

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO CITOLOGICO DO LÍQUIDO PERICÁRDICO DE
INDIVÍDUOS NORMAIS QUE SOFRERAM MORTE
VIOLENTA, COM UTILIZAÇÃO DE IMUNO-
CITOQUÍMICA - COMPARAÇÃO COM O QUADRO
HISTOLÓGICO DA PAREDE DO CORAÇÃO
(resultados preliminares)

Karia Saba

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biomédicas
da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
de grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Dezembro de 1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO CITOLÓGICO DO LÍQUIDO PERICÁRDICO DE
INDIVÍDUOS NORMAIS QUE SOFRERAM MORTE
VIOLENTA, COM UTILIZAÇÃO DE IMUNO-
CITOQUÍMICA - COMPARAÇÃO COM O QUADRO
HISTOLÓGICO DA PAREDE DO CORAÇÃO
(resultados preliminares)

Karla Saba

Orientador: Prof. Arnaldo Moreira da Silva

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biomédicas
da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

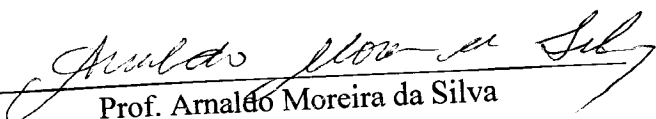
Uberlândia - MG
Dezembro de 1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

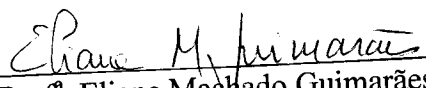
ESTUDO CITOLÓGICO DO LÍQUIDO PERICÁRDICO DE
INDIVÍDUOS NORMAIS QUE SOFRERAM MORTE VIOLENTA,
COM UTILIZAÇÃO DE IMUNO-CITOQUÍMICA - COMPARAÇÃO
COM O QUADRO HISTOLÓGICO DA PAREDE DO CORAÇÃO
(resultados preliminares)

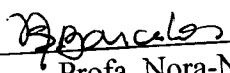

Karla Saba

Aprovada pela comissão em 2/12/96 Média 95


Prof. Arnaldo Moreira da Silva
Orientador


Prof. Ademir Rocha
Co-orientador


Profª. Eliane Machado Guimarães
Conselheira


Profª. Nora-Ney S. Barcelos
Coordenadora do Curso

Uberlândia, 2 de dezembro de 1996

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Georges e Neusa, ao meu avô Adel e à Tia Quemele, que são os principais responsáveis por esta minha conquista, pois foram eles que sempre me incentivaram e me apoiaram durante a caminhada até aqui.

Ao tio Elias, que me auxiliou no levantamento bibliográfico e sempre me dedicou seu apoio e carinho.

Ao Adriano, por todas as vezes que me ouviu e deu seu apoio. Nos méritos de minhas conquistas, há muito de sua presença.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Arnaldo, pela orientação e incentivo na realização deste trabalho, minha sincera admiração;

Ao Prof. Ademir Rocha e à Prof^a. Eliane Machado Guimarães, pela colaboração na realização deste trabalho;

A todos do Laboratório de Anatomia Patológica, pelo apoio e incentivo, e em especial à Jubimázia, pelo auxílio na confecção dos preparados citológicos e por tornar o nosso ambiente de trabalho tão agradável;

À Ignez Candelori pela realização das reações imuno-citoquímicas e por ter-se tornado uma grande amiga. Obrigada pelo carinho e atenção constante;

A toda minha família que, mesmo indiretamente, sempre me incentivou;

À minha irmã Aline, pelo incentivo e compreensão nos momentos difíceis;

A todos os amigos da Biologia, pelo convívio durante estes anos que se tornaram inesquecíveis. Sentirei saudades;

À Fúlvia, pela amizade, confiança e por sempre estar ao meu lado, nos momentos felizes e tristes, compartilhando e ajudando-me. Muito obrigada, amiga;

Aos cadáveres que, em seu anonimato, contribuíram para a realização deste trabalho;

Sobretudo a Deus, por cada desafio que colocou em minha vida e por cada momento de felicidade permitido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.Material	04
3.2.Métodos	
3.2.1.Confecção dos preparados citológicos	04
3.2.2.Confecção dos blocos celulares	05
3.2.3.Coloração dos preparados citológicos e reações imuno-citoquímicas	05
3.2.4.Exame macroscópico dos corações	06
3.2.5.Microtomia e coloração dos blocos celulares e dos fragmentos das paredes dos corações	06
3.2.6.Exame microscópico dos preparados histológicos e citológicos	06
4. RESULTADOS	08
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÕES	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

