

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO DE TUMORES NEUROEPITELIAIS PELA TÉCNICA DO ESFREGAÇO

LUIZ F. BLEGGI TORRES * — LUIZ MARTINS COLLAÇO **

RESUMO — Estudamos grupo de 198 casos de tumores neuroepiteliais com diagnóstico per-operatório feito pela análise citológica de esfregaços, comparando seus índices de acuidade com o diagnóstico final em cortes de parafina. Em 90,6% dos casos, o diagnóstico final obtido na parafina foi similar ao feito em esfregaços. No grupo de casos em que o diagnóstico citológico não foi confirmado pelos cortes em parafina, na maioria dos casos não foi afetada a conduta neurocirúrgica imediata, representando diferenças em graduação de astrocitomas e gliomas mistos. Os critérios citológicos nos principais grupos de tumores são apresentados, junto com as dificuldades para a interpretação deste método valioso para diagnóstico per-operatório.

PALAVRAS-CHAVE: tumores neuroepiteliais, diagnóstico citopatológico per-operatório, técnica do esfregaço.

Cytopathologic diagnosis of neuroepithelial tumours by the smear technique.

SUMMARY — We studied 198 cases of neuroepithelial tumours with intra-operative diagnosis made by smears comparing the accuracy rates with the final paraffin section diagnosis. In 90,6% of cases the final diagnosis obtained on paraffin preparations was similar to that made on smears. In the group of cases with cytological diagnosis not confirmed by paraffin sections the majority of cases were unlike to affect immediate neurosurgical management, and represent mainly differences in grading of astrocytomas and mixed gliomas. The cytological diagnostic criteria are discussed together with the main difficulties for the interpretation of this valuable approach to intra-operative neurosurgical diagnosis.

KEY WORDS: neuroepithelial tumours, intra-operative cytopathologic diagnosis, smear technique.

A utilização de esfregaços de tumores do sistema nervoso constitui excelente método diagnóstico per-operatório (biópsia de congelção), com elevados índices de acuidade diagnóstica^{5,10,15,18}. Esta técnica baseia-se na distensão de diminutos fragmentos teciduais entre duas lâminas, confeccionando-se película delgada de células. É utilizada em unidades neurocirúrgicas e neuropatológicas em diversos países^{4,7,15}. Nossa intenção é estimular colegas patologistas e neuro-oncologistas a adotarem este método diagnóstico, pela difusão dos principais pontos diagnósticos em cada tipo tumoral.

Trabalho realizado nas Unidades de Neuropatologia (*) e Citologia (**) dos Serviços de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR): * Professor Adjunto, Ph.D. em Neuropatologia; ** Professor Auxiliar.

Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres — Centro de Patologia de Curitiba - Rua Alcides Munhoz 433 - 80510 Curitiba PR - Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica do esfregaço é utilizada como método diagnóstico per-operatório em nosso Serviço desde 1987. Durante esse período, um total de 307 espécimes neurocirúrgicos foram analisados em consulta per-operatória, exclusivamente por preparações citológicas pela técnica do esfregaço¹⁸. Deste grupo, 198 casos (64,5%) representaram tumores de tecido neuroepitelial, de acordo com a nova classificação de tumores do sistema nervoso da Organização Mundial da Saúde¹⁹. Estes casos foram todos analisados pela técnica do esfregaço, que consiste na compressão de diminutos fragmentos teciduais, ao redor de 1 a 2 mm³, entre duas lâminas com pressão suficiente para, ao puxarmos a lâmina superior, configurar-se na lâmina de baixo delicada película celular. Pelo menos dois esfregaços de cada caso foram analisados.

Após a confecção dos esfregaços, estes são fixados em álcool absoluto por 30 segundos (2 trocas), lavados em água corrente por 10 segundos, corados em azul de toluidina a 1% aquoso (TOL.) por 30 segundos, lavados em água corrente, desidratados em álcool absoluto por 30 segundos (2 trocas). Após isto são clareados em xilol e montados em bálsamo. É importante que as lâminas sejam vigorosamente agitadas nas soluções fixativas e de lavagem, para remoção de resíduos líquidos inadequados. Após o diagnóstico per-operatório as lâminas são desmontadas, descoradas em álcool absoluto e recoradas pela técnica de Papanicolaou¹, para arquivo permanente. Em situações de dificuldade diagnóstica e pesquisa científica, utilizamos métodos imunocitoquímicos, pela técnica da avidina/biotina-peroxidase (ABV/DAB)³ para proteína glial ácida fibrilar (GFAP), proteína S-100, enolase neurônio específica, neurofilamento e vimentina (Dakopatts).

RESULTADOS E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Os critérios utilizados para diagnóstico de neoplasias neurogliais do sistema nervoso por preparações citológicas estão bem estabelecidos^{2,4,11,16,18}. Comentaremos pontos mais relevantes e algumas sugestões derivadas de nossa experiência pessoal¹⁶.

