e linfáticas, atuando na resposta imune, era esperada, diante do quadro clínico apresentado pelos pacientes avaliados, a observação dessas células nas amostras analisadas.

A imunocitoquímica e a imuno-histoquímica, assim como a citometria de fluxo são métodos que utilizam anticorpos conjugados com fluorocromos para identificar os antígenos *in situ* nas células investigadas. Considerando que, a partir da citometria de fluxo, é possível caracterizar os fenótipos das diferentes populações celulares em uma amostra, sejam elas células normais ou neoplásicas, em uma segunda etapa foi investigada a possibilidade de identificar células neoplásicas nas amostras de líquidos cavitários com esses marcadores

utilizados na imunocitoquímica. Assim, quando as amostras dos líquidos eram suspeitas de efusão maligna ou eram observadas células não hematológicas (CD45 negativas) pela citometria de fluxo, prosseguia-se com a marcação das células com o painel de anticorpos específicos para identificação de células neoplásicas (CK7, CK20, TTF-1, GCFDP-15, Ber-EP4 e Vimentina).

Inicialmente seriam utilizadas apenas amostras de pacientes atendidos no HU-UFSC; no entanto, como as amostras recebidas na maioria eram de pacientes com efusões benignas, solicitou-se a colaboração do CEPON neste estudo com o objetivo de ampliar o número de amostras de efusões malignas. Entretanto, houve atrasos no recebimento dessas amostras e consequente diminuição de casos analisados até o fim de estudo, mas, ainda assim, foi possível detectar em algumas amostras de efusões pleurais células com o fenótipo positivo para TTF-1, CK7 e CK20 por citometria de fluxo. Isso demonstra que é possível fazer a identificação de células neoplásicas em amostras de efusões pleurais (ver Figuras 13 e 14); porém, para mais análises, um número maior de amostras deve ser avaliado com esses marcadores.

O diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma envolvendo cavidades serosas e mesotelioma é bem conhecido como uma dificuldade da citologia dos líquidos (BATTIFORA; KOPINSKI, 1985). Assim, o próximo passo na padronização da metodologia foi verificar se os marcadores propostos no presente estudo eram capazes de fazer essa diferenciação. Para isso, foi utilizado o anticorpo Ber-EP4 conjugado com o FITC, que é um dos marcadores mais utilizados no diagnóstico diferencial entre carcinoma (Ber-EP4+) e mesotelioma (Ber-EP4-). Como pôde ser observado na Figura 9, foi possível avaliar a expressão do anticorpo Ber-EP4 conjugado com o fluorocromo FITC para análises por citometria de fluxo. Mesmo que essa avaliação não tenha sido realizada em amostras de efusão pleural, sua expressão em células de aspirado de linfonodo confirma a possibilidade de sua análise por citometria de fluxo.

Duas amostras provenientes de pacientes portadoras de câncer de mama foram marcadas com esse anticorpo e tiveram resultados negativos. O GCFDP-15 não foi avaliado no painel dessas duas pacientes pela imunocitoquímica realizada pelo Serviço de Patologia do HU, o que impossibilitou a comparação entre as duas metodologias.

Como pode ser observado, a metodologia para a investigação do fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários por citometria de fluxo foi padronizada, sendo, apesar do pequeno número de amostras

analisadas, possível concluir que é útil para distinguir as células neoplásicas das normais e, com isso, fazer o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas. No entanto, mais estudos com um número maior de amostras serão necessários para o estabelecimento da metodologia na rotina laboratorial de investigação de células neoplásicas.

CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES

A compilação dos resultados encontrados neste estudo permitiu concluir que

1. o painel de anticorpos monoclonais utilizado CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD38, CD45, CD64 e CD56 foi capaz de identificar células encontradas nos líquidos serosos, tais como linfócitos T, linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, linfócitos T alfa/beta, linfócitos T gama/delta, células natural killers, células natural killers T variante, eosinófilos, monócitos, neutrófilos presentes em efusões secundárias a processos benignos e malignos;
2. os anticorpos monoclonais TTF-1, CK7 e CK20 foram úteis na identificação das células neoplásicas provenientes de processo metastático pulmonar em efusões pleurais malignas;
3. embora não houvesse efusões malignas com células que expressassem Ber-EP4, detectadas por citometria de fluxo, foi possível padronizar a identificação desse marcador por essa metodologia;
4. a expressão dos anticorpos monoclonais Vimentina e GCDFP-15 não foi validada no estudo;
5. os resultados da avaliação das células reacionais presentes nas efusões cavitárias por citometria de fluxo foram compatíveis com aqueles obtidos pela avaliação morfológica;
6. a avaliação da expressão dos antígenos TTF-1, CK7 e Ber-EP4 nas células malignas presentes nas efusões cavitárias por citometria de fluxo foi compatível com aqueles obtidos pela avaliação da imunocitoquímica. Porém, para CK20, Vimentina e GCDFP-15 os resultados foram contraditórios e, portanto, mais análises serão necessárias; e
7. mais estudos com um número maior de amostras se fazem necessários para o estabelecimento da metodologia na rotina laboratorial de investigação de células neoplásicas.

Por fim, apesar do reduzido número de amostras provenientes de efusões malignas, as análises realizadas neste trabalho sugerem que a citometria de fluxo é uma metodologia aplicável à avaliação da celularidade de efusões cavitárias e útil na detecção de células neoplásicas.

CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS

1. Continuar a realização do presente trabalho para a obtenção de um número maior de amostras analisadas com suspeita de malignidade.
2. Desenvolver um painel de anticorpos para análise que seja capaz de detectar células mesoteliais e diferenciá-las de células provenientes de processos reacionais e/ou malignos.
3. Ampliar o estudo avaliando o fenótipo por citometria de fluxo das células de biópsias de tumores sólidos envolvidos nos processos metastáticos encontrados nos líquidos pleurais (câncer de pulmão e mama) com os anticorpos testados neste estudo (CK7, CK20, Ber-EP4, GCFPD-15, Vimentina).

REFERÊNCIAS

AFSHAR-MOGHADDAM, N.; HEIDARPOUR, M.; DASHTI, S. Diagnostic value of claudin-4 marker in pleural and peritoneal effusion cytology: Does it differentiate between metastatic adenocarcinoma and reactive mesothelial cells? **Adv. Biomed Res.**, v. 3, p. 161, 2014.

ALMEIDA JUNIOR, H. L. Citoqueratinas. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 135-145, 2004.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Measurement in medicine: The analysis of method comparison studies. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 32, n. 3, p. 307-317, 1983. Series D (The Statistician).

ALVES, F. A. V. Imunocitoquímica nos derrames cavitários. In: BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. **Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 145-172.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Ascite: estado da arte baseado em evidências. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 55, n. 4, p. 489-496, 2009.

ATKINSON, B. F. **Atlas de diagnóstico citopatológico**. 2. ed. Madrid: Elsevire España, 2005. v. único.

BAER, K. E.; SMITH, G. P. Serous body cavity fluid examination. **Laboratory Medicine**, v. 32, n. 2, p. 85-88, 2001.

BAMMANN, R. H. Condutas terapêuticas. In: BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. **Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 89-101.

BATTIFORA, H.; KOPINSKI, M. I. Distinction of mesothelioma from adenocarcinoma an immunohistochemical approach. **Cancer**, v. 55, p. 1679-1685, 1985.

BAYRAK, R.; HALTAS, H.; YENIDUNYA, S. The value of CDX2 and cytokeratins 7 and 20 expression in differentiating colorectal

adenocarcinomas from extraintestinal gastrointestinal adenocarcinomas: Cytokeratin 7-/20+ phenotype is more specific than CDX2 antibody. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2012.

BELDA, J. et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 2, p. 475-478, 2000.

