



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MANOELA LIRA REIS

**ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM EFUSÕES  
PLEURAS POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Florianópolis  
2020

MANOELA LIRA REIS

**ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM EFUSÕES  
PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>, Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.

Florianópolis

2020

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

Lira Reis, Manoela

Análise do fenótipo das células neoplásicas em efusões  
pleurais por citometria de fluxo. / Manoela Lira Reis ;  
orientador, Maria Cláudia Santos da Silva, 2020.  
119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

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

MANOELA LIRA REIS  
**ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EM EFUSÕES  
PLEURAIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Tadeu Ferreira de Paiva Junior, Dr.  
Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON)

Prof.(a) Flávia Martinello, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

---

Prof<sup>a</sup>. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Dra.  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho às minhas queridas avós, Maria José Carvalho de Lira (*in memoriam*) e Maria da Silva, e aos meus pais, Fátima e Moacir, meus exemplos de força e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Maria Cláudia Santos da Silva que acreditou em mim, mesmo quando pensei que não fosse capaz de concluir este estudo. Com muita paciência, sempre me trilhou de volta para o caminho que me permitiu chegar até aqui. Obrigada por todos esses onze anos de ensinamentos, dedicação e amizade. Se hoje estou diante de uma defesa de tese, atribuo este fato ao seu convite em 2008 para ser sua aluna de iniciação científica. Orientar uma menina que estava na terceira fase da turma da Farmácia/UFSC até a conclusão de um doutorado não é uma tarefa fácil. Na verdade, são poucos orientadores que conseguem essa proeza. Serei eternamente grata por tudo que conquistei e tudo o que este título poderá me ajudar a conquistar!

Aos integrantes do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), em especial Laura, Sandro, Iris e Chandra pela ajuda nos experimentos que envolviam citometria de fluxo.

Ao serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC (SAP/HU/UFSC), pela colaboração nos experimentos que envolviam análises morfológicas e imunocitoquímica, em especial aos meus queridos amigos Daniela Serafim, Jovana, Lica, Aline Costa, Bruno, Bianca, Rita e Danusa. Vocês me deram força nos momentos em que eu mais precisava.

Ao Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), em especial aos médicos Fábio May e Rodrigo Baretta, e ao bioquímico Eduardo Ribeiro, pela colaboração na aquisição das amostras.

Aos professores Alexandre e Fabiana Onofre pelos ensinamentos que envolviam citologia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESC) pelo financiamento que possibilitou a realização deste estudo.

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

Aos meus queridos pais e exemplos de vida, Maria de Fátima e Moacir, às minhas irmãs Marcela e Rafaela, aos meus cunhados Ângelo e Neto por toda torcida, caronas até o HU e por me presentear com as minhas duas pérolas, Pietro e Matheus, que deram vida aos meus dias mais cansativos! Vocês são meus alicerces. Obrigada por serem essa família maravilhosa.

Ao meu marido Lucas pelo suporte nos dias mais difíceis e, acima de tudo, por me dar o melhor e mais doce presente que eu poderia ganhar nessa vida, que é a nossa Maria Alice. Serei eternamente grata por me proporcionar momentos tão felizes no meio de toda essa loucura. Também agradeço à minha sogra, sgras e cunhadas; não tenho palavras para descrever tamanha sorte em tê-los na minha vida. Vocês foram essenciais para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

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

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina, e não perguntar o que se ignora.”

São Beda

## RESUMO

A efusão pleural (EP), também denominada de derrame pleural, é caracterizada pelo acúmulo de líquido no espaço pleural em decorrência do desequilíbrio entre a formação e a reabsorção de fluido, ou como consequência de uma alteração no sistema de drenagem linfática. De acordo com a etiologia e com base nos achados citológicos, as efusões pleurais podem ser classificadas em efusões pleurais reacionais (EPR), malignas (EPM) ou paramalignas (EPP). As EPM são definidas como o acúmulo de uma quantidade significativa de exsudato no espaço pleural, acompanhado da presença de células malignas ou tecido tumoral. A observação de células neoplásicas em amostras de efusão pleural por citologia é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de EPM. Quando somente os achados morfológicos não são suficientes para definir o diagnóstico, a imunocitoquímica é a metodologia mais utilizada para auxiliar na sua conclusão. No entanto, apesar de ser a metodologia mais utilizada, possui algumas limitações, como a morosidade do procedimento e as variações interobservadores. Estudos mostram que a citometria de fluxo vem sendo utilizada como uma metodologia sensível, rápida e versátil para avaliar o imunofenótipo de células hematopoiéticas, pois é capaz de analisar um grande número de células marcadas com diferentes marcadores. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos pleurais por citometria de fluxo e analisar a sua importância como marcadora fenotípica para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas. Para isso, foram analisadas 58 amostras de líquido pleural utilizando avaliações morfológicas e/ou análises imunofenotípicas por citometria de fluxo e imunocitoquímica. Na definição do painel de anticorpos considerou-se os antígenos presentes nas células neoplásicas de pulmão (CK7, CK20, TTF-1, Ber-EP4), de mama (CK7, CK20, GCDFP-15) e nas neoplasias linfoproliferativas (Kappa e Lambda). Os resultados obtidos mostram que, na comparação entre as análises dos marcadores *Lambda* e *Kappa* por citometria de fluxo e imunocitoquímica (padrão ouro), houve uma concordância boa (teste de concordância *Kappa* indicou valor 0,767) e excelente (teste de concordância *Kappa* indicou valor 1,00), respectivamente, quando avaliados nas EPM de neoplasias linfoproliferativas. Conforme a análise da concordância entre as metodologias citadas acima, CK7 (teste de concordância *Kappa* indicou valor 0,750) e TTF-1 (teste de concordância *Kappa* indicou valor 0,545) foram melhores do que o Ber-EP4 (teste de concordância *Kappa* indicou valor 0,250) para as neoplasias não hematológicas. A análise de concordância *Kappa* para os marcadores GCDFP-15 e CK20 foi inviabilizada, pois foram poucos os casos que apresentaram a expressão desses marcadores celulares. Além disso, a análise dos valores relativos da população leucocitária não mostrou diferença estatística entre os grupos de pacientes avaliados (pacientes com EPR, EPM e EPP), com exceção do percentual médio de células NK em EPM de câncer de mama, que foi maior (6,20%) do que o percentual médio de células NK em EPM de câncer de pulmão (1,15%) (p-valor = 0,024). Os resultados deste estudo mostram que a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta de diagnóstico laboratorial importante para detecção de células malignas em amostras de líquido pleural, e que em associação com a avaliação morfológica e imunocitoquímica pode auxiliar no diagnóstico diferencial das EPM. Isso implica na rapidez do diagnóstico e no aumento da eficiência dos tratamentos, o que pode resultar na diminuição do tempo de internação hospitalar e dos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e na melhoria da qualidade de vida desses indivíduos.

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



## ABSTRACT

Pleural effusion (PE), also called pleural effusion, is characterized by the accumulation of fluid in the pleural space as a result of imbalance between fluid formation and resorption, or as a consequence of a change in the lymphatic drainage system. According to etiology and based on cytological findings, pleural effusions can be classified into reactive (RPE), malignant (EPM) or paramalignant (EPP) pleural effusions. SEM is defined as the accumulation of a significant amount of pleural space exudate, accompanied by the presence of malignant cells or tumor tissue. Observation of neoplastic cells in pleural effusion specimens by cytology is considered the gold standard for the diagnosis of EPM. When only morphological findings are not sufficient to define the diagnosis, immunocytochemistry is the most used methodology to assist in the conclusion of the diagnosis. However, despite being the most used methodology, it has some limitations, such as the length of the procedure and interobserver variations. Studies show that flow cytometry has been used as a sensitive, rapid and versatile methodology to evaluate hematopoietic cell immunophenotype, as it is able to analyze a large number of cells labeled with different markers. Thus, the objective of this study was to evaluate the phenotype of cells present in pleural fluids by flow cytometry and to analyze their importance as phenotypic markers for the differential diagnosis between malignant and benign effusions. For this, 58 pleural fluid samples were analyzed using morphological and / or immunophenotypic analyzes by flow cytometry and immunocytochemistry. Antibodies present in lung (CK7, CK20, TTF-1, Ber-EP4), breast (CK7, CK20, GCDFP-15) and lymphoproliferative (Kappa and Lambda) neoplasms were considered in the definition of the antibody panel). The results show that when comparing the analyzes of Lambda and Kappa markers by flow cytometry and immunocytochemistry (gold standard) there was a good agreement (Kappa agreement test indicated value 0.777) and excellent agreement (Kappa agreement test indicated value 1.00). ), respectively, when evaluated in MPM of lymphoproliferative neoplasms. The agreement analysis between the above methodologies for CK7 (Kappa agreement test indicated value 0.750) and TTF-1 (Kappa agreement test indicated value 0.545) was better than Ber-EP4 (Kappa agreement test indicated value 0.250) for non-hematologic malignancies. Kappa agreement analysis for GCDFP-15 and CK20 markers was unfeasible, as there were few cases that showed the expression of these cellular markers. In addition, the analysis of the relative values of the leukocyte population showed no statistical difference between the groups of patients evaluated (patients with RPE, EPM and EPP) except for the mean percentage of NK cells in breast cancer EPM that was higher (6, 20%) when compared to lung cancer cases (1.15%) (p-value = 0.024). The results of this study show that flow cytometry can be an important laboratory diagnostic tool for detection of malignant cells in pleural fluid samples, and that in association with morphological and immunocytochemical evaluation can assist in the differential diagnosis of PPE. This implies rapid diagnosis and increased treatment efficiency, which may result in shorter hospital stays, lower costs for the Unified Health System (SUS), and improved quality of life for these individuals.

**Key-words:** Pleural effusions. Diagnosis. Flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa da cavidade pleural e do sistema de formação/reabsorção do líquido pleural .....	19
Figura 2 – Diferentes apresentações citológicas das EPRs .....	28
Figura 3 – Mecanismos envolvidos na patogênese das EPMs. ....	30
Figura 4 – Exemplos de apresentações citológicas observadas nas EPMs .....	35
Figura 5 – Exemplo citológico observado em uma amostra com diagnóstico de EPP.....	38
Figura 6 – Fluxograma das etapas de análise dos líquidos pleurais. ....	43
Figura 7 – Achados citológicos e histológicos em paciente com efusão pleural, exemplificando células coradas em Papanicolaou e H&E.....	45
Figura 8 – Semelhanças morfológicas entre EPR e EPM. ....	46
Figura 9 –Tipos de marcação empregadas na imunocitoquímica.....	49
Figura 10 –Caso de EPM secundário a câncer de pulmão metastático.....	54
Figura 11 – Análise morfológica e imunofenotípica por citometria de fluxo e imunocitoquímica em um caso de EPM.....	59
Figura 12 – Funcionamento interno de um Citômetro de fluxo .....	60
Figura 13 –Fluxograma experimental do estudo. ....	65
Figura 14 –Estratégia de <i>gating</i> para a avaliação dos líquidos pleurais por citometria de fluxo.....	70
Figura 15 –Estratégia de <i>gating</i> para os EPM secundários a câncer de pulmão e mama. ....	71
Figura 16 –Estratégia de <i>gating</i> para os EPM suspeitos quanto à doença hematológica. ....	72
Figura 17 – <i>Dot plots</i> representativos da imunofenotipagem da amostra de líquido pleural demonstrando as células hematopoiéticas. ....	73
Figura 18 – Análise de uma mostra de efusão pleural com infiltração de células plasmocíticas procedente de um paciente do estudo diagnosticado com mieloma múltiplo, avaliado por citometria de fluxo. ....	81
Figura 19 –Amostra de efusão pleural maligna procedente de um participante do estudo diagnosticado com câncer de pulmão metastático, avaliado por citometria de fluxo.....	82

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das efusões pleurais quanto ao seu aspecto .....	22
Quadro 2 – Definição das efusões pleurais de acordo com a sua formação e com a classificação proposta pelos Critérios de Light.....	23
Quadro 3 – Escore de prognóstico LENT. ....	32
Quadro 4 – Lista de doenças com maior probabilidade de associação com as EPI .....	40
Quadro 5 – Classificação e exemplos de substâncias fluoróforas utilizadas na imunocitoquímica.. ....	48
Quadro 6 – Resumo de alguns marcadores aplicados no diagnóstico diferencial das EPMS..	51
Quadro 7 – Antígenos expressos nas diferentes populações leucocitárias.....	58
Quadro 8 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo.....	67
Quadro 9 – Distribuição dos tubos de análise dos líquidos pleurais para a imunofenotipagem por citometria de fluxo. ....	68
Quadro 10 –Anticorpos primários usados na imunocitoquímica e seus respectivos fabricantes, clones, diluições e controle. ....	76
Quadro 11 - Comparação das análises dos marcadores por imunocitoquímica e por citometria de fluxo nas amostras de líquido pleural procedentes de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão, mama e neoplasia linfoproliferativa .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções de causas de efusões pleurais reacionais – benignas. ....	25
Tabela 2 – Características gerais das neoplasias malignas mais comuns associadas às EPMs	32
Tabela 3 – Distribuição dos pacientes com suspeita de EPM de acordo com a idade. ....	77
Tabela 4 – Distribuição das frequências das variáveis qualitativas. ....	77
Tabela 5 – Graus de concordância entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e imunocitoquímica. ....	80
Tabela 6 – Distribuição dos grupos EPP, EPM e EPR com relação à idade. ....	83
Tabela 7 – Distribuição dos grupos EPP, EPM e EPR de acordo com o gênero ....	83
Tabela 8 – Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes diagnosticados com neoplasia linfoproliferativa e neoplasia não hematológica (mama, pulmão e outras) ....	84
Tabela 9 – Comparação da subpopulação leucocitária presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes com EPP/EPM e EPR. ....	85
Tabela 10 – Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes com EPP e EPM. ....	86
Tabela 11 – Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes diagnosticados câncer de mama e de pulmão). ....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
Ac	Anticorpo
APC	Aloficocianina
APC-H7	Aloficocianina-cianina
Bcl2	Proteína B de linfoma 2
Ber-EP4	Glicoproteína epitelial de adesão
<sup>14</sup> C	Carbono-14
CCL2	Ligante 2 de quimiocina
CD	Cluster differentiation
Células NK	Células Natural Killers
Células NKT	Células T Natural Killer
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CEP	Comitês de Ética em Pesquisa
CF	Citometria de Fluxo
CK	Citoqueratina
CS&T	<i>Cytometer Setup and Tracking Bead</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncologic Group</i>
Ep-CAM	Glicoproteína epitelial de adesão humana
EP	Efusão Pleural
EPM	Efusão Pleural Maligna
EPP	Efusão Pleural Paramaligna
EPR	Efusão Pleural Reacional
EPI	Efusão Pleural de Origem Indeterminada
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GCFDP-15	Gross Cystic Disease Fluid Protein 15
HCl	Ácido Clorídrico
H&E	Hematoxilina e eosina
HER-2	Fato de crescimento epidermal humano

HU	Hospital Universitário
IL6	Interleucina 6
ICQ	Imunocitoquímica
LDH	Lactato Desidrogenase
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
NFκβ	Fator Nuclear Kappa B
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PB	Pacific Blue
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina cianina
PerCP	complexo proteína piridina de clorofila
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SSP 1	Fosfoproteína 1 secretada
SSC	<i>Side Scatter</i>
<sup>35</sup> S	Enxofre
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFα	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTF-1	Fator de transcrição da tireóide-1
ULAP	Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 PLEURA E EFUSÃO PLEURAL.....	19
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS EFUSÕES PLEURAS.....	20
<b>2.2.1 Efusões pleurais reacionais (benignas) – (EPRs) .....</b>	<b>24</b>
2.2.1.1 <i>Características citológicas das EPRs .....</i>	27
<b>2.2.2 Efusões pleurais malignas (EPMs).....</b>	<b>28</b>
2.2.2.1 <i>Características citológicas das EPMs.....</i>	34
<b>2.2.3 Efusões pleurais paramalignas (EPPs).....</b>	<b>36</b>
2.2.3.1 <i>Características citológicas das EPPs .....</i>	38
<b>2.2.4 Efusões pleurais de origem indeterminada (EPI) .....</b>	<b>39</b>
2.3 DIAGNÓSTICO E ANÁLISE LABORATORIAL DOS LÍQUIDOS PLEURAS .....	41
<b>2.3.1 Análises citológicas dos líquidos pleurais .....</b>	<b>44</b>
<b>2.3.2 Imunofenotipagem por imunocitoquímica (ICQ) .....</b>	<b>47</b>
2.3.2.1 <i>Caracterização fenotípica do câncer de mama para o diagnóstico de EPM.....</i>	50
2.3.2.2 <i>Caracterização fenotípica do câncer de pulmão para o diagnóstico de EPM.....</i>	52
2.3.2.3 <i>Caracterização fenotípica das neoplasias hematológicas para o diagnóstico de EPM. ....</i>	55
2.4 ESTUDO DAS EFUSÕES PLEURAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	60
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
3.1 Objetivo geral .....	63
3.2 Objetivos específicos.....	63
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	64
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	65
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	66
4.4 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS PRESENTES NOS LÍQUIDOS PLEURAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	66

<b>4.4.1 Estratégia de análise dos líquidos pleurais por citometria de fluxo .....</b>	<b>70</b>
<b>4.4.2 Quantificação das populações leucocitárias das amostras de líquido pleural procedentes de processos malignos ou reacionais por citometria de fluxo .....</b>	<b>72</b>
4.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS PRESENTES NOS LÍQUIDOS PLEURAIIS .....	73
<b>4.5.1 Análises imunocitoquímicas das células presentes nos líquidos pleurais .....</b>	<b>75</b>
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA .....	77
5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDOS PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	78
5.3 CLASSIFICAÇÃO DOS LÍQUIDOS PLEURAIIS DE ACORDO COM AS ANÁLISES MORFOLÓGICAS E IMUNOFENOTÍPICAS POR ICQ E CF .....	83
5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDOS PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	84
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>118</b>
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP SH.....	118
ANEXO B – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA CEP/CEPON .....	119



## 1 INTRODUÇÃO

A efusão pleural (EP), também denominada de derrame pleural, é caracterizada pelo acúmulo de líquido no espaço pleural em decorrência do desequilíbrio entre a formação e a reabsorção de fluido, ou como consequência de uma alteração no sistema de drenagem linfática (KUMMAR *et al.*, 2016). De acordo com a etiologia e com base nos achados citológicos, as efusões pleurais podem ser classificadas em efusões pleurais reacionais (EPR), malignas (EPM) ou paramalignas (EPP) (COMAR *et al.*, 2008, MEDENICA *et al.*, 2018). A efusão pleural maligna (EPM) é definida como o acúmulo de uma quantidade significativa de exsudato no espaço pleural, acompanhado da presença de células malignas ou tecido tumoral (PSALLIDAS *et al.*, 2016). A EPM, em alguns casos, pode ser a primeira manifestação clínica da doença neoplásica e é considerada um fator caracterizante de mau prognóstico, pois indica um sinal de doença avançada com baixa resposta ao tratamento sistêmico (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os tumores secundários provenientes da disseminação metastática são as causas mais comuns de EPM, e por esta ser uma manifestação de doença maligna avançada e sistemicamente disseminada, seu tratamento é paliativo e deve ser baseado em fatores como expectativa de sobrevida, sintomatologia e doença de base. Estima-se que a doença metastática pleural afete 200.000 pessoas por ano nos Estados Unidos e represente a segunda causa mais comum de derrame pleural exsudativo (após infecção) (LAT e PAUL, 2019). O mesotelioma, tumor primário do espaço pleural, é a causa menos comum de EPM e afeta aproximadamente 15.000 pessoas por ano no mundo e 3.000 pessoas por ano nos Estados Unidos. No Brasil, apesar da inexistência de levantamentos epidemiológicos precisos, acredita-se que o número de pacientes acometidos por esse tipo de efusão é semelhante, mesmo diante das diferenças econômicas entre esses países (VAZ *et al.*, 2006; BROADDUS *et al.*, 2017).

Apesar da possibilidade de qualquer neoplasia maligna evoluir para um quadro de EPM, certos tipos de tumores parecem ter atração metastática pela pleura, particularmente os tumores malignos de pulmão, de mama e linfomas, e, com menos frequência, as neoplasias gastrointestinais e geniturinárias. Em aproximadamente 7% a 15% dos casos, a neoplasia maligna de origem não é identificada, mesmo após extensa investigação diagnóstica, e os tumores são definidos como efusão de origem indeterminada (SHIDHAM, 2007; NEGROMONTE-FILHO, 2011; ANTONANGELO *et al.*, 2015; BROADDUS *et al.*, 2017).

Existe uma associação direta entre diagnóstico rápido e preciso e o sucesso terapêutico, o que resulta na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Para isso, há necessidade de profissionais da área da saúde capacitados e da utilização de um conjunto de métodos de

diagnóstico rápido e eficaz. Atualmente, o diagnóstico de neoplasias em EP é realizado pela observação de alterações morfológicas das células presentes na amostra do líquido pleural (PSALLIDAS *et al.*, 2016). No entanto, esse método de análise apresenta algumas dificuldades, por exemplo, nos casos em que o número de células nas efusões pleurais (EPs) é muito pequeno, ou quando a toracocentese foi de difícil punção, resultando em células com alterações morfológicas. Embora a citologia do líquido pleural seja mais sensível do que a biópsia pleural, sua sensibilidade de 40% a 87%, em alguns casos, ainda é insuficiente para tomar decisões clínicas e, geralmente, o diagnóstico é feito após o uso de procedimentos mais invasivos, como a toracoscopia ou toracotomia (ANTONANGELO *et al.*, 2015; KUMMAR *et al.*, 2016).

A dificuldade para realização do diagnóstico laboratorial ocorre devido às características morfológicas semelhantes observadas nas células patológicas das diferentes neoplasias relacionadas às EPs. Na tentativa de corrigir esse problema de identificação, novas metodologias estão constantemente sendo desenvolvidas e aplicadas, dentre as quais pode-se citar a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Estudos recentes mostram que a citometria de fluxo é uma metodologia sensível, rápida e versátil que permite avaliar um grande número de células com diferentes marcadores (BETTERS, 2015). Além disso, demonstra ser uma metodologia relevante que trouxe grandes contribuições para a área da saúde, pois é capaz de caracterizar e diferenciar fenotipicamente populações de células anormais das normais, mesmo quando as primeiras se encontram em baixo percentual na amostra (DAVIDSON, 2016). Embora a citometria de fluxo seja amplamente utilizada na rotina diagnóstica na área da hematologia, a sua aplicabilidade em tumores não hematológicos ainda permanece, em grande parte, no âmbito da pesquisa (MARTINS e GAGLIANI, 2008; FERREIRA-FACIO *et al.*, 2013; DAVIDSON, 2016).

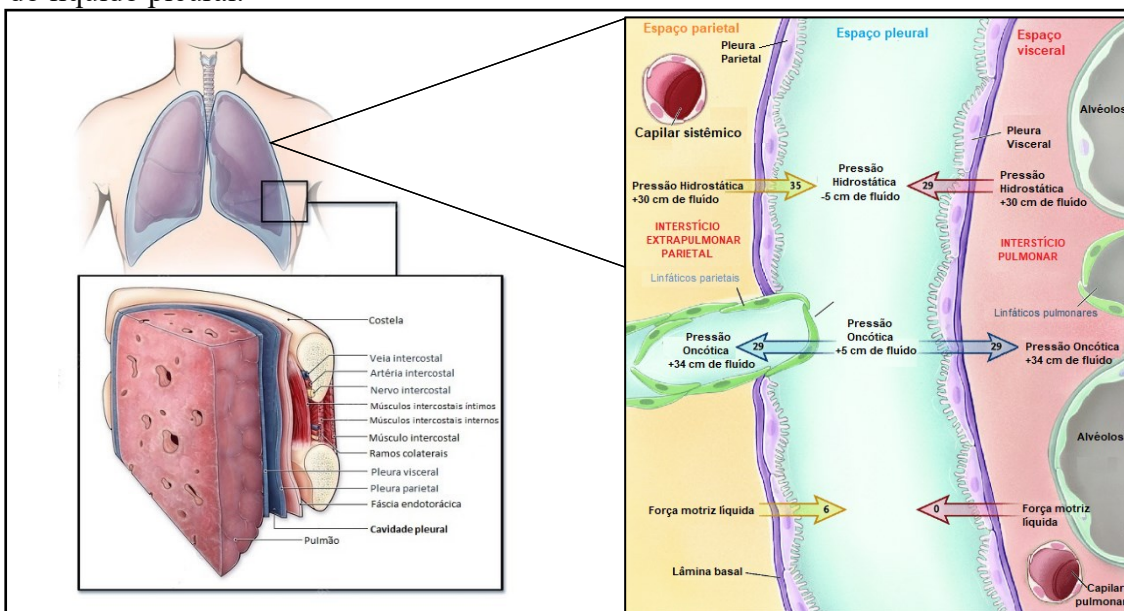
Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar o fenótipo das células presentes nos líquidos pleurais utilizando a citometria de fluxo, e analisar a importância dessa metodologia como marcadora fenotípica para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLEURA E EFUSÃO PLEURAL

A pleura é formada por uma camada única de células mesoteliais, unidas e apoiadas sobre uma membrana basal e uma camada de tecido conjuntivo frouxo, constituindo um folheto contínuo, sobreposto aos pulmões como um saco fibroso, que liga a superfície externa do parênquima pulmonar à parede mediastinal, à superfície torácica do diafragma e à superfície interna da caixa torácica óssea (SILVA, 1998). A porção exterior dessa membrana, também denominada de pleura parietal, reveste a parede torácica e o diafragma, enquanto a camada interior, ou pleura visceral, reveste diretamente o pulmão e as cisuras interlobares (Figura 1) (HALL e GUYTON, 2017). A irrigação do folheto parietal é realizada pela circulação sistêmica e pelo folheto visceral, que, por sua vez, é irrigado pela circulação pulmonar. O espaço formado entre os folhetos pleurais constitui a cavidade pleural, e no seu interior, flui um ultrafiltrado do plasma denominado líquido pleural (COMAR *et al.*, 2008).

Figura 1 – Imagem ilustrativa da cavidade pleural e do sistema de formação/reabsorção do líquido pleural.



Fonte: Adaptada de Science Photo Library – <https://www.sciencephoto.com/media/704289/view/lungs-and-pleura-illustration> e Feller-Kopman (2018)

O líquido pleural entra na cavidade por meio da circulação sistêmica e é removido pelos vasos linfáticos da pleura parietal, onde é renovado continuamente por um balanço de forças hidrostática e osmótica da microcirculação e do espaço pleural (Figura 1) (KUMMAR *et al.*,

2016). A função principal desse líquido é a lubrificação da superfície pleural, facilitando o deslizamento das pleuras visceral e parietal durante os movimentos respiratórios (KUMMAR *et al.*, 2016). Assim, a presença de líquido em pequeno volume no espaço pleural é normal e considerada necessária para a manutenção adequada da movimentação pulmonar durante a respiração (KUMMAR *et al.*, 2016). Em um indivíduo saudável, o volume de líquido pleural figura entre 7 ml e 16 ml, e é constituído basicamente por 1,05 g/dl a 1,5 g/dl de proteínas e cerca de 1.500 células/mm<sup>3</sup>, como monócitos, linfócitos, macrófagos, células mesoteliais e polimorfonucleares (KUMMAR *et al.*, 2016; TSE *et al.*, 2013).

No entanto, diversas condições locais e/ou sistêmicas podem modificar o microambiente do espaço pleural, provocando um acúmulo anômalo de líquido na cavidade em um processo denominado efusão pleural (CIBAS, 2009). A efusão pleural, também chamada derrame pleural, é caracterizada pelo acúmulo de líquido no espaço pleural em decorrência do desequilíbrio entre a formação e reabsorção de fluido, ou como consequência de uma alteração no sistema de drenagem linfática (FERREIRA *et al.*, 2006).

A análise laboratorial de um líquido pleural é considerada uma ferramenta imprescindível para a conclusão do diagnóstico em pacientes acometidos por uma efusão, pois fornece informações sobre a condição clínica do indivíduo, tais como o status de um processo inflamatório, ou ainda, a possível progressão de uma neoplasia maligna primária da cavidade pleural ou de uma neoplasia metastática (TSE *et al.*, 2013). Embora no Brasil não existam dados concretos da incidência de efusões pleurais, estima-se que esta seja semelhante à dos Estados Unidos, com cerca de 1 milhão de pacientes acometidos ao ano (DANTAS e REIS, 2018).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS EFUSÕES PLEURAS

Quando há uma suspeita de efusão pleural a partir da avaliação clínica, torna-se necessário a realização de exames de imagem, como radiografia de tórax por exemplo, para confirmar o acúmulo de líquido e definir sua extensão na cavidade, ou seja, verificar a ocorrência ou não de outros envoltimentos torácicos – pulmonar, cardíaco ou mediastinal (FERREIRA *et al.*, 2006). Após essa confirmação é iniciado o processo de retirada do líquido acumulado para a realização das análises laboratoriais (BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018).

A toracocentese é o procedimento médico responsável pela obtenção de mais de 90% das amostras de fluido pleural que são encaminhadas para as análises laboratoriais (ANTONANGELO e CAPELOZZI, 2006). Entretanto, amostras obtidas através de drenagem torácica, por coleta durante a toracoscopia (exame visual das superfícies do pulmão e do espaço

pleural através de um tubo denominado toracoscópio), ou mesmo durante a toracotomia (incisão da cavidade torácica para acessar seu conteúdo), também são utilizadas para análises bioquímicas e citológicas (FERREIRO *et al.* 2015; STEVIC *et al.*, 2018). Apesar de a toracocentese ser um procedimento seguro, de baixo custo e de grande eficiência diagnóstica, relatos na literatura indicam que pode haver contraindicações para a realização desse procedimento. Destacam-se principalmente situações em que os pacientes apresentam distúrbios de coagulação, ou seja, casos em que o volume de plaquetas está menor que 25.000/mm<sup>3</sup> e a atividade de protrombina menor que 50%, e quando os valores de creatinina estão maiores do que 6 mg/% (SALES e ONISH, 2006).

Dessa forma, a constatação clínico-radiológica da efusão pleural na rotina hospitalar é o primeiro passo do processo da análise de um líquido pleural, seguida de sua retirada para a realização das análises laboratoriais, para então ser estabelecida a causa da efusão e, por fim, a definição da melhor conduta terapêutica (BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018). Nesse contexto, as análises pré-laboratoriais e laboratoriais permitem classificar as efusões pleurais quanto à sua localização (grande cavidade, interlobar e mediastino), quanto ao seu aspecto (hemotórax, piotórax, quilotórax, urinotórax etc.), ou ainda, com relação à sua etiologia (tuberculose, pneumonia, neoplasia etc.) (COMAR *et al.*, 2008; KARKHANIS e JOSHI, 2012; BERTHOLD e WELTE, 2019; KRISHNA e RUDRAPPA, 2019).

O Quadro 1 resume algumas classificações das efusões pleurais com relação ao seu aspecto e às condições clínicas mais observáveis em cada situação. Porém, uma simplificação na classificação, sobretudo para promover uma aproximação diagnóstica, caracterizou a efusão pleural com base no mecanismo de formação do fluido em transudatos e exsudatos (COMAR *et al.*, 2008). Vários parâmetros bioquímicos e citológicos são usados para a diferenciação de transudatos e exsudatos, no entanto, os mais utilizados são os Critérios de Light, estabelecidos por Light *et al.* (1972).

Quadro 1 – Classificação das efusões pleurais quanto ao seu aspecto.

TIPOS	CONCEITOS	CONDIÇÃO CLÍNICA
<b>Hemotórax</b>	Caracteriza-se pela presença de sangue na cavidade pleural.	Pode ocorrer em acidente de punção, neoplasia, tuberculose, entre outras.
<b>Piotórax ou empiema</b>	Caracteriza-se quando a concentração de leucócitos se torna macroscopicamente evidente como um fluido espesso e turvo, ou seja, pus.	Pode ocorrer em infecções, durante a evolução de uma pneumonia ou abscesso pulmonar.
<b>Quilotórax</b>	Caracteriza-se pelo acúmulo de linfa no espaço pleural.	Pode ocorrer por procedimentos torácicos invasivos, intervenções cirúrgicas ou secundária à trombose da veia subclávia esquerda. Também pode ocorrer em patologias como sarcoidose, amiloidose, linfangioleiomiomatose, trombose da veia cava superior, tumores benignos, bem como complicações de radioterapia e anomalias congênitas.
<b>Urinotórax</b>	O urinotórax, ou seja, o acúmulo de urina no espaço pleural, é uma causa incomum e alguns estudos não o consideraram uma efusão pleural. Menos de 70 casos foram reportados mundialmente.	Desenvolve-se mais comumente em doentes com uropatia excretora ou trauma abdominal contuso.

Fonte: Comar *et al.*, (2008), Berthold e Welte (2019) e Krishna e Rudrappa (2019).

Vários parâmetros bioquímicos e citológicos são usados para a diferenciação de transudatos e exsudatos, no entanto, os mais utilizados são os Critérios de Light, estabelecidos por Light *et al.* (1972).

No Quadro 2 foram resumidas as principais condições para distinção dos líquidos conforme os Critérios de Light (LIGHT *et al.*, 1972). Essa distinção tornou-se uma importante etapa para o esclarecimento das causas da efusão, visto que diante de um transudato a possibilidade de haver doença pleural específica era mínima, enquanto para um exsudato a hipótese de doença pleural, quer seja primária ou secundária a alguma doença relacionada, poderia ser considerada (JUNIOR *et al.*, 2016).

Quadro 2 – Definição das efusões pleurais de acordo com a classificação proposta pelos Critérios de Light.

