

CONTAGEM ESPECÍFICA DE CÉLULAS DO LÍQUIDO CÉFALO RAQUIDEANO EM CÂMARA USANDO COLORAÇÃO SUPRAVITAL

SYDNEY F. DE MORAES-RÊGO * — ANA LUCILA RODRIGUES **
KATIA G. DE MORAES-RÊGO **

RESUMO — Os autores adaptaram ao estudo da citologia do LCR o líquido diluidor de Anguiano e Ancira, proposto para realização do hemograma em câmara de contagem. O procedimento técnico varia conforme o aspecto do LCR e de acordo com o número global de células. A morfologia das células à técnica de coloração supravital (TCSV) é descrita pormenorizadamente. Utilizando a técnica de Moraes-Rêgo e Fernandes os autores determinaram os desvios padrões para cada tipo de células e tabularam o percentual de células determinado na lâmina corada em cada caso. Demonstraram que os valores obtidos pela TCSV caíram dentro dos limites de tolerância calculados sendo, portanto, os valores das contagens equivalentes aos encontrados nas contagens feitas em lâminas, tomadas, estas, como padrão. Com a experiência adquirida durante 5 anos de utilização da TCSV, os autores a recomendam como técnica de eleição para a contagem diferencial da célula do LCR.

Specific count of cerebrospinal fluid cells in counting-chamber using supravital staining.

SUMMARY — The authors adapted to the cerebrospinal fluid (CSF) the staining technic developed by Anguiano and Ancira to perform differential leucocyte counts in the counting chamber. The formula they used is the following: methyl alcohol 1 ml, distilled water 2 ml. To this mixture are added: 6 drops of Leishman stain filtered in Whatman paper number 42; toluidine blue 0.25% aqueous solution (filtered in the same manner), 1 drop; acetate buffer 0.1 M, pH 5.4, 1 drop. The technic varies according to the intensity of pleocytosis. If the CSF is turbid or contains more than 100 cells per c.m. 1 drop is dripped in the bottom of a 10X75 test tube and then 2 drops of the staining fluid are added; the mixture is then shaken; after one or two minutes 1 drop is placed in the Fuchs-Rosenthal counting chamber. If the number of total cells is less than 100 per c.m. (Table 1), different CSF volumes are centrifuged at the rate of 2000r.p.m., during 6 minutes; the supernatant fluid is poured off and the sedimented cells are suspended in 2 drops of the staining fluid. The morphology of the cells as they appear after they are stained by the supravital staining technic (SVST) is described and illustrated in photomicrographies. By using the technic described by Moraes-Rêgo and Fernandes the authors enumerated the first 200 cells encountered in each of 10 smears of the same samples of CSF containing 450 cells per c.m., and calculated the standard deviation (SD) for each (Table 2). In another experiment they counted 200 cells in 10 samples of CSF with different levels of pleocytosis, by both technics. By applying the SD to the cell counts in stained smears they determined the acceptable superior and inferior limits for each count (Table 3). There one verifies that the corresponding counting by SVST fell between the maximum and minimum acceptable values. With the experience acquired in 5 years of intensive countings by the SVST the authors consider this technic the most adequate for differential counts of leucocytes in the CSF.

«Sidney F. de Moraes-Rêgo — Patologia Clínica e Hematologia»: * Médico; ** Farmacêutica-Bioquímica, Seção de LCR; *** Médica Residente (Faculdade Federal de Biomedicina, Uberlândia MG).

Dr. Sydney F. de Moraes-Rêgo — Rua Américo Brasiliense 284, 3º andar - 14100 Ribeirão Preto SP — Brasil.