BILIĆ-ZULLE, L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. **Biochemia Medica**, v. 21, n. 1, p. 49-52, 2011.

CASTRO, M. A. M.; ROSENBERG, N. P. Antígeno carcinoembrionário no diagnóstico diferencial dos derrames pleurais. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 1, p. 15-17, 2005.

CHARALAMPIDIS, C. et al. Pleura space anatomy. **Journal of Thoracic Disease**, v. 7, n. S1, p. 27-32, 2015.

CIBAS, E. S. Pleural, pericardial, and peritoneal fluids. In: CIBAS, E. S.; DUCTMAN, B. S. **Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. p. 129-153.

COSTA, J. R.; DE AGUSTIN, D. Líquidos orgânicos: I ascítico, pleural e pericárdico. **Cuadernos de Citopatología**. 1. ed. Madrid, España: Diaz de Santos, 2003.

CYTOVAS. Disponível em: Acesso em: <<http://www.cytovas.com/technology/>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

DARB-ESFAHANI, S. et al. Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15 expression in breast cancer subtypes). **Biomed Central Cancer**, v. 14, n. 546, p. 2-10, 2014.

DASA. Disponível em: <http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/conhecmedico_indice.php#>. Acesso em: 10 mar. 2015.

DASGEB, D. et al. Use of Ber-EP4 and epithelial specific antigen to differentiate clinical simulators of basal cell carcinoma. **Biomed Central Cancer**, v. 25, n. 5, p. 7-11, 2013.

- FERREIRA-FACIO, C. S. et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2013.
- FONSECA, L. F. A. Estudo do líquido pleural: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 3, p. 245-250, 2011.
- GENOFRE, E.; CHIBANTE, A. M. S.; MACEDO, A. G. Derrame pleural de origem indeterminada. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 4, p. 204-210, 2006.
- GOLIM, M. A. et al. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 361-368, 2007.
- GRAY, W.; KOCJAN, G. **Diagnostic Cytopathology**. 3. ed. Londres: Elsevier, 2010. p. 115-175.
- GU, Y. et al. Diagnostic values of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor for benign and malignant hydrothorax. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v. 128, n. 3, 2015.
- HAE-SEONG, N. et al. Malignant pleural effusion: Medical approaches for diagnosis and management. **Tuberc. Respir. Dis.**, v. 76, p. 211-217, 2014.
- HAROSKE, G. et al. Competence on demand in DNA image cytometry. **Pathology, Research and Practice**, v. 5, n. 196, p. 285-291, 2000.
- HORNA, P. et al. Flow cytometric analysis of surface light chain expression patterns in B-Cell lymphomas using monoclonal and polyclonal antibodies. **American Journal Clinical Pathology**, v. 136, p. 954-959, 2011.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil: Ministério da Saúde, 2011.

JAGIRDAR, J. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of primary and metastatic carcinoma to the lung. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 132, n. 3, p. 384-396, 2008.

JIANG, A. et al. The relationship between glasgow prognostic score and serum tumor markers in patients with advanced non-small cell lung câncer. **Biomed Central**, v. 15, p. 386-398, 2015.

JOSHI, J. P. et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 9, p. 1090-1099, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556 p.

JUNQUEIRA, J. J. M. et al. Derrame pleural maligno: abordagem individualizada conforme apresentação clínica. **Rev. Med.**, São Paulo, v. 86, n. 1, p. 39-51, 2007.

KANAJI, K. N. et al. Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines. **Oncology Reports**, v. 26, p. 763-768, 2011.

KOPCINOVIC, L. M.; CULEJ, J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions: A biochemical approach. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, p. 123-137, 2014.

KOSS, L. G. **Koss's diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 2006. 1804 p. v. 2.

KRISHAN, A. et al. Detection of tumor cells in body cavity fluids by flow cytometric and immunocytochemical analysis. **Diagn Cytopathol**, v. 34, n. 8, p. 528-541, 2006.