TIPO	CONCEITO	CONDIÇÕES CLÍNICAS OBSERVÁVEIS
TRANSUDATO	Está relacionado com o aumento da pressão hidrostática ou redução da pressão oncótica, mas com preservação da normalidade das superfícies pleurais.	Insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, cirrose hepática, hipoalbuminemia, diálise peritoneal.
EXSUDATO	Se relaciona, independentemente de sua causa, ao aumento da permeabilidade da microvascularização pleural e/ou obstrução linfática pleural ou do mediastino. Para os Critérios de Light, o líquido deve apresentar um dos seguintes fatores: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proporção de proteína do líquido pleural/proteína sérica superior a 0,5</li> <li>2. Razão desidrogenase do lactato do líquido pleural (LDH)/LDH sérica superior a 0,6</li> <li>3. Quando o LDH do líquido pleural está mais de dois terços acima do limite superior do valor normal do laboratório para o LDH sérico.</li> </ol>	Infecções, neoplasias malignas, tuberculose, efusão pleural parapneumônica, tromboembolia pulmonar (também presente nos transudatos), alterações linfáticas, entre outras.

Fonte: Light *et al.* (1972), Berthold e Welte (2019) e Krishna e Rudrappa (2019).

Assim, desde que Light *et al.* (1972) estabeleceram estes critérios de distinção por meio da dosagem pareada no soro e no líquido pleural da desidrogenase láctica (LDH) e proteínas totais, outras pesquisas e publicações foram realizadas na busca de métodos de diagnóstico que contemplassem o máximo de acurácia e o menor número de exames que favorecessem a correta distinção entre transudatos e exsudatos (MARANHÃO *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2010; HASSAN *et al.* 2012; JUNIOR *et al.*, 2016; FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018).

Assim, foi visto que em determinadas condições, como em pacientes que faziam o uso de diuréticos, as análises laboratoriais poderiam induzir a uma falsa classificação entre estes líquidos segundo os critérios propostos por Light *et al.* (1972) (MARANHÃO *et al.*, 2005). Deste modo, estudos posteriores indicaram a dosagem de outros parâmetros bioquímicos, tais como pH, glicose, marcadores tumorais ou de inflamações (CA-125, CA-15.3, CA-19.9, CYFRA, CEA, PCR etc.), adenosina desaminase (ADA), amilase e triglicérides, como forma

de determinar uma classificação mais fidedigna entre transudatos e exsudatos (FERREIRO *et al.*, 2015; JUNIOR *et al.*, 2016; CHUBB e WILLIAMS, 2018).

No entanto, apesar desta classificação ser utilizada rotineiramente na prática laboratorial, especialistas propõem que essa divisão categórica representa uma prática ultrapassada, pois não permite estabelecer uma causa definitiva da efusão (HASSAN *et al.* 2012; FERREIRO *et al.*, 2017; PORCEL *et al.*, 2017). Assim, demais parâmetros de investigação, tais como, análises microbiológicas, citológica e moleculares são aplicados em conjunto para a conclusão do diagnóstico (JONHSON *et al.*, 2017; FERREIRO *et al.*, 2017; CHUBB e WILLIAMS, 2018; CHEN *et al.*, 2018).

Dentre essas análises, a composição citológica mostrou ser uma excelente ferramenta diagnóstica (NA, 2014). Assim, neste estudo, avaliou-se os líquidos pleurais com base na classificação etiológica a partir dos achados citológicos. Portanto, para fins didáticos, as efusões pleurais foram classificadas em:

- 1) Efusões pleurais reacionais (benignas)
- 2) Efusões pleurais malignas
- 3) Efusões pleurais paramalignas
- 4) Efusões pleurais de origem indeterminada

As subseções a seguir detalham cada uma dessas condições clínicas.

### **2.2.1 Efusões pleurais reacionais (benignas) – (EPRs)**

As efusões pleurais reacionais são consideradas efusões benignas, visto que ocorrem secundariamente a processos infecciosos, inflamatórios, doenças autoimunes ou outras condições não relacionadas a processos neoplásicos malignos (BENLLOCH *et al.*, 2008). As causas das efusões pleurais reacionais são amplas e heterogêneas, e os pacientes podem se beneficiar de um tratamento menos agressivo e individualizado quando comparado ao tratamento de pacientes acometidos por efusões pleurais secundárias a causas malignas (BINTCLIFFE *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

Dados indicam que 1,5 milhão de pessoas desenvolvem efusões pleurais a cada ano nos Estados Unidos, com uma estimativa de que 1,1 a 1,3 milhão desses casos tenha etiologia não maligna (WALKER *et al.*, 2017). As condições clínicas mais associadas a esse tipo de efusão são tuberculose, pneumonia (também denominada efusão parapneumônica), infartos



pulmonares, abscessos pulmonares, bronquiectasia, além de outros distúrbios, como insuficiência cardíaca congestiva, cirrose, artrite reumatoide, lúpus sistêmico ou infecções sistêmicas difusas (SCHMITT e COSTA, 2001). Um estudo realizado no Reino Unido durante o período de cinco anos avaliou em uma série de 327 pacientes, as principais causas associadas às efusões pleurais, com exceção das causas malignas ou traumas. Os resultados obtidos foram compilados conforme mostra a Tabela 1 (BINTCLIFFE *et al.*, 2016). Apesar de o estudo ter sido realizado há quatro anos, a literatura internacional mais recente indica o mesmo perfil de causas (WALKER *et al.*, 2017; BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018; BRAMLEY *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Proporções de causas de efusões pleurais reacionais – benignas.

<b>Condição</b>	<b>Pacientes</b>
Infecção pleural <sup>#</sup>	131 (40.0%)
Insuficiência cardíaca congestiva	81 (34.8%)
Pleurite idiopática/não diagnosticada	41 (12.5%)
Efusão pleural benigna causada por exposição ao amianto	27 (8.3%)
Cirrose hepática	13 (4.0%)
Insuficiência renal	10 (3.1%)
Embolia pulmonar	6 (1.8%)
Revascularização pós-coronária	4 (1.2%)
Reação medicamentosa	3 (0.9%)
Efusão reumatoide	3 (0.9%)
Pulmão não expansível	2 (0.6%)
Pancreatite	2 (0.6%)
Outras <sup>†</sup>	4 (1.2%)

<sup>#</sup>: por exemplo, em efusões parapneumônicas, empiemas ou efusões pleurais tuberculosas;

<sup>†</sup>: por exemplo, nas diálises peritoneais, no lúpus eritematoso sistêmico ou como resultado de inalação de tinta.

Fonte: Adaptado de Bintcliffe *et al.* (2016).

No Brasil, registros sobre a incidência e a etiologia das efusões reacionais são escassos e pouco atualizados, no entanto, duas condições clínicas destacam-se entre os fatores associados a esse tipo de efusão no país: a tuberculose pleural e a efusão pleural benigna causada por exposição ao amianto (BRASIL, 2018; ALGRANTI *et al.*, 2019).

Com uma incidência aproximada de 39 casos/100.000 habitantes, o Brasil, juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, é responsável por cerca de 80% dos casos de tuberculose no mundo, sendo a forma extrapulmonar responsável por 14% a 18% dos casos diagnosticados no país, com envolvimento pleural observado em cerca de 50% desses pacientes (SCHMIDT *et al.*, 2019; MACÍAS *et al.*, 2019). A efusão pleural secundária à tuberculose é resultado da infecção da pleura pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, além da presença do bacilo no espaço pleural, esse tipo de efusão geralmente é caracterizado pelo acúmulo intenso

de substâncias e células inflamatórias na cavidade, geralmente se apresenta como um exsudado com uma predominância de células mononucleares (SCHMIDT *et al.*, 2019).

Além dessa condição clínica, a efusão pleural secundária à asbestose, uma das principais doenças ocupacionais causadas pela exposição ao amianto, também se mostra relevante no estudo das doenças com acometimento pleural (KUMMAR *et al.*, 2016; BINTCLIFFE *et al.*, 2016). Também chamado de asbesto, o amianto é uma fibra mineral que no Brasil foi utilizada principalmente na mistura com cimento como matéria-prima de telhas e caixas d'água (KALINKE *et al.*, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS), diante do elevado risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e carcinogênicas secundárias à exposição ao amianto, alertou que o uso de qualquer tipo do mineral fosse banido no mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

No Brasil, os ministros do Supremo Tribunal Federal, em 29 de novembro de 2017, declararam a inconstitucionalidade do artigo 2º da Lei Federal n.º 9.055/1995, que permitia a utilização do amianto do tipo crisólita, banindo em definitivo todas as formas do mineral na indústria brasileira (BRASIL, 1995). No entanto, segundo a Associação Brasileira dos Expostos ao Amianto (ABREA), a operação de algumas empresas somente cessou em fevereiro de 2019 (ABREA, 2019). Esses dados são alarmantes, pois informações obtidas pelo Boletim Informativo do Amianto de 2007, do Departamento Nacional de Produção Mineral, foi visto que haviam cerca de 170 mil trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva do amianto em 2006, no entanto, esse número seria bem maior se fossem considerados os trabalhadores expostos indiretamente ao mineral (comércio, oficinas mecânicas, construção civil etc.) (BRASIL, 2017). Além da asbestose, do mesotelioma e do câncer de pulmão, o amianto pode causar câncer de laringe, do trato digestivo, de ovário, além de espessamento da pleura e do diafragma, placas pleurais, severos distúrbios respiratórios e demais patologias associadas à ocorrência de efusão pleural (INCA, 2018).

Nesse contexto, fica clara a importância de uma abordagem rápida e bem direcionada no tratamento de pacientes nas diferentes condições clínicas que envolvem as efusões pleurais reacionais. Apesar disso, enquanto diretrizes internacionais produzidas pela *British Thoracic Society* e pela *American Thoracic Society* estabeleceram orientações aos profissionais de saúde na abordagem das efusões pleurais malignas, o mesmo não foi observado para as EPRs (BINTCLIFFE *et al.*, 2016). Assim, na ausência de diretrizes oficiais nacionais e internacionais, alguns centros médicos estabeleceram protocolos locais como uma alternativa de guiar profissionais para um melhor acolhimento desses pacientes (COELHO *et al.*, 2016; HASHIZUME *et al.*, 2017; DANTAS e REIS, 2018).

### 2.2.1.1 Características citológicas das EPRs

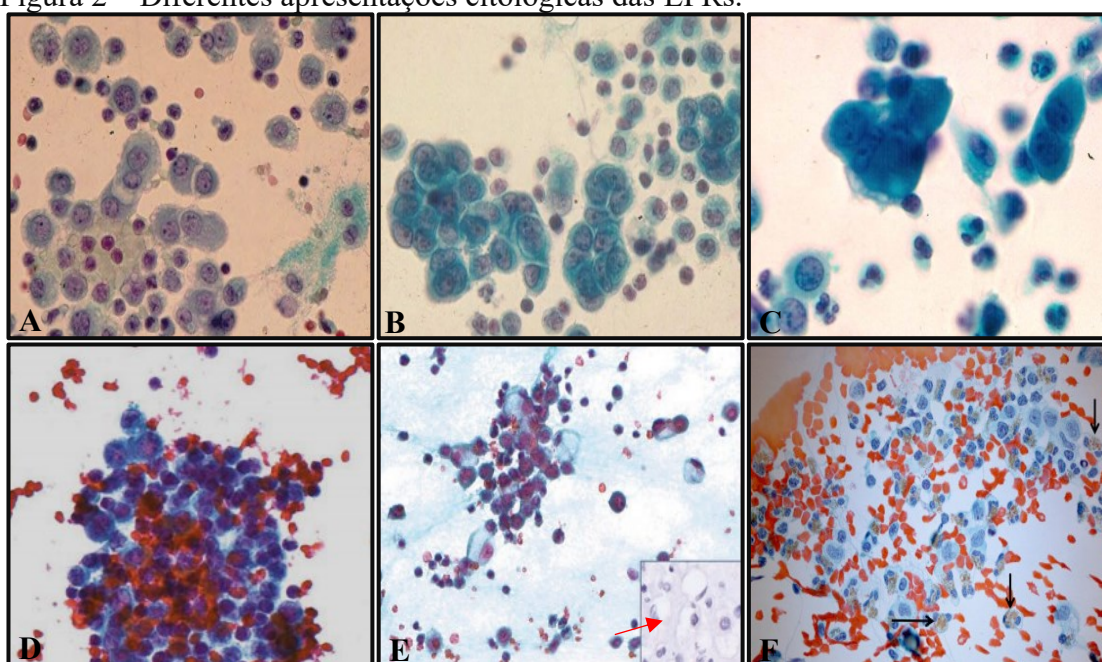
Como visto, as causas associadas às efusões pleurais reacionais (benignas) são multifatoriais, o que torna difícil pré-estabelecer uma única característica citológica para esse tipo de efusão, pois cada patologia envolvida nessa condição determina um comportamento celular diferente na cavidade, variando consideravelmente a quantidade de células leucocitárias, de células mesoteliais normais ou reativas (BINTCLIFFE *et al.*, 2016; BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018).

No entanto, em algumas situações, a observação das alterações citológicas pode fornecer informações importantes que auxiliam na decisão sobre exames complementares necessários para a rápida conclusão do diagnóstico. Por exemplo, o achado de um líquido neutrofílico aumenta a suspeita de uma efusão pleural parapneumônica (um processo agudo), enquanto o perfil de um fluido predominante em linfócitos pode sugerir câncer ou tuberculose (um processo crônico), de modo que exames laboratoriais para o diagnóstico diferencial, tais como a imunocitoquímica, tornam-se necessários (PORCEL *et al.*, 2017; LIGHT, 2006; CAGLE e ALLEN, 2011; BINTCLIFFE *et al.*, 2016). Outras alterações celulares, como células mesoteliais atípicas, são comuns nas efusões associadas a processos crônicos, como na cirrose, em doenças inflamatórias pulmonares crônicas, no infarto pulmonar, em doenças vasculares do colágeno ou trauma produzido por lesões no tórax ou toracotomia (BATRA e ANTONY, 2015). Além disso, células mesoteliais hiperplásicas, únicas ou agrupadas, presentes nesses líquidos reacionais, podem apresentar atipias celulares semelhantes às células malignas, o que requer um bom nível de atenção e capacitação do analisador para fazer a distinção morfológica entre esses tipos celulares (BOSE, 2018).

Outra condição citológica observável, porém, não muito comum, é a infiltração de eosinófilos no líquido pleural, também conhecida como efusão pleural eosinofílica (FERREIRO *et al.*, 2011). Essa condição é definida como uma efusão que contém pelo menos 10% de eosinófilos, e sua incidência relativa foi estimada entre 5% e 16% dentre todos os tipos de efusões, mas o significado clínico e sua relação com fatores de prognóstico ainda permanecem incertos (SHRESTHA *et al.*, 2019). A efusão pleural eosinofílica pode estar associada a uma ampla gama de condições patológicas, incluindo infecções (por exemplo, bacterianas, parasitárias ou fúngicas), doenças malignas, doenças autoimunes, reações medicamentosas, embolia pulmonar, trauma no tórax, entre outras (KRENKE *et al.*, 2009).

A Figura 2 mostra algumas das diferentes apresentações citológicas que podem ser observadas nas EPRs.

Figura 2 – Diferentes apresentações citológicas das EPRs.



Fonte: Adaptado de Nguyen (2009); Bose (2018); Evison *et al.* (2015).

Avaliação celular realizada por coloração de Papanicolaou em amostra de líquido pleural diagnosticadas como reacionais. (A) Células mesoteliais hiperplásicas com núcleos levemente aumentados, micronúcleos e um espaço claro ou “janela” entre células adjacentes, presentes isoladamente e em pequenos aglomerados, 40X; (B) Agrupamento maior de células mesoteliais hiperplásicas mostrando atipia levemente nuclear com pequenos nucléolos, 40X; (C) Um aglomerado de células mesoteliais altamente atípicas mostrando núcleos pleomórficos, proeminentes nucléolos e ligeira moldagem nuclear, 40X; (D) Agrupamento de células mesoteliais benignas atípicas associadas a células inflamatórias, 40X; (E) Células mesoteliais benignas contendo vacúolos intracitoplasmáticos degenerativos. Em destaque, sinalizada por uma seta vermelha, a imunomarcagem mostra a ausência de expressão para o anticorpo Ber-EP4, 40X; (F) Efusão pleural eosinofílica induzida pelo uso do medicamento olanzapina em um paciente idoso.

### 2.2.2 Efusões pleurais malignas (EPMs)

As efusões pleurais malignas, também denominadas de derrames pleurais neoplásicos, são definidas como o acúmulo de uma quantidade significativa de exsudato no espaço pleural, acompanhado da presença de células malignas ou tecido tumoral (TEIXEIRA *et al.* 2006; PSALLIDAS *et al.*, 2016). A EPM é uma manifestação comum em pacientes com doença metastática e pode ocorrer em 15% dos pacientes com câncer (SKOK *et al.*, 2019).

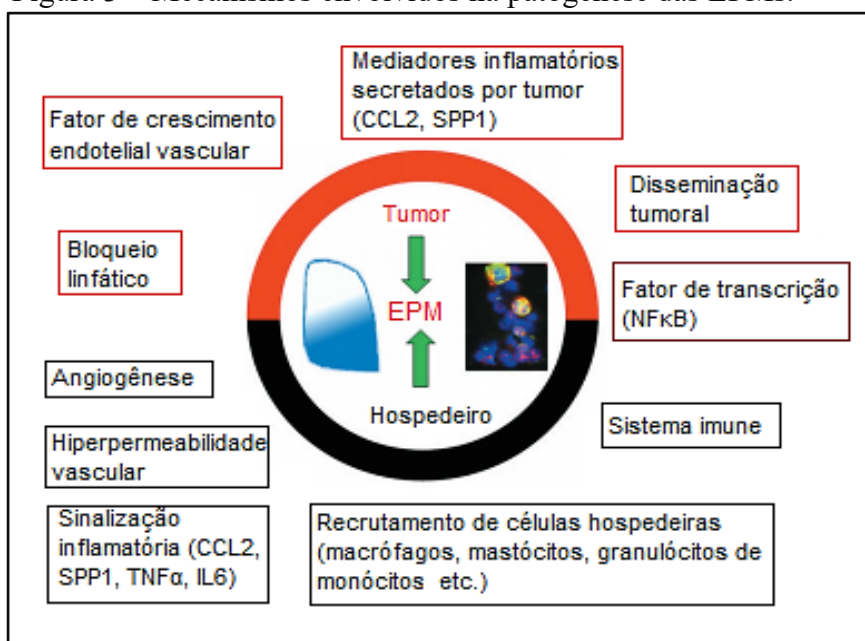
Apesar da possibilidade de qualquer neoplasia maligna evoluir para um quadro de EPM, certos tipos de tumores parecem ter atração metastática para a pleura, particularmente os tumores malignos de pulmão, de mama e linfomas, e, com menos frequência, as neoplasias gastrointestinais e geniturinárias (ANTONANGELO *et al.*, 2015; BROADDUS *et al.*, 2017). A cavidade pleural também pode ser afetada por neoplasias malignas da pleura, consideradas

tumores primários, como o tumor fibroso solitário e o mesotelioma maligno. Entretanto, o envolvimento metastático é considerado mais comum do que os tumores primários (MAJI *et al.*, 2013).

Ainda não estão totalmente elucidados todos os mecanismos que envolvem a formação da efusão em pacientes com diagnóstico de EPM. No entanto, alguns pesquisadores atribuem essa condição ao bloqueio do fluxo linfático, ocasionado pelo crescimento tumoral, o que resultaria no comprometimento da absorção do líquido pleural (SPELLA *et al.*, 2015). Contudo, o mesmo estudo verificou que esse não seria o único mecanismo de formação da efusão, pois embora muitos tumores causem obstrução linfática, foi observado que nem todos induziriam a formação de efusão maligna. Assim, outras pesquisas também atribuíram o fenômeno de formação da efusão às células do sistema imunológico, tais como, granulócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células linfoides e, possivelmente, outras células derivadas da medula óssea, como progenitores endoteliais e de fibroblastos, que atraídas para o espaço pleural pela sinalização de células tumorais, induziriam a produção de substâncias angiogênicas e demais processos inflamatórios importantes para a patogênese da EPM (GELTNER e ERRHALT, 2015; PSALLIDAS *et al.*, 2016; DESAI e LEE, 2017).

Na pesquisa realizada por Agalioti *et al.* (2017), em camundongos também se observou a influência do gene KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) mutado no mecanismo de formação das efusões. Nesse estudo, as células malignas circulantes portadoras do gene KRAS mutado, ao invadir a cavidade pleural através dos vasos sanguíneos, regulariam positivamente a produção do Ligante 2 de Quimiocina (CCL2), que na corrente sanguínea ativaria células mielóides da medula óssea do indivíduo (considerados como hospedeiros) para migrar para o espaço pleural, assim iniciando um processo inflamatório local que causaria o acúmulo anormal de líquido na cavidade e a consequente induzir a formação da EPM (AGALIOTI *et al.* 2017). Assim, os achados em conjunto demonstraram que a formação da EPM constitui um fenômeno biológico complexo com diversas interações entre as células tumorais, células do sistema imunológico, células do microambiente pleural além do envolvimento do sistema vascular. A Figura 3 mostra alguns desses fatores influenciadores do processo de formação das EPMs.

Figura 3 – Mecanismos envolvidos na patogênese das EPMs.



Fonte: Adaptada de Spella *et al.* (2015)

As interações tumor-hospedeiro são consideradas peças-chave na formação das EPM. A sinalização vasoativa e inflamatória provocada pela interação entre as células imunes e malignas induz mecanismos de angiogênese, hiperpermeabilidade vascular, inflamação e recrutamento de novas células hospedeiras no microambiente pleural, favorecendo o desenvolvimento de EPM.

Em algumas situações a efusão pleural pode ser o primeiro sinal da manifestação da doença primária, como observado em 15% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão, ou ainda, pode se desenvolver no decorrer da doença, sendo observado em aproximadamente 50% desses pacientes (DERVEAUX *et al.*, 2018). No caso dos pacientes diagnosticados com neoplasia hematológica ou câncer de ovário foram observados melhores prognósticos quando a efusão se apresentou como a primeira manifestação sintomática em comparação com aqueles que desenvolveram a efusão em alguma fase posterior (SKOK *et al.*, 2019). No entanto, independentemente do tempo de formação da efusão, a EPM é universalmente um sinal de mau prognóstico, pois indica que a doença primária está em estágio avançado ou em progressão (PORCELL *et al.*, 2017). Desse modo, em algumas condições o tratamento torna-se somente paliativo, de maneira a aliviar os sintomas que influenciam na qualidade de vida do paciente, como dispneia, tosse, fadiga, perda de peso e dor pleurítica (KARKHANIS e JOSHI, 2012).

A sobrevida média após o diagnóstico de uma EPM varia entre 3 e 12 meses, porém, determinados fatores, como o tipo de câncer primário, as características do tumor, a extensão da doença, comorbidades associadas e a constituição celular do líquido pleural torna variável o prognóstico para esses pacientes (DESAI e LEE, 2017). Assim, pesquisadores propuseram, no

decorrer dos anos, uma série de critérios e parâmetros que pudessem auxiliar na melhor aproximação de prognóstico para os pacientes acometidos por uma EPM (MARTINEZ-MORAGON *et al.*, 1998; HEFFNER *et al.*, 2000; PILLING *et al.*, 2010, KAO *et al.*, 2010).

Um dos critérios mais utilizados é escala de desempenho ECOG (*Eastern Cooperative Oncologic Group*) ou Performance de Zubrod, elaborada por Oken *et al.* (1982) que avalia a progressão da doença e quantifica a extensão do comprometimento da vida diária do paciente, utilizando um escore que varia de zero a cinco pontos, o que permite classificar o paciente com o índice 0 (totalmente ativo, capaz de continuar todo o desempenho de pré-doença, sem restrição); 1 (restrito para atividade física extenuante, porém capaz de realizar um trabalho de natureza leve ou sedentária); 2 (completamente capaz para o autocuidado, mas incapaz de realizar quaisquer atividades de trabalho fora do leito por mais de 50% do tempo); 3 (capacidade de autocuidado limitada, restrito ao leito ou à cadeira mais de 50% do tempo de vigília); 4 (completamente limitado, não pode exercer qualquer autocuidado; restrito ao leito ou à cadeira); e 5 (óbito) (OKEN *et al.*, 1982; PEREIRA *et al.*, 2014).

A partir desse estudo, outros pesquisadores também estabeleceram, em associação a outros critérios, novas maneiras de se avaliar o prognóstico de pacientes acometidos por EPM, dentre os quais, Clive *et al.* (2014). Os autores desenvolveram e validaram um sistema de pontuação conhecido como “escore de prognóstico LENT” (referência às iniciais dos parâmetros avaliados: lactato desidrogenase do líquido pleural, escore de desempenho ECOG, razão neutrófilos/linfócitos e tipo de tumor), no qual um sistema de pontuação de prognóstico é apresentado como uma ferramenta útil para a previsão de sobrevida, logo, auxiliando nas decisões de manejo clínico dos pacientes com EPM. Posteriormente, o estudo elaborado por Skok *et al.* (2019) resumizou e tabelou o escore LENT, conforme pode ser observado no Quadro 3.

Quadro 3 – Escore de prognóstico LENT.

Variáveis		Escore	
L	Níveis de LDH no líquido pleural (IU/L)		
	<1500	0	
	>1500	1	
E	PS ECOG		
	0	0	
	1	1	
	2	2	
	3 to 4	3	
N	R-N/L		
	<9	0	
	>9	1	
T	Tipos tumorais		
	Tipos de tumores de baixo risco	Mesoteliomas, neoplasias hematológicas	0
	Tipos de tumores de risco moderado	Câncer de mama, câncer ginecológico, carcinoma de células renais	1
	Tipos de tumores de alto risco	Câncer de pulmão Outros tipos de tumores	2
Categorias de risco		Total de pontos	
Baixo risco		0 a 1	
Risco moderado		2 a 4	
Alto risco		5 a 7	

Fonte: SKOK *et al.* (2019).

L - LDH; E - ECOG; N - razão neutrófilos / linfócitos; T - tipo de tumor.

Com relação à incidência das EPMs, estima-se que 150.000 novos casos ocorram anualmente nos Estados Unidos e 100.000 na Europa (DONNENBERG *et al.*, 2019; SKOK *et al.*, 2019). A Tabela 2, desenvolvida por Skok *et al.* (2019) a partir de dados sumarizados publicados por Clive *et al.* (2014), mostra a prevalência das EPMs nas doenças malignas obtidas através de um estudo prospectivo com 789 pacientes de diferentes nacionalidades (221 pacientes do Reino Unido, 253 da Austrália e 315 da Holanda) (CLIVE *et al.*, 2014; SKOK *et al.*, 2019).

Tabela 2 – Características gerais das neoplasias malignas mais comuns associadas às EPMs.

Tipo de câncer	Sobrevida média geral em dias (IC 95%)	Subtipo histológico	Prevalência (%)
Câncer de pulmão	74 (60 - 92)	Adenocarcinoma de pulmão	29–37
		Carcinoma de pequenas células	6–9
Câncer de mama	192 (133 - 271)	Adenocarcinoma mamário	8–40
Câncer ginecológico	230 (97 - 279)	Adenocarcinoma ovariano	18–20
Câncer gastrointestinal	61 (44 - 73)	Adenocarcinoma gástrico	2
		Colorretal	1
		Carcinoma de células renais	1
		Adenocarcinoma pancreático	3
Neoplasias malignas hematológicas	218 (160 - 484)	Linfoma	3-16
Câncer de pele	43 (23 - 72)	Melanoma	3-16
Mesotelioma	339 (267 - 422)	Mesotelioma maligno	1-6
Sarcoma	44 (19 - 76)	Sarcoma	1-3

Fonte: Skok *et al.* (2019).



No Brasil, apesar da inexistência de levantamentos epidemiológicos precisos, acredita-se que o número de pacientes acometidos por esse tipo de efusão seja semelhante mesmo diante das diferenças econômicas entre esses países (VAZ *et al.*, 2006; BROADDUS *et al.*, 2017). No entanto, espera-se um aumento da incidência dos óbitos por mesotelioma maligno ou outras neoplasias pleurais para a próxima década, particularmente entre os anos 2021-2026, quando se completam aproximadamente 30 anos do pico de consumo do amianto no país (ALGRANTI *et al.*, 2019). Um estudo elaborado por Kalinke *et al.* (2018) considera ainda o fato de que, em 2017, o Brasil era o terceiro maior produtor, consumidor e exportador mundial de crisótilo (uma variação do amianto), e, ao comparar as taxas de incidência de mesotelioma maligno nacionais com as taxas mundiais, observou-se uma discrepância de dados, indicando que possivelmente as informações relacionadas à quantidade de casos de mesotelioma maligno e de óbitos no Brasil são errôneas. Logo, a previsão do pico do número de casos de mesotelioma para as próximas décadas justifica a preocupação com o conhecimento da quantidade real de casos no país (KALINKE *et al.*, 2018).

Além disso, no Brasil, segundo estimativas elaboradas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2018-2019, foi prevista a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer (para cada ano), sendo os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto os mais incidentes (INCA, 2018). Ainda segundo registros do INCA, à exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes para os homens foram próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), enquanto para as mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figuraram entre os principais.

Por região geográfica, o levantamento observou que as regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de novos casos com um padrão da incidência predominante para os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de pulmão e de intestino (INCA, 2018). Nesse contexto, embora a efusão pleural possa surgir secundariamente a diferentes neoplasias, as causas mais comuns estão associadas ao câncer de pulmão (em homens) e ao câncer de mama (em mulheres), ou seja, os tipos de neoplasias mais incidentes no Brasil.

Dessa forma, fica clara a importância da implantação de estratégias que auxiliem na abordagem dos pacientes oncológicos, de maneira a definir não somente novas formas de diagnóstico precoce, como também intervenções efetivas que previnam a progressão da doença neoplásica e, conseqüentemente, o avanço das taxas de EPM (WAHLA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a EPM tornou-se um problema de saúde pública mundial, visto ser um agravante comum nos pacientes oncológicos e, portanto, com necessidade de elaboração de diretrizes oficiais para guiar profissionais da saúde quanto ao melhor manejo dessa condição clínica. Tendo em vista tal necessidade, no ano 2000 a *American Thoracic Society* publicou as primeiras diretrizes para o gerenciamento das EPMs (ATS, 2000). Em 2010, novas diretrizes foram publicadas pela *British Thoracic Society*, sendo ambas as publicações baseadas no consenso de um grupo de especialistas internacionais da área que revisaram sistematicamente dados obtidos da literatura (ROBERTS *et al.*, 2010).

Desde a publicação das diretrizes da *British Thoracic Society*, surgiram vários outros estudos grandes, multicêntricos e randomizados, bem como pesquisas que impactaram substancialmente a maneira como os pacientes com EPM deveriam ser avaliados e tratados (HOOPER *et al.*, 2010; ARBER *et al.*, 2013; SHAFIQ *et al.*, 2015; BERTOLACCINI *et al.*, 2017). E assim, após uma pesquisa elaborada pela *European Society of Thoracic Surgeons* sugerir a necessidade de uma atualização e revisão das diretrizes até então estabelecidas, a *American Thoracic Society*, em conjunto com a *Society of Thoracic Surgeons* e a *Society of Thoracic Radiology*, elaborou, em 2018, novas diretrizes oficiais com recomendações atualizadas para orientar profissionais da saúde/cuidadores quanto à melhor abordagem da EPM, desde o momento do seu diagnóstico até os melhores tratamentos e indicações que objetivam a melhoria da qualidade de vida do paciente (SCARCI *et al.*, 2017; FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018).

#### 2.2.2.1 Características citológicas das EPMs

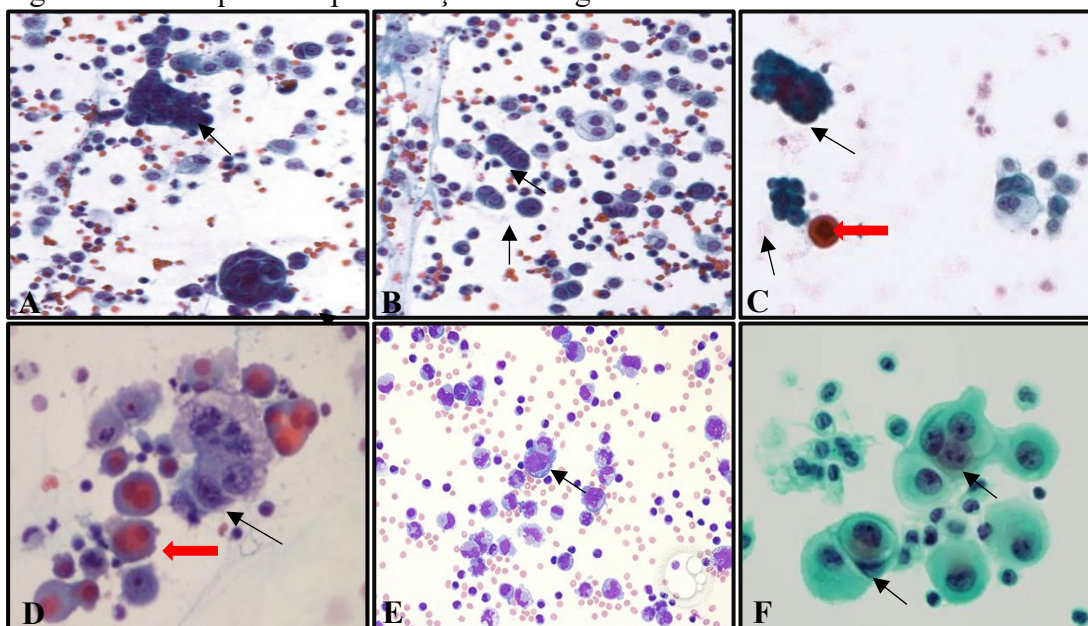
Conforme mencionado anteriormente, as EPMs são quase que exclusivamente (95%) causadas por metástases no espaço pleural. Cerca de dois terços (70-77%) desse total são classificados histologicamente como células procedentes de adenocarcinomas (LEPUS; VIVERO, 2018). Dentre estes, os tipos mais comuns de neoplasias causadoras de EMP são pulmão (37%), mama (16%), hematológico (10%) e primário desconhecido (10%), responsáveis por 50 a 67% de todas as EPM (MERCER *et al.*, 2019; SKOK *et al.*, 2019).