A. Tecido Encefálico Normal — Aspecto citológico variado, conforme sua origem topográfica. Amostras telencefálicas corticais (Fig. 1) demonstram neurônios com formato piramidal, núcleos vesiculosos com nucléolos proeminentes. Astrócitos são células com núcleos ovalados e discretamente vesiculosos, cromatina delicada e clara; oligodendrócitos têm aspecto linfocitóide, cromatina densa e são menores que astrócitos. Micróglia é representada por células alongadas e bastonetóides, sendo raras em tecido normal e geralmente indicando situações reativas infecciosas do sistema nervoso. Vasos sanguíneos capilares têm aspecto filiforme delicado, endotélio uniforme. Vasos fibro-musculares possuem diâmetros maiores, porém com endotélio delicado e sendo visíveis os núcleos de células da camada muscular, dispostos transversalmente ao eixo longitudinal vascular. Todos estes elementos citológicos estão distribuídos aleatoriamente, de maneira que a celularidade é baixa, polimórfica e harmônica. Em amostras da substância branca predominam oligodendrócitos e vasos fibro-musculares. Amostras cerebulares demonstram células de Purkinje similares aos neurônios piramidais, porém observando-se ainda neurônios da camada granular, que apresentam citoplasma escasso, núcleos redondos com cromatina densa, regular e uniforme. Demais células com características similares às descritas anteriormente.

B. Astrocitoma (n=44) — Demonstram tufo de células neoplásicas, geralmente envolvendo vasos sanguíneos. Esta relação com vasos deriva do íntimo contacto de pés astrocitários normais à parede vascular na barreira hêmato-encefálica. Estes vasos são pouco proliferados e mantêm, por vezes, aspecto próximo do normal. A celularidade do tumor é baixa e monótona, composta predominantemente de astrócitos com discreto pleomorfismo. Os núcleos são vesiculosos, ovalados ou reniformes com cromatina frouxa e salpicada, sem mitoses (Fig. 2). A carioteca apresenta focos de espessamento e indentações. Há fundo fibrilar delicado, metacromático ao azul de toluidina e refringente, se observado sob luz polarizada (Fig. 3). Este fundo é intensamente positivo para proteína glial ácida fibrilar por métodos imunocitoquímicos¹, representando o citoplasma astrocitário rico neste filamento intermediário (Fig. 4). Alguns casos podem suscitar dúvidas diagnósticas, com estados de gliose reacional em que notamos, porém, proliferação astrocitária normal e não neoplásica, com astrócitos tendo núcleos regulares e citoplasma estrelado, misturados a outros tipos celulares normais como oligodendroglia e neurônios, o que não é visto em situações neoplásicas. Tais focos de gliose são comuns na periferia de infartos, abscessos ou craniofaringiomas e merecem especial cuidado diagnóstico para sua distinção de tumores neurogliais, sendo recomendado correlação clínico-tomográfica para melhor interpretação.¹⁵

C. Astrocitoma Anaplásico (n=19) e Glioblastoma (n=64) — São neoplasias astrocitárias malignas que apresentam aspectos citológicos similares. Observam-se vasos sanguíneos prolife-