Foram estudados, citologicamente, líquidos pericárdicos (LP) obtidos durante a necrópsia de oito indivíduos que tiveram morte violenta. O volume destes líquidos, medido em proveta graduada, variou de 6,4 a 28,0 ml e sua celularidade total, verificada por contagem em câmara de Neubauer, de 293 a 3.296 células por mm^3 . Preparações citológicas confeccionadas em citocentrífuga foram coradas pelos processos de Papanicolaou e May-Grünwald-Giemsa e mediante reações imuno-citoquímicas para citoceratinas, vimentina, CD45RB, CD45RO, CD20 e antígeno mielóide/histiocítico. Fragmentos da parede das câmaras dos respectivos corações e blocos celulares dos LP foram processados, incluídos em parafina, microtomizados e corados pela hematoxilina e eosina. O exame microscópico com contagem das células, utilizando-se um retículo quadriculado (malha de 4 x 4 mm) instalado em uma das oculares, revelou numerosas células mesoteliais e linfócitos T, marcados para CD45RO, variando de 3 a 281 por mm^3 . Não foram vistas células marcadas para CD20 (linfócitos B). O antígeno mielóide/histiocítico não discriminou os macrófagos porque marcou também células mesoteliais. Por critérios puramente morfológicos, não é possível identificar com segurança aquelas células, em meio às mesoteliais. Histologicamente, dois dos corações eram totalmente normais, um apresentava discreta epicardite crônica, produtiva, focal, em átrio direito e um, miocardite aguda subendocárdica, com infiltrado neutrofilico, associada a necrose focal de células miocárdicas, provavelmente causada por isquemia subendocárdica. Aparentemente estas alterações não se refletiram nos respectivos líquidos pericárdicos. Em quatro corações não foi possível estudo histológico. Tais achados, não obstante as limitações decorrentes do tamanho e das características da amostragem, mostram evidências da presença de linfócitos T e ausência de linfócitos B no LP de pessoas aparentemente saudáveis, que faleceram de modo violento e estimulam o prosseguimento desta pesquisa, com aumento da amostragem, visando determinar o padrão citológico do LP normal.

1. INTRODUÇÃO

O líquido pericárdico (LP) humano, obtido de pacientes vivos, tem sido utilizado em pesquisas e no diagnóstico de diversas doenças envolvendo o coração e, em especial, o pericárdio (Wollert et al., 1988; Meyers & Bouska, 1989; Randall & Geisinger, 1990; Nance & Silverman, 1991; Luban et al., 1993; Zakowski & Ianuale-Shanerman, 1993; Maish, 1994; Riemann et al., 1994).

Em nosso meio, LP obtido à necrópsia de chagásicos crônicos tem sido analisado quanto a aspectos soro-imunológicos (Lopes et al., 1966; Lopes et al., 1973; Lopes et al., 1978; Rocha et al., 1987; Mineo et al., 1991) e bioquímicos (Reis, 1984). Em parte destes estudos, comprovou-se que o LP se presta ao diagnóstico "post-mortem" da doença de Chagas, como material para a realização de certas reações que visam detectar anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Durante anos, nele praticou-se apenas a reação de Guerreiro e Machado; vieram depois a hemaglutinação passiva, a imunofluorescência indireta e o teste imuno-enzimático ELISA (Lopes et al., 1966; Lopes et al., 1973; Lopes et al., 1978; Rocha et al., 1987).

No campo da imunologia, avaliaram-se, em amostras de LP, os teores de IgE total e específica anti-*Trypanosoma cruzi*, por meio de testes imunoenzimáticos. Concentrações significativamente maiores de IgE total foram observadas em diferentes formas anátomo-clínicas de doença de Chagas crônica. Quanto à IgE específica anti-*Trypanosoma cruzi*, foi encontrada positividade em 41% das amostras de chagásicos (Mineo et al., 1991).