A contagem global de células do líquido céfalo raquideano (LCR) não apresenta maiores dificuldades técnicas, podendo ser feita em amostras da ordem de 20 microlitros. Já a contagem específica, realizada sobre sedimento corado, esbarra com limitações às vezes intransponíveis. Tais limitações referem-se a pequenos volumes da amostra disponível e a pleocitoses de pequena monta. As dificuldades técnicas atingem seu grau máximo quando estas duas condições se associam. Considerando-se que a centrifugação, especialmente se realizada mais de uma vez no mesmo material, e a transferência das células sedimentadas para a lâmina de coloração são procedimentos traumatizantes, que levam à destruição de grande número delas, seria altamente desejável que se pudesse utilizar uma técnica de coloração a fresco, que permitisse o reconhecimento dos vários tipos de células do LCR em preparações úmidas, sem prévia centrifugação. Nos casos de amostras com discreto aumento de células, não sendo possível a coloração direta, uma única centrifugação seria desejável. Em nosso laboratório, usando o líquido diluidor proposto por Anguiano e Ancira¹ para a realização do hemograma em câmara de contagem e fazendo adaptações específicas para o estudo da citologia do LCR, conseguimos testar aquela hipótese de trabalho, tornando-a exequível na prática. Nossa experiência com a técnica de coloração supravital (TCSV) na contagem diferencial das células do LCR vem-se acumulando por mais de 5 anos, com excelentes resultados.

No presente estudo descrevemos os diferentes passos dessa técnica, desde a preparação dos reagentes até às adaptações feitas, de acordo com a intensidade da pleocitose do LCR e referimos os parâmetros estatísticos que forneceram o grau de confiabilidade exigido para que a adotássemos na rotina de nosso laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS. RESULTADOS

A. Reagentes — 1. Líquido diluidor de A/A (corante) — álcool metílico p.a. 1ml, água destilada 2ml; a esta mistura juntar 6 gotas da solução «stock» do corante de Leishman previamente filtrado em papel Whatman 42; acrescentar 2 gotas da solução aquosa de azul de toluidina a 0,25%, também filtrada; misturar; juntar 1 gota do tampão de acetato 0,1M, pH 5,4-5,5; conservar à temperatura ambiente. 2. Tampão de acetato — ácido acético glacial 0,8ml, acetato de sódio 7,06g; dissolver em água destilada o acetato; juntar o ácido acético; acertar o pH a 5,4-5,5, potenciometricamente; completar 1000ml com água destilada; conservar em geladeira.

B. Técnica de coloração supravital — O procedimento varia, conforme o aspecto do LCR: 1. LCR turvo — pingar 1 gota no fundo de tubo de hemólise (10X75) e acrescentar 2 gotas do corante A/A; agitar; preencher um dos lados da câmara de Fuchs-Rosenthal; esperar 1 a 2 minutos; identificar e contar as células. Nos casos de LCR turvo a mesma preparação serve para a contagem global e específica; o resultado da contagem global será multiplicado por 3, para corrigir a diluição inicial (1:3). 2. LCR límpido — procede-se inicialmente à contagem global de suas células carregando-se a câmara com LCR puro; a orientação será diferente conforme a contagem global se apresente superior ou inferior a 100 células/mm³, assim: (a) contagem global superior a 100 células/mm³ — proceder como no caso de LCR turvo; (b) contagem global inferior a 100 células/mm³ — Centrifugar volumes variáveis de LCR (Tabela 1) em tubo de hemólise, a cerca de 2000 r.p.m. por 6 minutos; decantar o sobrenadante para outro tubo e pingar 2 gotas do corante no tubo com o sedimento; agitar para ressuspender as células; encher a câmara e contar após 1-2 minutos. 3. LCR acidentalmente hemorrágico — se o LCR apresentar leve hemorragia como por acidente de punção e leucócitos abaixo de 100/mm³, havendo portanto necessidade de centrifugação, proceder do seguinte modo: (a) após a contagem direta em câmara, centrifugar volume de LCR indicado na tabela 1, correlacionado ao número de leucócitos/mm³; decantar o sobrenadante e pingar 2 gotas do corante sobre o sedimento; aguardar cerca de 1-2 minutos, após agitação; (b) pingar 1 gota do líquido de Türk, usado para contar leucócitos, no mesmo tubo; agitar e preencher a câmara de contagem; as hemácias desaparecem e os leucócitos são facilmente identificáveis.

C. Técnica para a obtenção de esfregaços das células do LCR — Usamos em nosso laboratório a técnica de Moraes-Rêgo e Fernandes⁵, cujo princípio se baseia na obtenção de esfregaços suficientemente finos, que secam quase instantaneamente sobre lâminas, a fim de que a estrutura celular seja conservada.