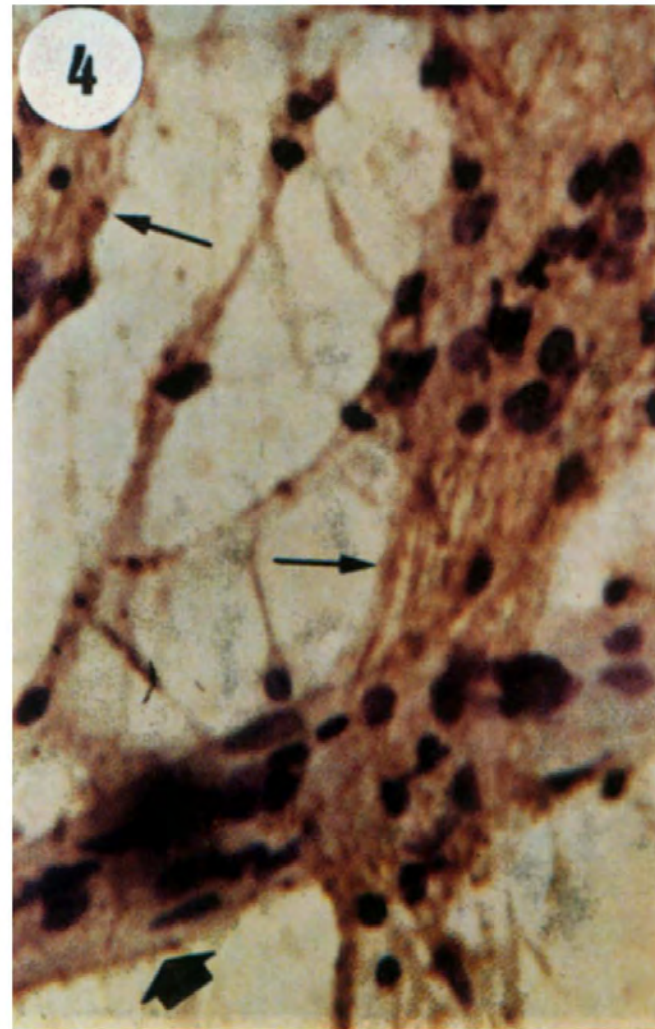
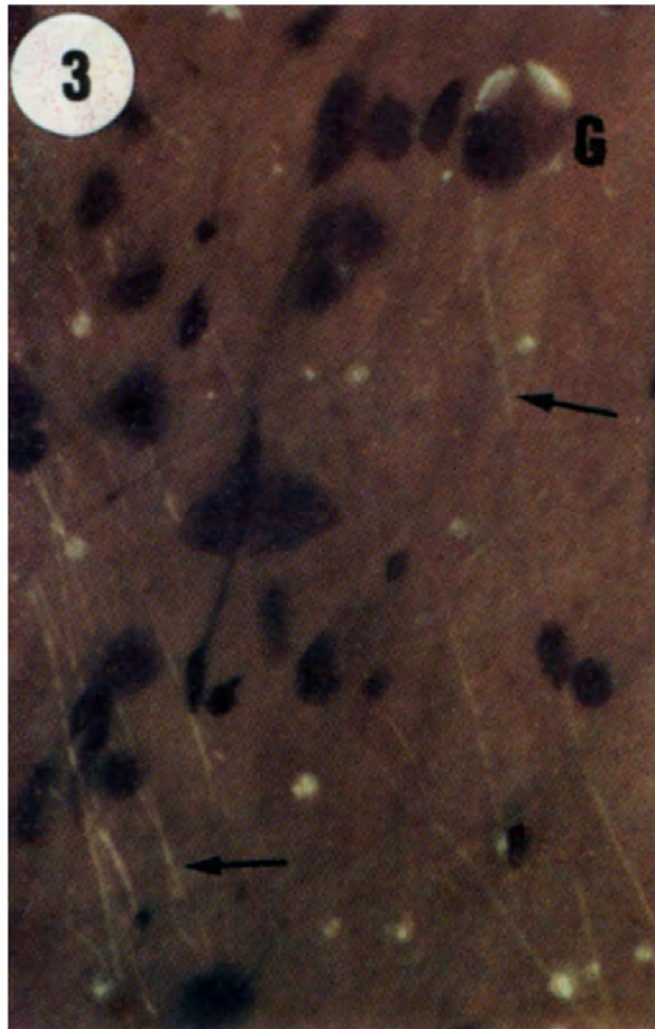
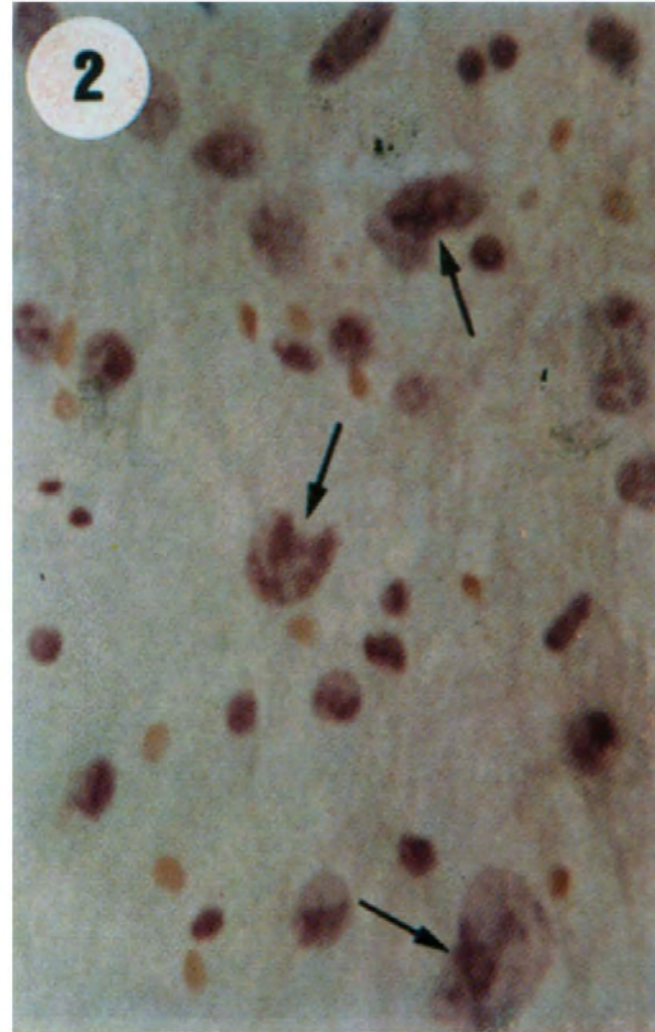
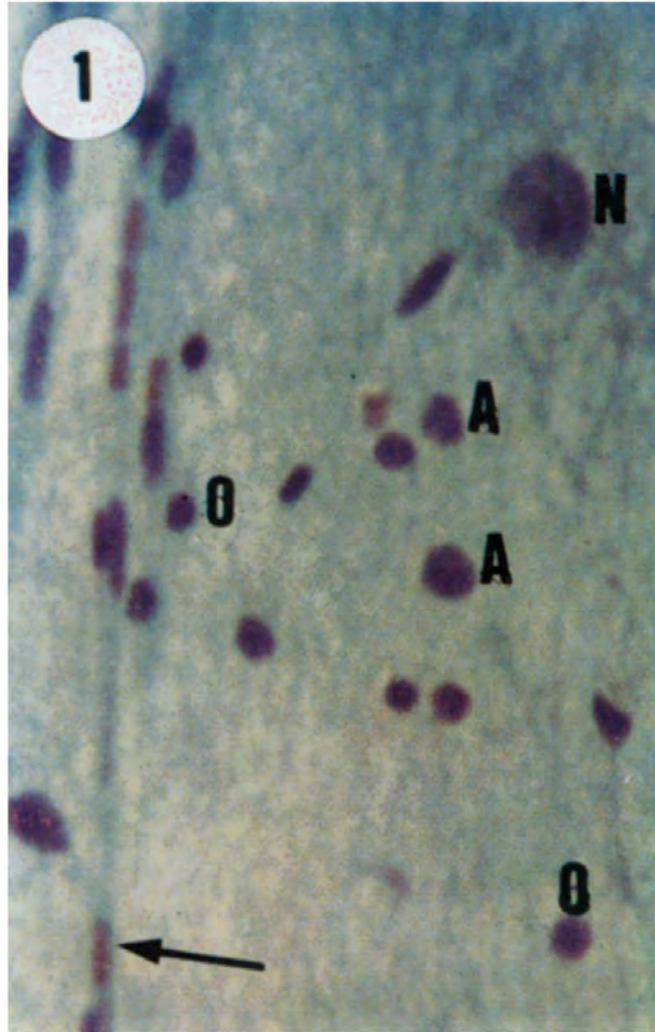