Reis (1984) constatou que a IgM, quantificada em termos de percentual de aparecimento, teve valores mais elevados em portadores de diversas patologias (doença de Chagas, cirrose hepática, doença hipertensiva, tuberculose pulmonar e tumores) que em indivíduos controles; e tais valores atingiam seus níveis mais altos em chagásicos com insuficiência cardíaca congestiva. Ainda de acordo com Reis (1984), o padrão eletroforético das

proteínas do LP de chagásicos que tiveram morte súbita mostrou aumento significativo de beta-globulinas.

Pretende-se estender tais estudos avaliando qualitativa e quantitativamente as células presentes no LP de cadáveres de pacientes com doença de Chagas, a fim de se estabelecer relações com a inflamação dos folhetos cardíacos (particularmente com o epicárdio, em razão da vizinhança) ou com as imunoglobulinas presentes no LP. Para tanto, é imprescindível investigar os aspectos citológicos do LP de pessoas normais, obtido de cadáveres de indivíduos que sofreram morte violenta. Ao que nos consta, nenhum trabalho publicado na literatura abordou especificamente este tema.

2. OBJETIVO

O presente trabalho visa determinar, por métodos imuno-citoquímicos, o padrão citológico do LP de cadáveres de pessoas aparentemente normais que sofreram morte violenta, comparando-o com os aspectos histológicos observados nos respectivos corações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O material utilizado neste experimento constituiu-se de corações e amostras de líquido pericárdico (LP) de oito cadáveres de indivíduos que sofreram morte violenta (acidente de trânsito ou homicídio), sendo sete homens e uma mulher, com idade que variou de 15 a 68 anos, necropsiados no Posto Medico-Legal de Uberlândia (Tabela 1). As amostras de LP foram coletadas em seringas descartáveis de 10 ou 20 ml e mantidas em refrigerador a 4 °C, por no máximo 72 horas, até o preparo das lâminas. Os corações foram fixados em formalina a 10% para posterior exame macro e microscópico. O tempo transcorrido entre o óbito e a necrópsia foi de no máximo 24 horas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Confeção dos preparados citológicos.

As amostras de LP foram medidas em proveta graduada e sua celularidade foi verificada por contagem em câmara de Neubauer, desprezando-se as hemácias; em sequência

foram submetidas a citocentrifugação (citocentrífuga FANEM modelo 216) por 4 minutos, a 600 rotações por minuto, obtendo-se 15 preparados citológicos em lâminas previamente tratadas com organossilano. Um dos preparados foi fixado por dessecação, sendo os demais fixados em etanol 95 °GL.

3.2.2. Confecção dos blocos celulares

Para obtenção de blocos celulares, porções restantes das amostras de LP foram misturadas, volume a volume, com etanol absoluto e centrifugadas (centrífuga FANEM modelo 204) por 5 minutos. O material depositado, após desprezar-se o sobrenadante, foi envolvido em papel de filtro e submetido a desidratação em etanol absoluto, diafanização em xilol, embebição em parafina fundida a 60 °C e, finalmente, incluído em bloco de parafina.

3.2.3. Coloração dos preparados citológicos e reações imuno-citoquímicas

Os preparados citológicos secos foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa (MGG) e, dos fixados em etanol, uma lâmina de cada caso foi corada pelo método de Papanicolaou (P).

As demais lâminas fixadas em etanol foram submetidas a reações imuno-citoquímicas pelo método da avidina-biotina-peroxidase (ABC), como descrito por Hsu e cols (1981), adaptado às nossas condições laboratoriais. Utilizaram-se como anticorpos primários: (1) anti-citoceratinas (DAKO-CK, LP34; M 717); (2) anti-vimentina (DAKO-Vimentin, V9; M 725); (3) anti-antígeno de células T, CD45RO (DAKO-CD45RO, UCHL1; M 742); (4) anti-antígeno de células B, CD20 (DAKO-CD20, L26; M 755); (5) anti-antígeno mielóide/histiocítico (DAKO-MAC387; M 747); (6) anti-antígeno leucocitário comum, CD45RB (DAKO-CD45RB, PD7/26; M 701). Após hidratação, bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 10 volumes, lavagem em água corrente e imersão em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 por 5 minutos, os preparados foram incubados, por 24 horas, a 4 °C, com o respectivo anticorpo primário. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de soro normal de cabra a 5% (DAKO; X 0501) em PBS 0,1M, pH 7,4, para o bloqueio de colorações de fundo. Na sequência, os preparados foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos, lavados delicadamente, inclusive com imersão em dois banhos, de 5 minutos cada, de PBS pH 7,4; foram, então, incubados, por 30 minutos, a 37 °C, com o anticorpo secundário e, em seguida, novamente lavados da mesma forma anterior. Como anticorpo secundário, utilizou-se soro de cabra anti-IgG de camundongo, biotilado (VECTOR-BA-5200). A amplificação da reação foi feita através do complexo ABC (VECTOR-PK 6100). As reações foram reveladas incubando-se as lâminas em solução de tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (SIGMA D-5637) em PBS, com água oxigenada a 10 volumes (substrato-cromógeno), por 4 minutos. Após lavagem em água corrente por 5 minutos, as lâminas foram coradas em hematoxilina de Mayer por 5 minutos, novamente lavadas por mais 5 minutos em água corrente, desidratadas e montadas com lamínulas, utilizando-se resina sintética Entellan (MERCK).