Ainda que o conteúdo celular das efusões pleurais malignas dependa da etiologia da doença, estas são compostas basicamente por proteínas serosas, células cancerígenas, células imunes linfóides e mielóides (DONNENBERG *et al.*, 2019).

Considerando a grande variabilidade de células metastáticas que podem invadir a cavidade pleural, em certas situações podem ocorrer dificuldades para a distinção morfológica

entre alguns achados citológicos presentes nas EPMs (ANTONANGELO *et al.*, 2015; BROADDUS *et al.*, 2017). Os maiores desafios relatados estão associados à distinção entre células de adenocarcinoma e o mesotelioma; hiperplasia mesotelial e o adenocarcinoma; hiperplasia mesotelial e o mesotelioma; e, por fim, células linfoides reativas e os linfomas (YAMAZOE *et al.*, 2018). A Figura 4 mostra alguns exemplos das diversas apresentações citológicas observáveis nas efusões pleurais malignas.

Figura 4 – Exemplos de apresentações citológicas observadas nas EPMs.



Fonte: Adptado de Nguyen (2009), iCytology (2014); Lazarchic e Davis (2010).

Amostras de líquidos pleurais corados em Papanicolaou. (A) Células epiteliais malignas e células mesoteliais benignas. As células malignas estão presentes como aglomerados coesos, indicadas por setas pretas, 40x; (B) Arranjos celulares (indicados por setas pretas) característicos do carcinoma de mama, 40x; (C) Carcinoma de células escamosas metastático de origem pulmonar, indicado por setas pretas, e célula queratinizada atípica (indicada por seta vermelha), 40x; (D) Presença de células tumorais malignas de origem mesotelial dispostas em aglomerados e isoladas, indicadas por uma seta preta, com células mesoteliais reativas, (indicadas por uma seta vermelha). Achados citológicos compatíveis com mesotelioma; (E) Amostra de líquido pleural com presença de linfócitos maduros, eritrócitos e células malignas de linfoma de grandes células B, indicadas por setas pretas, 20x; (F) Células procedentes de um mesotelioma pleural maligno, indicadas por setas pretas, em amostra de líquido pleural.

Além disso, as apresentações citológicas observadas em líquidos pleurais benignos e malignos, em algumas condições, são extremamente semelhantes. Por exemplo, as efusões associadas a linfomas podem ser semelhantes às efusões secundárias à tuberculose, ou seja, um líquido predominantemente exsudativo e linfocítico (KIM *et al.*, 2019). Assim, o baixo rendimento citológico, visto em algumas situações, torna o diagnóstico diferencial entre efusões benignas e malignas, por observações citológicas, extremamente difícil (AKTURK *et al.*, 2016). Por exemplo, as EPMs associadas à linfoma, em alguns casos, além de apresentarem um

rendimento citológico relativamente menor em comparação com outros tumores sólidos (como o adenocarcinoma de pulmão, por exemplo), possuem poucas células com alterações morfológicas passíveis de distinção. Em virtude disso, o líquido maligno assemelha-se citologicamente a uma efusão pleural reacional, de modo que efusões linfocitárias muitas vezes necessitam de exames laboratoriais complementares para a conclusão do diagnóstico (ZHANG *et al.*, 2018).

### **2.2.3 Efusões pleurais paramalignas (EPPs)**

A efusão pleural em pacientes com diagnóstico de câncer, nem sempre é um sinal de metástase, mas é evidente que na maioria dos casos está relacionado à doença primária (LARA *et al.*, 2017). Assim, um pequeno percentual de pacientes com neoplasia, pode desenvolver uma efusão devido a condições não neoplásicas, tais como, insuficiência cardíaca, infecções e hipoproteinemia (MEDENICA *et al.*, 2018). Portanto, o termo “efusão pleural paramaligna” está reservado para aquelas efusões em que não há um resultado direto do envolvimento neoplásico com a pleura, e sim, como um efeito de condições que atuam indiretamente no espaço pleural, como a obstrução brônquica, infiltração de linfonodo mediastinal, tromboembolismo ou síndrome da veia cava superior, além disso, também podem ser resultantes de ações da radioterapia ou uso de medicamentos como ciclofosfamida, procarbazina, bleomicina ou metotrexato (medicamentos utilizados no tratamento de alguns tipos de neoplasias) (TEIXEIRA *et al.*, 2006; LARA *et al.*, 2017).

Desta forma, a distinção diagnóstica entre as efusões malignas e paramalignas se torna primordial, pois a estratégia terapêutica aplicada é completamente diferente em cada uma dessas situações, assim como o prognóstico (MEDENICA *et al.*, 2018). Portanto, nessas condições é imprescindível uma avaliação clínico e laboratorial criteriosa para estabelecer a correta etiologia e direcionar a melhor terapia, visto que é a distinção dos diferentes tipos de efusão que define entre um tratamento curativo ou paliativo (LARA *et al.*, 2017).

Entretanto, é importante ressaltar que resultados falso negativos não se caracterizam como amostras paramalignas, e diante disto, estudos apontam que uma análise complexa, incluindo diferentes abordagens de diagnóstico, poderiam refletir em resultados mais fidedignos para as amostras de EPP (ZHANG *et al.*, 2018; BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018; ZHOU *et al.*, 2018; MEDENICA *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Bibby *et al.* (2018) relatou que o acompanhamento de pacientes cujas biópsias pleurais originais mostraram pleurite inespecífica, descobriram que até 15% foram subsequentemente diagnosticados com

malignidade pleural, mais frequentemente mesotelioma (BIBBY *et al.*, 2018). Assim, neste mesmo estudo, foi indicado realizar biópsias e coletas repetidas, para evitar estes falsos resultados. Nesse contexto, estudos apontam que dentre as análises laboratoriais para o diagnóstico diferencial entre EPM e EPP, a análise citológica continua sendo o padrão-ouro, apesar da sensibilidade variável (WU *et al.*, 2017; BIBBY *et al.*, 2018; MERCER *et al.*, 2019). Dados da literatura indicam que a análise citológica de um líquido pleural com suspeita maligna, possui uma faixa de sensibilidade entre 40% a 87%, diante disso, algumas pesquisas foram realizadas com o propósito de avaliar o volume ideal de líquido a ser encaminhado para as análises citológicas, e assim, otimizar sua sensibilidade (ABOUZGHEIB *et al.*, 2009; HOOPER *et al.*, 2010; SWIDEREK *et al.*, 2010; THOMAS *et al.*, 2011; ROOPER *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017). No entanto, dentre os estudos avaliados, nenhum deles concluiu um volume ideal exato, em geral, os volumes obtidos variaram entre 50 ml e 100 ml. Neste sentido, um estudo elaborado por Lara *et al.*, (2017) indicou que a associação entre critérios clínicos, radiografia de tórax, além das análises obtidas a partir da toracocentese, seria uma boa abordagem sistemática para distinguir efusões reacionais, malignas ou paramalignas (LARA *et al.*, 2017). Assim como, resultados obtidos de estudos anteriores também mostraram que a aplicação de tomografia computadorizada, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET), ultrassonografia de tórax, cirurgia torácica vídeo assistida (VATS) ou toracotomia, seriam boas ferramentas para a distinção entre os tipos de efusões, quando aplicadas em conjunto aos parâmetros avaliados por toracocentese (citologia e demais análises laboratoriais) (BUGALHO *et al.*, 2014; TREGLIA *et al.*, 2014; PORCEL *et al.*, 2015; CAKMAK e DURKAN, 2017; PERIKLEOUS *et al.*, 2017). No entanto, o estabelecimento do diagnóstico por imagem requer elevados recursos financeiros, tanto para aquisição quanto para manutenção dos aparelhos, o que limita, em alguns locais, sua aplicação em conjunto com outras análises no diagnóstico das efusões pleurais (AZEVEDO *et al.*, 2016).

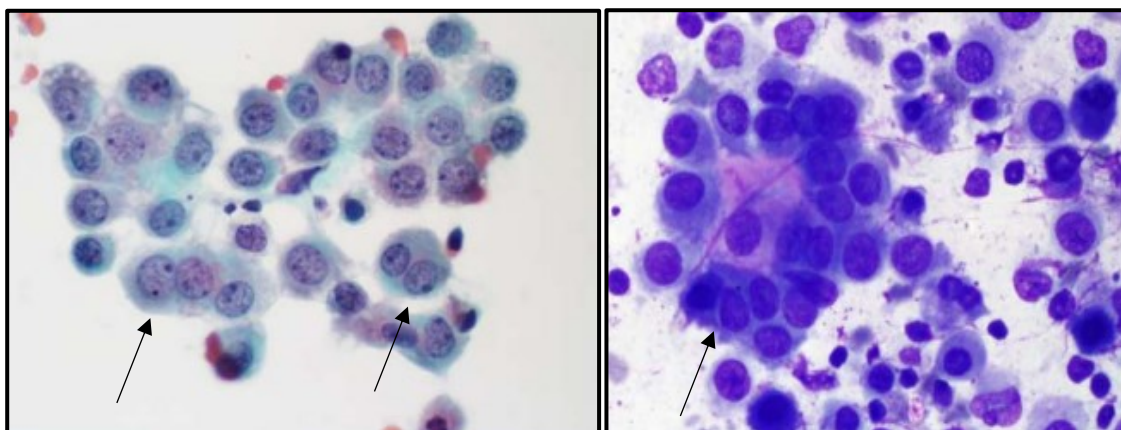
Assim, a ausência de diretrizes com alternativas e informações mais integradas, com respostas mais práticas e atualizadas que auxiliem os profissionais na melhor abordagem dos pacientes com efusão, propiciou o desenvolvimento de dados descentralizados, além de uma escassez na literatura nacional sobre informações importantes como incidência, prevalência e protocolos no estudo das efusões no Brasil. Acredita-se que o desenvolvimento destes estudos poderiam proporcionar a evolução de diagnósticos mais rápidos, terapias mais direcionadas, consultas médicas mais informadas e uma visão geral mais clara das necessidades geradas nesta área no decorrer dos anos.

### 2.2.3.1 Características citológicas das EPPs

No estudo citológico das EPP a principal característica observada é que não são encontradas células neoplásicas malignas no líquido avaliado, pois como visto, apesar deste tipo de efusão estar associado a pacientes com diagnóstico de neoplasia, essas células não invadiram a cavidade pleural (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Desta forma, estes líquidos estão mais relacionados às causas reacionais do que malignas e, portanto, podem ser caracterizados citologicamente semelhantes aos líquidos procedentes de EPR (MEDENICA *et al.*, 2018). Deste modo, assim como nas efusões reacionais, estes líquidos não possuem uma única característica citológica e podem variar consideravelmente a quantidade de células leucocitárias, de células mesoteliais normais e reativas (BINTCLIFFE *et al.*, 2016; BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018; MEDENICA *et al.*, 2018).

Nestas condições, como será visto mais adiante, é comum que células mesoteliais apresentem alterações reativas devido à grande variedade de estímulos e lesões que normalmente podem ocorrer neste quadro clínico (SUBBARAYAN *et al.*, 2019). O que se observa, em algumas dessas situações, são células mesoteliais com elevada capacidade de proliferação celular somadas às alterações nucleares e citoplasmáticas que podem se assemelhar a morfologia das células malignas (YAHYA *et al.*, 2013).

Figura 5 - Exemplo citológico observado em uma amostra com diagnóstico de EPP.



Fonte: Shield *et al.*, (2017).

(A) Amostra de líquido pleural benigna coradas em Papanicolaou (40x) de uma paciente com histórico de carcinoma de mama. Observa-se (indicadas por setas pretas) células mesoteliais reativas formando pequenos grupos celulares, que se assemelham à células malignas (B) Mesma amostra da paciente descrita na imagem (A) porém utilizando coloração de Diff-Quik.

No entanto, ressalta-se que conclusões diagnósticas obtidas a partir das observações citológicas destes líquidos, devem ser avaliadas com cautela. Um estudo realizado por Akturk

*et al.*, (2016) concluiu que o cálculo da razão entre a quantidade de neutrófilos e linfócitos, empregada algumas vezes como parâmetro de prognóstico, pode ter utilidade no diagnóstico diferencial entre efusão secundária a tuberculose, mas não entre efusões malignas, parapneumônicas ou paramalignas (AKTUK *et al.*, 2016). Não diferente, um estudo realizado por Cakmak e Durkan (2017) também não observou diferenças estatísticas entre a quantidade de leucócitos em efusões malignas e paramalignas (CAKMAK e DURKAN, 2017). Além disso, as células mesoteliais reativas atípicas podem ser uma armadilha para um diagnóstico falso positivo de malignidade (SUBBARAYAN *et al.*, 2019). Portanto, assim como nas demais efusões, a citologia das EPP requer uma análise complexa e criteriosa, para evitar a liberação de falsos resultados que acarretem consequências sérias no tratamento dos pacientes com diagnóstico de efusão pleural (MEDENICA *et al.*, 2018).

#### **2.2.4 Efusões pleurais de origem indeterminada (EPI)**

O diagnóstico de uma efusão pleural de origem indeterminada é considerado umas das tarefas mais difíceis e complicadas da área médica, tanto clínica, quanto laboratorial. (CHEN *et al.*, 2018). Genofre *et al.*, (2006) definiu como EPI aquelas efusões em que permanecem sem diagnóstico etiológico definido mesmo depois de aplicados todos os métodos de diagnósticos disponíveis (GENOFRE *et al.*, 2006). Enquanto um estudo elaborado por Ferreiro *et al.* (2017) caracterizou uma EPI quando a etiologia da efusão permanecer desconhecida mesmo após uma revisão completa da história clínica e aplicação de exames de imagem do tórax, análise do líquido pleural e exames de sangue (FERREIRO *et al.*, 2020).

Assim, existem vários fatores que podem contribuir para a dificuldade em estabelecer a etiologia das EPI, como por exemplo, a variação da sensibilidade das técnicas de diagnóstico atualmente disponíveis, etiologias menos comuns que podem ser negligenciadas, como no caso de efusões secundárias ao extravasamento do líquido cefalorraquidiano que mesmo sendo raro, uma vez que se suspeite, pode ser rapidamente confirmado pela presença da *beta-2* transferrina no líquido pleural, além de uma variedade de doenças gastrointestinais, especialmente pancreatite e fístulas pancreáticas pleurais que apesar de estarem associadas às efusões, podem ser negligenciadas nas avaliações clínico-laboratoriais (PANJWANI e ZAID, 2017; FERREIRO *et al.*, 2020).

A EPI pode se resolver espontaneamente ou assumir um caráter persistente, necessitando então de uma rotina de investigação que deve ser iniciada pela revisão de todas as informações presentes no prontuário, considerando até mesmo a coleta de novos exames e

realização de procedimentos habitualmente não utilizados para a investigação de efusões pleurais de etiologia mais comum (GENOFRE *et al.*, 2006). Dados da literatura indicam que um dos fatores primordiais a serem considerados diante de uma EPI é avaliar as características bioquímicas do líquido para definir seu caráter transudativo ou exsudativo, e assim, a partir dessas avaliações ser possível estabelecer uma conduta clínica com informações suficiente que possam auxiliar no diagnóstico laboratorial (LIGHT, 2006, PORCEL *et al.*, 2015; FERREIRO *et al.*, 2020). O Quadro 4, elaborado por Light, listou as doenças mais associadas ao desenvolvimento de uma EPI, organizadas de acordo com a classificação das efusões em transudatos e exsudatos.

Quadro 4. Lista de doenças com maior probabilidade de associação com as EPI.

EFUSÕES PLEURAIAS TRANSUDATIVAS	EFUSÕES PLEURAIAS EXSUDATIVOS	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Insuficiência cardíaca congestiva</li> <li>● Cirrose</li> <li>● Síndrome nefrótica</li> <li>● Urinotórax</li> <li>● Mixedema</li> <li>● Extravazamento do líquido cefalorraquidiano para a pleura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Neoplasias malignas</li> <li>● Pneumonia (especialmente anaeróbica)</li> <li>● Tuberculose</li> <li>● Embolia pulmonar</li> <li>● Infecção por fungos</li> <li>● Pseudocisto pancreático</li> <li>● Abscesso intra-abdominal</li> <li>● Doença pericárdica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Síndrome de Meigs'</li> <li>● Síndrome de hiperestimulação ovariana</li> <li>● Pleurite reumatóide</li> <li>● Lúpus eritematoso</li> <li>● Doença pleural induzida por drogas</li> <li>● Derrame pleural de amianto</li> <li>● Síndrome das unhas amarelas</li> <li>● Uremia</li> <li>● Quilotórax</li> <li>● Pseudoquilotórax</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Light, (2006).

Por fim, como visto, as análises para a conclusão do diagnóstico em algumas condições ainda é um problema na prática clínica, sobretudo no que diz respeito às EPI (CHEN *et al.*, 2018; DIXIT *et al.*, 2017; ASCIAK e RAHMAN, 2018). E assim, as etapas adicionais necessárias para a resolução destes casos afeta diretamente na vida destes pacientes, pois foi observado que o tratamento precoce de uma efusão reacional ou paramaligna diminui a possibilidade de complicações e tende a ser curativo, enquanto que o tratamento precoce de uma efusão maligna pode proporcionar um aumento na qualidade de vida dos indivíduos com neoplasia, deste modo, estudos reportam que existe uma associação direta entre o diagnóstico rápido e preciso, e o sucesso terapêutico (FERREIRA *et al.*, 2006; MEDENICA *et al.*, 2018; LARA *et al.*, 2017; CARRINGTON e KRUSE, 2019; BERTHOLD e WELTE, 2019). No entanto, para isso, há necessidade de profissionais bem informados e capacitados, além da



utilização de um conjunto de técnicas que proporcionem essa agilidade diagnóstica (TEIXEIRA *et al.*, 2006; KARKHANIS e JOSHI, 2012; AKULIAN e FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018; HE e OH, 2018, ZHOU *et al.*, 2018; BEAUDOIN e GONZALES, 2018). No entanto, as informações disponíveis sobre a melhor abordagem dos diferentes tipos de efusão, ainda são descentralizadas, em algumas situações, estão desatualizadas, o que dificulta o estabelecimento de diretrizes oficiais, nacionais e internacionais, que orientem os profissionais da saúde sobre melhor manejo desses pacientes (HOOPER *et al.*, 2010; KARKHANIS e JOSHI, 2012; ASCIAK e RAHMAN, 2018; FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018; RAKESH e GELZINIS, 2019). Diante disso, a partir de dados obtidos da literatura, resumimos a seguir, as principais etapas de avaliação dos líquidos pleurais utilizadas no diagnóstico diferencial entre EPR, EPM e EPP, e resolução de possíveis EPIs.

### 2.3 DIAGNÓSTICO E ANÁLISE LABORATORIAL DOS LÍQUIDOS PLEURAIS

O diagnóstico da efusão pleural geralmente se inicia através de um exame físico em conjunto com exames de imagem (PORCEL *et al.*, 2015). Assim, uma vez confirmada a efusão, a etapa subsequente consiste na análise do líquido a fim de avaliar suas características físicas, bioquímicas e citopatológicas, e assim, ser possível definir sua etiologia para prosseguir para a terapia mais adequada (HE e OH, 2018). Além da aplicação dos exames clínicos e de imagem para confirmar a presença anormal de líquido na cavidade, a anamnese inicial é considerada um dos passos mais importantes para se buscar elementos que corroborem com alguma hipótese diagnóstica (FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018). Desse modo, a história do paciente pode orientar na melhor escolha de exames que podem ser solicitados para auxiliar no diagnóstico diferencial (BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018). Portanto, nesta etapa de coleta de dados, deve-se realizar uma avaliação dos medicamentos utilizados, fatores de risco, como por exemplo, para tuberculose, além de identificar sintomas sugestivos de infecção respiratória, doença maligna, doenças autoimunes, bem como doenças cardíacas, hepáticas ou renais (ZHOU *et al.*, 2018) Além disso, deve-se avaliar a história ocupacional completa do indivíduo, com questionamentos específicos sobre a exposição ao amianto pois, como visto, mesmo diante de uma exposição mínima ao mineral, foram observadas pré-disposições ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer mesmo décadas após o fim da exposição (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

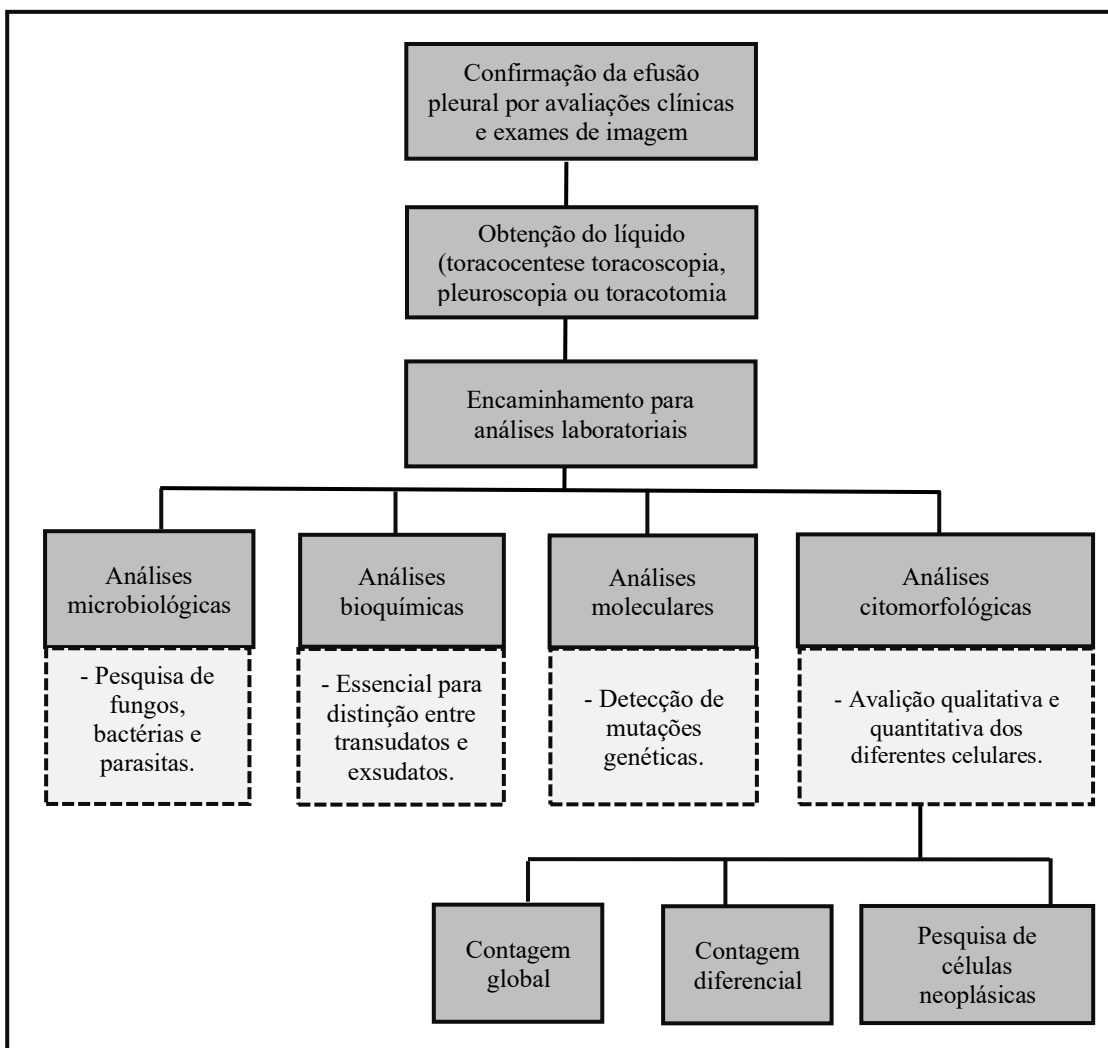
Em seguida à anamnese e aos exames de imagem, realiza-se a coleta do líquido da cavidade, que pode ser obtido por toracocentese ou drenagem torácica durante a toracoscopia,

pleuroscopia ou toracotomia (RODRIGUEZ-PANADERO *et al.*, 2006). Não há dados precisos quanto ao volume exato a ser enviado para as análises laboratoriais, a *American College of Physicians Health and Public Policy Committee* indicou um volume de 50–100 ml para que sejam realizadas as análises citológicas. Não diferente, a *British Thoracic Society* recomendou não menos que 50 ml para as análises citológicas. Enquanto um estudo elaborado por Swiderek *et al.* (2010) que dividiu o líquido pleural coletado em alíquotas de 10 ml, 60 ml e  $\geq 150$  ml, concluiu que um volume de 60 ml seria o mais adequado para diagnosticar uma EPM. Em contrapartida, Thomas *et al.* (2011) relataram 25–50 mL de líquido foram adequados para diagnosticar derrame pleural maligno. Por outro lado, um estudo retrospectivo realizado por Rooper *et al.* (2014) indicou 75 mL como volume mínimo a ser encaminhado para as análises citológicas (HOOPER *et al.*, 2010; SWIDEREK *et al.*, 2010; THOMAS *et al.*, 2011; ROOPER *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017; FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018). Portanto, como pode ser visto, não há diretrizes oficiais que estabeleçam um volume exato a ser encaminhado para cada análise laboratorial, no entanto, a partir destes dados, estipula-se que o ideal é encaminhar pelo menos 50 ml de amostra para as análises citológicas, visto que são estas primordiais para o diagnóstico diferencial das efusões pleurais (MERCER *et al.*, 2019).

Em continuidade às avaliações, segundo um estudo elaborado por Comar *et al.* (2008) o ideal é que as amostras sejam coletadas em tubos diferentes para serem encaminhados para os diferentes setores que constituem um laboratorial de análises clínicas, assim, seria um tubo para as avaliações microbiológicas, citológicas e bioquímicas e, no caso de a amostra ser encaminhada em apenas um tubo, esta deve ser destinada primeiramente para análises microbiológicas, seguida das análises citológicas e, por último, análises bioquímicas, evitando desta forma, contaminações externas que possam influenciar nos resultados das análises microbiológicas e perdas celulares, no caso das análises citológicas (COMAR *et al.*, 2008).

A Figura 6 mostra um fluxograma resumindo as principais etapas realizadas para o diagnóstico diferencial das efusões pleurais, obtidas a partir de informações da literatura (COMAR *et al.*, 2008, KARKHANIS e JOSHI, 2012, HE e OH, 2018, ZHOU *et al.*, 2018; BEAUDOIN e GONZALEZ, 2018; ASCIAK e RAHMAN, 2018; FELLER-KOPMAN *et al.*, 2018; RAKESH e GELZINIS, 2019).

Figura 6 - Fluxograma das etapas de análise dos líquidos pleurais.



Fonte: Elaborado pela autora.

As análises microbiológicas são importantes para o tratamento dos casos classificados como EPRs, no entanto ressalta-se que os métodos convencionais utilizados nesta etapa, tais como coloração por Ziehl-Neelsen ou cultura para a caracterização bacteriana/fúngica, no líquido pleural ou da biópsia pleural, não devem ser realizados como diagnóstico diferencial (ZHANG *et al.*, 2018). Enquanto as avaliações bioquímicas, como a dosagem de proteínas totais, LDH, glicose, triglicerídeos, pH e demais parâmetros, auxiliam na distinção entre transudatos e exsudatos, sendo consideradas importantes ferramentas na distinção e caracterização das efusões (CHUBB e WILLIAMS, 2018).

Com relação aos diagnósticos moleculares, o fato que nem todos os laboratórios possuem o suporte necessário para o estabelecimento de técnicas moleculares, tais como, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), hibridização *in situ* por prata (SISH) ou técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), limita a aplicabilidade destes testes na rotina

laboratorial (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Apesar disto, estudos reportaram a aplicação destes e de outros testes moleculares na detecção de mutações genéticas úteis no diagnóstico diferencial das efusões (OH *et al.*, 2016; CARTER *et al.*, 2017; AGALIOTI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

Em contrapartida, a análise citológica do líquido pleural obtido por toracocentese é o método mais aplicado na rotina laboratorial (MERCER *et al.*, 2019). Isto porque, a detecção de células neoplásicas apenas pela citologia do líquido mostrou vantagens econômicas, boa especificidade, simplicidade técnica, além de poupar os pacientes de investigações mais invasivas (DIXIT *et al.*, 2017, ARNOLD *et al.*, 2018, RAKESH e GELZINIS, 2019).

Neste sentido, tendo em vista que o foco deste trabalho é a detecção de células malignas no líquido pleural, esta revisão foi direcionada para o estudo das análises citológicas das efusões pleurais.

### **2.3.1 Análises citológicas dos líquidos pleurais**

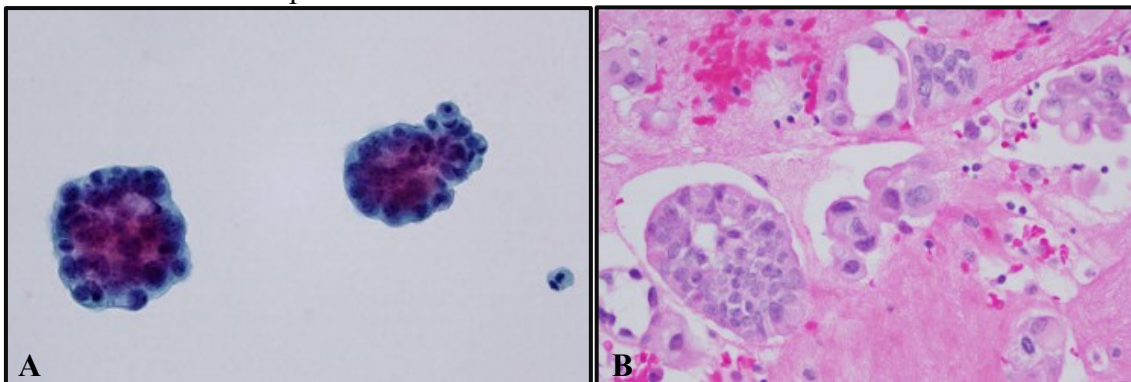
Por mais de um século, o diagnóstico de neoplasias pelo achado de alterações celulares em líquidos pleurais vem sendo realizado, mostrando ser um método de alta especificidade diagnóstica (MERCER *et al.*, 2019). Em muitas ocasiões identifica neoplasias, sugerindo o sítio primário, antes que o mesmo tenha sido detectado (LONGATTO-FILHO *et al.*, 1999). No entanto, sua sensibilidade variável é uma de suas desvantagens, pois pode influenciar no tempo de liberação dos resultados, o que acarreta em atrasos na decisão de novas investigações, além disso, a taxa de confiabilidade é dependente da extensão da doença, do seu tipo histológico (maior no adenocarcinoma e menor no mesotelioma) e da habilidade de análise do citologista (ARNOLD *et al.*, 2018, RAKESH e GELZINIS, 2019). Outra desvantagem é que as análises citológicas nos líquidos pleurais podem apresentar algumas dificuldades, como por exemplo, nos casos em que o número de células é muito pequeno, ou quando problemas na coleta ou no processamento da amostra, resultam em células com diversas alterações morfológicas (MICHAEL e DAVIDSON, 2016).

Assim, para evitar essas ocorrências é recomendado que a análise citológica do líquido pleural seja iniciada imediatamente após sua coleta, e caso não seja possível, a amostra deve ser refrigerada entre 2 °C e 8 °C, durante no máximo 24 horas (ANTONANGELO e CAPELOZZI, 2006). Também é indicado que amostras coaguladas, envelhecidas ou sem a

correta identificação sejam rejeitadas para as análises citológicas, visto que podem induzir a falsos resultados (COMAR *et al.*, 2008).

Com relação a preparação das lâminas para a realização das análises citológicas, estas podem ser obtidas utilizando centrifugação convencional, citocentrifugação, *cells blocks* (amostra bloqueada em parafina) ou ainda filtros Milipore® da amostra coletada (NEGROMONTE-FILHO, 2011). A técnica de coloração geralmente estabelecida é a coloração por Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942), porém Longatto-Filho *et al.* (2001) considera a utilização da coloração hematológica ou coloração por Giemsa, também seja empregada, pois facilitaria a visualização de células procedentes de neoplasias hematológicas, enquanto Papanicolaou seria mais adequado para a observação de células procedentes de tumores sólidos (LONGATTO-FILHO *et al.*, 2001). Naylor, (2008) também recomenda que para a coloração de amostras processadas por *cells blocks* a lâmina seja corada por Hematoxilina-Eosina (H&E) (NAYLOR, 2008). Diante disto, visto que na rotina laboratorial dos laboratórios de patologia, as amostras são comumente preparadas por *cell block* e citocentrifugação, as colorações mais aplicadas são Papanicolaou e H&E (Figura 7) (MIYOSHI *et al.*, 2016)

Figura 7 - Achados citológicos e histológicos em paciente com efusão pleural, exemplificando células coradas em Papanicolaou e H&E.



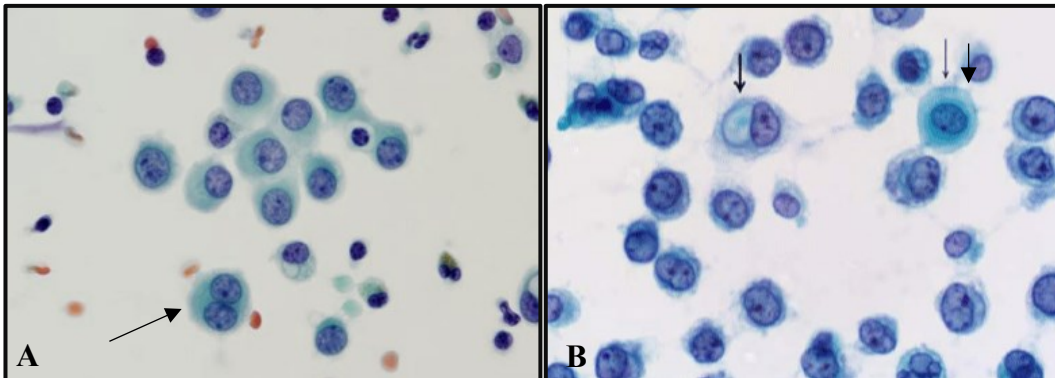
Fonte: Assawasaksakul *et al.* (2017).