Fig. 1. Esfregaço de tecido cerebral normal com vasos capilares (seta), celularidade variada e polimorfa: neurônios (N), astrócitos (A) e oligodendrócitos (O). TOL, X400.

Fig. 2. Astrocitoma com moderado pleomorfismo nuclear, carioteca indentada (setas), cromatina salpicada e frouxa. Fundo fibrilar. Papanicolaou, X400.

Fig. 3. Astrocitoma anaplásico sob luz polarizada demonstrando refringência delicada das fibrilas glias metacromáticas (setas), bem como astrócito gemistocítico (G). TOL, X400.

Fig. 4. Imunocitoquímica para GFAP com positividade em citoplasma astrocitário e fundo fibrilar, representados por precipitado acastanhado (seta fina). Vaso sanguíneo negativo (seta grossa). AVB/DAB, X400.

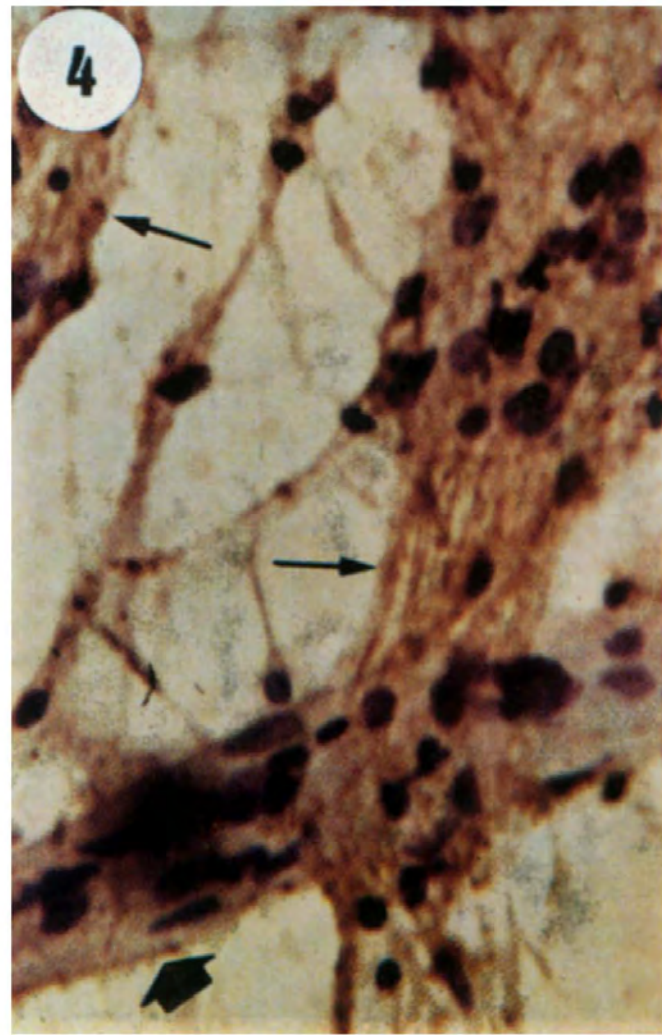
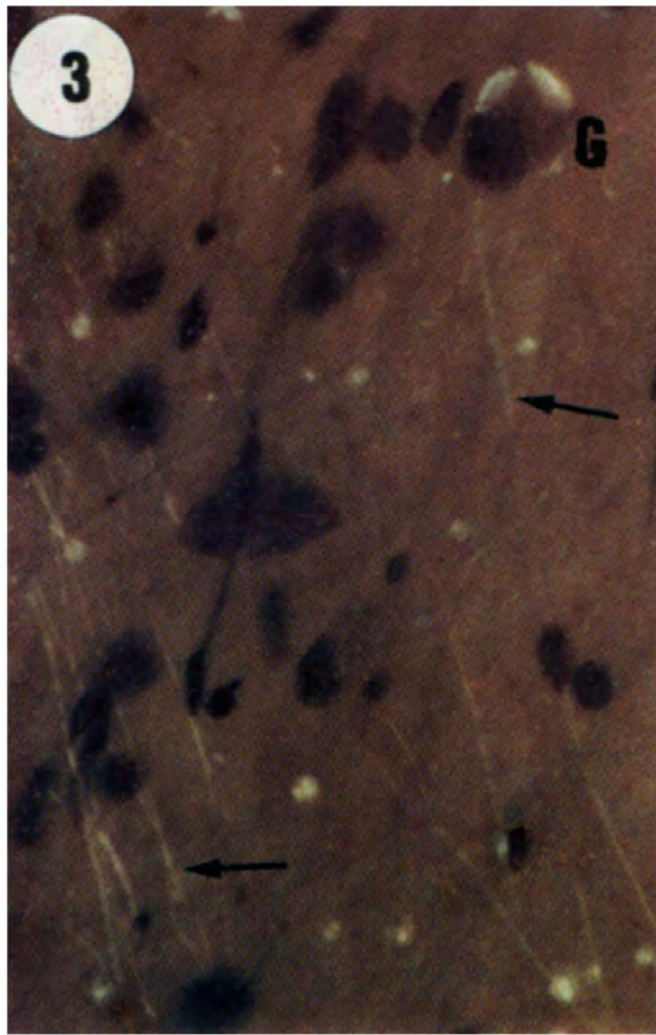
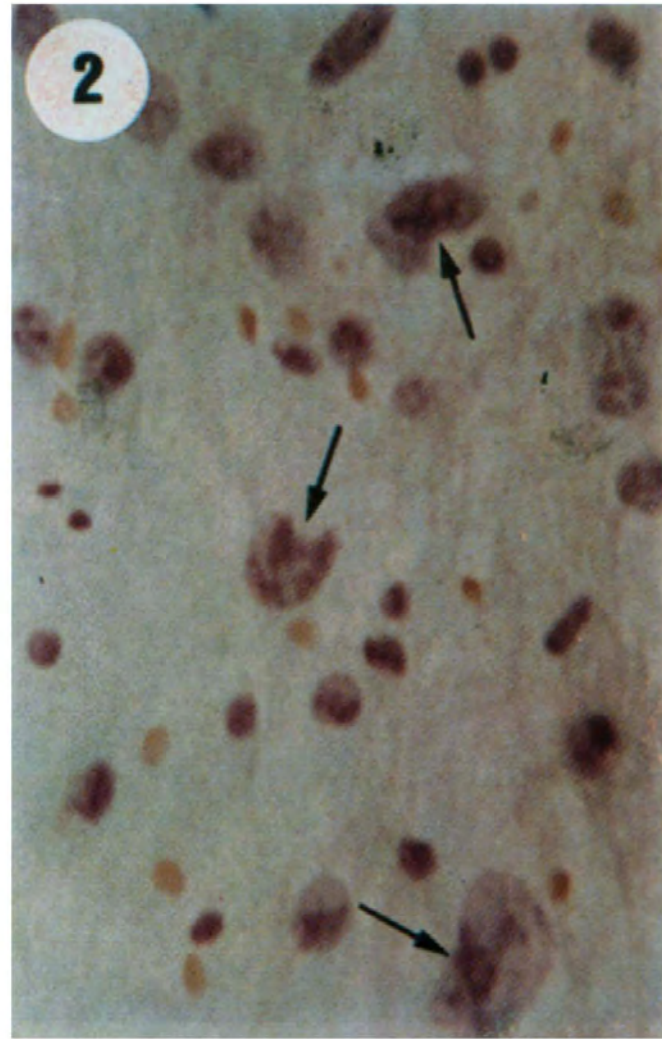
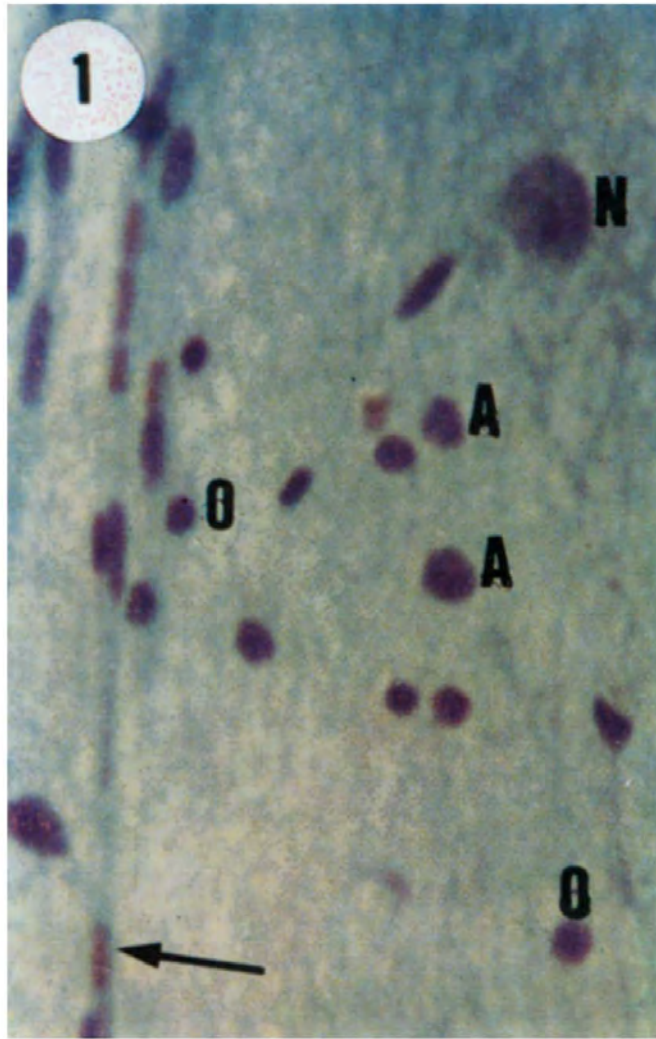