D. Morfologia das células do LCR em preparações coradas a fresco — Na descrição que se faz a seguir são referidos os aspectos discriminativos de cada tipo celular obtidos com microscópio Zeiss, usando-se 250 aumentos (ocular 10X, objetiva 25X Plan) e câmara

Células por mm ³	Volume de LCR a centrifugar	Tipo de célula	Desvio padrão
100 ou >100	zero	Neutrófilo	3,60 %
75 a 90	1,0 ml	Linfócito	3,00 %
50 a 70	1,5 ml	Monócito	2,40 %
30 a 45	2,0 ml	Eosinófilo	0,50 %
10 a 30	3,0 ml	Basófilo	0,75 %
4 a 10	4,0 ml	Plasmócito	0,75 %

Tabela 1 — Relação entre a contagem global de células do LCR e o volume mínimo a ser centrifugado.

Tabela 2 — Desvios padrões determinados sobre 10 contagens de amostras de LCR em lâmina corada pelo Leishman.

de Fuchs-Rosenthal, montada com laminula fina. As observações foram feitas entre 1 e 5 minutos após a coloração. Ressalte-se que todos os aspectos morfológicos tendem a se acentuar com o decorrer do tempo.

a. Neutrófilos — Apresentam-se como pequenas formações arredondadas, outras vezes grosseiramente retangulares, de ângulos rombos, com citoplasma apresentando granulações finas que, no conjunto, conferem tonalidade ligeiramente verde-maçã à célula. O núcleo, em células bem conservadas, é nítido, lobado ou não, de cor arroxeada. Em outras preparações nota-se apenas o contorno dos lobos dos núcleos ou, então, a célula lembra o aspecto de um cisto de ameba: pequenos círculos que se amoldam entre si. Esta imagem ocorre quando os lobos do núcleo se unem no centro da célula e são visualizados em visão frontal, como se vistos a partir da sua porção mais dilatada (vide célula do meio, na foto 1). Em processos inflamatórios de evolução crônica os grânulos são raros, agrupados em pequena área de um citoplasma hialino (Fotos 1, 2 e 3).

b. Linfócitos — São células menores que os neutrófilos, com halo hialino de citoplasma e núcleo que em geral o ocupa quase inteiramente, de aspecto vesiculoso, já que só a membrana nuclear vem demarcada. Observam-se freqüentemente nucléolos. Podem apresentar tamanhos variáveis, mas a relação núcleo-citoplasmática é sempre próxima de 1. (Fotos 1, 2, 3, 4 e 7).

c. Monócitos — São células maiores que os linfócitos e facilmente identificáveis quando apresentam morfologia semelhante à dos monócitos do sangue periférico: células maiores que os neutrófilos, com citoplasma hialino ou fracamente azulado, com núcleo grande, reniforme, lobado ou arredondado, em geral com nucléolo. O núcleo é bem demarcado nos seus contornos mas, geralmente, é tenuamente corado. Outras vezes estas células são de porte menor, muito semelhantes aos linfócitos. O critério que adotamos para sua identificação como monócito é o halo citoplasmático bem mais abundante que o do linfócito. Duas células podem ter núcleos praticamente iguais: identificamos como monócitos aquela que tiver citoplasma mais evidente que o da maioria dos linfócitos, que é quase sempre um halo apenas (Fotos 6 a 7).

d. Eosinófilos — São facilmente identificáveis; seu porte é igual ou ligeiramente menor que o do neutrófilo. Apresentam inclusões características, grosseiras, às vezes em forma de pequenos grânulos ou de bastonetes curtos, cor de fumo, castanho-amarelado claro, que tende a se tornar castanho-escuro e até preto com o passar do tempo, por intensificação da coloração. Neste estágio a célula assume aspecto característico: núcleo claro, citoplasma hialino com uma área justa-nuclear negra, contendo grânulos compactados (Foto 5). Decorridos cerca de 3 minutos de coloração, pode-se suspeitar de eosinofilia no LCR já em exame feito com a objetiva panorâmica: algumas células têm citoplasma mais escuro que as demais. A confirmação é feita ao grande aumento (Fotos 4 e 5).