(A) A amostra citológica demonstra adenocarcinoma metastático com células tumorais dispostas em configuração tridimensional (coloração de Papanicolaou,  $\times 400$ ); (B) bloco celular correspondente seção do mesmo paciente (coloração com H&E,  $\times 400$ ).

No entanto, mesmo obedecendo as condições exigidas para uma análise citológica adequada, frequentemente são encontrados casos de efusão pleural de difícil distinção, quando se utiliza apenas amostras coradas por Papanicolaou e H&E – (TEIXEIRA, *et al.*, 2006; KUMMAR *et al.*, 2016). Os relatos mais comuns encontrados pelos citopatologistas é a dificuldade em distinguir células mesoteliais benignas atípicas das células metastáticas de

adenocarcinoma (SHIELD *et al.*, 2017, SUBBARAYAN *et al.*, 2019). O fato é que o mesotélio benigno sofre inúmeras alterações arquiteturais e celulares em reação aos numerosos estímulos; por outro lado, células malignas bem diferenciadas podem mascarar-se como células benignas (YAHYA *et al.*, 2013). A Figura 8 mostra um exemplo de apresentação citológica de células mesoteliais benignas atípicas e células metastáticas de adenocarcinoma.

Figura 8 – Semelhanças morfológicas entre EPR e EPM.



Fontes: Shield *et al.* (2017), Firat, (2018).

Amostra de líquido pleural coradas utilizando a coloração de Papanicolaou, 40X (A) Células mesoteliais reacionais (indicadas por uma seta preta); (B) Células metastáticas de adenocarcinoma de pulmão em uma amostra de líquido pleural. Observam-se células malignas dispersas, uniformes e de tamanho semelhante às células mesoteliais (indicadas por setas pretas).

Além disso, apesar das neoplasias envolverem diferentes tipos celulares, muitas vezes suas apresentações citológicas são semelhantes e, portanto, fazer o diagnóstico apenas por critérios morfológicos torna-se inviável (CIBAS, 2009). Diante disso, a aplicação de técnicas complementares se faz necessário, e assim, análises citológicas em determinadas situações são suplementadas com emprego de outras técnicas, tais como, citoquímica, imunocitoquímica, citogenética ou biologia molecular (KOSS, 2006). Dentre estas, a mais utilizada na rotina laboratorial é a imunocitoquímica, por ser uma técnica relativamente simples, confiável e amplamente utilizada para determinar a origem do tecido neoplásico e investigar o comportamento ou a progressão de uma determinada neoplasia (YAHYA *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Imunofenotipagem por imunocitoquímica (ICQ)

A imunocitoquímica é uma técnica que tem como fundamento a utilização de anticorpos contra uma proteína que se pretende identificar e localizar em uma determinada célula (BACARELLI *et al.*, 1995). Essa proteína, considerada um antígeno, após passar pela marcação com o anticorpo, permite caracterizar fenotipicamente a célula suspeita (WERNER, 2005). Assim, a imunocitoquímica é uma técnica de imunofenotipagem que permite a identificação e caracterização de um subconjunto de célula com base em diferentes tipos de antígenos expressos na superfície, no citoplasma ou no núcleo celular (WANG e HERVE, 2017). Na verdade, o termo imunocitoquímica está associado a uma série de metodologias que usam imunoenaios para localizar um epítipo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas (como por exemplo, *cytospin*®) ou preparações monocamada (como por exemplo, *Thinprep*®) (FERRO, 2014). Com isso, é possível identificar e classificar células específicas dentro de uma população celular morfológicamente heterogênea, ou aparentemente homogênea (CAPELOZZI, 2009).

Uma vez que os anticorpos, como proteínas que são, não possuem cor própria nem outra forma de serem visualizados nas preparações citológicas ou histológicas (neste caso, denominada de imuno-histoquímica), é necessário a utilização de substâncias que os tornem visíveis quando se encontram ligados aos antígenos (FERRO, 2014). Assim, a observação do complexo antígeno-anticorpo é possível pela adição de um fluorocromo ou alternativamente uma enzima, que quando conjugado ao anticorpo, pode ser observado ao microscópio (RENSHAW, 2016). O Quadro 5 mostra os diferentes tipos de substâncias que podem ser utilizadas como fluoróforos visíveis à reação.

Quadro 5 – Classificação e exemplos de substâncias fluoróforas utilizadas na imunocitoquímica.

Grupo	Exemplo
Compostos fluorescentes	Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)
Enzimas	Isotiocianato de Rodamina
	Peroxidase
	Fosfatase alcalina
Metais pesados	Ferritina
	Ouro coloidal
Compostos Radioativos	<sup>14</sup> C
	<sup>35</sup> S

Fonte: Ferro (2014).

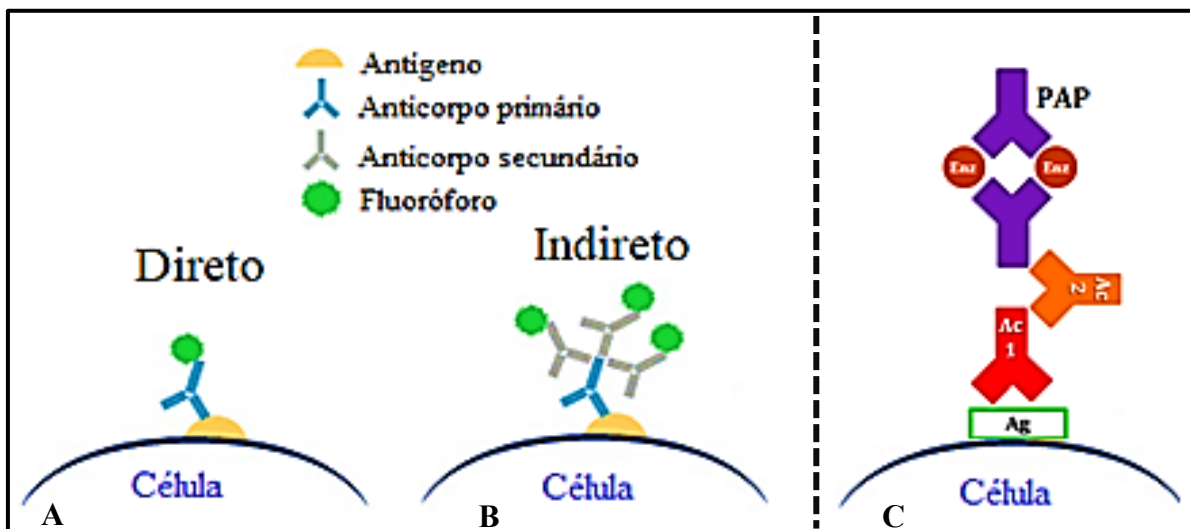
<sup>14</sup>C:Carbono-14; <sup>35</sup>S: Enxofre

Assim, para a formação do complexo antígeno-anticorpo-fluoróforo, a amostra de líquido pleural é previamente preparada, por centrifugação ou por confecção de *cellblock*, para em seguida, aderida a uma lâmina de vidro, ser marcada, direta ou indiretamente com o fluoróforo que permita a visualização anticorpo que se deseja detectar o antígeno, como exemplifica a Figura 9 (A-B) (BURRY, 2011). Na marcação direta, é utilizado somente um anticorpo primário que já está conjugado com um marcador (florescente) (Figura 9-A), este tipo de marcação tem como vantagem a simplicidade e a rapidez do processamento, e, como desvantagem, a pouca ampliação de sinal, pois somente existe uma molécula de marcador por molécula de antígeno (FERRO, 2014). Enquanto na marcação indireta, o anticorpo primário que se liga ao antígeno, necessita de um anticorpo secundário, o qual estará marcado com a substância que permite a visualização do complexo (Figura 9-B). Neste tipo de marcação, a vantagem é ser mais sensível do que o método direto, pois há um maior número de moléculas de marcador por cada molécula de antígeno, enquanto sua desvantagem está no fato de ser mais demorado e complexo do que o método direto (FERRO, 2014).

A visualização do complexo antígeno-anticorpo-fluoróforo também pode ser realizada pelo método peroxidase anti-peroxidase (PAP). Neste método são utilizados três tipos de reagentes são eles, um anticorpo primário que se liga ao antígeno, um anticorpo secundário, que funciona como uma ponte para o complexo PAP, responsável pela visualização da reação (Figura 9-C).



Figura 9 – Tipos de marcação empregadas na imunocitoquímica.



Fonte: Adaptado de: Abcam® e FERRO (2014).

(A) Marcação imunocitoquímica direta, no qual, o anticorpo possui o marcador que se liga diretamente ao antígeno; (B) Marcação imunocitoquímica indireta, no qual, são utilizados anticorpos secundários para detecção de antígenos; (C) Marcação imunocitoquímica pelo método Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP).

Assim, além de todo cuidado técnico necessário para que as reações por imunocitoquímica sejam de qualidade e possam ser interpretadas da maneira correta pelo patologista, a fase de escolha dos anticorpos a serem aplicados, após a análise da lâmina corada em H&E ou Papanicolaou, é igualmente importante (WERNER *et al.*, 2005).

No entanto, não foram encontrados na literatura, diretrizes oficiais que estabeleçam quais anticorpos devem ser utilizados para cada suspeita clínica no diagnóstico das EPMS metastáticas, ou seja, não há um consenso sobre quais marcadores devem ser utilizados para cada tipo de câncer. Porém, já é reconhecido que alguns antígenos são expressos em determinados tipos celulares, caracterizando a origem histológica, e assim, definir mais precisamente o diagnóstico e a conduta a ser realizada (KARPATHIOU *et al.*, 2015). Por exemplo, anticorpos específicos para filamentos intermediários mostraram ser eficazes no auxílio ao diagnóstico das EPMS metastáticas, isso porque, as células procedentes de tumores sólidos frequentemente contêm filamentos intermediários característicos da sua célula de origem (MACHADO e FIGUEIREDO, 1996). É o caso da expressão de citoqueratinas, detectadas por imunocitoquímica, que podem indicar uma origem epitelial (carcinoma), enquanto a desmina, outro tipo de filamento intermediário, é específica para neoplasias de origem muscular (ABBAS, 2015).

Deste modo, diante da ampla diversidade de células neoplásicas que podem invadir a cavidade pleural, e conseqüentemente, das diferentes apresentações fenotípicas expressas por

essas células, direcionou-se esta revisão para a caracterização fenotípica das células neoplásicas mais associados às EPM, que são câncer de mama, pulmão e neoplasias hematológicas (MERCER *et al.*, 2019; SKOK *et al.*, 2019).

### 2.3.2.1 Caracterização fenotípica do câncer de mama para o diagnóstico de EPM

Um tecido glandular normal da mama é composto por três tipos de células que expressam diferentes subconjuntos de proteínas: luminal, basal e mioepitelial (ZAHA, 2014). As células luminais expressam citoqueratinas (CK 7, 8, 18, 19), antígeno da membrana epitelial (EMA), antígeno da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM),  $\alpha$ -lactalbumina, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP). As células mioepiteliais expressam CKs do tipo basocelular e marcadores específicos: actina do músculo liso, calponina, S100 e p63, enquanto os tipos celulares basais expressam diferentes citoqueratinas (5/6, 14, 17) (ZAHA, 2014; WEIGAND *et al.*, 2016). Células neoplásicas podem surgir de qualquer um desses tecidos, assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em julho de 2012 a 4ª edição da Classificação dos Tumores de Mama, onde, nesta edição foram reclassificados cerca de 20 subtipos histológicos de câncer de mama, além de sugeridos novos escores para avaliação por imuno-histoquímica de receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR), além do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) (GOBBI, 2012).

Assim, considerando que a base de classificação desses tumores é a expressão de destes receptores hormonais e da expressão de HER-2, as células procedentes de tumores malignos da mama, podem ser identificadas nas amostras de efusão pleural pela expressão de ER, PR e HER-2 (FRANCIS *et al.*, 2016).

No entanto, a expressão dos receptores hormonais (ER e PR) não é específica somente das células mamárias, sendo também observados em células metastáticas de carcinoma originários dos órgãos reprodutores feminino, assim como a expressão do antígeno HER-2 também pode ser observada em células do trato digestivo (estômago) (ABRAHAO-MACHADO; SCAPULATEMPO-NETO, 2016). Dessa forma, a utilização desses marcadores não é recomendada em suspeitas clínicas que necessitam da distinção desses tipos histológicos (FRANCIS *et al.*, 2016). Além disso, algumas células metastáticas de origem mamária podem ter o fenótipo triplo negativo, ou seja, não expressam os antígenos ER, PR e HER-2, e conseqüentemente, podem gerar resultados falsos negativos (PALA *et al.*, 2012). Apesar de não haver diretrizes oficiais com orientações específicas sobre a melhor abordagem das EPMs secundárias ao câncer de mama, as diretrizes elaboradas pela *American Society of Clinical*

*Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP)* com especificações para o diagnóstico de câncer de mama, recomenda que a detecção dos receptores hormonais (RE e RP) e do HER-2, sejam sempre incluídos nos testes laboratoriais das amostras de tecidos suspeitos de recorrência ou amostras com suspeitas de metástases em pacientes com câncer de mama, portanto, podem ser consideradas como amostras suspeitas de lesões metastáticas, os líquidos pleurais com suspeita de EPM (HAMMOND *et al.*, 2010). Esta recomendação se baseia no fato de que podem ocorrer mutações genéticas durante o progresso do tumor primário que podem influenciar no tratamento da doença (MATSUI *et al.*, 2019).

Além destes marcadores, outros anticorpos podem ser utilizados contra os antígenos expressos em células mamárias, o que permite sua caracterização e posterior identificação em sítios metastáticos (ver Quadro 6) (ZAHA, 2014; MAGLA *et al.*, 2017).

Quadro 6 – Resumo de alguns marcadores aplicados no diagnóstico diferencial das EPMs.

MARCADOR (anticorpos)	PADRÃO DE EXPRESSÃO	FINALIDADE
<b>Marcação mioepitelial</b>		
Actina do músculo liso (SMA)	Citoplasmático	Diferencia entre proliferações invasivas e benignas com aparência morfológica semelhante.
Calponin	Citoplasmático	
p63	Nuclear	
Cadeia pesada da miosina do músculo liso (SMMHC)	Citoplasmático	
<b>Ductal and lobular (carcinomas in situ)</b>		
E-caderina	Membranar	O ductal é positivo para E-caderina e CK8 (+) é periférico citoplasmático
Citoqueratina 8/18	Periférico citoplasmático ou perinuclear	
<b>Origem mamária no carcinoma metastático</b>		
GCDFP-15	Citoplasmático	Útil na detecção de tecido mamário em metástases distantes, onde a aparência morfológica pode ser enganosa.
Mamaglobina A	Citoplasmático	
Carcinoembryonic antigen protein (CEA)	Citoplasmático	
<b>Marcadores de prognóstico</b>		
Receptor de estrógeno (RE)	Nuclear	Útil na direção da terapia hormonal no tratamento do câncer de mama
Receptor de progesterona (RP)	Nuclear	
Fato de crescimento epidermal humano (HER-2)	Membranar	
Ki-67	Nuclear	Útil como índice de proliferação celular (Ki-67)
Antígeno relacionado ao fator VIII	Citoplasmático	Marcadores de angiogênese
Fator de crescimento vascular endotelial	Membrana nuclear, membrana	

	citoplasmática e citoplasma	
--	--------------------------------	--

Fonte: MANGLA *et al.*, 2017.

Dentre os marcadores citados no Quadro 6, a detecção da expressão da Proteína fluida 15 da doença cística transversal (GCDFP-15) e da Mamaglobina A tem mostrado ser uma boa ferramenta na identificação de metástases originadas da mama em líquidos pleurais (MI *et al.*, 2017). A GCDFP-15, também conhecida como BRST-2, é uma das proteínas detectadas no fluido do cisto mamário, enquanto a mamaglobina A é uma proteína secretora das células da mama (TAKEDA *et al.*, 2008). Assim, o uso de anticorpos que detectem os antígenos GCDFP-15 e Mamaglobina A são um dos marcadores mais utilizados na imunocitoquímica para identificar células metastáticas de origem da mamária no líquido pleural, além dos receptores hormonais e do HER-2 (HUO *et al.*, 2013; DARB-ESFAHANI *et al.*, 2014, MATSUI *et al.*, 2019).

### 2.3.2.2 Caracterização fenotípica do câncer de pulmão para o diagnóstico de EPM

O câncer de pulmão é tradicionalmente dividido em carcinoma de pulmão de não pequenas células e carcinoma de pequenas células, sendo o primeiro responsável por 80% dos casos e o segundo pelos 20% restantes (ZHENG, 2016). O reconhecimento da diversidade dos carcinomas levou à sua subclassificação em 2015 pela OMS, dos quais destacam-se os adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (TRAVIS *et al.*, 2015). Em todos esses tipos celulares, a efusão pleural é uma possível complicação da doença (MEDENICA *et al.*, 2018).

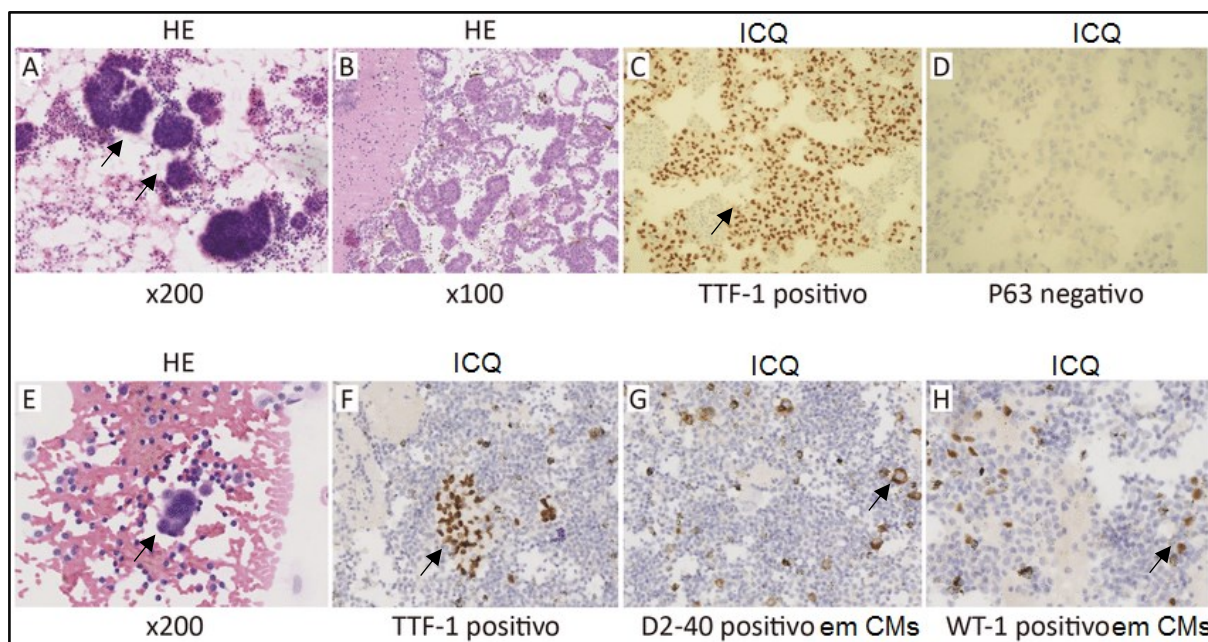
A decisão sobre quais anticorpos devem ser utilizados na detecção de células malignas em amostras de efusão pleural, geralmente é guiada a partir das características fenotípicas do tumor primário (quando já diagnosticado) ou após a visualização morfológica das células do líquido pleural coradas em H&E e/ou Papanicolaou (HALIMI *et al.*, 2019). A Figura 10 mostra dois casos de EPM secundária a câncer metastático de pulmão diagnosticado por análises morfológicas e imunocitoquímicas.

A disponibilidade comercial de uma ampla variedade de anticorpos facilitou o diagnóstico das EPM malignas secundárias à câncer de pulmão, dentre estes, o uso do anti-CEA, anti-MOC 3.1, anti-B72.3, anti-Ber-EP4, anti-BG-8, anti-Napisa A, anti-citoqueratinas CK7 e CK20, por serem expressos em variantes malignas pulmonares, mostrarem ser boas

ferramentas na detecção de células metastáticas de câncer de pulmão em amostras de líquido pleural (YE *et al.*, 2011 ; WANG *et al.*, 2014 ; ZHENG, 2016 ; DIXIT *et al.*, 2017 ; HALIMI *et al.*, 2019).

Além destes, a utilidade dos anticorpos TTF-1 (fator de transcrição da tireóide-1) e do p63, tem sido apontada como uma importante ferramenta na caracterização e distinção de células neoplásicas de carcinoma epidermoide (variante pequenas células) e do carcinoma de pequenas células (YATABE *et al.*, 2019). O TTF-1 é uma proteína nuclear fisiologicamente expressa durante o desenvolvimento da tireoide, do pulmão e de algumas regiões cerebrais, assim, sua expressão em células normais pulmonares foi observada primariamente no núcleo das células alveolares (particularmente pneumócitos tipo II) e em células brônquicas (não ciliares e basais), em contrapartida também foi observado sua expressão em mais de 80% dos carcinomas de pequenas células do pulmão (MARINHO e RAMOS, 2010). Enquanto o p63 é uma proteína membro da família do gene p53 e suas mutações embrionárias foram associadas a graves alterações do desenvolvimento da mama em roedores e humanos, a expressão anormal do p63 foi originalmente documentada em carcinomas epidermóides da cavidade oral e do esôfago e em lesões pré-malignas e invasivas da cérvix uterina (MA *et al.*, 2015). No epitélio brônquico, ele está positivo em células basais normais, epitélios metaplásico e displásico e em carcinomas epidermóides pouco diferenciado, entretanto, ele também pode estar expresso em algumas subpopulações de adenocarcinomas e em tumores neuroendócrinos pouco diferenciados, e geralmente negativo em carcinoma de pequenas células (WU *et al.*, 2003).

Figura 10 – Caso de EPM secundário a câncer de pulmão metastático.



Fonte: WANG *et al.*, (2016).

Imagens de EPM procedente de dois pacientes (A-D: Paciente 1; E-H: Paciente 2) com diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão. (A) Amostra de EPM corada em H&E revela alto conteúdo tumoral (indicados por setas pretas); (B) Amostra corada em H&E, preparada por *cellblock* revela alto conteúdo tumoral - células tumorais > 90%; (C) Amostra revela alto conteúdo tumoral observada pela expressão positiva difusa do TTF-1; (D) Mostra expressão negativa para p63; (E) Amostra corada em H&E de EPM com baixo conteúdo tumoral; (F) Células tumorais (<10%) com expressão positiva para TTF-1 indica baixo conteúdo tumoral para esta amostra (células indicadas por uma seta preta); (G) Nesta imagem se observa células mesoteliais hiperplásicas (CMs) e células inflamatórias, em conjunto com células malignas. A expressão positiva para D2-40, somente é observada nas células mesoteliais hiperplásicas; (H) Nesta imagem se observa células mesoteliais hiperplásicas (CMs) e células inflamatórias, em conjunto com células malignas uma expressão positiva para WT-1 é observada somente nas células mesoteliais hiperplásicas, e não em células cancerígenas.

Além destas publicações, um estudo realizado por Marinho e Ramos (2010) relatou que a expressão do fenótipo TTF-1+/p63- está presente em 87% a 94% dos carcinomas de pequenas células, enquanto um fenótipo p63+/TTF-1- é observado em 96% a 100% dos carcinomas epidermóides pouco diferenciados (MARINHO e RAMOS, 2010). Além deste, outros estudos aplicados à detecção de células metastáticas pulmonares mostraram que o uso das citoqueratinas CK7 e CK20 em um painel com outros anticorpos, podem ser úteis para distinguir se a origem celular metastática é primária pulmonar (CK7+, CK20-) ou metastática do trato digestivo em amostras de efusões pleurais (CK7-, CK20+) (SU *et al.*, 2006; AL-ZAHRANI, 2008; CAPELOZZI, 2009). Também foi observado que o uso da calretinina, da mesotelina, da queratina 5/6, da podoplanina e do WT-1 foram úteis na identificação de células mesoteliais malignas e reacionais, e conseqüentemente na distinção de células malignas pulmonares (AFSHAR-MOGHADDAM *et al.*, 2014). A distinção entre adenocarcinoma metastático e mesotelioma maligno e/ou células mesoteliais reativas é muito importante para o estadiamento

e tem implicações significativas no tratamento (HUSAIN et al., 2018). Assim, o Ber-EP4, um anticorpo monoclonal que identifica glicoproteínas de superfície celular de 34 kD e 39 kD presentes na membrana das células epiteliais humanas, mas não nas células mesoteliais reativas ou malignas, tem demonstrado ser um bom marcador no diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma metastático, mesotelioma maligno e células mesoteliais reativas (WANG *et al.*, 2014).

Como visto, a interpretação dos resultados imunocitoquímicos é algo complexo que deve ser realizado com cautela pelos citopatologistas, principalmente porque um mesmo anticorpo pode marcar antígenos expressos por diferentes tipos celulares (WU et al., 2003; MARINHO e RAMOS, 2010; HUSAIN et al., 2018). Desta forma, determinar se o sítio primário é realmente pulmonar, em algumas situações, irá requerer uma combinação de investigações clínicas, radiológicas e a escolha de um painel de anticorpos que permita distinguir corretamente a origem celular, considerando que resultados equivocados podem afetar diretamente na terapia e na qualidade de vida do paciente (YATABE *et al.*, 2019; MERCER *et al.*, 2019).

### *2.3.2.3 Caracterização fenotípica das neoplasias hematológicas para o diagnóstico de EPM*

As neoplasias hematológicas constituem um complexo grupo de doenças clonais que podem afetar as diversas linhagens e tecidos hematopoiéticos, formando células com diversas alterações morfológicas, genéticas e imunofenotípicas (TAYLOR *et al.*, 2017). Diante disto, em 2008, a OMS publicou a 4ª edição do livro “Classificação dos tumores hematopoiéticos e tecidos linfoides”, onde estabeleceu diretrizes e classificações dos diferentes tipos de neoplasias hematológicas com base na tipificação genética e histológica dos diversos tumores hematológicos, além disso, o livro contém orientações e informações sobre os critérios de diagnóstico, características patológicas e alterações genéticas associadas, resposta à terapia, características e resultados clínicos, epidemiologia, prognóstico e fatores preditivos oficiais para os tumores do tecido hematopoiético e linfóide (SWERDLOW et al., 2008). Em 2017, a OMS realizou uma atualização desta edição, não considerada uma quinta edição pois ainda existem outros volumes pendentes da quarta edição, no qual foram revistos e revisados mais de 70 subtipos de leucemias, linfomas e outras síndromes hematológicas (SWERDLOW et al., 2017).

Desta forma, descrever as diferentes apresentações citológicas e imunofenotípicas das células neoplásicas hematológicas em amostras de líquido pleural, requer um estudo amplo e

complexo (VAKIL *et al.*, 2018; SWERDLOW *et al.*, 2017). Porém, em uma abordagem mais simplificada da relação das efusões pleurais e as neoplasias hematológicas, nota-se que as EPMS são apresentações comuns em pacientes com neoplasias hematológicas, podendo ocorrer em até 48% destes pacientes, dentre os quais, 10% foram associadas ao linfoma do tipo não-Hodgkin (diagnosticados ao exame citológico positivo para células malignas) (BODE-LESNIEWSKA, 2016). Em contrapartida, foram raramente associadas à leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda e síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa (FAIZ *et al.*, 2013). Relatos da literatura apontam que linfomas e leucemia foram as causas mais frequentes de efusões malignas em crianças (BODE-LESNIEWSKA, 2016). Enquanto em um outro estudo elaborado por Gilbert *et al* (2015), em 91 pacientes adultos com doença hematológica e necessidade de toracocentese, foram observados que 62% tinham diagnóstico de linfoma, seguido de leucemia (21%), mieloma múltiplo (13%) e 4 pacientes secundários à amiloidose ou mielofibrose (GILBERT *et al.*, 2015).

Apesar da infiltração de células malignas no espaço pleural ser a causa mais comum de efusão em pacientes com diagnóstico de neoplasia hematológica, essa também pode ser causada por infecções (especialmente tuberculose), dano pleural devido a irradiação torácica prévia, quimioterapia ou infiltração por outras neoplasias (ALEXANDRAKIS *et al.*, 2014). Desta forma, visto que a patogênese das efusões pleurais secundárias às neoplasias hematológicas é multifatorial, a distinção entre EPR, EPM e EPP, constituem um verdadeiro desafio no diagnóstico diferencial de efusões reacionais e malignas, com destaque para efusões pleurais reacionais linfocíticas e linfomas (ALEXANDRAKIS *et al.*, 2014; BODE-LESNIEWSKA, 2016). Isto porque, as análises laboratoriais dos diferentes líquidos pleurais podem apresentar condições morfológicas semelhantes entre si, como em alguns casos de linfomas não-Hodgkin que podem apresentar elevados níveis de ADA e predomínio linfocítico, um achado comum em pacientes com diagnóstico de tuberculose, porém incomum em EPMS (ANTONANGELO *et al.*, 2012). Diante disto, o encaminhamento para a imunofenotipagem e a seleção de anticorpos apropriados para a caracterização das células suspeitas, constituem uma das etapas mais importantes para um diagnóstico correto e eficaz (ALEXANDRAKIS *et al.*, 2014).

Assim, a seleção do painel apropriado leva em consideração as características fenotípicas da neoplasia primária, dos resultados clínicos e laboratoriais, além de uma extensa análise morfológica das células presentes na amostra de líquido pleural (BODE-LESNIEWSKA, 2016). Além disto, é recomendado que os perfis imunofenotípicos das células suspeitas sejam comparados com os das células hematopoiéticas normais, o que exige um



conhecimento prévio das expressões fenotípicas normais para a identificação e caracterização das células com expressões anormais (DONGEN *et al.*, 2012).

Diante disto, a determinação dos percentuais relativos dos leucócitos normais pode ser avaliada pela expressão do antígeno (CD45+) (conhecido como um pan-leucocitário), linfócitos T pela expressão (CD3+) e suas subpopulações T auxiliar (CD4+), T citotóxico (CD8+), T  $\gamma\delta$  (CD3+ CD4- CD8-) e T  $\alpha\beta$  (CD3+ CD4+ CD8+), linfócitos B (CD19+), células NK (CD56+ CD3-) e células NKT (CD56+ CD3+) (SWERDLOW *et al.*, 2017). Assim, considerando que os linfomas são definidos como proliferação clonal de linfócitos em diferentes estágios de maturação, um painel de anticorpos apropriado deve incluir marcadores de células B (CD19, CD20, CD79a), marcadores de células T, e demais marcadores presentes na maturação celular, tais como, CD23, ciclina, D1, Bcl2, CD15, CD30, Ki67 e CD45, além da análise da expressão da imunoglobulina de cadeia leve que mostrou ter um papel importante na avaliação dos linfócitos B e no diagnóstico dos pacientes com suspeita de linfoma de células maduras B (SWERDLOW *et al.*, 2017). A identificação de uma população de células B, expressando apenas um único tipo de imunoglobulina de cadeia leve, Kappa ou Lambda ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ), indica um processo clonal de células B, que em conjunto com outros marcadores, podem sustentar a hipótese de linfoma (HORNA *et al.*, 2011). Além disso, um imunofenótipo patológico de células T, com uma perda de expressão de antígeno ou uma coexpressão incomum de marcadores (por exemplo, CD7, CD4 e CD8), pode ser indicativo de neoplasia de células T (BODE-LESNIEWSKA, 2016).

O Quadro 7 resume alguns antígenos expressos por diferentes populações leucocitárias nos estudos das neoplasias hematológicas por imunofenotipagem.

Quadro 7 – Antígenos expressos nas diferentes populações leucocitárias.