Fig. 1. Esfregaço de tecido cerebral normal com vasos capilares (seta), celularidade variada e polimorfa: neurônios (N), astrócitos (A) e oligodendrócitos (O). TOL, ×400.

Fig. 2. Astrocitoma com moderado pleomorfismo nuclear, carioteca indentada (setas), cromatina salpicada e frouxa. Fundo fibrilar. Papanicolaou, ×400.

Fig. 3. Astrocitoma anaplásico sob luz polarizada demonstrando refringência delicada das fibrilas gliais metacromáticas (setas), bem como astrócito gemistocítico (G). TOL, ×400.

Fig. 4. Imunocitoquímica para GFAP com positividade em citoplasma astrocitário e fundo fibrilar, representados por precipitado acastanhado (seta fina). Vaso sanguíneo negativo (seta grossa). AVB/DAB, ×400.

rados e com aspecto glomerulóide, apresentando endoteliose exuberante, envoltos por tufo de células neoplásicas (Fig. 5). Esta proliferação vascular-endotelial deriva da produção, pelas células neoplásicas, de fatores de proliferação de vasos, entre os quais o fator angiogênico tumoral, que estimulam o crescimento anormal da vascularização neoplásica nestas situações de neoplasias astrocitárias malignas.¹⁴ As células neoplásicas apresentam grande anaplasia, com cromatina grosseira e mitoses. Em casos de glioblastoma observa-se ainda presença de focos de necrose tumoral, representados por restos celulares necróticos e exsudato neutrofilico permeando o tumor (Fig. 6). Casos de glioblastoma de células gigantes demonstram, além dos elementos já mencionados, inúmeras células bizarras com cromatina grosseira e dimensões enormes. Estes elementos gigantes parecem não representar as células com maior atividade proliferativa e agressividade biológica, como mostram estudos com anticorpo Ki-67, sendo somente formas em regressão^{9,14}.

D. Meduloblastoma (n=20) — São tumores primitivos neuroectodérmicos originados da camada granular fetal cerebelar e que se caracterizam por afetar a fossa posterior de crianças e adultos jovens¹⁸. Preparações citológicas demonstram lençol ricamente celular, composto por células monótonas e relativamente uniformes, citoplasma inaparente, distribuídas ao acaso e não relacionadas a vasos sanguíneos. Por vezes, observam-se cordões celulares ou esboço de estruturas rosetiformes. Os núcleos são hipercromáticos, redondos ou ovais, com carioteca espessa e ocasionais mitoses. Focos de citólise individual também são geralmente vistos. Grande cuidado deve ser tomado para não confundir as células tumorais com neurônios granulares normais que, por vezes, podem vir com a amostra e estão geralmente misturados a outros elementos gliais e neuronais normais.

E. Ependimoma (n=12) — Demonstram íntima relação entre as células neoplásicas e vasos sanguíneos, com presença de inúmeras pseudo-rosetas perivascularares. As células ependimárias neoplásicas têm citoplasma fibrilar radiado, núcleos uniformes, ovalados ou goticulares (Fig. 7). Cromatina regular e densa. Ocasionalmente mitoses e vasos sanguíneos com endotélio pouco proliferado. Rosetas verdadeiras permitem o diagnóstico de certeza, porém são de difícil caracterização. Nas formas malignas os ependimomas apresentam maior celularidade com atipias nucleares, focos de necrose e proliferação vascular. Ependimomas mixo-papilares, encontrados geralmente na região de cauda equina, são compostos por eixo central hialino, amorfo e metacromático ao azul de toluidina, circundados por células ependimárias em arranjo radiado.