3.2.4. Exame macroscópico dos corações

Os corações foram examinados macroscopicamente, sendo obtidos fragmentos das paredes das quatro câmaras para estudo histológico. Estes fragmentos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina.

3.2.5. Microtomia e coloração dos blocos celulares e dos fragmentos das paredes dos corações

Os blocos celulares e os dos fragmentos das paredes das câmaras cardíacas foram cortados em micrótomo rotativo com espessura de 2 a 3 μm . As secções foram montadas em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano e deixadas em estufa a 60 °C durante 20 minutos, para secagem, sendo então coradas em hematoxilina e eosina (H&E) e montadas em laminulas com Entellan (MERCK).

3.2.6. Exame microscópico dos preparados histológicos e citológicos

Os preparados histológicos e citológicos foram cuidadosamente examinados, por dois pesquisadores, em microscópio binocular de campo claro (Olympus BH2) com objetivas planacromáticas de 4x, 10x, 20x, 40x e, quando necessário, de 100x (sob imersão em óleo). Com o auxílio de um retículo quadriculado (malha de 4x4 mm), colocado em uma das oculares, foram contadas as células mononucleares identificadas morfológicamente (nas colorações de Papanicolaou e/ou MGG) e marcadas pelos anticorpos utilizados, determinado-se sua porcentagem em relação ao total de células nucleadas vistas nos preparados citológicos. As porcentagens foram convertidas em células por mm^3 com base no total de células contadas em câmara de Neubauer.

Tabela 1

LÍQUIDOS PERICÁRDICOS OBTIDOS DE CADÁVERES DE
INDIVÍDUOS FALECIDOS DE MODO VIOLENTO

CASO	IDADE (anos)	SEXO	COR	INTERVALO ENTRE O ÓBITO E A NECRÓPSIA (em horas)	CAUSA DA MORTE
1	16	M	B	≤ 17	PT
2	15	M	B	≤ 24	HIA
3	16	M	B	≤ 22	TCE
4	47	M	Pd	≤ 17	TCE
5	28	M	B	≤ 24	TCE
6	68	M	B	≤ 24	TCE
7	32	F	B	≤ 24	TCE
8	24	M	B	≤ 24	PT

M - masculino; F - feminino; B - branco; Pd - pardo; PT - politraumatismo; HIA - hemorragia interna aguda; TCE - traumatismo crânio-encefálico

4. RESULTADOS

O exame dos preparados citológicos corados pelos métodos de P e MGG revelou que o LP dos casos avaliados é constituído principalmente por células mesoteliais e, em menor número, por leucócitos mononucleares. As células mesoteliais são grandes, apresentam-se descamadas ocasionalmente em lençóis e, com maior frequência, em pequenos grupos ou isoladas, possuem abundante citoplasma eosinófilo, às vezes vacuolado, e núcleos uniformes em tamanho, redondos ou ovais, centrais ou excêntricos, com cromatina densa, regularmente distribuída. Ocasionalmente podem ser binucleadas. Em algumas, os núcleos são deslocados para a periferia por grandes vacúolos citoplasmáticos (fig. 2 e 3). Os leucócitos mononucleares, em sua maioria, são pequenos, têm escasso citoplasma eosinófilo, núcleos redondos e compactos, sendo semelhantes a pequenos linfócitos; outros são de tamanho médio a grande, possuem citoplasma variando de eosinófilo a levemente basófilo e núcleos vesiculosos, com cromatina em pequenos grumos bem distribuídos, mostrando, às vezes, pequeno nucléolo central, semelhando prolinfócitos (fig. 2 e 3). Macrófagos não puderam ser discriminados de linfócitos grandes ou de células mesoteliais, por método morfológico, nas colorações utilizadas. Várias células mesoteliais mostraram graus variados de autólise e, em decorrência da condensação da cromatina e das alterações citoplasmáticas, algumas podem ter sido confundidas com leucócitos mononucleares.