POPULAÇÕES CELULARES IDENTIFICADAS	ALVOS ANTIGÊNICOS
Células B normais ou clonais	CD19, CD20, kappa, lambda
Células B da LLC vs. outros distúrbios linfoproliferativos	CD19, CD20, CD5, CD23, CD22, FMC7, CD11c, CD25, CD103, CD10
Células plasmáticas	CD38, cyt kappa, cyt lambda, CD45, BB4, CD56
Células T normais ou anormais	CD3, CD5, CD7, CD2, CD4, CD8, TCRab, TCRgd
Células T imaturas	CD1, CD2, CD4, CD8, CD34, CD7, cytCD3, TdT
Células B imaturas	CD19, CD10, CD34, CD20, CD79a, CD22, CD45, TdT
Células mieloides imaturas	CD34, CD33, CD13, HLADR, CD45, CD117
Células mieloides exibindo diferenciação granulocítica	CD15, CD11b, CD16, CD10
Células mieloides exibindo diferenciação monocítica	CD4, CD14, CD64, CD33, CD11b, CD45
Células mieloides exibindo diferenciação megacariocítica	CD61, CD41, CD42b; CD34
Precusores de glóbulos vermelhos	CD71, CD45, Glycophorin A
Expressão aberrante do antígeno mieloide	CD33, CD13, CD56, CD34, CD15, CD117
Expressão aberrante do antígeno linfoide	CD19, TdT, CD7, CD3

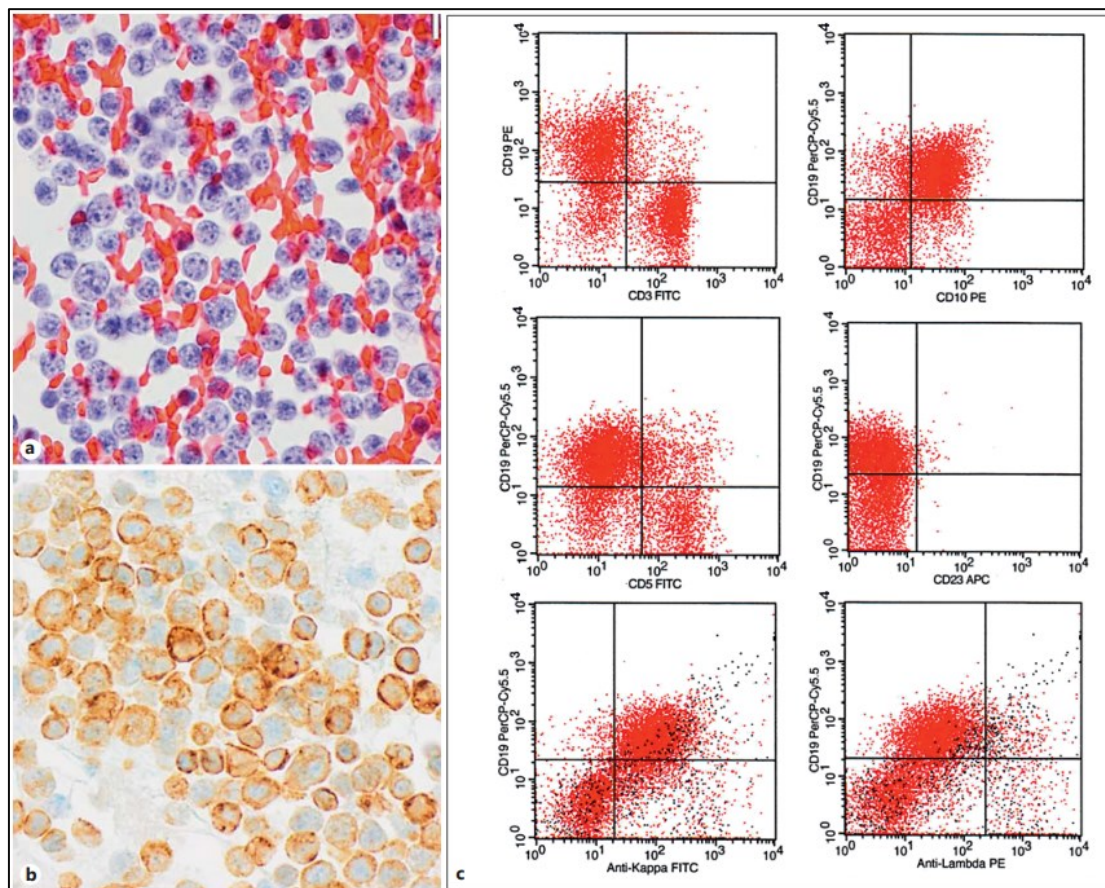
Adaptado de: STEWART et al. (1997).

No entanto, como descrito inicialmente, o estudo das neoplasias hematológicas, principalmente quando envolve pacientes em situações metastáticas, requer uma análise mais detalhada, incluindo diferentes painéis de anticorpos que diante das diversas suspeitas clínicas, podem ainda ser ampliados com outros anticorpos, para promover a correta conclusão do diagnóstico (LAU *et al.*, 2004; SWERDLOW *et al.*, 2017). Assim, tendo em vista a ampla variedade de anticorpos disponíveis para caracterizar os diversos tipos celulares presentes em neoplasias hematológicas, pesquisas são constantemente realizados com o intuito de estabelecer diagnósticos mais rápidos e fidedignos que promovam as melhores condutas terapêuticas aos pacientes acometidos com neoplasias hematológicas (TAYLOR *et al.*, 2017; BORGHAIN *et al.*, 2017). Dentre as pesquisas observadas, o estudo realizado pelo grupo europeu *Euroflow* tem proporcionado contribuições relevantes na área do diagnóstico laboratorial das neoplasias hematológicas ao propor o estabelecimento e a padronização da imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) (DONGEN *et al.*, 2012).

A imunofenotipagem por CF permitiu resultados mais rápidos, precisos e altamente sensíveis para diagnóstico, classificação prognóstica, além do acompanhamento da eficácia do tratamento das neoplasias hematológicas (KALINA *et al.*, 2012). Assim, a aplicação da CF tem permitido bons rendimentos principalmente quando combinada com a aplicação de outras técnicas auxiliares, como imunocitoquímica e métodos moleculares (BODE-LESNIEWSKA,

2016). A Figura 11 mostra um caso de EPM associado a linfoma, diagnosticado por estudos morfológicos e imunofenotípicos, por ICQ e CF.

Figura 11 – Análise morfológica e imunofenotípica por citometria de fluxo e imunocitoquímica em um caso de EPM.



Fonte: Adaptada de Bode-lesniewska (2016).

(A) Observação dos linfócitos corados em Papanicolaou, x400; (B) Observação de linfócitos por imunocitoquímica com expressão positiva para antígeno Bcl2; (C) Avaliação da amostra por citometria de fluxo demonstrando uma grande população de células B, CD19 positivas com expressão monoclonal para a cadeia  $\kappa$  e co-expressão de CD10, correspondendo ao diagnóstico de linfoma.

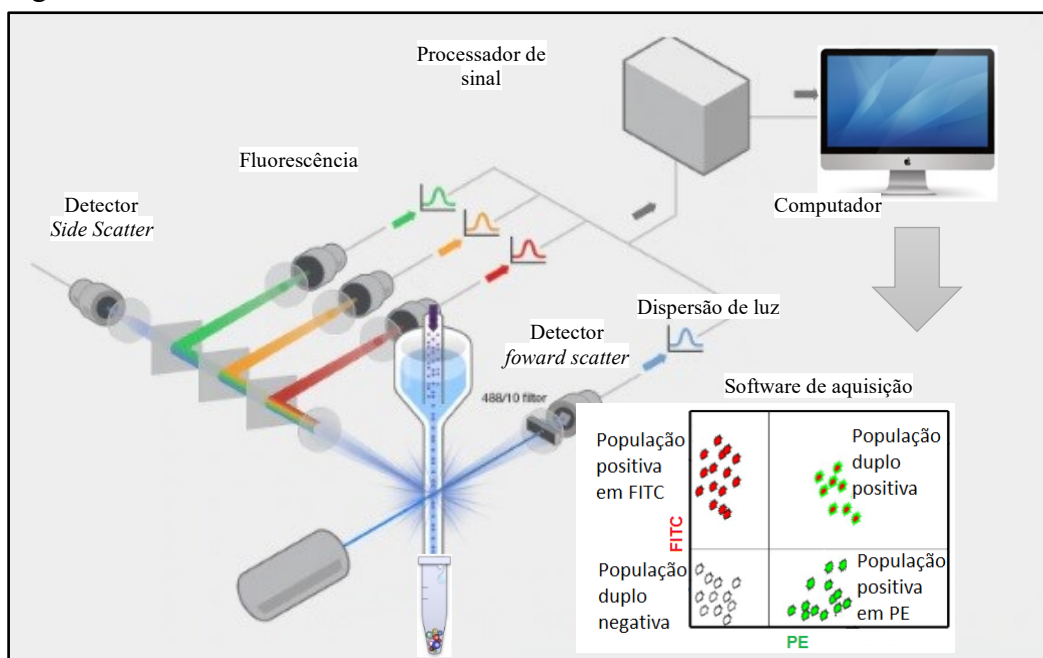
Assim como a imunocitoquímica, a imunofenotipagem por citometria de fluxo permite caracterizar uma população de células normais, diferenciar populações anormais, definir o seu fenótipo, seu percentual na amostra em estudo e interpretar o resultado no contexto clínico e morfológico (CHEN e LUU, 2017). Além disto, permite a análise simultânea de populações mistas de células do sangue, da medula óssea, bem como tecidos sólidos que podem ser dissociados em células únicas, como linfonodos, baço e tecidos mucosos (HORNA *et al.*, 2011). Como visto, as amostras de líquido pleural são consideradas amostras adequadas para avaliação por citometria de fluxo, pois consistem em preparações em suspensão, com antígenos celulares disponíveis para a ligação com os anticorpos (CHEN e LUU, 2016). No entanto, apesar de ser

amplamente aplicada no diagnóstico de distúrbios hematológicos, raramente tem sido utilizada na caracterização de células epiteliais e mesoteliais no cenário diagnóstico (BODE-LESNIEWSKA, 2016).

## 2.4 ESTUDO DAS EFUSÕES PLEURAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo, introduzida em meados do século XX, era uma metodologia utilizada apenas em centros de pesquisas para obtenção de parâmetros básicos da morfologia celular, porém com os avanços tecnológicos e grandes descobertas, como a produção de anticorpos monoclonais, abriu um amplo espectro dentro do diagnóstico laboratorial (CHANG e HEDLEY, 2012; O'DONNELL *et al.*, 2013). É um método que analisa rapidamente células ou partículas únicas à medida que elas passam por um ou vários lasers, dependendo do modelo do citômetro de fluxo, enquanto suspensas em uma solução à base de sal tamponada (CHEN e LUU, 2016). Cada partícula é analisada quanto à dispersão da luz visível em um ou vários parâmetros de fluorescência (ver Figura 12) (ADAN, et al., 2017).

Figura 12 – Funcionamento interno de um Citômetro de fluxo.



Fonte: Adaptado de: ThermoFisher®, (2020).

A dispersão da luz visível é medida em duas direções diferentes, a direção direta (dispersão direta ou “*forward scatter* [FSC]), que indica o tamanho relativo das células, e a 90 ° dispersão lateral ou *side scatter* [SSC]), que indica a complexidade ou a granularidade interna das células (MACEY, 2007). Assim, quando as amostras são aspiradas pelo citômetro de fluxo, as células marcadas passam, uma a uma, por um conjunto de feixes de lasers, e emitem fluorescência (referente ao tipo de fluorocromo ligado ao anticorpo utilizado), isso possibilita uma análise multiparamétrica simultânea de cada uma das células observadas, e permite a separação de populações celulares dependendo do padrão de expressão de antígenos encontrados nas mesmas (PEDREIRA *et al.*, 2013).

Apesar do crescente interesse de sua aplicabilidade na análise do perfil imunofenotípico em diferentes tumores sólidos, a necessidade da preparação da amostra biológica sólida em uma suspensão celular parece ser um fator limitante para seu estabelecimento na rotina laboratorial (FULLER e THRALL, 2016). Um complexo estudo elaborado por Davidson (2016), apresentou uma revisão de dados com estudos realizados nos últimos 20 anos sobre a aplicabilidade da citometria de fluxo em amostras de efusão pleural com suspeitas malignas (DEIVIDSON, 2016). Nesta revisão, foi visto que CF desempenhou um papel importante na análise da ploidia do DNA para distinção entre efusões malignas e benignas. Os resultados obtidos mostraram que a metodologia tem boa sensibilidade, apesar de que alguns autores relataram que a citometria de imagem teve um desempenho melhor que o CF, enquanto outros tiveram a experiência oposta (FRIEDMAN *et al.*, 1996; CHEN, *et al.*, 1998). Em uma outra abordagem, Davidson (2016) relata uma série de outros estudos direcionados à análise imunofenotípica em amostras de efusão secundárias a tumores não-hematológicos, assim, as efusões pleurais foram avaliadas aplicando um painel de anticorpos que continha os marcadores Ber-EP4, N-Caderina, CD45 e CD14, os resultados mostraram que estes marcadores avaliados por CF, foram efetivos na identificação de células de carcinoma, células mesoteliais, leucócitos e macrófagos, respectivamente (DEIVIDSON, 2016). Em outro estudo realizado por Pillai *et al.* (2013) foi avaliada a eficácia do painel Ber-EP4, CD45, CD14, B72.3, AH6 e HB-Tn em 83 amostras de efusão pleural, os resultados obtidos mostraram uma sensibilidade e especificidade em 88,15 e 97,64% para detecção de malignidade, respectivamente, comparados a 73,68 e 100% para morfologia, além disto, foi observado por citometria de fluxo que as células de carcinoma expressaram 3 dos 4 marcadores epiteliais (BerEP4, B72.3, AH6 e HB-Tn) em 77% dos casos, em comparação com 7% das amostras reativas, e células positivas para todos os 4 marcadores foram encontradas em 39% das efusões secundárias a carcinoma (PILLAI *et al.* 2013). Hartman *et al.* (1999) também avaliaram o anticorpo 6E6 contra a proteína MUC1/Y

em efusões secundárias a carcinoma de ovário e mama, e relataram alta sensibilidade na detecção destes tumores (HARTMAN *et al.* (1999).

Assim, o conjunto destes estudos mostram que apesar de bem estabelecida na área hematológica, a incorporação da CF aos diagnósticos citopatológicos de rotina ainda não está bem definida, e que apesar dos resultados promissores, a aplicação desta metodologia para o estudo das neoplasias não-hematológicas ainda permanece em sua grande parte, apenas no âmbito da pesquisa. (FULLER e THRALL, 2016).

Por fim, acredita-se que a utilização dessa ferramenta na caracterização da origem do tipo celular em suspeitas de neoplasias malignas não-hematológicas, poderia auxiliar os métodos de diagnóstico utilizados atualmente a definir mais precisamente a conclusão diagnóstica, como tem sido visto na área hematológica, e, conseqüentemente, na conduta terapêutica a ser realizada em pacientes acometidos por câncer (DAVIDSON, 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Investigar o fenótipo das células presentes em efusões pleurais por citometria de fluxo e analisar a importância destes como marcadores fenotípicos para o diagnóstico diferencial entre efusões reacionais, malignas e paramalignas e comparar os resultados da imunofenotipagem por citometria de fluxo com aqueles obtidos nas avaliações morfológicas e imunocitoquímicas;

#### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar por citometria de fluxo o fenótipo das células presentes em amostras de efusões pleurais dos pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) e no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) com suspeita clínica de efusão pleural maligna;
- Avaliar a importância dos marcadores para a detecção do fenótipo das células provenientes das efusões pleurais para o diagnóstico diferencial de carcinomas primários ou metastáticos, de pulmão e de mama e neoplasias linfoproliferativas;
- Verificar as marcações fenotípicas nas células provenientes de efusões pleurais por citometria de fluxo como ferramenta no diagnóstico diferencial entre proliferações malignas e reacionais;
- Avaliar as diferentes populações leucocitárias nas amostras de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão e mama e discutir sua relação com a neoplasia.

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo utilizou-se o método não-probabilístico de amostragem por conveniência, assim, foram incluídas 58 amostras de líquido pleural procedentes de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC – n= 54) e no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON - n = 4) com suspeita de efusão pleural maligna no período de julho de 2015 a setembro de 2019. Foram realizadas análises dos prontuários dos pacientes incluídos neste estudo, a fim de observar a evolução da doença em cada paciente, assim como, avaliar as conclusões diagnósticas e outras características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo.

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

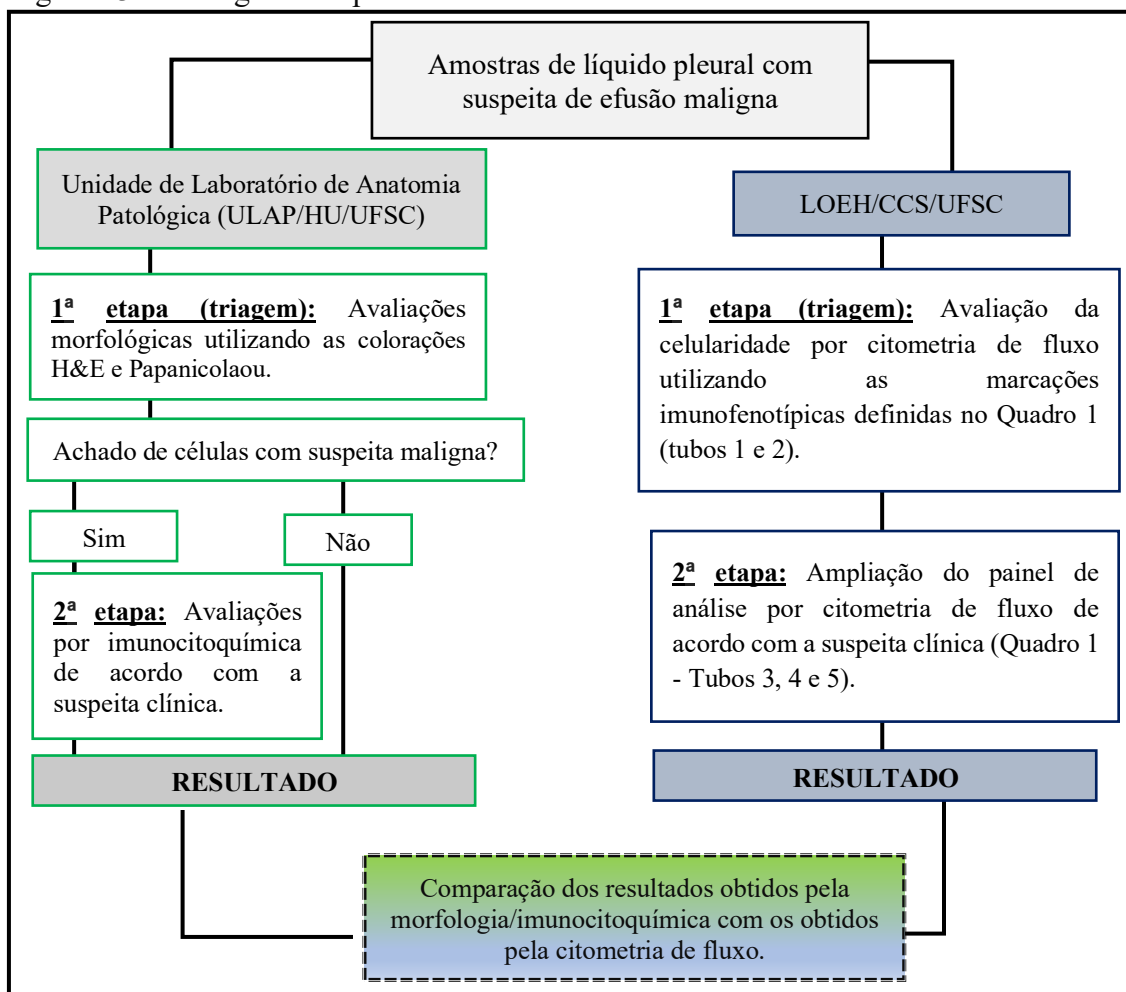
As amostras de líquidos pleurais, logo após toracocentese, foram encaminhadas simultaneamente para o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH-CCS/UFSC) e para a Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica (ULAP/HU/UFSC) para a realização das análises laboratoriais, conforme as metodologias estabelecidas em cada local. Como pode ser observado no fluxograma experimental (Figura 9), em ambos laboratórios, a primeira etapa desse estudo consistiu na análise da celularidade presente nas amostras recebidas, e então na definição de quais amostras estavam aptas para seguir para as etapas seguintes.

Nessa etapa de triagem, além de se observar a celularidade da amostra, no ULAP/HU/UFSC também foi definida a presença ou a ausência de células malignas pela análise da morfologia em amostra corada por hematoxilina e eosina (H&E) e Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942). Caso fosse confirmada a presença dessas células ou houvesse dúvidas com relação a morfologia observada, a amostra era encaminhada para as análises por imunocitoquímica, para definição do diagnóstico. Já no LOEH/CCS/UFSC, além das análises iniciais estabelecerem a quantidade de células viáveis, também foram realizadas as caracterizações fenotípicas das células encontradas pela expressão do marcador anti-CD45, a fim de avaliar a população leucocitária e diferenciá-la das células não hematopoiéticas presentes na amostra. Assim, na etapa seguinte, foi estabelecido o painel de anticorpos a ser realizado, conforme a suspeita clínica (Quadro 6).

Ao fim das análises, os resultados obtidos por cada laboratório foram comparados e as análises estatísticas realizadas para verificar a concordância entre as metodologias.



Figura 13 - Fluxograma experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fluxograma experimental indicando as vias de análise realizadas no estudo para a avaliação dos líquidos pleurais suspeitos de efusão pleural maligna.

#### 4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo 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). Após receberem as devidas informações, os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas no estudo as amostras de efusão pleural procedentes de pacientes de ambos os sexos atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) e no Hospital Universitário da UFSC (HU/UFSC) com suspeita clínica de efusão pleural maligna. Somente foram analisadas as amostras dos pacientes que concordaram assinar o TCLE. Também foram incluídas no estudo apenas as amostras que, após a análise do tubo de triagem por citometria de fluxo (Quadro 6- tubos 1 e 2), apresentaram viabilidade celular superior a 95%. Este estudo considerou o método não-probabilístico de amostragem por conveniência

#### 4.4 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS PRESENTES NOS LÍQUIDOS PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em todas as amostras encaminhadas para o LOEH-CCS/UFSC. Antes das análises imunofenotípicas, como parte da rotina do laboratório, o controle de qualidade foi realizado diariamente pela calibração e compensação do citômetro utilizando-se os 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.

Assim, após a verificação da compensação do citômetro de fluxo, foi iniciado o processamento das amostras recebidas. Estas foram encaminhadas em diferentes recipientes de transporte para o LOEH/CCS/UFSC, cujos frascos variaram de acordo com o volume de líquido coletado, sem adição de conservantes (líquido fresco). Por esse motivo, essas amostras foram processadas logo após seu recebimento, visando garantir maior viabilidade celular. Na maioria dos casos foram recebidas em tubos do tipo *falcon* de 15 mL, nos quais foram centrifugadas por 5 minutos x 2.000 g. Nas situações em que o volume do frasco ultrapassou o limite de 15 ml, o recipiente enviado foi homogeneizado e uma alíquota de 15 mL do líquido foi retirada e centrifugada seguindo os passos descritos anteriormente.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e no tubo original foi separado cerca de 1 mL da amostra. A partir desse tubo (pós-centrifugado), foram retiradas alíquotas de 100 µL da suspensão celular, as quais foram distribuídas em diferentes tubos de análise (próprios para o citômetro de fluxo). Nesses tubos (contendo 100 µL da amostra), foi iniciada a etapa de marcação celular com os anticorpos previamente selecionados com a ULAP/HU/UFSC. Os anticorpos visavam identificar os antígenos expressos por células metastáticas procedentes de tumores sólidos de pulmão, de mama e/ou neoplasias linfoproliferativas em amostras de líquido pleural.

Todos os anticorpos monoclonais utilizados no estudo estavam conjugados a um fluorocromo, como isotiocianato de fluoresceína (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). As especificações dos anticorpos monoclonais em relação ao fluorocromo conjugado, clone, fabricante e volumes utilizados estão descritas no Quadro 8.

Quadro 8 – Descrição dos anticorpos utilizados no estudo.

<b>Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos</b>	<b>Clone</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Fabricante</b>
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	Soln4204	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 – APCH7	A5C3	1 µL	Imuny
CK20 – FITC	A5B4	1 µL	Imuny

Fonte: Elaborado pela autora.

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

O Quadro 9 mostra como foi estabelecida a marcação celular com os anticorpos monoclonais e a respectiva função de cada marcação para a imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Quadro 9 – Distribuição dos tubos de análise dos líquidos pleurais para a imunofenotipagem por citometria de fluxo.

FL ID	FITC	PE	PerC P5.5	PeCy7	APC	APC H7	PB	V500	Objetivo
1	-	-	-	-	-	-	-	-	Tubo controle
2	-	-	7AAD	-	-	-	-	CD45	Viabilidade celular da amostra.
3	CD8/KP <sup>1</sup>	CD56/ LB <sup>2</sup>	CD5	CD19	CD3	CD38	CD20/4	CD45	Caracterização da população leucocitária e detecção de neoplasia linfoproliferativa.
4	Ber-EP4	-	-	-	-	CK7	-	CD45	Detecção de células malignas procedentes de câncer de pulmão.
5	TTF-1	-	-	-	-	CK7	-	CD45	Detecção de células malignas procedentes de câncer de pulmão.
6	CK20	-	-	-	-	CK7	-	CD45	Detecção de células malignas procedentes de câncer de pulmão e mama
7	GCFPD-15	-	-	-	-	CK7	-	CD45	Detecção de células malignas procedentes de câncer de mama

FL: Fluorocromo; ID: identificação dos tubos; <sup>1</sup>KP: *Kappa*; <sup>2</sup>LB: *Lambda*; - : Indica que não foram utilizados anticorpos.

Nos casos em que o paciente não tinha uma suspeita clínica definida (efusão pleural de origem indeterminada), foi procedida a marcação da amostra com todos os tubos descritos no Quadro 4, com exceção do tubo 7, caso o paciente fosse do sexo masculino, pelo fato de este ser realizado para a detecção de células malignas procedentes de câncer de mama.

Após a marcação, a amostra foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término da incubação, foi adicionado 1 mL 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 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de PBS à suspensão celular com lisante, a qual foi centrifugada por 5 minutos x 2.000 g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* foi ressuspenso com 500 µL de PBS e o tubo foi encaminhado para aquisição estabelecida em 50.000 eventos ou mais, não ultrapassando 100.000 eventos (eventos referem-se a células ou restos celulares presentes na amostra).

Como os antígenos reconhecidos pelos anticorpos Ber-EP4, GCFDP-15, 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. Além disso, para otimização antes da marcação da análise das cadeias leves de imunoglobulinas dos linfócitos B (Kappa e Lambda), foram adicionados 10 mL de PBS a cerca de 300 µL da amostra, que foi centrifugada em seguida, por 5 minutos x 2.000 g. Esse procedimento foi repetido três vezes. Depois, foi retirado o sobrenadante e suspenso em 300 µL para, então, ser retirada uma alíquota de 100 µL dessa suspensão para marcação com os anticorpos descritos no Quadro 4 - tubo 3.

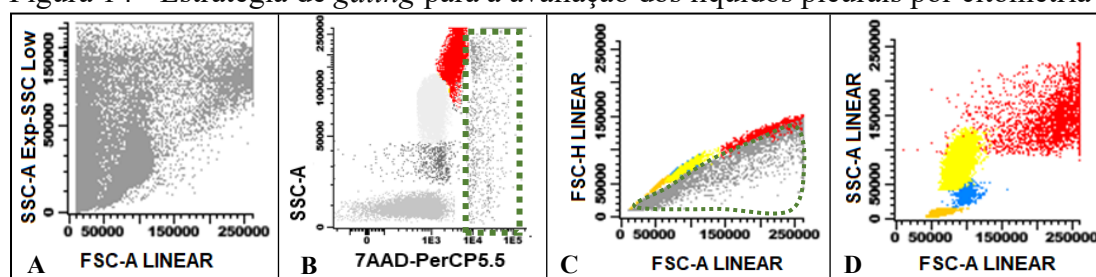
Após a preparação da amostra com a marcação dos anticorpos, foi iniciada a etapa de aquisição e, para isso, foi utilizado o software BD FACSDiva™. Para cada amostra foi realizado um tubo controle, no qual não foram adicionados anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos. Esse controle é importante para que a autofluorescência das células não seja considerada um resultado “falso positivo”. Além disso, também serve para ajustar a quantidade de células da amostra, que não podem ultrapassar o limite de 2.000 eventos/segundo na velocidade “*high*” durante a aquisição no citômetro de fluxo. Nos casos de amostras hipercelulares, estas foram diluídas e, quando estavam hipocelulares, foram centrifugadas e ressuspenso em uma quantidade menor de volume para concentrar o número de células. Esse processo, além de garantir resultados dentro da linearidade do equipamento, também permite a otimização da reação antígeno-anticorpo.

Por fim, para a análise dos dados foi utilizado o software Infinicyt® versão 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha) e a estratégia de análise estabelecida foi realizada conforme descrita a seguir.

#### 4.4.1 Estratégia de análise dos líquidos pleurais por citometria de fluxo

Para a análise e identificação das populações celulares foi utilizada a estratégia de *gates* (janelas de identificação) sequenciais, como mostra a Figura 14. Primeiramente foi avaliada a celularidade para todas as amostras no momento da aquisição do tubo 2, a partir dos parâmetros tamanhos (FSC-A) *versus* complexidade interna (SSC-A) (Figura 10, Painel A). A partir daí, as células inviáveis ou restos celulares que poderiam interferir na seleção das células de interesse foram eliminados das análises.

Figura 14 - Estratégia de *gating* para a avaliação dos líquidos pleurais por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora.

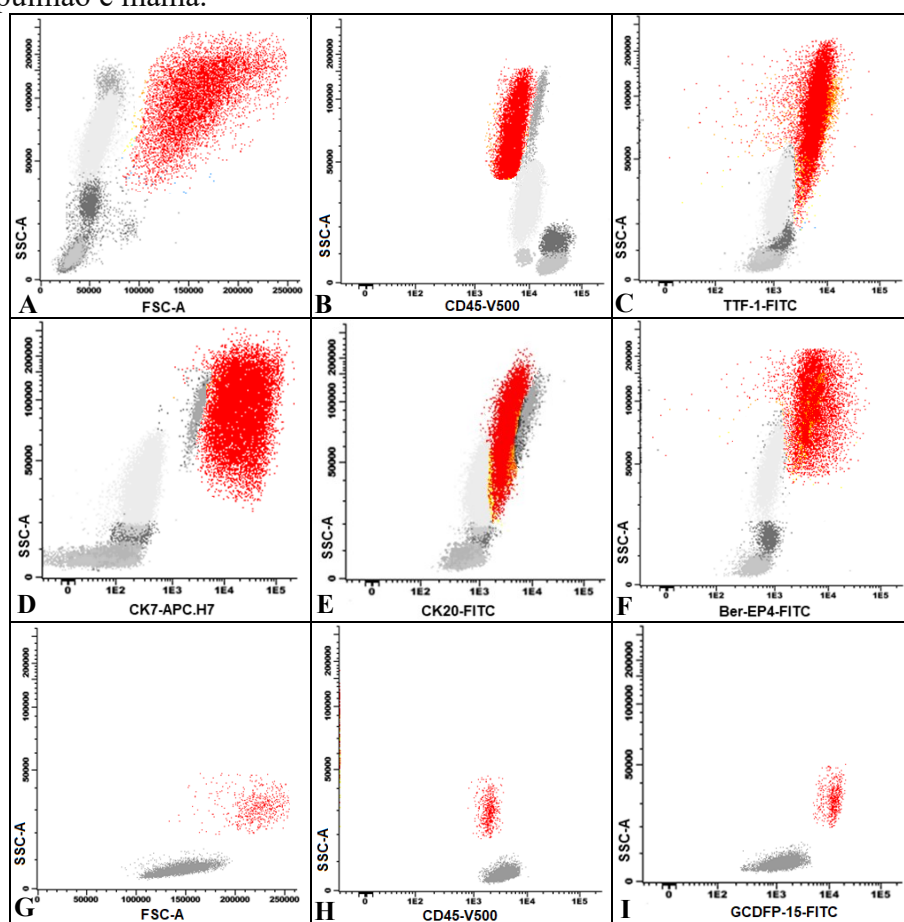
Em vermelho observa-se uma população de células suspeitas para malignidade (Dot plots A, B e C). Enquanto a população leucocitária pode ser observada nas colorações laranja, azul e amarela (Dot plots B e C). (A) Dot plot das subpopulações celulares separadas de acordo com tamanho e granularidade; (B) Dot plot das subpopulações de células viáveis 7AAD (-) e 7AAD não viável (+) selecionadas em pontilhados verde; (C) Doublets, selecionados em pontilhados verde; (D) Dot plot das subpopulações celulares separadas de acordo com tamanho e granularidade.

Para confirmar a viabilidade das amostras analisadas, foi utilizada a marcação com o 7-aminoactinomycin D (7AAD) conjugado com fluorocromo complexo proteína piridina de clorofila (PerCP). Assim, pela expressão de 7AAD foram removidas as células inviáveis conforme mostrado na Figura 3 - Painel B. Em seguida, foram removidos os *doublets* (células agrupadas) após seleção do tamanho celular em relação à altura e à área (FSC-H *versus* FSC-A) (Figura 3, Painel C). Por fim, para essa primeira etapa de análise, as subpopulações celulares foram separadas de acordo com tamanho e granulosidade. Nessa etapa, as células hematológicas foram separadas das células não hematológicas, que poderiam ser as células mesoteliais e/ou possíveis células neoplásicas presentes no líquido pleural. Para isso, foi utilizado o anticorpo anti-CD45, que por ser um marcador pan-leucocitário, permite a separação dos leucócitos das células não-hematológicas.

No passo seguinte da estratégia de análise, foi levado em consideração que células normais ou neoplásicas hematológicas não expressam os marcadores TTF1, CK7, CK20, Ber-EP4 e GCFPD-15, enquanto alguns tipos celulares procedentes de tumores de pulmão e mama expressam esses marcadores. Nesse sentido, conforme a suspeita clínica, observamos a

positividade para os antígenos TTF1, CK7, CK20 e GCFPD-15 nas células suspeitas (Figura 4). Essa estratégia de análise foi definida em estudo prévio (LIRA-REIS, 2015) utilizando células de cultura (A549) com expressão de antígenos conhecida para os anticorpos Ber-EP4, CK7, CK20, TTF-1, enquanto para o anticorpo anti-GCDFP-15 utilizou-se uma amostra de líquido pleural com diagnóstico prévio de células metastáticas de câncer de mama. A Figura 15 mostra a estratégias de *gates* aplicadas para a análise da população de células suspeitas por citometria de fluxo.

Figura 15 – Estratégia de *gating* para as efusões pleurais malignas secundárias a câncer de pulmão e mama.