KUNDU, R.; HANDA, U.; MOHAN, H. Role of DNA flow cytometry and immunocytochemical analysis in diagnosis of malignant effusions. **Diagn Cytopathol**, v. 40, n. 10, p. 887-892, 2012.

LAU, L. G. et al. Acute lymphoblastic leukemia with the phenotype of a putative B-Cell/T-Cell bipotential precursor. **American Journal of Hematology**, v. 77, p. 156-160, 2004.

LETHEULLE, J. et al. Parapneumonic pleural effusions: Epidemiology, diagnosis, classification and management. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 32, n. 4, p. 344-357, 2015.

LIBERTI, E. Anatomia das membranas serosas. In: BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. **Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 1-7.

LIMA, P. R. L.; CROTTI, P. L. R. Tumores cardíacos malignos. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 19, n. 1, p. 64-73, 2004.

LONGATTO FILHO, A. et al. Frequência de adenocarcinomas em derrames cavitários. **Rev. Ass. Méd. Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 327-336, 1999.

MAJI, A. et al. Role of common investigations in aetiological evaluation of exudative pleural effusions. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, p. 2223-2226, 2013.

MARTINEZ-VEA, A. et al. Diagnostic value of tumoral markers in serous effusion: Carcinoembryonic antigen, alpha 1-acidglycoprotein, alpha-fetoprotein, phosphohexose isomerase, and beta 2-microglobulin. **Cancer**, v. 50, n. 9, p. 1783-1788, 1982.

MARTINS; D. M.; GAGLIANI, L. H. Importância da fitometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 5, n. 8, p. 55-61, 2008.

MUTSAERS, S. E. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. **Respirology**, v. 7, n. 3, p. 171-191, 2002.

NEGROMONTE FILHO, G. C. **Tumores metastáticos nos líquidos cavitários**. 92 f. Monografia (Especialização em Citologia Clínica) – Universidade Paulista Centro de Consultoria Educacional, Recife, 2011.

OLIVEIRA, R. A. G.; POLI NETO, A. **Anemias e leucemias**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. 421 p.

ORDÓÑEZ, N. The diagnostic utility of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing between peritoneal mesotheliomas and serous carcinomas: A comparative study. **Modern Pathology**, v. 19, p. 34-48, 2006.

ORFAO, A. et al. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 55, n. 221, p. 145-152, 1995.

PALMA, J. H. et al. Drenagem pericárdica videotoroscópica no tratamento dos derrames pericárdicos. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 24, n. 1, p. 44-49, 2009.

PAPANICOLAOU, G. N. A new procedure for staining vaginal smear. **Science**, n. 95, p. 438-439, 1942.

PASSING, H.; BABLOK, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods: Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry (Part I). **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 709-720, 1983.

PATHPEDIA. Disponível em:
<http://www.pathpedia.com/education/atlas/histopathology/pleura/malignant_mesothelioma.aspx>. Acesso em: 5 jan. 2015.

PILLAI, V. et al. A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies. **American Journal Clinical Pathology**, v. 139, p. 672-681, 2013.

PIZZICHINI, E. et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: Reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, p. 308-317, 1996.

POLITI, E. et al. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. **Diagnostic Cytopathology**, v. 32, n. 3, p. 151-155, 2005.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

ROSENBERG, R. et al. Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 19, Issue 5, p. 430-437, Sept. 2004.

RYU, J. S. et al. Prognostic impact of minimal pleural effusion in non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 9, p. 960-967, 2014.

SANGISETTY, S. L.; THOMAS, J. M. Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. **World J Gastrointest Surg.**, v. 4, n. 4, p. 87-95, 2012.

SCHMITT, F. C.; COSTA, C. Biologia celular. In: BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. **Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 41-56.

SHIDHAM, V. B.; ATKINSON, B. F. **Cytopathologic diagnosis of serous fluids**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007.

SOUFEN, H. N. et al. Doença neoplásica do pericárdio: análise de 26 pacientes. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 72, n. 1, p. 51-54, 1999.