F. Oligodendroglioma (n=6) — Neoplasias de difícil caracterização ao esfregaço, visto que apresentam lençóis celulares monótonos onde os limites citoplasmáticos são evidenciáveis dando, por vezes, aspecto similar ao visto em preparações histológicas, com halo claro perinuclear. Os núcleos são redondos, regulares, com cromatina delicada e massas nucleolares discretas. Ocasionalmente mitoses. Carioteca delicada. Focos de calcificação por vezes presentes (Fig. 8). Em áreas, nota-se septação dos ninhos celulares por trama vascular. Em casos malignos haverá necrose e proliferação vascular. Cuidado em separar esta entidade de ependimomas de células claras deve ser tomado⁸.

G. Demais lesões neuroepiteliais menos freqüentes — Neste grupo encontram-se casos de diagnóstico citopatológico mais difícil, devido a raridade e peculiaridade quanto a topografia e dados clínicos destas lesões. **Astrocitomas subependimários de células gigantes:** Afetam principalmente ventrículos laterais, determinando hidrocefalia e relacionam-se a esclerose tuberosa¹⁴. Preparações citológicas demonstram aspecto característico, representado por células grandes e piramidais com citoplasma amplo e núcleos ovalados ou vesiculosos, com nucléolos por vezes evidentes. Há íntima relação com vasos sanguíneos, notando-se inúmeras pseudo-rosetas perivascularares. Estas células lembram neurônios e astrócitos gemistocíticos e parecem derivar de células gliais displásicas, com potencial de diferenciação ao longo de ambas as linhagens^{14,18}. **Astrocitoma pilocítico:** Origina-se em região hipotalâmica e cerebelo de pacientes jovens. Em preparações citológicas se caracteriza por aspecto fibrilar difuso, núcleos discretamente alongados e com cromatina delicada, porém salpicada com focos discretos de reforço cariotecal. Ausência de mitoses. Especial cuidado deve ser dado em não exercer muita pressão na hora da confecção dos esfregaços; caso contrário, será induzido aspecto «pseudo-pilocítico» às células, as quais, porém, mostram compressão e estiramento nuclear, impossibilitando análise adequada. **Gliomas mistos:** São reconhecidamente foco de dificuldade diagnóstica em preparações citológicas, porém não afetando a conduta neurocirúrgica imediata¹⁸. Devem ser sempre lembrados em casos de oligodendrogliomas, pois estes tumores são, na maioria das vezes, gliomas mistos tipo oligo-astrocitomas. **Papilomas de plexo coróide:** São lesões que acometem ventrículos laterais de crianças com eixo conjuntivo e vascular revestido por células epiteliais cúbicas, com citoplasma mediano e núcleos ovais com cromatina delicada. Este aspecto assemelha-se muito ao de plexo coróide normal, devendo-se ter cuidado para confirmar este

diagnóstico. Em casos malignos há alteração na relação núcleo/citoplasma com atipias, mitoses, alterações cromatínicas e necrose. Tumores embrionários, incluindo meduloblastoma, neuroblastoma, ependimoblastoma e retinoblastoma. Afetam topografia específica e têm aspecto citológico de neoplasia maligna de células pequenas, similar ao meduloblastoma. Dados clínicos e correlação tomográfica são indispensáveis à conclusão diagnóstica.

COMENTARIOS

O tratamento adequado de tumores neuroepiteliais depende de sua localização, tamanho e tipo histológico. Técnicas tomográficas e de ressonância magnética permitem altos índices de detecção desses tumores, porém o exame anátomo-patológico da peça neurocirúrgica ainda é mandatório para a definição do tipo histológico e consequente terapêutica complementar¹¹. A técnica do esfregaço com análise citopatológica é importante adjuvante no diagnóstico de lesões obtidas por estereotaxia e representadas, na maioria das vezes, por pequenos fragmentos teciduais de difícil manuseio técnico por métodos histológicos convencionais. Além disto, a análise citopatológica de tumores fornece informações valiosas e rápidas, com alto índice de acerto diagnóstico em consultas per-operatórias^{2,11,15,17,18,20}.

Na presente série de casos de tumores de linhagem neuroepitelial tivemos concordância diagnóstica, entre a preparação citológica e o material de biópsia incluído em parafina, em 90,4% dos casos (Tabela 1). Entretanto, detectamos diferença diagnóstica citopatológica em 19 casos (9,6%), porém sem implicação direta na conduta neurocirúrgica, visto que se tratavam de astrocitomas, com graduação histológica inadequada, devido à pouca representatividade do material recebido para esfregaço (n=8), gliomas mistos nos quais só se valorizou um tipo citopatológico (n=6) e tumores neuroepiteliais com tipo histológico erroneamente classificado ao esfregaço, porém com critério de malignidade corretamente estabelecido (n=5)¹⁸.

Tabela 1. Diagnósticos citológicos de tumores neuroepiteliais confirmados pela parafina. Valores percentuais relacionados ao número total de casos estudados (n = 307).