Os cortes histológicos dos blocos celulares mostraram abundante material amorfo, eosinófilo, provavelmente constituído por proteínas coaguladas, em meio ao qual se distribuem grupos de células mesoteliais e leucócitos mononucleares. Suas características morfológicas foram menos nítidas neste material, em relação aos preparados citológicos (fig. 4 e 5).

Os cortes histológicos das paredes das câmaras cardíacas, nos casos 1 e 2, foram normais (fig. 6); no caso 3 observou-se discreta epicardite crônica produtiva focal em átrio

direito, caracterizada por área de fibrose e discreto infiltrado mononuclear; no caso 4 havia miocardite aguda subendocárdica, caracterizada por pequenos e múltiplos focos de infiltração neutrofílica, associada a necrose focal de células miocárdicas, na parede dos ventrículos e do septo interventricular, provavelmente causada por isquemia subendocárdica (fig. 7).

Pelo estudo imuno-histoquímico, as células mesoteliais foram positivas para vimentina (fig. 8) e, em grande parte, para citoceratina (fig. 9). As células mononucleares foram positivas, em sua maioria, para CD45RB (fig. 10) e CD45RO (fig. 11). Não foram vistas células positivas para CD20 (fig. 12). O antígeno mielóide/histiocítico marcou algumas células mesoteliais e alguns leucócitos mononucleares, não sendo, portanto, capaz de discriminar os macrófagos (fig. 13).

O volume do LP obtido nas necrópsias variou de 6,4 a 28,0 ml; a celularidade total, de 293 a 3.296 células/mm³; o número de leucócitos mononucleares identificados morfolologicamente, de 68 a 306 por mm³; o número de células positivas para CD45RB (linfócitos B ou T), de 181 a 247 por mm³, porém a contagem só foi possível em dois casos devido a falhas nas reações dos demais; o número de células positivas para CD45RO (linfócitos T) variou de 3 a 281 por mm³ (tabela 2; fig. 1).

Tabela 2

RESULTADOS DOS EXAMES CITOLÓGICOS DOS LÍQUIDOS PERICÁRDICOS E DAS
OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS DAS PAREDES DAS CÂMARAS CARDÍACAS, DE
CADÁVERES DE INDIVÍDUOS FALECIDOS DE MODO VIOLENTO

CASO	VOLUME do LP (ml)	TOTAL DE CÉLULAS/mm ³	MONONUCLE- ARES/mm ³	CÉLULAS CD45RB +/mm ³	CÉLULAS CD20 +/mm ³	CÉLULAS. CD45RO +/mm ³	ASPECTO HISTOLÓGICO
1	?	2.133	197	181	-	171	normal
2	28,0	293	68	fr	-	3	normal
3	7,0	1.072	120	fr	-	107	ECPFD
4	8,0	853	306	247	-	100	MAS
5	15,0	1.685	mpm	fr	-	211	nd
6	6,0	3.296	mpm	fr	-	132	nd
7	7,0	584	mpm	fr	-	47	nd
8	6,4	2.005	mpm	fr	-	281	nd

CD45RB - antígeno comum dos leucócitos (presente em células linfóides B e T); CD20 - Pan-B; CD45RO - Pan-T; mpm - má preservação morfológica; fr - falha na reação; ECPFD - epicardite crônica produtiva, focal, discreta; MAS - miocardite aguda subendocárdica; nd - cortes histológicos não disponíveis.