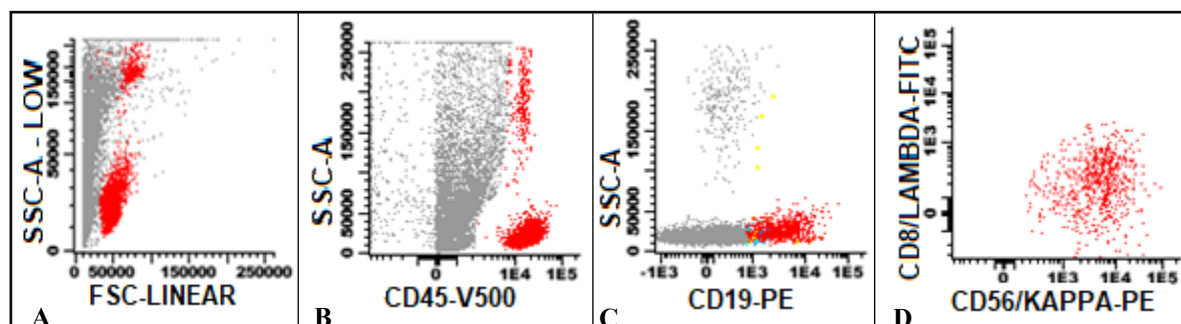


Fonte: Elaborado pela autora.

Em cinza destacam-se os leucócitos (CD45+). (A) Dot plot separadas de acordo com tamanho e granulosidade; (B) Dot plot das células A549 (destacadas em vermelho) negativas para expressão do CD45 conjugado com o FITC; (C) Dot plot das células A549 (destacadas em vermelho) positivas para expressão do TTF-1 em FITC; (D) Dot plot das células A549 positivas para CK7 em APC.H7; (E) Dot plot das células A549 (destacadas em vermelho) negativas para CK20 em FITC; (F) Dot plot das células A549 positivas para Ber-EP4 em FITC; (G) Dot plot das células metastáticas de câncer de mama (destacadas em vermelho) separadas de acordo com tamanho e granulosidade; (H) Dot plot das células metastáticas de câncer de mama (destacadas em vermelho) negativas para expressão do CD45 conjugado com o FITC; (I) Dot plot das células metastáticas de câncer de mama (destacadas em vermelho) positivas para GCDFP-15 em FITC.

Para os casos suspeitos de doença linfoproliferativa, as células linfoides B neoplásicas foram selecionadas por um *gate* nas populações CD45 positivas/CD19 positivas. Posteriormente, a presença de uma população de células B expressando apenas um único tipo de imunoglobulina de cadeia leve Kappa ou Lambda ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ) indicou um processo clonal de células B, sustentando a hipótese de um diagnóstico de linfoma ou mieloma múltiplo, conforme observado na Figura 16.

Figura 16 - Estratégia de *gating* para os EPM suspeitos quanto à doença hematológica.



Fonte: Elaborado pela autora.

*Dot plots* representativos da imunofenotipagem para amostra de líquido pleural demonstrando as células hematopoiéticas neoplásicas. (A) Células de médio a grande tamanho evidenciado pelas características de dispersão de luz (SSC x FSC), colorido em vermelho; (B) Células hematológicas (CD45+); (C) Células B (CD19+); (D) Células B neoplásicas clonais Kappa.

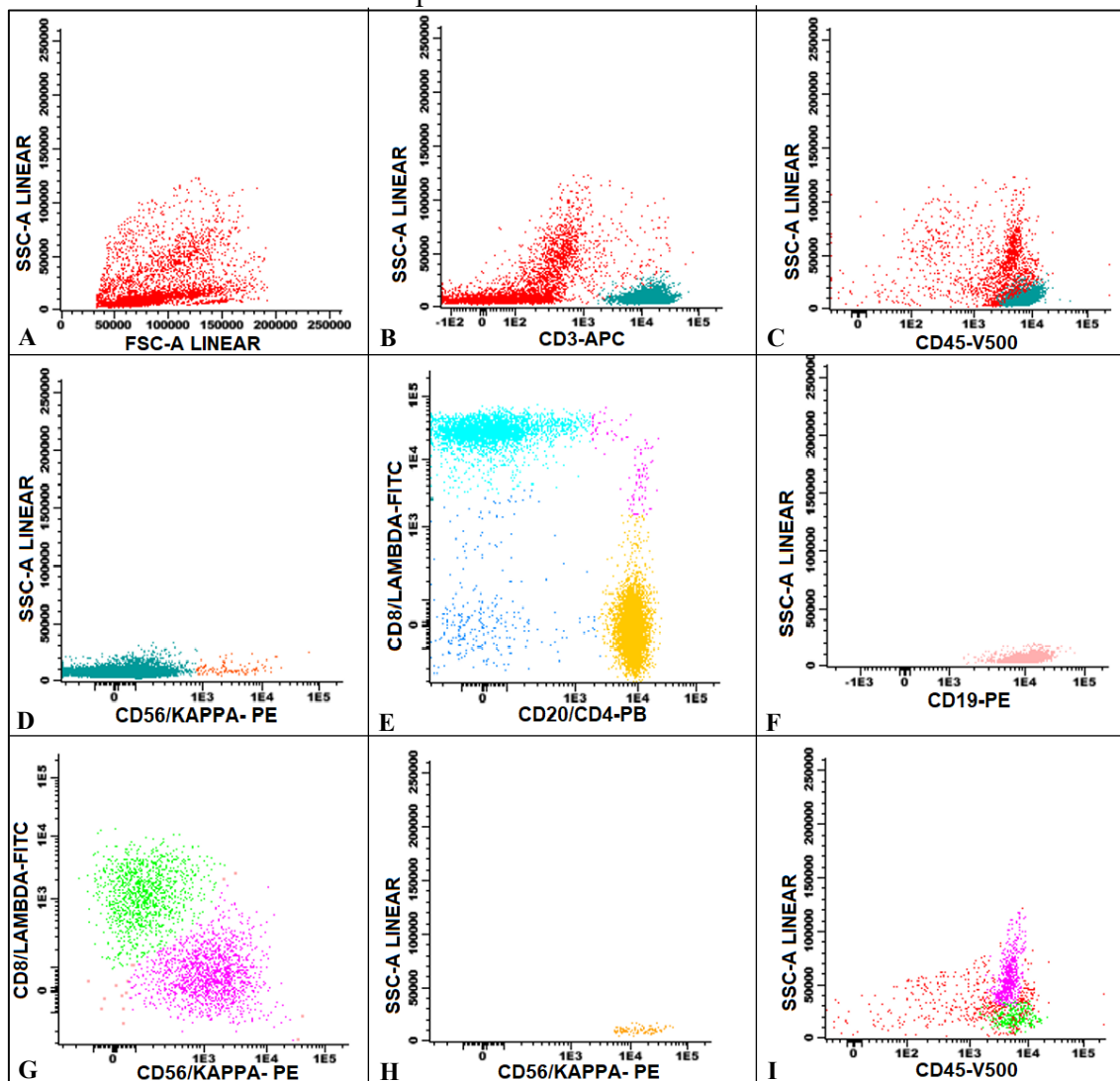
#### 4.4.2 Quantificação das populações leucocitárias por citometria de fluxo das amostras de líquido pleural procedentes de processos malignos ou reacionais

Os anticorpos utilizados no estudo para a detecção de células neoplásicas procedentes de neoplasias linfoproliferativas, além de permitirem identificar células neoplásicas de origem hematológica, também permitiram a determinação dos valores relativos dos linfócitos T, linfócitos B, células NK e NKT das amostras analisadas.

Assim, para essa etapa também foram utilizadas as estratégias de *gates* avaliando a expressão positiva do marcador CD45 em conjunto com os marcadores CD3+ para identificação dos linfócitos T e de suas subpopulações T auxiliar pela expressão CD4+, T citotóxico pela expressão CD8+, T  $\gamma\delta$  pela expressão CD3+/CD4-/CD8- e T  $\alpha\beta$  pela expressão CD3+/CD4+/CD8+. Para os linfócitos B, foi considerada a expressão CD19+, já para as células NK, a expressão CD56+/CD3-, enquanto as células NKT foram avaliadas pela expressão CD56+/CD3+. A Figura 17 ilustra a estratégia de análise utilizada para a identificação dessas populações celulares por citometria de fluxo.



Figura 17 – *Dot plots* representativos da imunofenotipagem da amostra de líquido pleural demonstrando as células hematopoiéticas.



Fonte: LIRA-REIS (2015)

(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).

#### 4.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS PRESENTES NOS LÍQUIDOS PLEURAIIS

As amostras foram encaminhadas para a ULAP/HU/UFSC em frascos de transporte sem conservantes (líquido fresco). Nos casos em que o processamento da amostra não ocorreu logo após a punção, foi adicionado um volume de álcool 95% proporcional ao volume da amostra (50/50) para a conservação do líquido, até que fosse iniciado seu processamento. Na maioria

dos casos, as amostras de líquido pleural foram recebidas em tubos do tipo *falcon* de 15 mL, no qual foram realizadas as análises macroscópicas de cor e aspecto. Nas situações em que o volume do frasco ultrapassou o limite de 15 ml, o recipiente enviado foi homogeneizado e uma alíquota de 15 mL do líquido foi retirada para as devidas análises. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 15 minutos x 1.500 g, e o sobrenadante foi transferido para outro frasco (o sobrenadante foi armazenado na geladeira durante sete dias para, se necessário, repetir o processamento). Com o *pellet* foram realizados três esfregaços em lâmina previamente preparada com albumina, para não houvesse perda celular durante as etapas de coloração. Essas lâminas foram coradas seguindo a técnica de *Papanicolaou* (PAPANICOLAOU, 1942). Com o restante do *pellet* foi confeccionado um “*cellblock*”, que após o processamento foi corado por hematoxilina e eosina (H&E). Na rotina laboratorial, o “*cellblock*” é um método complementar ao citocentrifugado no preparo de amostras. O método consiste em acondicionar, em um papel filtro, o precipitado remanescente do citocentrifugado. Essa amostra acondicionada em papel filtro foi armazenada em um pequeno recipiente denominado cassete, que são pequenas peças rotineiramente utilizadas no processamento de amostras em laboratórios de anatomia patológica. Esses pequenos recipientes são fabricados em polioximetileno, e são totalmente resistentes à ação química de solventes, mantendo os espécimes seguramente submersos nos líquidos utilizados durante os procedimentos de rotina patológica (fixação, desidratação, clarificação e inclusão em parafina).

Assim, no processamento das amostras na ULAP/HU/UFSC para a etapa de fixação, desidratação e clarificação, foi utilizado o processador automático de tecidos Lupetec Modelo PT09 TS. As amostras do estudo foram processadas com as demais amostras da rotina do setor, onde foram realizados múltiplos banhos em formol, álcool, xilol e parafina, em um procedimento com duração total de 12 horas (processo “*overnight*”). No dia seguinte, após os banhos de preparação, foi realizada a inclusão da amostra em parafina utilizando uma central inclusora Lupetec CI 2014. Essa etapa permite a obtenção de um bloco facilmente manejável, no qual a amostra está envolvida em um meio (parafina) que lhe confere um suporte necessário para a obtenção de cortes citológicos com 2 µm de espessura utilizando o micrótomo Leica Biosystems RM2245. Após os cortes, a fita de parafina contendo a amostra foi impregnada em lâmina de vidro, encaminhada para estufa com variação de temperatura de 55°C-60°C para possibilitar a retirada da parafina (desparafinização) sem danificar a amostra, e assim ser iniciado o processo de coloração.

Ao término de todo o processamento, para cada amostra de líquido pleural recebida na ULAP/HU/UFSC foram confeccionadas quatro lâminas, das quais três foram coradas em *Papanicolaou* e uma, obtida pelo “*cellblock*”, foi corada em H&E.

#### **4.5.1 Análises imunocitoquímicas das células presentes nos líquidos pleurais**

Nos casos em que apenas os critérios morfológicos não foram suficientes para definir malignidade, as amostras foram encaminhadas para avaliação imunofenotípica por imunocitoquímica. Assim, a avaliação da expressão dos marcadores imunofenotípicos dos carcinomas de pulmão, mama e linfoma foi realizada pelo método estreptoavidina-biotina-peroxidase. Para tal avaliação foi utilizada a plataforma de imunocoloração automatizada VENTANA BenchMark ULTRA, seguindo-se estritamente o protocolo do fabricante, acompanhado do kit de detecção VENTANA OptiView DAB IHC.

As amostras utilizadas para essa etapa foram obtidas dos “*cellblocks*”, confeccionados conforme descrito na etapa anterior. A partir dos *cellblocks* foram obtidos cortes de 3 µm de espessura da amostra, as quais foram impregnadas em lâminas de silano próprias para a utilização do aparelho de imunocitoquímica. Essas lâminas foram silanizadas para evitar a perda do material durante o processo de marcação com os anticorpos, e previamente preparadas com controles próprios do setor.

Para essa etapa foram utilizados os anticorpos anti-CK7, anti-CK20, anti-TTF-1, anti-Ber-EP4, anti-GCDFP-15, anti-Kappa, anti-Lambda e anti-CD20. Em algumas situações, para a determinação do subtipo tumoral, houve ampliação do painel dos anticorpos utilizados. Porém, em virtude do objetivo do estudo ser a comparação dos resultados obtidos entre as metodologias (citometria de fluxo e imunocitoquímica), essa ampliação não foi considerada e, portanto, esses anticorpos não foram incluídos no estudo.

O Quadro 10 mostra os anticorpos primários usados na imunocitoquímica e suas especificações.

Quadro 10 - Anticorpos primários usados na imunocitoquímica e seus respectivos fabricantes, clones, diluições e controle.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle</b>
Ep-CAM	DAKO	Ber-EP4	1:200	Epitélio
CK7	DAKO	Clone OV-TL 12/30	1:100	Carcinoma pulmonar
CK20	DAKO	Clone K20.8	1:50	Carcinoma gástrico
TTF-1	DAKO	SPT24	1:200	Carcinoma pulmonar
GCDFP-15	DAKO	ZM23	1:100	Mama
KAPPA	DAKO	NaM76-5F3	1:50	Medula óssea
LAMBDA	DAKO	N10/2	1:100	Medula óssea
CD20	DAKO	2H7	1:100	Medula óssea

Fonte: Elaborado pela autora.

A interpretação dos resultados foi realizada pelos patologistas da ULAP/HU/UFSC de acordo com a expressão dos marcadores.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade das variáveis quantitativas foi realizada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar os três grupos (EPR, EPM, EPP) quanto a idade e populações leucocitárias. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar os grupos aos pares e determinar entre quais grupos ocorreu a diferença. Para a avaliação de concordância entre os resultados obtidos das metodologias (citometria de fluxo e imunocitoquímica/morfologia) foi utilizado o teste Kappa e adotaram-se como referência os valores determinados por Altman (1991). Desta forma, foi atribuída concordância pobre para valores de Kappa entre 0,00-0,20, concordância razoável a valores entre 0,21 a 0,40, concordância moderada a valores entre 0,41-0,60, concordância boa a valores 0,61- 0,80 e excelente concordância a valores entre 0,81-1,00.. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e intervalos de confiança de 95%. As análises dos dados foram efetuadas utilizando o *software* SPSS, versão 2.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Neste estudo, foram avaliadas 58 amostras de pacientes com suspeita de efusão pleural maligna. Destas, 53,4 % eram procedentes de pacientes do sexo feminino (n = 31), e 46,6% do sexo masculino (n = 27). A Tabela 3 mostra uma análise descritiva referente à idade desses pacientes.

Tabela 3- Distribuição dos pacientes com suspeita de EPM de acordo com a idade.

<b>Parâmetro</b>	<b>Idade (anos)</b>
Média	57,2
Mediana	58,5
Desvio Padrão	14,9
n	58

A média de idade dos pacientes foi de 57,2 anos, com mínima de 15 anos e máxima de 84 anos. Além disso, a distribuição da frequência relativa das variáveis qualitativas (óbito, gênero, pacientes com diagnóstico prévio de câncer e tipos de câncer diagnosticados) foi caracterizada (Tabela 4). Como demonstrado na Tabela 4, do total de pacientes participantes deste estudo, 62,1% tiveram o diagnóstico de câncer confirmado (n=36). Destes, 13,9% foram diagnosticados com câncer de pulmão (n = 5); 8,3% com câncer de mama (n = 3); e 47,2% com neoplasia maligna hematológica (n=17), dentre estas linfoma (n= 13) e mieloma múltiplo (n=4).

Tabela 4 - Distribuição das frequências das variáveis qualitativas.

<b>Variáveis</b>	<b>(n)</b>	<b>%</b>	
Mortalidade	Óbito	24	41,4%
	Vivos	34	58,6%
Gênero	Feminino	27	46,6%
	Masculino	31	53,4%
Diagnóstico de câncer	Sim	36	62,1%
	Não	22	37,9%
Tipo de Câncer	Pulmão	5	13,9%
	Mama	3	8,3%
	Linfoproliferativa	17	47,2%
	Outros	11	30,6%

Fonte: Elaborado pela autora.

Do total de pacientes incluídos neste estudo, n=11 (30,6%) tinham diagnóstico prévio de câncer de pele (n = 1), câncer no mediastino (n = 1), câncer no intestino (n = 3), câncer no cérebro (n = 2), câncer no testículo (n=2) e câncer no estômago (n = 2). Visto que a seleção dos anticorpos para este estudo foi feita considerando as neoplasias que afetam com mais frequência a cavidade pleural, quais sejam, as neoplasias metastáticas de pulmão, de mama e as neoplasias linfoproliferativas, os tipos de câncer desses pacientes foram classificados como “outros”.

Os demais participantes (n = 22) tinham suspeita de efusão pleural de origem indeterminada, por não possuírem histórico de diagnóstico prévio de câncer. No decorrer deste estudo, foram registrados 24 óbitos.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDOS PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Esta etapa do estudo consistiu em avaliar a presença de células neoplásicas nos líquidos pleurais por imunofenotipagem por citometria de fluxo e comparar com a análise morfológica e/ou imunocitoquímica, consideradas metodologias padrão ouro, como representado pelas Figuras 18 e 19.

Como visto, dos 58 líquidos pleurais analisados, 36 tinham diagnóstico prévio de câncer, dos quais foram considerados para as análises subsequentemente apenas os indivíduos portadores de câncer de pulmão ([n=5] - avaliados pela expressão dos marcadores Ber-EP4, TTF-1, CK7 e CK20), neoplasia linfoproliferativa ([n=17] – avaliados pela expressão clonal dos marcadores *Kappa* e *Lambda*) e câncer de mama ([n=3] – avaliados pela expressão dos marcadores CK7,CK20 e GCDFP-15). Nesses casos, foram realizadas análises por citometria de fluxo e imunocitoquímica, e os resultados obtidos por ambas as metodologias foram organizados de acordo com a expressão dos marcadores, como mostra o Quadro 11.

Quadro 11 - Comparação das análises dos marcadores por imunocitoquímica e por citometria de fluxo nas amostras de líquido pleural procedentes de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão, mama e neoplasia linfoproliferativa.

		Negativo (ICQ)	Positivo (ICQ)	TOTAL
Ber-EP4	Negativo (CF)	3	1	4
	Positivo (CF)	1	0	1
TOTAL		4	1	5
TTF-1	Negativo (CF)	3	1	4
	Positivo (CF)	0	1	1
TOTAL		3	2	5
CK20	Negativo (CF)	7	0	7
	Positivo (CF)	1	0	1
TOTAL		8	0	8
CK7	Negativo (CF)	3	1	4
	Positivo (CF)	0	4	4
TOTAL		3	5	8
GCFPD-15	Negativo (CF)	3	0	3
	Positivo (CF)	0	0	0
TOTAL		3	0	3
<i>Kappa</i>	Negativo (CF)	13	0	13
	Positivo (CF)	0	4	4
TOTAL		13	4	17
<i>Lambda</i>	Negativo (CF)	14	0	14
	Positivo (CF)	1	2	3
TOTAL		15	2	17

Fonte: Elaborado pela autora.

Os marcadores Ber-EP4 e TTF-1 foram utilizados exclusivamente para a detecção de células malignas procedentes do pulmão, enquanto os marcadores C7 e CK20 foram aplicados tanto para o diagnóstico de câncer de pulmão quanto para mama. Assim, três amostras foram diagnosticadas com EPM secundárias a câncer de pulmão após as análises morfológicas, associadas a expressão fenotípica expressarem fenótipo TTF-1(+), Ber-EP4 (+), CK7(+), sendo que em um caso não foram observadas células positivas para o TTF-1, no entanto a expressão dos outros marcadores associados a morfologia confirmaram a malignidade. Não foram

diagnosticadas nenhuma EPM secundária a câncer de mama quando avaliadas pelo painel proposto neste estudo. Enquanto das 17 amostras procedentes de indivíduos com diagnóstico de neoplasia hematológica, a monoclonalidade do marcador *Kappa* ou do marcador *Lambda*, confirmou a neoplasia hematológica em seis pacientes.

A partir dos resultados demonstrados no Quadro 8 foi possível estimar, para cada marcador, o grau de concordância entre as metodologias utilizando o Teste *Kappa*, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Graus de concordância entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e imunocitoquímica.

Marcador	Valor de Kappa	Concordância*
Ber-EP4	0,250	Razoável
TTF-1	0,545	Moderada
CK7	0,750	Boa
<i>Kappa</i>	1,000	Excelente
<i>Lambda</i>	0,767	Boa

\*Valores de p para teste Kappa.

\*Referência aos valores determinados por Altman (1991).

Como demonstrado na Tabela 5, a comparação dos resultados obtidos pela citometria de fluxo e pela imunocitoquímica mostra que os marcadores *Lambda* e *Kappa* apresentaram uma concordância boa e excelente, respectivamente, quando avaliados para neoplasias hematológicas. Por sua vez, os marcadores CK7 e TTF-1 apresentaram resultados de concordância melhores quando comparados ao marcador Ber-EP4 para as efusões pleurais secundárias a câncer de pulmão. No entanto, a análise da concordância *Kappa* para os marcadores GCDFP-15 e CK20 foi inviabilizada, em virtude do número insuficiente de casos com expressão positiva para esses marcadores celulares.

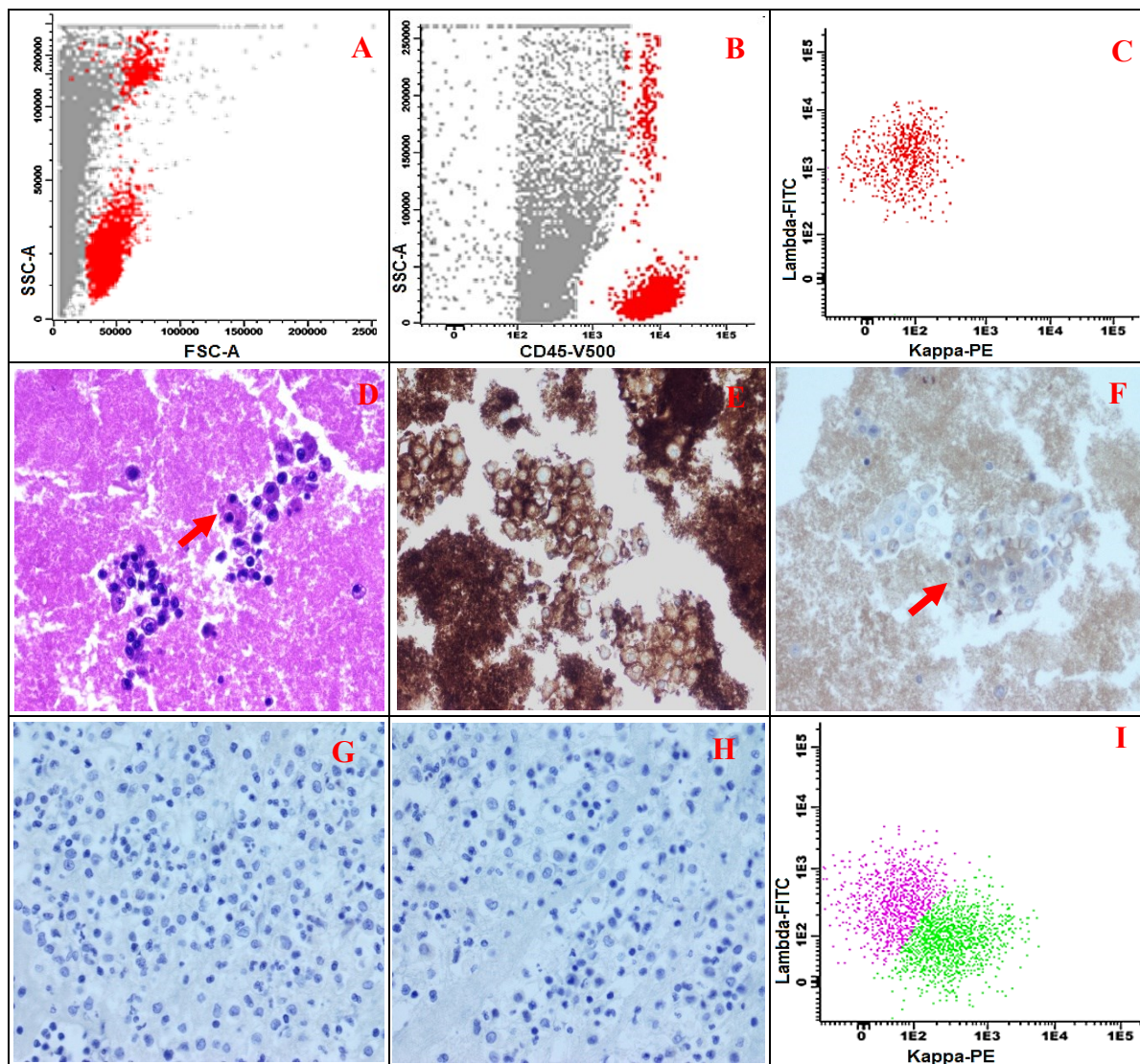
Das 33 amostras remanescentes, em 22 casos procedentes de pacientes sem diagnóstico prévio de câncer, foi observada a expressão de TTF-1 (n=3), Ber-EP4 (n=2) e CK7 (n=5), por citometria de fluxo. Apesar do perfil fenotípico indicar uma possível malignidade, as análises morfológicas não mostraram evidências de células malignas e, portanto, esses casos foram concluídos como benignos (reacionais). Em um caso procedente de um paciente diagnosticado com mieloma múltiplo, as análises morfológicas não indicaram a presença de células neoplásicas na amostra analisada, no entanto, foram detectadas células plasmocitárias monoclonais por citometria de fluxo.

Em 11 amostras de pacientes com diagnóstico prévio de câncer, as análises morfológicas não detectaram a presença de células neoplásicas, e a comparação com as análises por



citometria de fluxo foi limitada visto que os marcadores utilizados não eram aplicáveis para a caracterização das neoplasias primárias dos pacientes avaliados.

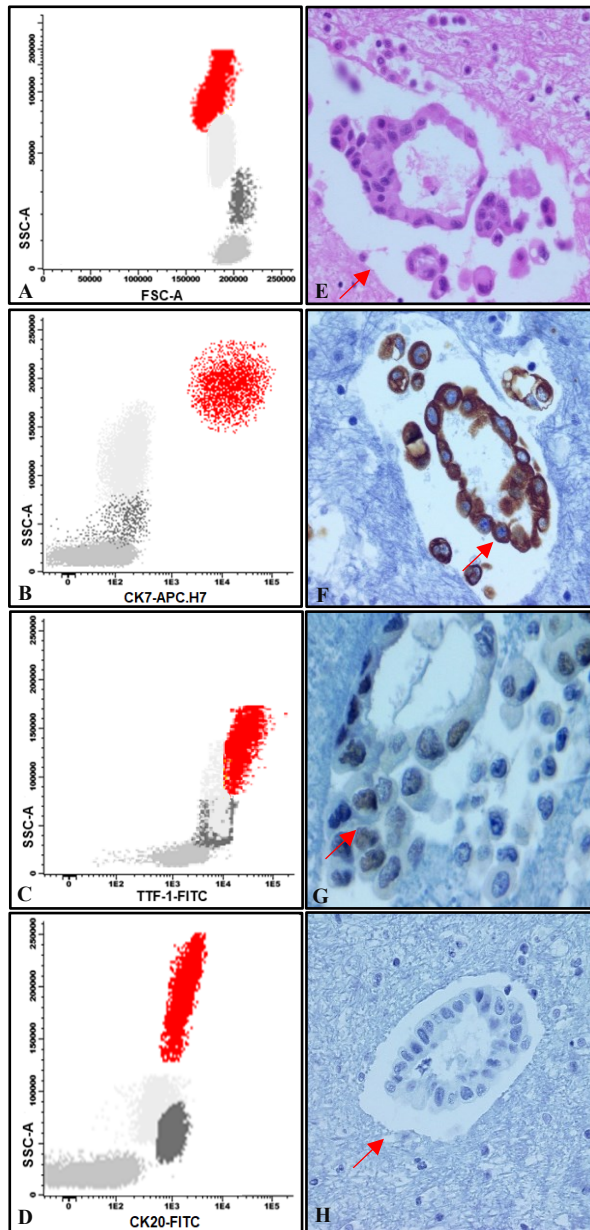
Figura 18 – Análise de uma mostra de efusão pleural com infiltração de células plasmocíticas procedente de um paciente do estudo diagnosticado com mieloma múltiplo, avaliado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Painéis A – C: confirmado por análises morfológicas e por imunocitoquímica (painéis de D – F), e análise de um processo reacional benigno de um paciente do estudo evidenciando policlonalidade Kappa em Lambda. (A) *Dot plot* das células neoplásicas de mieloma múltiplo (destacadas em vermelho) separadas de acordo com tamanho e granulidade analisado por citometria de fluxo; (B) *Dot plot* das células neoplásicas de mieloma múltiplo (destacadas em vermelho) positivas para CD45 em V500 analisadas por citometria de fluxo; (C) *Dot plot* das células neoplásicas (destacadas em vermelho) monoclonais para *lambda*; (D) Análises morfológicas das células plasmocíticas coradas em H&E em 40X; (E) Células com expressão monoclonal para *lambda* em 40X analisadas por imunocitoquímica; (F) Células com expressão negativa para *Kappa* em 40X; (G) Expressão celular marcador *Kappa* em processo reacional analisado por imunocitoquímica em 40X; (H) Expressão celular marcador *Lambda* em processo reacional analisado por imunocitoquímica em 40X; (I) Análise por citometria de fluxo de um processo reacional benigno evidenciando expressão policlonal dos marcadores *Kappa* e *Lambda*.

Figura 19 – Amostra de efusão pleural maligna procedente de um participante do estudo diagnosticado com câncer de pulmão metastático, avaliado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Painéis A – D: e confirmado por análises morfológicas e por imunocitoquímica (painéis de E – H). (A) *Dot plot* das células metastáticas de pulmão (destacadas em vermelho; células leucocitárias em cinza) separadas de acordo com tamanho e granulosidade; (B) *Dot plot* das células metastáticas de pulmão (destacadas em vermelho; células leucocitárias em cinza) positivas para CK7 em APC.H7; (C) *Dot plot* das células metastáticas de pulmão (destacadas em vermelho; células leucocitárias em cinza) positivas para TTF-1 em FITC; (D) *Dot plot* das células metastáticas de pulmão (destacadas em vermelho; células leucocitárias em cinza) negativas para CK20 em FITC; (E) Análises morfológicas em 40X; (F) Células com expressão positiva para CK7 em 40X; (G) Células com expressão nuclear positiva para TTF-1 em 60X; e (H) Células com expressão negativa para CK20 em 40X.

### 5.3 CLASSIFICAÇÃO DOS LÍQUIDOS PLEURAIIS DE ACORDO COM AS ANÁLISES MORFOLÓGICAS E IMUNOFENOTÍPICAS POR ICQ E CF

A partir dos resultados obtidos pela análise morfológica, imunocitoquímica e pela citometria de fluxo, foi definido que as amostras de efusão pleural seriam consideradas malignas (EPM) quando detectada a presença de células neoplásicas no líquido analisado por qualquer uma das metodologias aplicadas, e paramaligna (EPP) se o paciente tivesse o diagnóstico de câncer, mas não houvesse células neoplásicas no líquido analisado por meio das metodologias aplicadas. Nos casos em que a causa da efusão pleural era de origem indeterminada, mas o acompanhamento mostrou resolução da efusão sem novo acúmulo e sem a detecção subsequente de câncer primário, a etiologia foi considerada benigna ou reacional (EPR).

Inicialmente, verificou-se a caracterização dessa amostragem comparando os grupos citados acima, com relação à idade. Como mostra a Tabela 6, não existiu diferença significativa entre os grupos em relação à idade.

Tabela 6 – Distribuição dos grupos EPP, EPM e EPR com relação à idade.

Idade	EPP	EPM	EPR
Média	55,8	58,5	58,2
Mediana	56	65	59
Desvio Padrão	12,6	15,0	17,7
N	26	10	22
IC	4,9	9,3	7,4
P-valor	0,829		

EPP: Efusão pleural paramaligna; EPM:Efusão pleural maligna; EPR: Efusão pleural reacional.

Prosseguindo com a comparação entre os três grupos, foi realizada uma análise quanto à distribuição do gênero (ver Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição dos grupos EPP, EPM e EPR de acordo com o gênero.

	EPP		EPM		EPR		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Feminino	11	42,3%	5	50,0%	11	50,0%	27	46,6%	
Masculino	15	57,7%	5	50,0%	11	50,0%	31	53,4%	
Total	26	44,8%	10	17,2%	22	37,9%	58	100%	
								p-valor = 0,843	

EPP: Efusão pleural paramaligna; EPM:Efusão pleural maligna; EPR: Efusão pleural reacional.

A Tabela 7 mostra a distribuição conjunta das variáveis para valores absolutos e seus percentuais. Assim, foi observado que não houve diferença significativa entre os três grupos quando distribuídos em relação ao gênero.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDOS PLEURAIIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ao contrário da microscopia de luz, que não permite diferenciar subpopulações linfocitárias, a citometria de fluxo permite uma ampla análise das células do sistema imunológico por meio de anticorpos conjugados a fluorocromos, 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 tanto em processos reacionais quanto em processos malignos (LAINA, *et al.* 2012).