Diagnóstico final	Número de casos	Porcentagem geral
Glioblastoma	64	21,0
Astrocitoma	44	14,3
Meduloblastoma	20	6,5
Astrocitoma anaplásico	19	6,2
Ependimoma	12	4,0
Oligodendroglioma	6	2,0
Glioma misto	5	1,6
Papiloma plexo coróide	3	1,0
Carcinoma plexo coróide	2	0,6
Pinealocitoma	2	0,6
PNET	1	0,3
Astrocitoma subependimário	1	0,3
Total	179	58,3%

Outros autores detectaram índices de correlação semelhantes, oscilando de 87,5 a 95%, incluindo além de tumores neuroepiteliais os tumores meníngeos e de nervo periférico^{11,15}. Entre os principais fatores de erro relatados estão a presença de processos inflamatórios atípicos, frequentes hoje em dia devido ao crescimento do número de pacientes com neuro-AIDS^{6,12}, bem como a pouca representatividade tumoral na amostra colhida¹³.

Finalmente, gostaríamos de entatizar que a utilização da técnica do esfregaço para análise per-operatória de neoplasias do sistema nervoso apresenta inúmeras vantagens, incluindo: (1) rapidez e confiabilidade; (2) ser adequada para espécimes pequenos obtidos em estereotaxia; (3) baixo custo operacional; (4) propiciar preparações permanentes para arquivamento e para estudo imunocitoquímico complementar;

(5) apresentar baixa incidência de falso positivo; (6) permitir ao patologista grande mobilidade, por não necessitar de micrótomo de congelação ou criostato para execução de consultas per-operatórias.

Agradecimentos — Os autores agradecem os demais patologistas e neurocirurgiões de ambos os hospitais, pelo auxílio na coleta dos casos, bem como os técnicos e citotécnicos, pela confecção do material.

REFERÊNCIAS

1. Bancroft J, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1982, p 332-363.
2. Bekerley BB, Adams JH, Doyle D, Graham DI, Harper CG. The smear technique in the diagnosis of neurosurgical biopsies. NZ Med J 1978, 87:12-15.
3. Bibbo M. Comprehensive Cytopathology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991.
4. Burger PC. Use of cytological preparations in the frozen section diagnosis of central nervous system neoplasia. Am J Surg Pathol 1985, 9:344-354.
5. Cahill EM, Hidvegi DF. Crush preparations of lesions of the central nervous system: a useful adjunct to the frozen section. Acta Cytol 1985, 29:279-285.
6. Gray F, Gherardi R, Scaravilli F. The neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): a review. Brain 1988, 111:245-266.
7. Hume Adams J, Grahman DI, Doyle D. Brain Biopsy: The Smear Technique for Neurosurgical Biopsies. London: Chapman and Hall, 1981, p 2-124.
8. Kawano N, Yade K, Aihara M, Yashigita S. Oligodendroglioma-like cells (clear cells) in ependymoma. Acta Neuropath (Berlin) 1983, 62:141-145.
9. Kepes JJ. Review of the WHO's new proposed classification of brain tumors. Annals of the XIth International Congress of Neuropathology, Kyoto, 1990, p 6.
10. Marshall LF, Adams JH, Doyle D, Graham DI. The histological biopsies. J Neurosurg 1973, 39:82-88.
11. Mouriquand C, Benabid AL, Breyton M. Stereotaxic cytology of brain tumours: review of an eight-year experience. Acta Cytol 1986, 31:756-764.
12. Navia BA, Petito CK, Gold JWM, Cho E-S, Jordan BD, Price RW. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. Ann Neurol 1986, 19:224-238.
13. Ostertag CB, Mennel HD, Kiesling M. Stereotactic biopsy of brain tumours. Surg Neurol 1980, 14:275-283.
14. Russell DS, Rubinstein LJ. Pathology of Tumours of the Nervous System. Ed5. London: Edward Arnold, 1989.
15. Taratuto AL, Sevelev G, Piccardo P. Clues and pitfalls in stereotaxic biopsy of the central nervous system. Arch Pathol Lab Med 1991, 115:596-602.
16. Torres LFB. Citopatologia do sistema nervoso: critérios diagnósticos para análise de esfregaços de tumores do sistema nervoso. XIII Congresso Brasileiro de Citopatologia, 1991.
17. Torres LFB, Almeida R, Avila S, Alessi S, Freitas R. Brains tumours in South Brazil: a retrospective study of 438 cases. Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo) 1990, 48:279-285.
18. Torres LFB, Collaço LM. Análise citológica per-operatória de lesões do sistema nervoso central e periférico. Anais do XVIII Congresso Latino Americano de Patologia 1991, 1:101 (Abst).
19. World Health Organization. Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System. Geneva: WHO, 1991.
20. Zhang YX, Luo KS, Liv JC, Chen Y, Chen YH, Lai RS. Cytological diagnosis of 500 cases of intracranial tumors during craniotomy. Chinese J Clin Cytol 1987, 3:19-27.