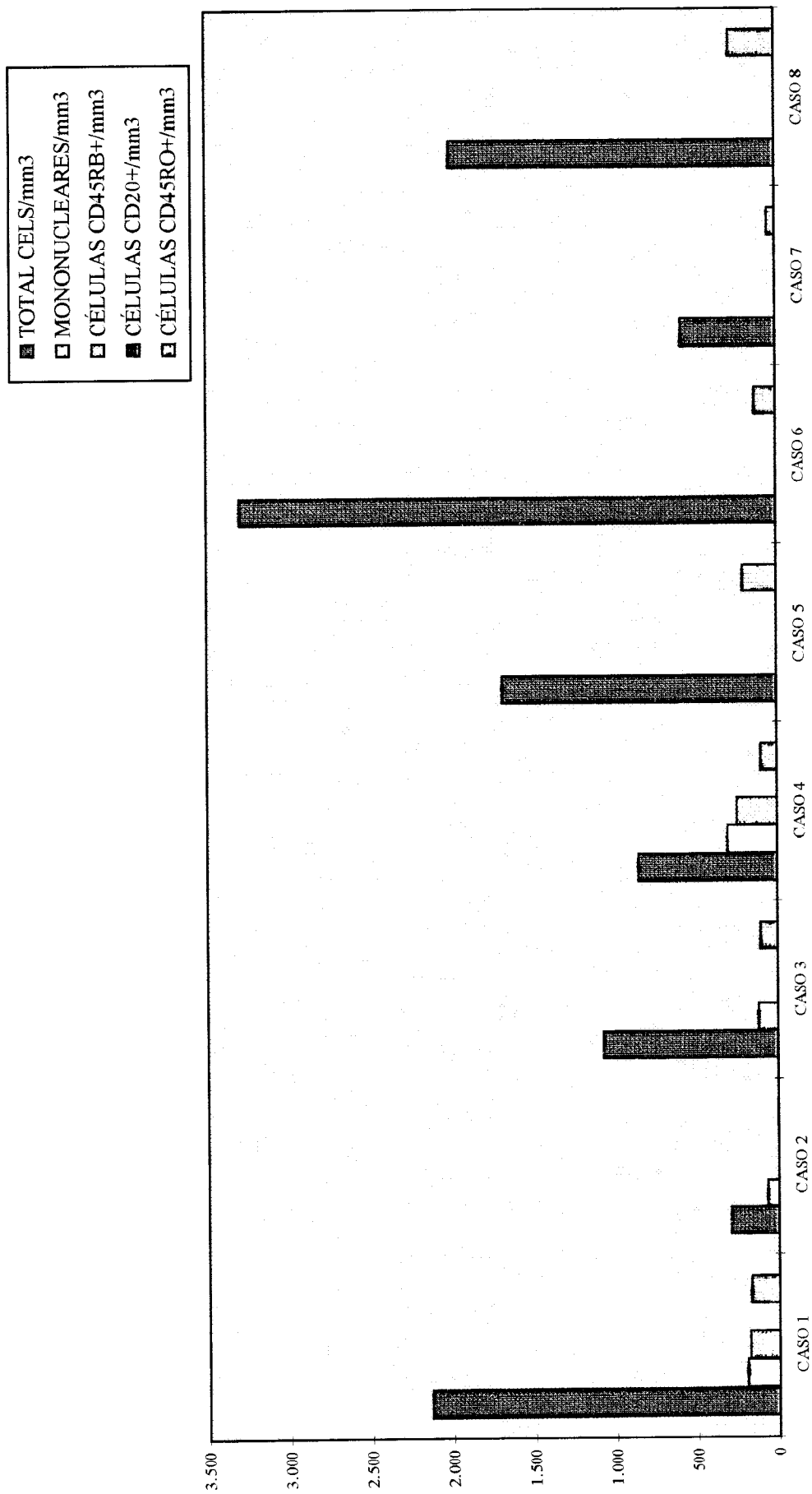


FIGURA 1

RESULTADOS DOS EXAMES CITOLÓGICOS DOS LÍQUIDOS PERICÁRDICOS DE INDIVÍDUOS FALECIDOS DE MODO VIOLENTO