e. Plasmócitos — Célula de fácil identificação, pois guarda na coloração supravital as características do plasmócito sangüíneo. Apresenta-se como célula de vasto citoplasma, sem grânulos, que se tingem em azul claro ou mais escuro, conforme o tempo de coloração, com núcleo vesiculoso, freqüentemente com barras de cromatina no seu interior. Nos casos de intensa plasmocitose do LCR, temos visto células arredondadas, do porte de monócitos, com núcleo vesiculoso, com nucléolos e halo citoplasmático que se coram em azul claro, as quais temos identificado como imunoblastos (Fotos 3 e 8).

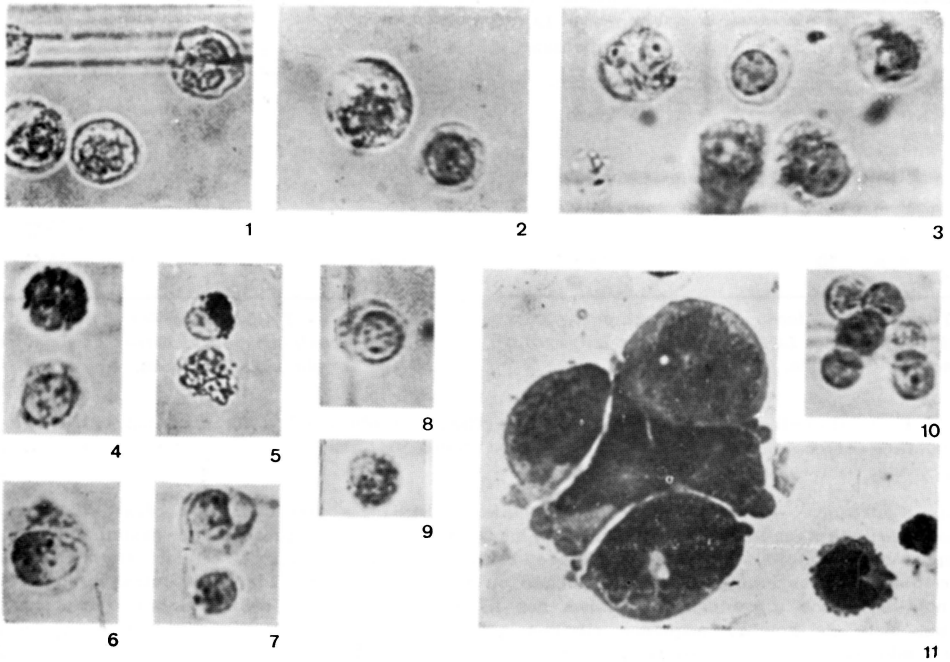


Fig. 1 — Microfotografias de células do LCR (788X). 1. Neutrófilos: observar os diferentes aspectos dos núcleos; um linfócito encontra-se sobre o retículo da câmara (TCSV). 2. Neutrófilo e linfócito: observar o tamanho das células e núcleos (TCSV). 3. Neutrófilo, linfócito e três plasmócitos (TCSV). 4. A célula acima é eosinófilo: notar cor escura e grânulos grosseiros (TCSV). 5. A célula situada inferiormente é um eosinófilo típico, com grânulos grosseiros; a célula acima é um eosinófilo com grânulos acumulados em área do citoplasma (TCSV). 6. Monócito típico: célula maior que o linfócito com vasto citoplasma e núcleo claro proporcional (TCSV). 7. Monócito com vacúolo e linfócito (TCSV). 8. Plasmócito: notar halo citoplasmático em crescente, mais escuro; neste caso a cromatina não é tão grosseira; comparar com a foto 3 (TCSV). 9. Basófilo: célula menor que o eosinófilo, com granulações metacromáticas (TCSV). 10. Grupo típico de células neoplásicas (TCSV). 11. Células neoplásicas agrupadas (coloração de Giemsa, após sedimentação em câmara de Köhler). TCSV, técnica de coloração supravital.