Assim, a etapa final deste estudo, consistiu em determinar os valores relativos dos linfócitos T (CD3+) e das 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+) presentes nas amostras de efusão pleural coletadas para este estudo (Tabelas 8, 9 e 10). Para isso, as amostras foram agrupadas de acordo com o diagnóstico do tumor primário e de acordo com a classificação das efusões (EPP, EPM e EPR). Visto que as neoplasias hematológicas presentes no estudo (linfoma e mieloma) afetam diretamente a produção de células leucocitárias, considerou-se que poderiam existir diferenças entre as quantidades celulares dos pacientes com história de neoplasia linfoproliferativa e pacientes com diagnóstico de tumor sólido (no caso deste estudo, pulmão, mama e outros não hematológicos). Assim, foi realizada uma análise entre esses dois grupos, conforme pode ser observado na Tabela 8.



Tabela 8 - Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes diagnosticados com neoplasia linfoproliferativa e neoplasia não hematológica (mama, pulmão e outras).

Tipo celular	Tipo de neoplasia	Média	Mediana	Desvio Padrão	Min	Max	N	P-valor
LINFÓCITOS TOTAIS	Linfoproliferativa	52,07%	66,01%	38,10%	2,97%	97,40%	17	0,833
	Não-hematológica	52,49%	56,83%	27,26%	2,83%	91,40%	19	
LINFÓCITOS T	Linfoproliferativa	46,17%	58,01%	35,15%	0,35%	87,20%	17	0,874
	Não-hematológica	45,37%	51,14%	23,70%	2,61%	71,23%	19	
LINFÓCITOS T CD8+	Linfoproliferativa	14,90%	12,17%	14,93%	0,15%	43,58%	17	0,958
	Não-hematológica	13,23%	13,16%	11,24%	0,00%	37,51%	19	
LINFÓCITOS T CD4+	Linfoproliferativa	30,31%	30,67%	25,94%	0,15%	67,30%	17	0,916
	Não-hematológica	28,48%	31,47%	18,83%	2,25%	61,34%	19	
LINFÓCITOS CD4+/CD8+	Linfoproliferativa	0,38%	0,01%	0,68%	0,00%	2,00%	17	0,149
	Não-hematológica	0,59%	0,30%	0,73%	0,00%	2,58%	19	
LINFÓCITOS CD4-/CD8-	Linfoproliferativa	0,58%	0,40%	0,55%	0,00%	1,71%	17	0,178
	Não-hematológica	3,07%	0,80%	7,78%	0,00%	31,80%	19	
LINFÓCITOS B	Linfoproliferativa	5,90%	3,23%	6,99%	0,00%	21,90%	17	0,833
	Não-hematológica	7,12%	2,89%	11,46%	0,00%	45,23%	19	
CÉLULAS NK	Linfoproliferativa	2,05%	0,71%	2,49%	0,00%	7,45%	17	0,245
	Não-hematológica	3,26%	2,06%	3,45%	0,00%	11,10%	19	
CÉLULAS NKT	Linfoproliferativa	1,61%	0,85%	2,88%	0,07%	9,73%	17	0,316
	Não-hematológica	3,46%	1,97%	4,35%	0,00%	16,74%	19	
MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS	Linfoproliferativa	7,73%	1,60%	12,90%	0,00%	36,61%	17	0,355
	Não-hematológica	5,64%	5,10%	3,95%	0,00%	11,60%	19	
NEUTRÓFILOS	Linfoproliferativa	28,73%	11,13%	36,74%	0,70%	90,28%	17	0,792
	Não-hematológica	20,51%	14,78%	22,00%	0,00%	68,16%	19	
EOSINÓFILOS	Linfoproliferativa	0,84%	0,00%	1,53%	0,00%	4,63%	17	0,857
	Não-hematológica	1,23%	0,00%	3,22%	0,00%	13,06%	19	
BASÓFILOS	Linfoproliferativa	0,72%	0,00%	1,45%	0,00%	3,74%	17	0,813
	Não-hematológica	0,74%	0,00%	1,98%	0,00%	6,91%	19	
PLASMÓCITOS	Linfoproliferativa	0,32%	0,05%	0,48%	0,00%	1,13%	17	0,192
	Não-hematológica	0,47%	0,00%	1,74%	0,00%	7,00%	19	

Tabela 9 - Comparação da subpopulação leucocitária presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes com EPP/EPM e EPR.

Tipo celular	Classificação	Média	Mediana	Desvio Padrão	Min	Max	N	P-valor
LINFÓCITOS TOTAIS	EPP/EPM	52,05%	53,85%	26,81%	2,83%	91,40%	19	0,666
	EPR	50,45%	47,81%	29,26%	0,27%	92,73%	22	
LINFÓCITOS T	EPP/EPM	44,64%	48,96%	23,36%	2,61%	71,23%	19	0,724
	EPR	42,56%	40,08%	29,80%	0,00%	88,79%	22	
LINFÓCITOS T CD8+	EPP/EPM	13,08%	12,23%	10,33%	0,00%	37,51%	19	0,314
	EPR	11,28%	9,18%	13,68%	0,00%	66,33%	22	
LINFÓCITOS T CD4+	EPP/EPM	28,35%	30,37%	19,40%	2,25%	61,34%	19	0,896
	EPR	28,45%	23,92%	22,75%	0,00%	73,09%	22	
LINFÓCITOS CD4+/CD8+	EPP/EPM	0,55%	0,33%	0,67%	0,00%	2,58%	19	0,273
	EPR	0,41%	0,12%	0,56%	0,00%	1,99%	22	
LINFÓCITOS CD4-/CD8-	EPP/EPM	2,65%	0,63%	7,17%	0,00%	31,80%	19	0,896
	EPR	2,42%	0,89%	6,66%	0,00%	31,80%	22	
LINFÓCITOS B	EPP/EPM	7,42%	3,64%	10,85%	0,00%	45,23%	19	0,839
	EPR	7,02%	2,79%	10,79%	0,00%	45,06%	22	
CÉLULAS NK	EPP/EPM	3,49%	2,62%	3,49%	0,00%	11,10%	19	0,635
	EPR	5,94%	3,53%	9,65%	0,00%	45,00%	22	
CÉLULAS NKT	EPP/EPM	2,96%	1,29%	4,15%	0,00%	16,74%	19	1,000
	EPR	3,90%	1,16%	6,41%	0,00%	22,23%	22	
MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS	EPP/EPM	6,28%	5,46%	4,86%	0,00%	19,57%	19	0,824
	EPR	10,55%	5,32%	12,97%	0,00%	41,51%	22	
NEUTRÓFILOS	EPP/EPM	20,60%	17,20%	20,76%	0,00%	68,16%	19	0,581
	EPR	21,23%	8,99%	28,99%	0,00%	93,44%	22	
EOSINÓFILOS	EPP/EPM	1,60%	0,00%	3,71%	0,00%	13,06%	19	0,734
	EPR	0,94%	0,00%	2,10%	0,00%	8,06%	22	
BASÓFILOS	EPP/EPM	0,78%	0,00%	1,85%	0,00%	6,91%	19	0,603
	EPR	0,18%	0,00%	0,39%	0,00%	1,24%	22	
PLASMÓCITOS	EPP/EPM	0,42%	0,00%	1,60%	0,00%	7,00%	19	0,677
	EPR	0,10%	0,00%	0,38%	0,00%	1,76%	22	

EPP: Efusão pleural paramaligna; EPM:Efusão pleural maligna; EPR: Efusão pleural reacional.

Tabela 10 - Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes com EPP e EPM.

Tipo celular	Classificação	Média	Mediana	Desvio Padrão	Min	Max	N	P-valor
LINFÓCITOS TOTAIS	EPP	52,49%	56,83%	27,26%	2,83%	91,40%	16	0,576
	EPM	49,74%	49,85%	29,73%	19,95%	79,41%	3	
LINFÓCITOS T	EPP	45,37%	51,14%	23,70%	2,61%	71,23%	16	0,823
	EPM	40,73%	32,87%	25,92%	19,64%	69,67%	3	
LINFÓCITOS T CD8+	EPP	13,23%	13,16%	11,24%	0,00%	37,51%	16	1,000
	EPM	12,28%	12,22%	3,45%	8,86%	15,75%	3	
LINFÓCITOS T CD4+	EPP	28,48%	31,47%	18,83%	2,25%	61,34%	16	1,000
	EPM	27,64%	23,18%	26,98%	3,16%	56,57%	3	
LINFÓCITOS CD4+/CD8+	EPP	0,59%	0,30%	0,73%	0,00%	2,58%	16	0,538
	EPM	0,38%	0,42%	0,07%	0,30%	0,43%	3	
LINFÓCITOS CD4-/CD8-	EPP	3,07%	0,80%	7,78%	0,00%	31,80%	16	0,314
	EPM	0,43%	0,40%	0,14%	0,31%	0,59%	3	
LINFÓCITOS B	EPP	7,12%	2,89%	11,46%	0,00%	45,23%	16	0,576
	EPM	9,01%	9,74%	8,36%	0,31%	16,98%	3	
CÉLULAS NK	EPP	3,26%	2,06%	3,45%	0,00%	11,10%	16	0,613
	EPM	4,73%	6,11%	4,22%	0,00%	8,09%	3	
CÉLULAS NKT	EPP	3,46%	1,97%	4,35%	0,00%	16,74%	16	0,117
	EPM	0,31%	0,17%	0,40%	0,00%	0,77%	3	
MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS	EPP	5,64%	5,10%	3,95%	0,00%	11,60%	16	0,502
	EPM	9,67%	6,02%	8,67%	3,42%	19,57%	3	
NEUTRÓFILOS	EPP	20,51%	14,78%	22,00%	0,00%	68,16%	16	0,653
	EPM	21,10%	26,48%	15,80%	3,31%	33,50%	3	
EOSINÓFILOS	EPP	1,23%	0,00%	3,22%	0,00%	13,06%	16	0,897
	EPM	3,59%	0,00%	6,22%	0,00%	10,78%	3	
BASÓFILOS	EPP	0,74%	0,00%	1,98%	0,00%	6,91%	16	0,175
	EPM	1,00%	0,75%	1,14%	0,00%	2,24%	3	
PLASMÓCITOS	EPP	0,47%	0,00%	1,74%	0,00%	7,00%	16	0,665
	EPM	0,17%	0,00%	0,30%	0,00%	0,52%	3	



Tabela 11 - Comparação das subpopulações leucocitárias presente nas efusões pleurais procedentes de pacientes diagnosticados câncer de mama e de pulmão).

Tipo celular	Tipo de neoplasia	Média	Mediana	Desvio Padrão	Min	Max	N	P-valor
LINFÓCITOS TOTAIS	Mama	63,21%	76,17%	25,31%	34,05%	79,41%	3	0,655
	Pulmão	44,03%	49,85%	27,57%	2,83%	74,65%	5	
LINFÓCITOS T	Mama	55,26%	68,22%	23,71%	27,90%	69,67%	3	0,297
	Pulmão	37,66%	32,87%	24,08%	2,61%	64,10%	5	
LINFÓCITOS T CD8+	Mama	19,45%	14,09%	10,95%	12,22%	32,05%	3	0,180
	Pulmão	7,29%	8,86%	6,94%	0,00%	15,18%	5	
LINFÓCITOS T CD4+	Mama	35,06%	35,33%	21,64%	13,29%	56,57%	3	0,655
	Pulmão	29,80%	32,57%	18,40%	2,39%	51,03%	5	
LINFÓCITOS CD4+/CD8+	Mama	0,28%	0,30%	0,06%	0,21%	0,33%	3	0,655
	Pulmão	0,33%	0,38%	0,35%	0,00%	0,84%	5	
LINFÓCITOS CD4-/CD8-	Mama	0,47%	0,59%	0,24%	0,19%	0,63%	3	0,294
	Pulmão	0,24%	0,02%	0,34%	0,00%	0,76%	5	
LINFÓCITOS B	Mama	7,95%	7,95%	1,80%	6,15%	9,74%	3	0,655
	Pulmão	6,37%	3,64%	7,25%	0,22%	16,98%	5	
CÉLULAS NK	Mama	6,20%	5,61%	1,67%	4,91%	8,09%	3	0,024
	Pulmão	1,15%	0,95%	1,56%	0,00%	3,79%	5	
CÉLULAS NKT	Mama	1,51%	0,77%	1,53%	0,49%	3,27%	3	0,456
	Pulmão	2,00%	0,17%	3,26%	0,00%	7,57%	5	
MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS	Mama	7,18%	6,02%	3,97%	3,92%	11,60%	3	0,297
	Pulmão	5,02%	4,74%	2,16%	3,00%	8,46%	5	
NEUTRÓFILOS	Mama	16,99%	5,09%	22,17%	3,31%	42,56%	3	0,297
	Pulmão	35,26%	33,50%	17,70%	17,20%	63,62%	5	
EOSINÓFILOS	Mama	0,41%	0,00%	0,71%	0,00%	1,23%	3	0,845
	Pulmão	0,40%	0,00%	0,89%	0,00%	2,00%	5	
BASÓFILOS	Mama	0,25%	0,00%	0,43%	0,00%	0,75%	3	0,558
	Pulmão	0,03%	0,00%	0,08%	0,00%	0,17%	5	
PLASMÓCITOS	Mama	0,17%	0,00%	0,30%	0,00%	0,52%	3	0,197
	Pulmão	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5	

Apesar do fato das linhagens leucocitárias serem diretamente afetadas em neoplasias hematológicas como linfomas e mielomas múltiplos (SWERDLOW *et al.*, 2017), em nossos estudos, conforme visto na Tabela 8, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes tipos celulares de pacientes diagnosticados com neoplasia hematológica e tumores de mama e pulmão.

Mesmo não observando diferenças estatísticas entre esses grupos, as análises subsequentes não incluíram no grupo das EPMs, indivíduos portadores de neoplasias hematológicas. Assim, em continuidade com as avaliações leucocitárias, considerando possíveis diferenças citológicas entre pacientes com diagnóstico de câncer e sem histórico de câncer, foi estabelecida uma comparação entre os tipos celulares desses grupos, conforme pode ser observado na Tabela 9. No entanto, nas nossas análises não foram observadas diferenças significativas das subpopulações de células leucocitárias entre os grupos de pacientes diagnosticados com EPP/EPM e EPR. Em seguida, foram realizadas análises para a comparação das células leucocitárias presentes nas amostras indivíduos com EPP e EPM, e assim, verificar possíveis diferenças entre os grupos (Tabela 10). Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados.

Por fim, ao avaliar o líquido pleural de indivíduos com diagnóstico de câncer de pulmão e câncer de mama (Tabela 11), foram observadas diferenças estatísticas para as células NK, com um aumento significativo para paciente com câncer de mama em comparação aos pacientes com câncer de pulmão, com média de 6,20% e 1,15%, respectivamente (p-valor = 0,024).

## 6. DISCUSSÃO

Os tumores secundários provenientes da disseminação metastática são as causas mais comuns de EPM, e, entre esses, os tumores malignos de pulmão, mama e linfoma são os mais prevalentes (BROADDUS *et al.*, 2017). Assim, a investigação das células neoplásicas é imprescindível nessas amostras, pois a confirmação de uma EPM é considerada um fator de mau prognóstico e indica um sinal de doença avançada com baixa resposta ao tratamento sistêmico (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, a observação de células neoplásicas em amostras de efusão pleural por citologia é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de efusões pleurais malignas (MEDENICA *et al.* 2018). No entanto, quando somente os achados morfológicos não são suficientes para definir o diagnóstico, a imunocitoquímica é umas das metodologias mais utilizada para auxiliar na conclusão do diagnóstico (FERRO, 2014). Porém, apesar disso, possui algumas limitações, como a morosidade do procedimento e as variações interobservadores (Werner *et al.*, 2005). Essas limitações comprometem a precisão e a reprodutibilidade dos diagnósticos citopatológicos (BURRY, 2011).

Nesse contexto, foi avaliado neste estudo se a imunofenotipagem por citometria de fluxo poderia ser uma metodologia laboratorial auxiliar a avaliação morfológica e imunocitoquímica para a análise das EP com suspeita de neoplasias malignas, pois é um método facilmente reprodutível e rápido (ADAN *et al.*, 2017).

A origem deste trabalho surgiu na rotina do laboratório clínico, quando muitas amostras de EPs recebidas para investigação de infiltração por linfoma por CF apresentavam a presença de células não hematológicas sugestivas de outras neoplasias. Assim, criou-se a hipótese de investigar o fenótipo dessas células para o diagnóstico clínico, pois na literatura, não havia protocolos descritos para tal procedimento.

Para atingir esse objetivo, inicialmente foi necessário definir um painel de anticorpos adequado para diferenciar as células de origem pulmonar, mamária e linfoides que fosse aplicável a rotina laboratorial como um método de diagnóstico rápido e sensível para avaliação diferencial entre carcinomas, primários ou metastáticos, de pulmão e de mama, e para diferenciá-los dos linfomas. Na definição do painel considerou-se os marcadores presentes nas células neoplásicas metastáticas de pulmão, de mama e as neoplasias linfoproliferativas, as quais são aquelas que mais frequentemente afetam a cavidade pleural (MEDENICA *et al.*, 2018). Além disso, também foi levado em consideração a disponibilidade comercial de anticorpos que pudessem ser utilizados para imunofenotipagem

por imunocitoquímica e por citometria de fluxo, de tal forma que fosse possível compará-las. Assim, o painel foi definido como mostra Quadro 6, e fez parte de um estudo anterior realizado no LOEH (LIRA-REIS, 2015). Depois dessa etapa concluída, deu-se início a análise das amostras de EP oriundas de pacientes suspeitos de EPM. Dos pacientes avaliados, foi observada uma baixa variabilidade amostral em relação a idade, visto que o CV é menor que 50%, o que é bom, pois demonstra que os dados foram homogêneos.

A avaliação morfológica de efusões ricas em linfócitos e a decisão definitiva sobre se a linfocitose é de natureza puramente reativa ou se trata de uma neoplasia linfoproliferativa sempre é um obstáculo a ser vencido pelo morfologista (LESNIEWSKA *et al.*, 2016). Nessas situações, a citometria de fluxo já demonstrou oferecer muitas vantagens em relação a avaliação morfológica, e o seu estabelecimento na rotina laboratorial já foi bem definido para o diagnóstico diferencial entre efusões reacionais e malignas secundárias a neoplasias hematológicas (BINTCLIFFE *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017). Esse fato corrobora com os resultados obtidos pelo nosso estudo quando em um caso avaliado por análises morfológicas não foram observados plasmócitos com alterações morfológicas compatíveis com mieloma múltiplo, no entanto, quando a mesma amostra foi avaliada por citometria de fluxo, foram observadas células plasmocitárias com padrão de expressão monoclonal (*Lambda*) e fenótipo aberrante, conduzindo assim, o diagnóstico para mieloma múltiplo. Quando os marcadores *Lambda* e *Kappa*, utilizados para avaliação de clonalidade, foram avaliados por imunocitoquímica e citometria de fluxo e comparados, os resultados mostraram que as metodologias eram concordantes, inclusive foram os marcadores que obtiveram melhor concordância de acordo com o teste estatístico de *kappa* para avaliar o grau de concordância entre as duas metodologias (Tabela 5) dentre todos os marcadores analisados neste estudo (Quadro 5), o que demonstra a importância da citometria de fluxo como ferramenta laboratorial para o diagnóstico das efusões pleurais infiltradas com células neoplásicas hematológicas.

Neste estudo, o maior desafio, foi estabelecer a padronização para a detecção de células procedentes de neoplasias não-hematológicas (pulmão e mama) utilizando os marcadores anti-TTF-1, anti-BER-EP4, anti-CK20, anti-CK7 e anti-GCDFP-15, pois, como citado anteriormente, ainda não são utilizados na rotina laboratorial, e, portanto, não estão padronizados. Em análises prévias, na etapa de padronização, foi observado que os eosinófilos apresentaram autofluorescência, o que pode simular uma expressão falso-positiva, principalmente para os marcadores anti-CK7 e anti-CK20. Dessa forma, um tubo sem marcação com os anticorpos (controle negativo), mostrou ser necessário durante as

análises por citometria de fluxo (Figura 15) para garantir que não havia falsa positividade de expressão dos marcadores utilizados.

Os resultados obtidos neste estudo, de acordo o teste *kappa*, mostram que os marcadores Ber-EP4, TTF-1 e CK7 apresentaram razoável, moderada e boa concordância, respectivamente, entre a citometria de fluxo e a imunocitoquímica (Tabela 5). Isso conduz para boas expectativas em relação ao uso da citometria de fluxo para imunofenotipagem de tumores sólidos. Estudos recentes revelam que esses marcadores possuem uma boa eficácia para discriminar células presentes em neoplasias primárias e metastáticas de adenocarcinoma pulmonar (AL-ZAHRANI, 2008; WANG *et al.*, 2014). O adenocarcinoma se localiza principalmente nos pulmões, no cólon e na mama, assim, uma análise combinada da expressão de TTF-1, CK7 e CK20 por citometria de fluxo, pode ter alta sensibilidade e especificidade para a separação de adenocarcinomas primários de pulmão de adenocarcinomas metastáticos de origem de cólon ou mama, pois por essa metodologia é possível analisar todos esses marcadores juntos na mesma célula, ou seja uma análise multiparamétrica (YAHYA *et al.*, 2013). Dessa forma, acreditamos que no futuro, esses marcadores possam ser estabelecidos no diagnóstico diferencial entre células procedentes de tumores sólidos por citometria de fluxo, assim como visto para os marcadores leucocitários no estudo das neoplasias hematológicas.

As citoqueratinas 7 e 20 (CK 7 e CK20) são proteínas de baixo peso molecular, e suas distribuições anatômicas estão geralmente restritas aos epitélios e nas neoplasias originadas nesses tecidos, enquanto o marcador GCDFP-15 mostra ser eficiente na detecção de células malignas metastáticas, diante disto, estes marcadores foram incluídos no estudo para detectar EPM secundárias a câncer de mama (AL-ZAHRANI, 2008; MANGLA *et al.*, 2017). Infelizmente, uma limitação da pesquisa foi o tamanho da amostragem que não permitiu maiores conclusões sobre os marcadores GCDFP-15 e CK20, pois para a análise da concordância *Kappa* é necessário haver expressão positiva, o que não foi observado em nenhum dos casos avaliados, assim, a comparação estatística entre as metodologias foi prejudicada. Apesar disto, podemos concluir que não foram observados resultados falsos positivos nas amostras avaliadas para os marcadores CK20 e para o GCDFP-15 por citometria de fluxo, no entanto, mais estudos serão necessários para uma avaliação mais completa destes marcadores.

Em alguns casos, foi observado a expressão positiva para os marcadores TTF-1 (n=3), Ber-EP4 (n=2) e CK7 (n=5) por citometria de fluxo, o que indicava um imunofenótipo sugestivo de células neoplásicas malignas, entretanto, as análises morfológicas não

mostraram evidências malignas para estas células. Esse fato se explica porque a expressão desses marcadores também pode ser observada em células não neoplásicas procedentes de diversos tecidos normais, tais como o tecido pulmonar ou ainda células mesoteliais reativas (HE e OH, 2018). Assim, a expressão desses marcadores por citometria de fluxo, deve sempre ser avaliada em conjunto com outros métodos de diagnóstico, como a análise morfológica, para que sejam evitados falsos resultados.

Apesar da amostragem deste trabalho não ter sido robusta o suficiente para a análise de concordância de alguns marcadores, e o número de amostras ter sido estratificado em diferentes grupos de acordo com o tipo de neoplasia presente nas EPMs (pulmão, mama e linfomas); durante o desenvolvimento desta pesquisa foi evidente a importância da avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo na rotina laboratorial para análise de casos que apresentem células não-hematológicas. Um dos casos foi de um homem de 64 anos com câncer de pulmão sem tratamento e com EP confirmada por RX. Após a toracentese, a amostra foi encaminhada para a citologia e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Na avaliação da citologia foi observado 700 leucócitos/mm<sup>3</sup> e na avaliação morfológica 18% de neutrófilos, 18% de mononucleares e 64% de células mesoteliais. Na imunofenotipagem por citometria de fluxo foram observadas 2,38% de monócitos, 0,96% de células NKT; 28,79% de células T; 10,31% de células B; 18,03% de neutrófilos e 39,53% de células não hematológicas (CD45 negativas). O imunofenótipo dessas células por citometria de fluxo apresentou CK7 positivo e TTF1 positivo, o que é sugestivo de câncer de pulmão. Como foram observadas células CD45 negativo pela citometria de fluxo e o fenótipo era sugestivo de células neoplásicas de câncer de pulmão, a amostra foi encaminhada para a imunocitoquímica, e os resultados foram semelhantes aos observados na citometria de fluxo (REIS et al., 2016).

Em uma outra análise de caso realizada em parceria com outra pesquisa, uma mulher de 38 anos com história de depressão pós-parto e mastite, apresentou epistaxe, alopecia, linfadenopatia, dispnéia ao esforço, petéquias nos membros inferiores e perda de peso de 20 kg. A paciente foi admitida no hospital para investigação de neoplasia linfoproliferativa. Assim, o aspirado de medula óssea foi realizado e encaminhado para a imunofenotipagem por citometria de fluxo, e imunohistoquímica. De acordo com os marcadores utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo foi descartada a possibilidade de neoplasias linfoproliferativas, no entanto, foram observadas células não hematopoiéticas (CD45 negativas), as quais foram marcadas com anti-HER2, e apresentaram positividade para esse marcador. Assim, o painel de anticorpos da imuno-histoquímica foi direcionado para o câncer

de mama e não para neoplasias linfoproliferativas. Os resultados da imuno-histoquímica confirmaram o diagnóstico do câncer de mama (REIS et al., 2019). Esses relatos de caso mostram que a citometria de fluxo é uma metodologia rápida e eficaz e que a partir dela o diagnóstico definitivo pode ser direcionado para a imunocitoquímica, o que também pode representar uma economia para o serviço e agilidade para o diagnóstico laboratorial final, o que influencia diretamente no início do tratamento.

Como visto anteriormente, as efusões associadas ao câncer podem surgir com um resultado da obstrução venosa causada pela neoplasia, ou devido a alterações inflamatórias secundárias à neoplasia, ou ainda pela secreção produzida pela própria neoplasia (HOOPER, 2010). Nessas efusões, o número de células neoplásicas na cavidade pode variar consideravelmente, e, geralmente, contêm células benignas (mesoteliais, macrófagos e leucócitos), que, frequentemente, estão em maior número que as células neoplásicas (PERES, 2018). Relatos da literatura indicam que mediadores derivados de tumores estimulam diretamente o influxo de células inflamatórias para a pleura e iniciam alterações vasculares. Na pleura, os leucócitos atraídos se acumulam localmente e têm impacto na proliferação de células tumorais pleurais e vazamento vascular (DESAI *et al.*, 2017). Desta forma, estudos mostram que a razão da quantidade de neutrófilos e linfócitos podem servir como fator de prognóstico para pacientes diagnosticados com EPM (KAO et al., 2010). Assim, considerando que ao contrário da microscopia de luz, que não permite diferenciar subpopulações linfocitárias, a citometria de fluxo permite uma ampla análise das células do sistema imunológico por meio de anticorpos conjugados a fluorocromos, nosso estudo avaliou a quantidade de 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 nos diversos tipos de efusão do estudo (EPR, EPM, EPP). Assim, foram utilizados os anticorpos específicos para cada tipo de célula e os resultados entre os diferentes tipos de EP foram comparados. Nossos resultados mostram que não há diferença significativa entre as populações avaliadas (Tabelas 8, 9 e 10). Entretanto, um fato relevante foi observado em relação ao percentual médio de células NK nas EPMs: nos casos de câncer de mama o percentual dessas células foi maior (6,20%) quando comparados com os casos de câncer de pulmão (1,15%) (p-valor = 0,024). Um estudo realizado por (TRONCARELLI *et al.*, 2019) sugere a existência de uma proteína expressa pelas células NK, que quando ativada, pode atuar contra as células neoplásicas dos tumores da mama, e que esse fenômeno ocorre somente nos casos de mau prognóstico. No entanto, esses estudos ainda estão em andamento (TRONCARELLI *et al.*, 2019). Assim, a

detecção das células NK por citometria de fluxo poderá futuramente servir como um método para avaliação de prognóstico nos casos de câncer de mama com EPM, visto que pela avaliação morfológica não há possibilidade de diferenciar as células linfoides.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo mostram que a citometria de fluxo é uma ferramenta de diagnóstico laboratorial importante para detecção de células malignas em amostras de líquido pleural, e que em associação com a avaliação morfológica e imunocitoquímica, pode auxiliar no diagnóstico das EPMs. Assim, por ser um método que proporciona resultados mais rápidos que as metodologias consideradas padrão-ouro, a CF pode oferecer uma agilidade no diagnóstico, o que poderia influenciar no tempo de internação hospitalar e nos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e nos serviços privados, além da melhoria da qualidade de vida desses indivíduos.



## 7. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir:

- A avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo dos marcadores *Lambda* e *Kappa*, utilizados para avaliar clonalidade nas neoplasias linfoproliferativas, apresentou uma concordância boa e excelente, respectivamente, quando comparada à imunocitoquímica, o que demonstra a eficiência da citometria de fluxo como ferramenta laboratorial para o diagnóstico das efusões pleurais infiltradas com células neoplásicas hematológicas;
- A avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo dos marcadores CK7 e TTF-1 utilizados para caracterizar células malignas de câncer de pulmão em amostras de líquido pleural, apresentou uma concordância boa e moderada, respectivamente, quando comparada à imunocitoquímica, apesar da concordância razoável do marcador Ber-EP4, o conjunto destes resultados mostram que a citometria pode obter resultados promissores no estudo das EPs secundárias a neoplasias pulmonares;
- Mais estudos são necessários para avaliar a eficácia dos marcadores GCDFP-15 e CK20 quando aplicados nos diagnósticos de EPM secundários a câncer de mama;
- As análises imunofenotípicas por citometria de fluxo devem ser avaliadas em conjunto com outras metodologias para garantir que não sejam obtidos falsos resultados;
- Os valores relativos dos linfócitos dos pacientes com diagnóstico final de EPR, EPM e EPP não mostraram diferença significativa entre os grupos avaliados. A exceção foram os pacientes com diagnóstico prévio de câncer de mama e câncer de pulmão, cujos resultados mostraram diferença estatística para as células NK. Assim, acreditamos que futuramente a detecção das células NK por citometria de fluxo poderá servir como um método para avaliação de prognóstico nos casos de câncer de mama com EPM, visto que pela avaliação morfológica não há possibilidade de diferenciar as células linfóides.

Por fim, a citometria de fluxo demonstrou ser uma ferramenta boa ferramenta complementar no diagnóstico laboratorial para detecção de células malignas em amostras de líquido pleural, e que em associação com a avaliação morfológica e imunocitoquímica pode contribuir no diagnóstico diferencial entre EPM, EPP e EPR. Isso implica na rapidez do diagnóstico e no aumento da eficiência dos tratamentos, o que pode resultar na diminuição do tempo de internação hospitalar e dos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e na melhoria da qualidade de vida desses indivíduos.

## REFERÊNCIAS

ABCAM® plc. **Direct vs indirect staining.** Disponível em: <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/week-1--choosing-your-antibody>. Acesso em: 10/11/2019.

ABOUZGHEIB, W.; BARTTER, T.; DAGHER, H.; PRATTER, M.; KLUMP, W. **A prospective study of the volume of pleural fluid required for accurate diagnosis of malignant pleural effusion.** Chest, v.135, p.999-1001, 2009.

ABREA - **Associação Brasileira de Expostos ao Amianto**, 2019 – Disponível em: <https://abrea.org.br/not%C3%ADcias/publica%C3%A7%C3%B5es.html>. Acesso em: 15/12/2019.

ADAN, A *et al.* **Flow cytometry: basic principles and applications.** Crit Rev Biotechnol. v. 37, n.2, p. 163-176, 2017.

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.

AGALIOTI, Theodora *et al.* **Mutant KRAS promotes malignant pleural effusion formation.** Nature Communications, v.8, n.15205, 2017.

AKTURK, Ulku A. *et al.* **Role of the Neutrophil-Lymphocyte Ratio in the Differential Diagnosis of Exudative Pleural Effusion.** Clinics vol.71, n.10, pp.611-616, 2016.

AKULIAN, Jason; FELLER-KOPMAN, David. **The past, current and future of diagnosis and management of pleural disease.** J Thorac Dis, v.7, p.329-S338, 2015.

ALEXANDRAKIS, Michael G. *et al.* **Pleural Effusions in Hematologic Malignancies.** CHEST, v.125, n.4, 2004.

ALGRANTI, Eduardo. **Prevention of Asbestos Exposure in Latin America within a Global Public Health Perspective.** Annals of Global Health. v.85, n.1, p. 1–15, 2019.

AL-ZAHRANI, I.H. **The value of immunohistochemical expression of TTF-1, CK7 and CK20 in the diagnosis of primary and secondary lung carcinomas.** Saudi Med J. v.29, n.7, p.957-961, 2008.

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research.** London: Chapman and Hall; p.404–408, 1991.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). **Management of Malignant Pleural Effusions** Am J Respir Crit Care Med, v.62, p.1987–2001, 2000.

ANTONANGELO L.; CAPELOZZI, Z.L. **Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural.** J Bras Pneumol. v.32, p.163-169, 2006.

ANTONANGELO, L.; SALES, R.K.; CORÁ, A.P.; ACENCIO, M.M.P.; TEIXEIRA, L.R.; VARGAS, F.S. **Pleural fluid tumour markers in malignant pleural effusion with inconclusive cytologic results.** Current Oncology, v. 22, n. 5, 2015.