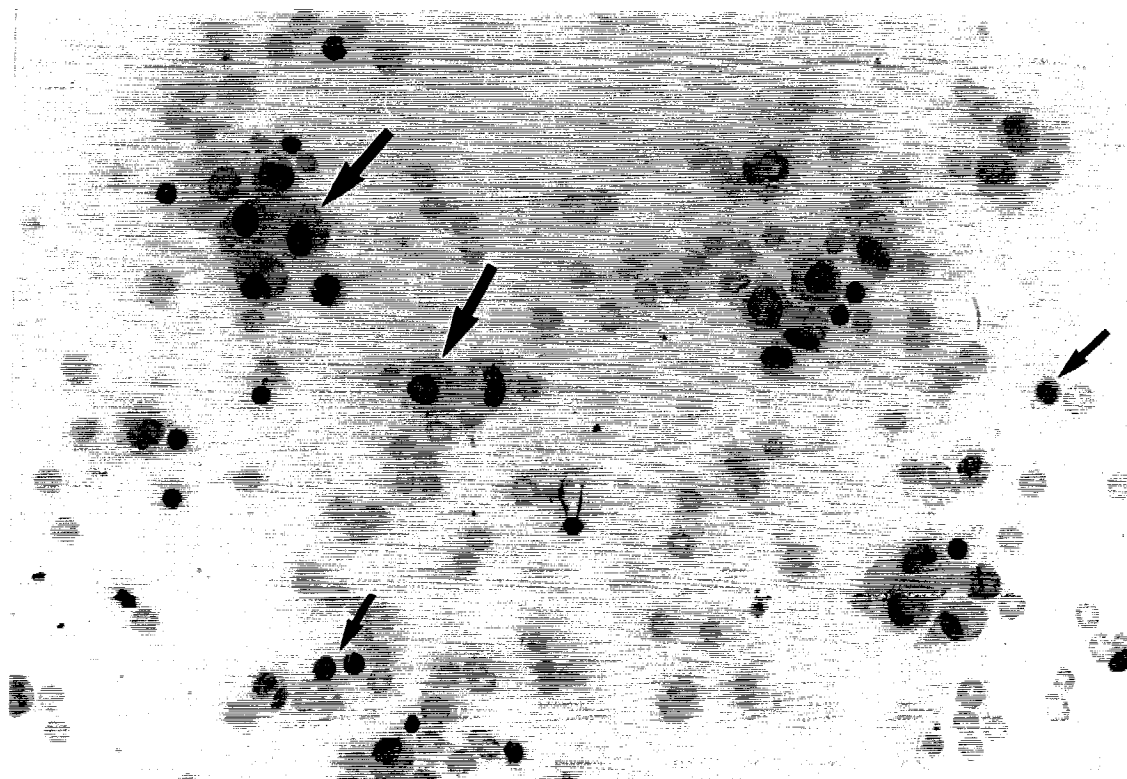


Fig. 2 - Líquido pericárdico do caso 2. Observar as células mesoteliais (setas grandes) e as mononucleares (setas pequenas). Papanicolaou x416.