f. Basófilos — Estas pequenas células são identificadas com surpreendente facilidade: têm o núcleo vesiculoso e, no citoplasma azulado, agrupam-se grânulos metacromáticos azul-arroxeados que têm tendência a ocupar área restrita do citoplasma (Foto 9).

g. Macrófagos — Apresentam-se como células volumosas, às vezes em sinete, outras vezes com vasto citoplasma contendo «debris» celulares, como ocorre na evolução das hemorragias; outras vezes aparecem agrupadas. Têm nucléolos evidentes e confundem-se freqüentemente com células neoplásicas.

h. Células neoplásicas — Apresentam-se geralmente em grupos, mas podem ocorrer isoladas, como nas meningites carcinomatosas. Deve-se levantar a suspeita de neoplasia toda vez que se encontrarem no exame com coloração supravital células de grande porte, isoladas ou agrupadas, com nucléolos gigantes (Foto 10). O material deve ser examinado, então, em esfregaço corado, após centrifugação 5 ou sedimentação em câmaras apropriadas, tipo Köhler³, ou citocentrífuga (Foto 11).

E. Comparação entre a contagem específica de células do LCR em esfregaços corados e em câmara (TCSV) — O estudo comparativo entre a contagem específica de células do LCR em esfregaços corados pelo Leishman e a TCSV precedeu a implantação desta na rotina de nosso laboratório. A técnica de Moraes-Rêgo e Fernandes antes referida foi usada como padrão. Com efeito, sua confiabilidade fora demonstrada em experiências prévias, cujos

Caso	%	LC	TCSV	LT
1	L	53,5	56,0	47,5 - 59,5
	M	17,5	22,5	12,7 - 22,3
	P	2,0	1,0	0,5 - 3,5
	N	27,0	20,5	19,8 - 34,2
2	L	93,0	88,5	87,0 - 99,0
	M	6,5	11,0	1,7 - 11,3
	P	0,5	0,5	0,0 - 2,0
3	L	95,0	94,0	89,0 - 100
	M	3,5	2,5	0,0 - 8,3
	P	0,5	2,0	0,0 - 2,0
	B	1,0	1,5	0,0 - 2,5
4	L	2,0	2,5	0,0 - 8,0
	M	2,0	4,5	0,0 - 6,8
	N	96,0	93,0	88,8 - 100
5	L	86,5	83,0	80,5 - 92,5
	M	7,0	9,0	2,2 - 11,8
	P	6,5	8,0	5,0 - 8,0
6	L	98,0	97,0	92,0 - 100
	M	2,0	3,0	0,0 - 6,8
7	L	12,0	11,0	6,0 - 18,0
	M	7,0	4,0	2,2 - 11,8
	P	2,0	1,0	0,5 - 3,5
	N	76,0	83,0	68,8 - 83,2
	E	3,0	2,0	2,0 - 4,0
8	L	49,0	55,0	43,0 - 55,0
	M	10,0	6,0	5,2 - 14,8
	N	3,0	1,0	0,0 - 10,2
	E	37,0	37,0	36,0 - 38,0
	B	1,0	1,0	0,0 - 2,5
9	L	3,0	4,0	0,0 - 9,0
	M	6,0	4,0	1,2 - 10,8
	P	2,0	1,0	0,5 - 3,5
	B	2,0	1,0	0,5 - 3,5
	E	9,0	8,0	8,0 - 10,0
	N	78,0	82,0	70,8 - 85,2
10	L	64,0	60,0	58,0 - 70,0
	M	10,0	12,0	5,2 - 14,8
	P	6,0	5,0	4,5 - 7,5
	N	18,0	22,0	10,8 - 25,2
	B	2,0	1,0	0,5 - 3,5

Tabela 3 — Contagem diferencial (%) de leucócitos no LCR de 10 casos. LC, lâmina corada pelo Leishman; TCSV, técnica de coloração supravital; LT, limites de tolerância (± 2 SD); L, linfócitos; M, monócitos; P, plasmócitos; N, neutrófilos; B, basófilos; E, eosinófilos.