ANTONANGELO, Leila *et al.* **É possível diferenciar derrames pleurais linfocíticos secundários a tuberculose ou linfoma através de variáveis clínicas e laboratoriais?** J Bras Pneumol. v.38, n.2, p. 181-187, 2012.

ARBER A.; CLACKSON C.; DARGAN S. **Malignant pleural effusion in the palliative care setting.** Int J Palliat Nurs. v.19, n.7, p.320-322, 2013.

ARNOLD, D.T. *et al.* **Investigating Unilateral Pleural Effusions: The role of cytology.** Eur Respir J, 2018.

ASCIAK, Rachelle; RAHMAN, Najib M. **Malignant Pleural Effusion: From Diagnostics to Therapeutics.** v.39, n.1, p.181-193, 2018.

AZEVEDO, Yuri G.P. *et al.* **Análise de Custeio em Exames de Diagnóstico por Imagem: Um Estudo de Caso Utilizando o Método Activity-Based Costing.** Rev. Gest.Saúde. Brasília. v.07, n. 03, p. 1106-25, 2016.

BACARELLI, João C. **Imuno-histoquímica: aplicações em patologia oral.** Revista de Ciências Médicas – PUCCAMP, Campinas, v. 4, n.2, p.66-70, 1995.

BATRA, Hitesh; ANTONY, Veena B. **Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases.** J Thorac Dis. v.7, n.6, p. 964–980, 2015.

BEAUDOIN, Stéphane; GONZALEZ, Anne V. **Evaluation of the patient with pleural effusion.** CMAJ March 12;190: p.291-5, 2018.

BENLLOCH, Susana; GALBIS-CARAVAJAL, José M.; MASSUTÍ, Bartomeu. **Differentiation Between Malignant and Benign Pleural Effusions: Methylation Specific Polymerase Chain Reaction Analysis.** Hayat M.A. (eds) General Methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma. Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis, v.2, 2008.

BERTHOLD, Jany; WELTE, Tobias. **Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment.** Dtsch Arztebl Int, v.116, n.21, p.377-386, 2019.

BERTOLACCINI, Luca *et al.* **A benchmarking project on the quality of previous guidelines about the management of malignant pleural effusion from the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) Pleural Diseases Working Group.** European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, v.52, n.2, p. 356–362, 2017.

BETTERS, D.M. **Use of Flow Cytometry in Clinical Practice.** J Adv Pract Onco. v. 6, n.5., p. 435–440, 2015.

BIBBY, Anna C. *et al.* **ERS/EACTS statement on the management of malignant pleural effusions.** Eur Respir J, v.52 2018.

BINTCLIFFE, Oliver J. *et al.* **The management of benign non-infective pleural effusions.** Eur Respir Rev. v.25, p.303–316, 2016.

BODE-LESNIEWSKA, Beata. **Flow Cytometry and Effusions in Lymphoproliferative Processes and Other Hematologic Neoplasias.** Acta Cytologica. v.60, p. 354–364, 2016.

BORGOHAIN, Mondita *et al.* **Diagnostic Utility of Immunohistochemistry in Lymphoma.** J Clin Oncol. v.4, n.12, 2017.

BOSE, Shikha. **Cytology of Pleural and Peritoneal Lesions. Practical Pathology of Serous Membranes.** Cap. 05, The University of British Columbia Library, p.53–66, 2018.

BRAMLEY, Kyle; DEBIASI, Erin; PUCHALSKI, Jonathan. **Indwelling Pleural Catheter Placement for Nonmalignant Pleural Effusions.** Semin Respir Crit Care Med, v.39, p.713–719, 2018.

BRASIL. Lei nº 9.055, de 01 de junho de 1995. Disciplina a extração, industrialização, utilização, comercialização e transporte do asbesto/amianto e dos produtos que o contenham, bem como das fibras naturais e artificiais, de qualquer origem, utilizadas para o mesmo fim e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, 1995. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L9055.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9055.htm). Acesso em: 15/12/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde de populações expostas a contaminantes químicos.** Vigipeq, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: especial tuberculose.** 2018.

BROADDUS, V.C.; MASON, R.J.; ERNST, J.D.; KING-JR, T.E.; LAZARUS, S.C.; MURRAY, J.F.; NADEL, J.A.; SLUTSKY, A.S.; GOTWAY, M. B.; **Murray &**

**Nadel Tratado de Medicina Respiratória.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 1568, Mar. 2017.

BURRY, Richard W. **Controls for Immunocytochemistry: An Update.** Histochem Cytochem, v.59, p. 6–12, 2011.

BUGALHO, Antonio *et al.* **The diagnostic value of transthoracic ultrasonography in predicting malignancy in undiagnosed pleural effusions: a prospective observational study.** Respiration v. 87, p.270–278, 2014.

CAGLE, Philip T.; ALLEN, Timothy C. **Pathology of the pleura: What the pulmonologists need to know** resp\_1957 430.438. Respiology16, p. 430–438, 2011.

CAKMAK, Muharrem; DURKAN, Atilla. **Analysis of patients with malignant and paramalignant pleural effusion.** Biomedical Research 28 (5): p. 2226-2229, 2017.

CARRINGTON, Joseph M.; KRUSE, Derek A. **Rapid Diagnosis and Treatment of a Pleural Effusion in a 24-Year-Old Man.** CHEST 155(4):p. 83-85, 2019.

CARTER, Jamal *et al.* **Molecular Profiling of Malignant Pleural Effusion in Metastatic Non–Small-Cell Lung Carcinoma. The Effect of Preanalytical Factors.** Ann Am Thorac Soc.v.14, n.7, p. 1169–1176, 2017.

CARVALHO, Lina. **Reclassificação do carcinoma broncopulmonar: Diferenciação do tipo histológico em biópsias por imuno -histoquímica.** Revista Portuguesa de Pneumologia, v.15, n. 6, 2009.

CHEN, L.M. **The role of conventional cytology, immunocytochemistry, and flow cytometric DNA ploidy in the evaluation of body cavity fluids: a prospective study of 52 patients.** Am J Clin Pathol v.109, p.712–721, 1998.

CHEN, Rui-Lin *et al.* **Diagnostic value of medical thoracoscopy for undiagnosed pleural effusions.** Exp Ther Med. v.16, n.6, p. 4590–4594, 2018.

CHEN, W.; LUU, H.S. **Immunophenotyping by Multiparameter Flow Cytometry.** *Methods Mol Biol.*v.33, n.51, 2017.

CHUBB, Paul S.A.; WILLIAMS, Robin A. **Biochemical Analysis of Pleural Fluid and Ascites.** *Clin Biochem Rev.* v.39, n.2, p. 39–50, 2018.

CIBAS, E.S. **Pleural, Pericardial, and Peritoneal Fluids** em: CIBAS, E.S. & DUCTMAN, B.S. *Cytology: diagnostic principles and clinical correlates*, 3 ed., Philadelphia, USA: Elsevier, p.129-153, 2009.

CLIVE, Amelia O. *et al.* **Predicting survival in malignant pleural effusion: development and validation of the LENT prognostic score.** *Thorax.* v.69, n.12, p. 1098-104, 2014.

COELHO, Ana. *et al.* **Fibrinolytics in the Treatment of Complicated Pleural Effusions.** *Acta Med Port.* Nov; 29(11):p. 711-715, 2016.

COMAR, Ricardo S. *et al.* **Análise citológica do líquido pleural no hospital das clínicas da universidade federal do paraná (UFPR).** *Estud Biol.* v. 30, n 70, p. 17-25, 2008.

DANTAS, George C.; REIS, Ricardo C. **Protocolo de abordagem de derrame pleural.** *Rev Med UFC.* v.58, n.2, p. 67-74, 2018.

DAVIDSON, B. **Malignant Nonhematological Effusion Characterization by Flow Cytometry.** *Acta Cytologica*, n.60, p. 365–371, 2016.

DAVIDSON, B. *et al.* **Detection of malignant epithelial cells in effusions using flow cytometric immunophenotyping: an analysis of 92 cases.** *Am J Clin Pathol.* 118:85–92, 2002.

DAVIDSON, Ben . **Malignant Nonhematological Effusion Characterization by Flow Cytometry.** *Acta Cytologica* n.60, p.365–371, 2016.

DERVEAUX, Elien. *et al.* **Diagnosis of Lung Cancer: What Metabolomics Can Contribute.** Lung Cancer - Strategies for Diagnosis and Treatment. Cap. 4. p. 79-83, 2018.

DESAI, Neeraj R.; HANS J. LEE, Hans J. **Diagnosis and management of malignant pleural effusions: state of the art in 2017.** J Thorac Dis. v.10, p. 1111–1122, 2017.

DIXIT, Ramakant *et al.* **Diagnosis and management options in malignant pleural effusions.** Lung India. v.34, n.2, p.160–166, 2017.

DONGEN, Van J.J.M. *et al.* **EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes.** Leukemia v.26, p.1908–1975, 2012.

DONNENBERG, Albert D.; LUKETICH, James D.; DHUPAR, Rajeev; DONNENBERG, Vera S. **Treatment of malignant pleural effusions: the case for localized immunotherapy.** Journal for ImmunoTherapy of Cancer v.7, n.110, 2019.

EVISON, Matthew. **Olanzapine-induced eosinophilic pleuritis.** Respiratory Medicine Case Reports v. 14, p. 24-26, 2015.

FAIZ, Saadia A. *et al.* **Pleural effusions in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome.** Leukemia & Lymphoma, v.54, n.2, p.329–335, 2013.

FELLER-KOPMAN, David J. *et al.* **Management of Malignant Pleural Effusions An Official ATS/STS/STR Clinical Practice Guideline.** Am J Respir Crit Care Med, v.98, n.7, p.839–849, 2018.

FERREIRA, Adilson C. *et al.* **Papel da ultra-sonografia na avaliação da efusão pleural.** Radiol. Bras., v.39, n.2, p.145 -150.2006.

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.



FERREIRO, Lucia *et al.* **Advances in pleural effusion diagnostics.** *Expert Rev Respir;* v.14, n.1, p.51-66, 2020.

FERREIRO, Lucia *et al.* **Eosinophilic Pleural Effusion: Incidence, Etiology and Prognostic Significance.** *Arch Bronconeumol.* v.47, n.10, p.504–509, 2011.

FERREIRO, Lucia, PORCEL, José M., VALDÉS, Luis. **Diagnosis and Management of Pleural Transudates.** *Arch Bronconeumol.* v. 53, n.11, p. 629-636, 2017.

FERREIRO, Lucia; JOSÉ, Maria E. S.; VALDÉS, Luis. **Manejo del derrame pleural paraneumónico en adultos.** *Archivos de Bronconeumología,* v.51, n.12, p.637-646, 2015.

FERREIRO, Lucia; SUÁREZ-ANTELO, Juan; VALDÉS, Luis. **Pleural procedures in the management of malignant effusions.** *Ann Thorac Med.* v.12, n.1, p.3–10, 2017.

FERRO, Amadeu B. **Imunohistoquímica.** Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), 2014. Disponível em: [www.amadeuferro.pt.vu](http://www.amadeuferro.pt.vu). Acesso em: 05/11/2019.

FIRAT, P. **Benign Effusions.** *Serous Effusions,* v.3, n.28, 2018.

FRANCIS, I. M. *et al.* **Metastatic breast carcinoma in pleural fluid: Correlation of receptor and HER2 status with the primary carcinoma—a pilot study.** v.44, n.12, p. 980-986, 2016.

FRIEDMAN, M.T. *et al.* **Malignant mesothelioma: immunohistochemistry and DNA ploidy analysis as methods to differentiate mesothelioma from benign reactive mesothelial cell proliferation and adenocarcinoma in pleural and peritoneal effusions.** *Arch Pathol Lab Med,* v.120, p.959–966, 1996.

FULLER, Maren Y.; THRALL, Michael J. **Utility of flow cytometry analysis for pleural and peritoneal fluids.** *Journal of the American Society of Cytopathology.* v.16, 2016

GELTNER, Christian.; ERRHALT, Peter. **Malignant pleural effusion: pathogenesis, diagnosis, and management.** Memo - Magazine of European Medical Oncology. v.8, n.4, p. 235–241, 2015.

GILBERT, C.R. *et al.* **The use of indwelling tunneled pleural catheters for recurrent pleural effusions in patients with hematologic malignancies: a multicenter study.** Chest. v.148, n.752–758, 2015.

GOBBI, Helenice. **Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012.** J Bras Patol Med Lab, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.

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.

HALIMI, Monireh *et al.* **The Role of Immunohistochemistry Studies in Distinguishing Malignant Mesothelioma from Metastatic Lung Carcinoma in Malignant Pleural Effusion.** Iran J Pathol, v.14, n.2, p. 122-126, 2019.

HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica.** 13. ed. Rio de Janeiro, unidade V e VII, Elsevier, 2017.

HAMMOND, M.E. *et al.* **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** Arch Pathol Lab Med. v.134, p.907–922, 2010.

HARTMAN, M. *et al.* **MUC1 isoform specific monoclonal antibody 6E6/2 detects preferential expression of the novel MUC1/Y protein in breast and ovarian cancer.** Int J Cancer. V.82, p.256–267, 1999.

HASHIZUME, Robson T. **Derrame pleural na Sala de Urgência.** Universidade de São Paulo. Revista Qualidade HC, p. 1-9, 2017.

HASSAN, T; AL-ALAWI, M.; CHOTIRMALL, S.H.; MCELVANEY, N. G. **Pleural Fluid Analysis: Standstill or a Work in Progress?** *Pulm Med.*, v. 2012, p.1-8, 2012.

HE, Tao; OH, Scott. **Diagnostic approach to pleural effusions.** *AME Med*, v.3, n.116, 2018.

HEFFNER, John E.; NIETERT, Paul J.; BARBIERI, Celia. **Pleural Fluid pH as a Predictor of Survival for Patients With Malignant Pleural Effusions.** v.117, n.1, p.79–86, 2000.

HOOVER, Clare; LEE, Gary Y. C.; MASKELL, Nick **Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline,** *Thorax*, v.65, n.2, 2010.

HUSAIN, Aliya N. *et al.* **Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma. 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group.** *Arch Pathol Lab Med.* v.142, p. 89–108, 2018.

ICYTHOLY, **Cytological specimen: pleural effusion.** 2014. Disponível em: <https://icytology.wordpress.com/interesting-cases-2/case-n35-pleural-effusion-mesothelioma/> - Acesso em: 07 Dez. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, Brasil: Ministério da Saúde, 2018.

JUNIOR, Cyro T.S.; MARANHÃO, Bernardo H.F.; CHIBANTE, Antonio M.S.; CARDOSO, Gilberto P. **Novo critério bioquímico para classificar transudatos e exsudatos pleurais com dosagens de proteínas totais e desidrogenase lática somente no líquido pleural.** *Pulmão RJ* v.25, n. 1, p. 29-32, 2016.

KALINKE, Luciana P. *et al.* **Uma proposta de criação de um sistema para monitoramento dos casos de mesotelioma maligno em Curitiba, Paraná, Brasil.** *Cad. Saúde Pública*; v.34, n.9, 2018.

KAO, Steven C.H. *et al.* **High blood neutrophil-to-lymphocyte ratio is an indicator of poor prognosis in malignant mesothelioma patients undergoing systemic therapy.** Clin Cancer Res. v.16, n.23, p.5805–5813, 2010.

KARKHANIS, Vinaya S; JOSHI, Jyotsna M. **Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management.** Emerg Med. v.4, p31–52, 2012.

KIM, Chang H. *et al.* **Differential diagnosis between lymphoma-associated malignant pleural effusion and tuberculous pleural effusion.** Ann Transl Med.; v.7, n.16, p.373, 2019.

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

KRENKE, R. **Incidence and aetiology of eosinophilic pleural effusion.** Eur Respir J; v.34, p.1111–1117, 2009.

KRISHNA Rachana, RUDRAPPA, Mohan. **Pleural Effusion.** em: StatPearls. Treasure Island (FL): Disponivel em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448189/> - 2019.Acesso em: 10/11/2019.

KUMMAR, Vinay; ABBAS, Abul K., ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran Patologia — Bases Patológicas das Doenças.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1592, 2016.

LAINA, T. *et al.* **EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols.** Leukemia, v.26, p.1986–2010, 2012.

LAKHANI, S. R. *et al.* **WHO classification of tumours of the breast.** Lyon: IARC, 2012.

LARA, Herrera S. *et al.* **Predicting Malignant and Paramalignant Pleural Effusions by Combining Clinical, Radiological and Pleural Fluid Analytical Parameters.** Lung, v.195 n.5, p.653-660, 2017.

LAT, Tasnim; PAUL, Manju. **Malignant Effusion**. em: StatPearls. Treasure Island (FL): Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519522/> - 2019. Acesso em: 27/11/2019.

LAZARCHICK, John; DAVIS, Brian. **Large B-cell lymphoma presenting as a pleural effusion**. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/imageset/975/large-bcell-lymphoma-presenting-as-a-pleural-effusion>. - 12/01/2010. Acesso em: 10/12/2019.

LIGHT, Richard W. *et al.* **Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates**. Ann Intern Med, v.77, n.4, p.507-513, 1972.

LIGHT, Richard. **The Undiagnosed Pleural Effusion**. Clinics in Chest Medicine, v.27, n.2, p.309-19, 2006.

LIRA-REIS, M. **Investigação do fenótipo das células presentes nos líquidos cavitários para o diagnóstico diferencial entre as efusões malignas e as benignas**. 84 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

LIU, Liping *et al.* **Next generation sequencing-based molecular profiling of lung adenocarcinoma using pleural effusion specimens**. J Thorac Dis v.10, n.5, p.2631-2637, 2018.

LONGATTO FILHO, Adhemar. *et al.* **Técnica de preparo de Amostras em Citopatologia** In: BIBBO, Marluce & LONGATTO FILHO, Adhemar. Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos Derrames Cavitários. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, p.125-133, 2001.

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

MACÍAS, Antonio A. *et al.* **Epidemiology and diagnosis of pleural tuberculosis in a low incidence country with high rate of immigrant population: A retrospective study**. v.78, p. 34–38, 2019.

MA, Yunfan *et al.* **Expression of p63 and CK5/6 in early-stage lung squamous cell carcinoma is not only an early diagnostic indicator but also correlates with a good prognosis.** Thorac Cancer, v.6, n.3, p.288–295, 2015.

MACHADO, Gisele F.; FIGUEIREDO, Florêncio. **Revisão: Filamentos Intermediários.** Medicina, Ribeirão Preto, v.29, p.104-113, 1996.

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.

MANGLA, Ankit *et al.* **Metastasis of cervical cancer to breast: A case report and review of literature.** Gynecologic Oncology Reports. v.21, 2017.

MARANHÃO, Bernardo; JUNIOR, Cyro T. S.; CARDOSO, Gilberto P. **Crítérios bioquímicos para classificar transudatos e exsudatos pleurais.** Pulmão RJ, v.14,n.4,p.315-320, 2005.

MARINHO, Rachel M.; RAMOS, Simone G. **Small cell variant of squamous cell carcinoma vs. small cell carcinoma of the lung: differential diagnosis in biopsies.** J Bras Patol Med Lab. v. 46, n. 2, p. 123-128, 2010.

MARTINEZ-MORAGON E. *et al.* **Malignant pleural effusion: prognostic factors for survival and response to chemical pleurodesis in a series of 120 cases.** Respiration, v. 65, n. 108, p.13, 1998.

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

MATSUI, Akira *et al.* **Clinical significance of evaluating hormone receptor and HER2 protein using cell block against metastatic breast cancer: a multi-institutional study.** v.10, n.55, p. 5680–5689, 2019.

MEDENICA, Milic; MEDENICA, Miras; COSOVIC, Danilo. **Pleural Effusions in Lung Cancer: Detection and Treatment.** Lung Cancer - Strategies for Diagnosis and Treatment. Cap. 3, pag. 1-36, 2018.

MERCER, Rachel M. *et al.* **Interpreting pleural fluid results.** Clin Med (Lond). v.19, n.3, p.213–217, 2019.

MI, E. H. *et al.* **Comparison of GATA-3, mammaglobin, GCDFP-15 expression in breast carcinoma in serous effusions: A cell-block micro-array study.** Pleura Peritoneum v.2, n.3, p. 143-148, 2017.

MICHAEL, Claire W.; DAVIDSON, Ben. **Pre-analytical issues in effusion cytology.** Pleura Peritoneum. v.1, n.1, p.45–56, 2016.

MIYOSHI, Shion *et al.* **Diagnostic Utility of Pleural Fluid Cell Block versus Pleural Biopsy Collected by Flex-Rigid Pleuroscopy for Malignant Pleural Disease: A Single Center Retrospective Analysis.** Plos one. v.11, n.11, 2016.

NA, Moon J. **Diagnostic Tools of Pleural Effusion.** Tuberc Respir Dis (Seoul).; v.76, n.5, p.199–210, 2014.

NAYLOR, B. **Pleural, Peritoneal, and Pericardial Effusions In: Bibbo, M. & Wilbur, D.C. Comprehensive Cytopathology.** 3.ed. Philadelphia, USA:Elsevier:, , p.515-575, 2008.

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

NGUYEN, Gia-Khanh. **Essentials of fluid cytology.** University of Alberta Edmonton, Alberta, Canada. Disponível em:

<https://pathology.ubc.ca/files/2012/06/FLUIDCYTOLOGYBook09R1.pdf> – 2009. Acesso em: 10/11/2019

OH, Scott; RONAGHI, Reza; CAI, Guoping. **Molecular Testing on Pleural Fluid Samples.** Pleura Peritoneum. v.1, n.1, p. 45–56, 2016.

OKEN, Martin M. *et al.* **Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.** American Journal of Clinical Oncology, v.5, n.6, p. 649-656, 1982.

OLIVEIRA, Anabely A. *et al.* **Impacto do amianto na saúde dos brasileiros.** Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v.22, n.1, p.82-85, 2018.

PALA, E.E.; BAYOL, Ü.; CUMURCU, S.; KESKIN, E. **Immunohistochemical characteristics of triple negative/basal-like breast câncer.** Turk Patoloji Derg v.28, n.3, p.238-244, 2012.

PANJWANI, A.; ZAID T. **An interesting case of undiagnosed pleural effusion.** Breathe v.13, p.46–52, 2017.

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

PEREIRA, Esdras E. B.; SANTOS, Nadia, B.; SARGES, Edilene S. N. F. **Avaliação da capacidade funcional do paciente oncogeriátrico hospitalizado.** Rev Pan-Amaz Saude v. 5, n. 4, p. 37 - 44, 2014.

PERIKLEOUS, Periklis; RATHINAM, Sridhar,. WALLER, David A. **VATS and open chest surgery in diagnosis and treatment of benign pleural diseases.** J Vis Surg. v.3, n. 84, 2017.

PERES, Isabela. **Sensibilidade dos marcadores imunocitoquímicos para o diagnóstico de carcinoma em lavado peritoneal e líquidos pleural, ascítico e pericárdico.** Dissertação. Universidade de Brasília, 2018.



PILLAI, V. *et al.* **A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies.** Am J Clin Pathol, v.13, p. 672–68, 2013.

PILLING, J.E. *et al.* **Prognostic factors for survival after surgical palliation of malignant pleural effusion.** J Thorac Oncol v. 5, p.1544–1550, 2010.

PITTELLA, J. E. H.; BARBOSA, A. J. A. **A nova classificação dos tumores da mama da OMS.** J Bras Patol Med Lab, v.48, n. 6, 2012.

PORCEL José M., SOLÉ Cristina, SALUD Antonieta, BIELSA Silvia. **Prognosis of Cancer with Synchronous or Metachronous Malignant Pleural Effusion.** Lung.v.195, p.775–779, 2017.

PORCEL, José M. *et al.* **Accuracy of Fluorodeoxyglucose-PET Imaging for differentiating benign from malignant pleural effusion. A meta-analysis.** CHEST v.147, p.502–512, 2015.

PSALLIDAS, I.; KALOMENIDIS, I.; PORCEL, J.M.; ROBINSON, B.W.; STATHOPOULOS G.T. **Malignant pleural effusion: from bench to bedside.** European Respiratory Review. v.25, n. 140, p. 189-198. Jun. 2016.

RAKESH, Hulimangala R; GELZINIS, Theresa A. **The Updated ATS/STS/STR Clinical Practice Guidelines on the Management of Malignant Pleural Effusions: What Is New in 2018?** Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, v.33, n.5, p. 1181-1186, 2019.

RENSHAW, S. **Immunohistochemistry and Immunocytochemistry Essential Methods,** The Immunoassay Handbook, 4th edition, David G. Wild, Immunohistochemistry and Immunocytochemistry, 357–377, 2016.

REIS, Manoela L. *et al.* **Detection of Metastatic Lung Cancer by Immunocytochemistry and Flow Cytometry in a Sample of Pleural Fluid.** International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports, v. 7, p. 1-5, 2016.

REIS,M.L.; VIEIRA, D.S.C.; WALTER,L.O; SANTOS-SILVA, M. C. **Detection of Metastatic Breast Carcinoma Cells in Bone Marrow by Flow Cytometry** International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports, v.12, n.3, p.1-6, 2019.

RISBERG, B. *et al.* **Detection of monocyte/macrophage cell populations in effusions – a comparative study using flow cytometric immunophenotyping and immunocytochemistry.** Diagn Cytopathol, v.25, p.214–219, 2001.

RISBERG, B. *et al.* **Flow cytometric immunophenotyping of serous effusions and peritoneal washings: comparison with immunocytometry and morphological findings.** J Clin Pathol. v.53, p. 513–517, 2000.

ROBERTS, Mark E., *et al.* **Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society pleural disease guideline.** Thorax 2010;65(Suppl 2) p.32-40. 2010.

RODRIGUEZ-PANADERO, F.; JANSSEN, J. P.; ASTOUL P. **Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion.** European Respiratory Journal , v.28, p. 409-422, 2006.

ROOPER, Lisa M.; ALI, Syed Z.; OLSON Matthew T. **A minimum fluid volume of 75 mL is needed to ensure adequacy in a pleural effusion: A retrospective analysis of 2540 cases.** Cancer Cytopathol; v.122, p. 657-65, 2014.

S 170 Sales R, Onishi R

SALES, Roberta K.B.; ONISHI, Roberto. **Toracocentese e biópsia pleural.** J Bras Pneumol. v.32, p. 170-173, 2006.

SCARCI M. *et al.* **Current practices in the management of malignant pleural effusions: a survey among members of the European Society of Thoracic Surgeons.** Interact Cardiovasc Thorac Surg. v.24, n.3, p.414-417, 2017.

SCHMIDT, Lucas Y. S. **Granuloma epitelióide em pleura por biópsia como instrumento diagnóstico de tuberculose pleural: um relato de caso.** Revista de Patologia do Tocantins, v.6, n.2, p.45-49, 2019.

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, p. 41-56, 2001.

SHAFIQ M. *et al.* **Management of Malignant Pleural Effusion: A Cost-Utility Analysis.** J Bronchology Interv Pulmonol. v.22, n.3, p.215-25, 2015.

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

SHIELD, P. W. **External quality assurance in nongynecologic cytology: The Australasian experience.** Cancer Cytopathology, v.125, n.5, p. 349–361, 2017.

SHRESTHA T M. *et al.* **Idiopathic Eosinophilic Pleural Effusion Treated Successfully with Corticosteroid Therapy: A Clinical Case Report.** Cureus v.11, n.1, 2019.

SKOK, Kristijan *et al.* **Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review.** Medicina (Kaunas). v. 55, n. 8, p.490, 2019.

SPELLA, Magda *et al.* **Switching off malignant pleural effusion formation—fantasy or future?** J Thorac Dis, v.7, n.6, p.1009-1020, 2015.

STEVIC, Ruza *et al.* **Sonographic Indicators for Treatment Choice and Follow-Up in Patients with Pleural Effusion.** Canadian Respiratory Journal, v. 2018, 2018.

STEWART, Carleton C. *et al.* **U.S.-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Selection of Antibody Combinations.** Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) v.30, p.231–235, 1997.

SU, Y.C.; HSU, Y.C.; CHAI, C.Y. **Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma.** Kaohsiung J Med. Sci. V.22, n.1, p.14-19, 2006.

SUBBARAYAN, Devi *et al.* **Use of panel of markers in serous effusion to distinguish reactive mesothelial cells from adenocarcinoma.** v.36, n.1, p. 28-31, 2019.

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.

SWERDLOW, S. H. *et al.* **WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 4th Ed., 2017.

SWIDEREK J. *et al.* **Prospective study to determine the volume of pleural fluid required to diagnose malignancy.** Chest, v.137, p.68-73, 2010.

TAKEDA, Y. *et al.* **Analysis of Expression Patterns of Breast Cancer–Specific Markers (Mammaglobin and Gross Cystic Disease Fluid Protein 15) in Lung and Pleural Tumors.** Arch Pathol Lab Med—Vol 132, 2008.

TAYLOR, J.; XIAO, W.; ABDEL-WAHAB, O. **Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics.** Blood, v.130, n.4, p.410-423, 2017.

TRAVIS W.D. *et al.* **WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th edition.** Lyon (France): IARC Press; 2015.

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

THOMAS, S.C.; DAVIDSON, L.R.; MCKEAN, M.E. **An investigation of adequate volume for the diagnosis of malignancy in pleural fluids.** *Cytopathology*, v.22, p.179-183, 2011.

TSE H.T. *et al.* **Quantitative diagnosis of malignant pleural effusions by single-cell mechanophenotyping.** *Sci Transl Med.* v.5, n. 212, p.212, 2013.

TURCHETTO-ZOLET, Andreia C., *et al.* **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações.** Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, p.181 p 2017.

THERMOFISHER. **Figura 4. As partes de trabalho do citômetro de fluxo** Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

TREGLIA G. *et al.* **Diagnostic accuracy of 18F-FDG-PET and PET/CT in the differential diagnosis between malignant and benign pleural effusions. A systematic review and meta-analysis.** *Acad Radiol* v.21, p.11–20, 2014.

TRONCARELLI, Flores, B.C. *et al.* **Molecular and Kinetic Analyses of Circulating Tumor Cells as Predictive Markers of Treatment Response in Locally Advanced Rectal Cancer Patients.** *Cells.* v.8, n.7, 2019.

VAKIL, Erik; JIMENEZ, Carlos A.; FAIZ, Saadia A. **Pleural effusions in hematologic malignancies and their management with indwelling pleural catheters.** *Curr Opin Pulm Med.*, v. 24, 2018.

VAZ, M.C.; MARCHI, E.; VARGAS, F.S. **Pleurodesis: technique and indications.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* v.32, n.4, p.347-56. 2006.

WAHLA, Ali S. *et al.* **Managing malignant pleural effusion.** Cleveland Clinic Journal of Medicine, v.86, n.2, p.95-99, 2019.

WALKER, Steven P. *et al.* **Nonmalignant Pleural Effusions: A Prospective Study of 356 Consecutive Unselected Patients.** Chest, v.151, n.5, p.1099-1105, 2017.

WANG, Bo *et al.* **Diagnostic Accuracy of Ber-EP4 for Metastatic Adenocarcinoma in Serous Effusions: A Meta-Analysis.** v.9, n.9, 2014.

WANG, Xiaoting; LEBREC, Herve. **Immunophenotyping: Application to Safety Assessment.** Toxicol Pathol. v.45, n.7, p.1004-1011, 2017.

WANG, Zheng *et al.* **ALK gene expression status in pleural effusion predicts tumor responsiveness to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinoma.** Chinese Journal of Cancer Research, v. 28, n.6, p.606-616, 2016.

WARTH, A.; FINK, L. **Immunophenotyping of lung tumors: An update.** Pathologie. v.40, n.5, p. 506-513, 2019.

WEIGAND, A. *et al.* **Selective isolation and characterization of primary cells from normal breast and tumors reveal plasticity of adipose derived stem cells.** Breast Cancer Res. v.18, n.1, 2016.

WERNER, B. *et al.* **Uso práctico da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica.** J Bras Patol Med Lab. v. 41, n. 5, p. 353-64, 2005.

WU, Huimin *et al.*, **The minimum volume of pleural fluid required to diagnose malignant pleural effusion: A retrospective study.** Lung India, v.34, n.1, p. 34–37, 2017.

WU, M. *et al.* **p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung.** Am J Clin Pathol. v.119, n.5, p.696-702, 2003.

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.

YAMAZOE, Masatoshi. **Simultaneous presence of lung adenocarcinoma and malignant pleural mesothelioma: A case report.** Respir Med Case Rep, v.26, p. 45–49, 2018.

YATABE Y. *et al.* **Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer.** J Thorac Oncoll, v.4, n.3, p. 377–407, 2019.

YE J. *et al.* **Combination of napsin-a and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. v.19, n.4, p.313-317, 2011.

ZAGO, M. A. *et al.* **Hematologia:** Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu, 2001.

ZAHA, D. C. **Significance of immunohistochemistry in breast cancer.** World J Clin Oncol v.5, n.3, p.382-392, 2014.

ZAMBONI, M.M.; JUNIOR, C.T.S.; BARETTA, R.; CUNHA, E.T.; CARDOSO, G.P. **Fatores prognósticos para a sobrevida dos pacientes com derrame pleural maligno.** Pulmão. Rio de Janeiro. v.25, n.1, p.43-52. 2016.

ZHANG, Xirong *et al.* **Differential diagnosis between benign and malignant pleural effusion with dual-energy spectral CT.** Plos One, v.13, n.4, 2018.

ZHENG, Min. **Classification and Pathology of Lung Cancer.** Surg Oncol Clin N Am v. 25, 447–468, 2016.

ZHOU L. *et al.* **New Dimensional Perspectives on Differential Diagnosis of Pleural Effusion.** Chin Med J v.131, n.18, p. 2257–2258, 2018.

## 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)3721-9206 Fax: (48)3721-9998 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 HEMOŞC E CEPON – FAHECE  
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 N° 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, 06 de Setembro de 2014.

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