SWERDLOW, S. H. et al. (Ed.). Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. **International Agency for research on Cancer (IARC)**, Lyon, 4th., p. 439, 2008.

TAKAHASHI, T. et al. Ber-EP4 immunoreactivity in infundibulocystic basal cell carcinoma. **The Journal of Dermatology**, v. 41, n. 6, p. 565-567, 2014.

TANG, Z. et al. Different expression of FoxM1 in human benign and malignant pleural effusion. **Medical. Oncology.**, v. 32, n. 1, p. 312-319, 2015.

TARADA, T. An immunohistochemical study of adenomatoid tumores of the uterus and fallopian tube. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 20, n. 2, p. 173-176, 2012.

TEIXEIRA, L. R.; PINTO, J. A. F.; MARCHI, E. Derrame pleural neoplásico. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 4, p. 182-189, 2006.

VIRGO, P. F.; GIBBS, G. J. Flow cytometry in clinical pathology. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 49, p. 17-28, 2012.

WAGNER, I. C. et al. Avaliação dos valores sérico e pleural dos marcadores tumorais CEA, CYFRA21-1 e CA 15-3 em portadores de derrame pleural. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 2, p. 185-191, 2007.

WAISBERG, D. R. et al. Conduta cirúrgica do derrame pleural parapneumônico em adultos. **Rev. Med.**, v. 90, n. 1, p. 15-28, 2011.

WANG, B. et al. Diagnostic accuracy of Ber-Ep4 for metastatic adenocarcinoma in serous effusions: A meta-analysis. **Plos. One.**, v. 9, n. 9, p. 1-9, 2014.

YAHYA, Z. M.; ALI, H. H.; HUSSEIN, H. G. Evaluation of the sensitivity and specificity of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of effusion cytology. **Oman Medical Journal**, v. 28, n. 6, p. 410-416, 2013.

YAMADA, S.; TAKEDA, T.; MATSUMOTO, K. Prognostic analysis of malignant pleural and peritoneal effusions. **Cancer**, v. 51, p. 136-140, 1983.

YANG, M.; NONAKA, D. A Study of immunohistochemical differential expression in pulmonary and mammary carcinomas. **Modern Pathology**, v. 23, p. 654-661, 2010.

ZHAN, P. et al. Prognostic value of TTF-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. **Translational Cancer Research**, v. 2, n. 1, p. 25-32, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP SH

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Importância da Análise Multimodal para o Diagnóstico das Efusões Pleurais.

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 18715613.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 378.712

Data da Relatoria: 26/08/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto orientado por Santos da Silva que pretende analisar líquido pleural de 170 sujeitos.

Objetivo da Pesquisa:

investigar o fenótipo e o conteúdo de DNA das células presentes em efusões pleurais e analisar a importância dos mesmos como marcadores fenotípicos e moleculares para o diagnóstico diferencial e prognóstico de carcinomas primários ou metastáticos de pulmão e de mama, e para diferenciá-los dos linfomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pode contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 30 de Agosto de 2013

Assinador por:
Ylmar Correa Neto
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9205 Fax: (48)3721-9968 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

ANEXO B – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA CEP/CEPON



ESTADO DE SANTA CATARINA
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO DE APOIO AO HEMOSC E CEPON - FARECE
CENTRO DE PESQUISAS ONCOLÓGICAS - CEPON
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins e efeitos legais, que o Comitê de Ética em Pesquisa do CEPON, em reunião realizada no dia 05 de setembro de 2014, analisou e aprovou os documentos pertencentes ao Protocolo de Pesquisa CEP/CEPON Nº 003/2014 "Importância da análise multimodal para o diagnóstico das efusões pleurais". A lista dos documentos aprovados por este Comitê encontra-se na Plataforma Brasil.

Florianópolis, 05 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Luiz Roberto Medina dos Santos
Coordenador do CEP/CEPON

Assinatura: _____
Nome: _____
Ass: _____