relatórios fazem parte de trabalho em andamento. O experimento consistiu em fazer a contagem de células sobre 10 preparações «em pente»⁷ de uma mesma amostra de LCR com pleocitose de 250 células/mm³. Em cada preparação fez-se a contagem diferencial das primeiras 200 células encontradas. O conjunto das 10 contagens foi submetido a tratamento estatístico, calculando-se a média e o desvio padrão (SD) para as contagens de cada tipo celular. Esses índices constam da tabela 2 e serviram para avaliar a confiabilidade das contagens pela TCSV. Dez amostras de LCR com pleocitoses variadas foram contadas simultaneamente pelos dois métodos: a fresco e em lâminas coradas. As contagens efetuadas constam da tabela 3, onde vêm indicados os limites de tolerância para 2 SD. Esses limites foram calculados a partir do valor percentual encontrado na contagem de cada tipo de célula na lâmina. Sobre este valor, considerado padrão, foi aplicado o SD do tipo de célula respectivo (Tabela 2). Desse modo pode-se verificar facilmente se o valor encontrado para TCSV caiu dentro dos limites aceitáveis ou não.

F. Técnica de preparação de LCR artificialmente meningítico — Nas sessões de demonstração da TCSV temos preparado amostras de LCR com pleocitose acentuada, que mimetiza a pleocitose das meningites, do seguinte modo: em tubo de hematócrito de Wintrobe centrifuga-se amostra de sangue cuja contagem global de leucócitos não seja menor que 8000/mm³; despreza-se o plasma sobrenadante e recolhe-se com agulha longa, montada em seringa, o creme leucocitário; pinga-se 1 gota deste material em 1-2ml de LCR límpido. Após homogeneização obtém-se amostra turva, como ocorre com o LCR em meningites. Este material, uma vez tratado pela TCSV, permite treinamento de técnicos no reconhecimento das células inflamatórias do LCR; alia à vantagem da disponibilidade imediata de abundante material aquela de não oferecer risco de contaminação, ao ser manuseado.

G. Documentação fotomicrográfica — A documentação fotomicrográfica apresentada foi feita com o aparelho de microfotografia da Zeiss, acoplado ao microscópio. Usou-se ocular 12,5X e objetiva da imersão 63X Planapo. Para as preparações úmidas usou-se câmara de contagem de Neubauer «improved» e lamínula fina. As microfotografias que documentam os neutrófilos (Foto 1) e os eosinófilos (Foto 5) foram tiradas com filme branco e preto; as demais são cópias de diapositivos coloridos.

COMENTÁRIOS

A condição de ser o LCR suspensão com baixa concentração de células nucleadas permite obterem-se preparações isentas de detritos em câmara ao contrário do sangue, que apresenta contingente de elementos sólidos de até 50% do volume a ser tratado. O líquido diluído deve ter atividade hemolítica nas diluições empregadas para a feitura do hemograma em câmara, a fim de que as hemácias não interfiram na visualização das células coradas. Resultam preparações «sujas» que não se comparam às preparações «limpas» obtidas com o LCR na diluição de 1:3, aqui preconizada. Em observações piloto, nas fases de adaptação que antecederam à implantação da TCSV, ao estudarmos o comportamento das células do LCR frente ao corante de A/A, verificamos que nas baixas diluições empregadas (1:2 e 1:3) a hemólise, em casos com hemorragia, era em média de 60%. Este fato tem importância prática nos casos de hemorragias meningéas, quando há interesse em estudar-se a reação inflamatória ou, mesmo, uma meningite associada.

A relação entre a contagem global de células e o volume mínimo de LCR a ser centrifugado consta da tabela 1. Os volumes indicados como mínimos foram os que a experiência demonstrou serem os mais adequados. Não houve preocupação de se fazer tabela relacionando cada caso estudado, porque houve grande variação entre o número de células contadas em todo o retículo da câmara quando se variava o volume de LCR centrifugado. Os volumes indicados prevêm perdas celulares máximas de 35% no processo de manipulação. A previsão teórica das contagens obtidas matematicamente não correspondeu, na maior parte dos casos, ao valor obtido na prática. Nestes estudos comparativos contávamos as células que caíam apenas dentro do retículo. Na prática, é evidente que a contagem específica é feita dentro e fora do retículo. A morfologia das células normais e inflamatórias do LCR coradas pela TCSV é de aprendizado rápido para quem está habituado ao estudo das células do sangue. A segurança em reconhecer as células com exatidão deve ser baseada em estudos comparativos com esfregaços corados, como feito neste estudo. Células neoplásicas, especialmente em grupos, podem ser reconhecidas facilmente. Serve de exemplo o caso documentado nas fotos 9 e 10 de material de um mesmo paciente, corado sucessivamente pela TCSV e pelo Leishman, após sedimentação na câmara de Kölmel⁸.

Deve-se enfatizar que o encontro de células volumosas, isoladas ou em grupos, levanta a suspeita de células neoplásicas, obrigando o pesquisador a proceder a técnicas especificamente recomendadas para essa finalidade. Embora autores americanos^{4,6} recomendem técnicas semelhantes à TCSV para pesquisa de células neoplásicas, nossa experiência ainda é pequena com a aplicação da técnica presente nesse campo.

A análise do tabela 3 mostra claramente que, nos 10 casos estudados, as contagens feitas com aTCSV estiveram dentro dos limites de tolerância estipulados, levando-se em conta os desvios padrões encontrados para cada tipo de célula, contadas em lâmina corada. Estes índices, aliás, são muito próximos daqueles encontrados por Dacie² em esfregaços de sangue. Este fato se explica pela semelhança existente entre a técnica do «pente» e aquela adotada para sangue pelo autor referido. No caso do LCR a distribuição de células é certamente mais homogênea, à feitura do esfregaço, por se tratar de suspensão concentrada de leucócitos, sem a interferência das hemátias.

A TCSV descrita apresenta uma série de vantagens sobre outras técnicas usadas em laboratórios de patologia clínica, principalmente aquelas fastidiosas de dupla centrifugação, com suspensão em soro. Tais processos, além de trabalhosos, condicionam a perda de grande número de células. A grande vantagem da técnica aqui descrita é permitir que se utilizem pequenos volumes: as células são perfeitamente identificáveis em uma gota diluída de LCR, se houver pleocitose acima de 100 células/mm³ ou, no máximo, após uma única centrifugação, sem manuseio agressivo delas. A experiência adquirida em 5 anos de intensa utilização da TCSV, examinando número considerável de amostras de LCR, particularmente em situações de emergência, com finalidade diagnóstica e no controle evolutivo das meningites, autoriza-nos a recomendá-la como técnica de eleição para a contagem diferencial das células do LCR. A simplicidade de sua execução, exigência de um mínimo de material, necessidade de apenas alguns minutos para liberar resultados confiáveis, são aspectos que, no conjunto, lhe conferem a condição de ser a técnica que melhor se presta, no momento, para a contagem diferencial das células do LCR.

REFERENCIAS

1. Anguiano G, Ancira GV — Direct simultaneous total and differential leucocyte counts in the counting chamber. *Acta Haemat* 13:124, 1955.
2. Dacie JV — *Practical Haematology*. Ed 2. Churchill, London, 1956.
3. Kölmel HW — *Atlas of Cerebrospinal Fluid Cells*. Springer, Berlin, 1976.
4. McCormack LJ, Hazard JB, Belovich D, Gardner WJ — Identification of neoplastic cells in cerebrospinal fluid by a wet-film method. *Cancer* 10:1293, 1957.
5. Moraes-Rêgo SF, Moraes-Rêgo KG — Exame citológico do líquido céfalo-raquideano no diagnóstico de neoplasias primitivas ou metastáticas do sistema nervoso. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 44:165, 1986.
6. Naylor B — The cytologic diagnosis of cerebrospinal fluid. *Cancer* 8:141, 1964.
7. Spriggs AI, Boddington MM — *The Cytology of Effusions in the Pleural, Pericardial and Peritoneal Cavities and of Cerebrospinal Fluid*. Ed 2. Heinemann, London, 1968.