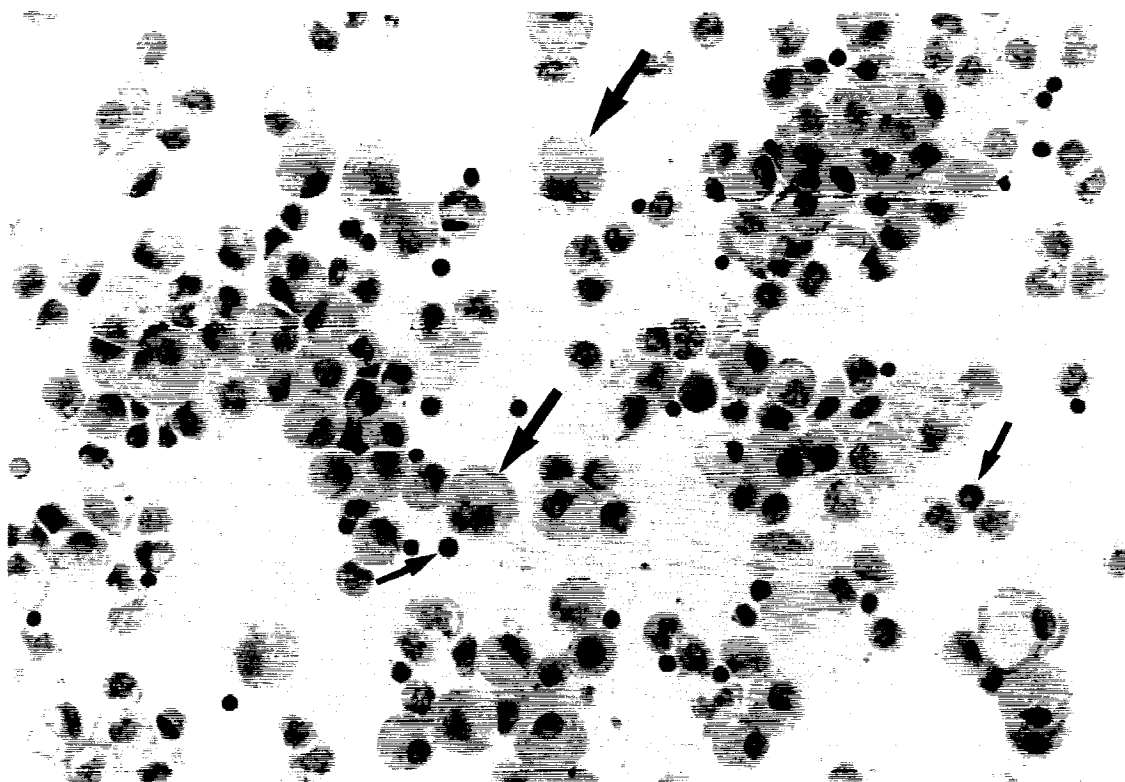


Fig. 3 - Líquido pericárdico do caso 3. Observar as células mesoteliais (setas grandes) e as mononucleares (setas pequenas). May-Grünwald-Giemsa x416.

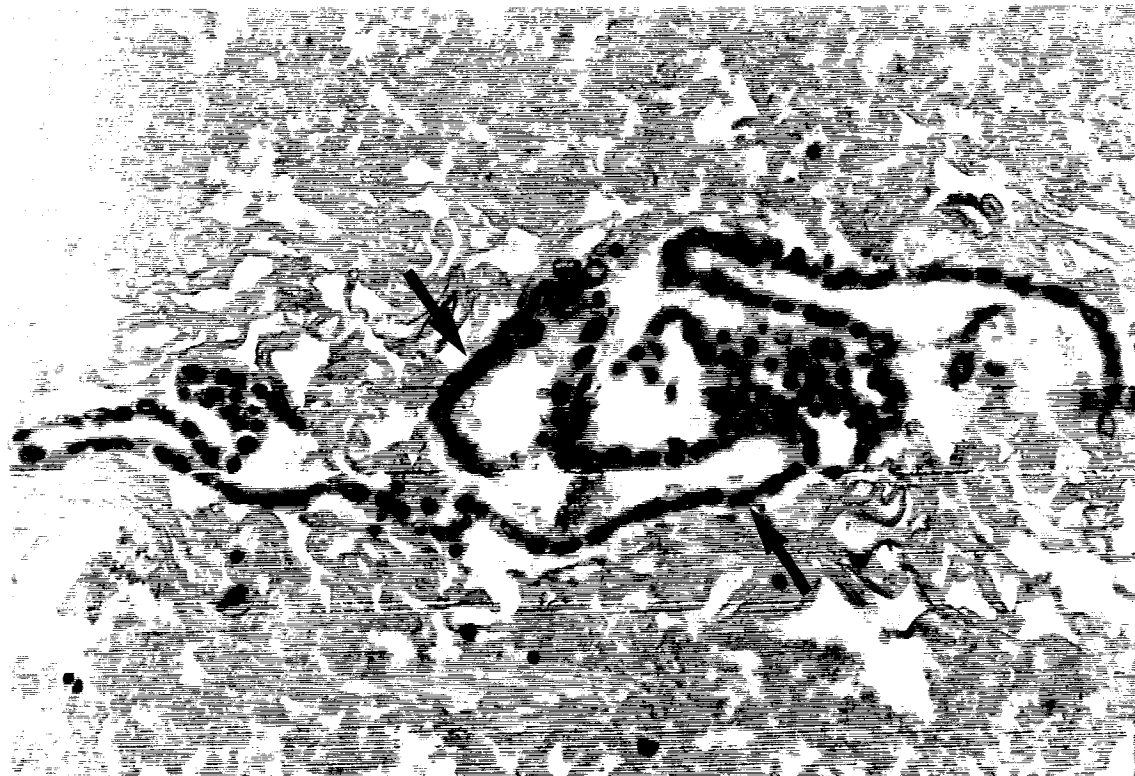


Fig. 4 - Secção do bloco celular do líquido pericárdico do caso 4. Observar as células mesoteliais (setas). As células mononucleares não podem ser identificadas morfológicamente com segurança. H&E x416.

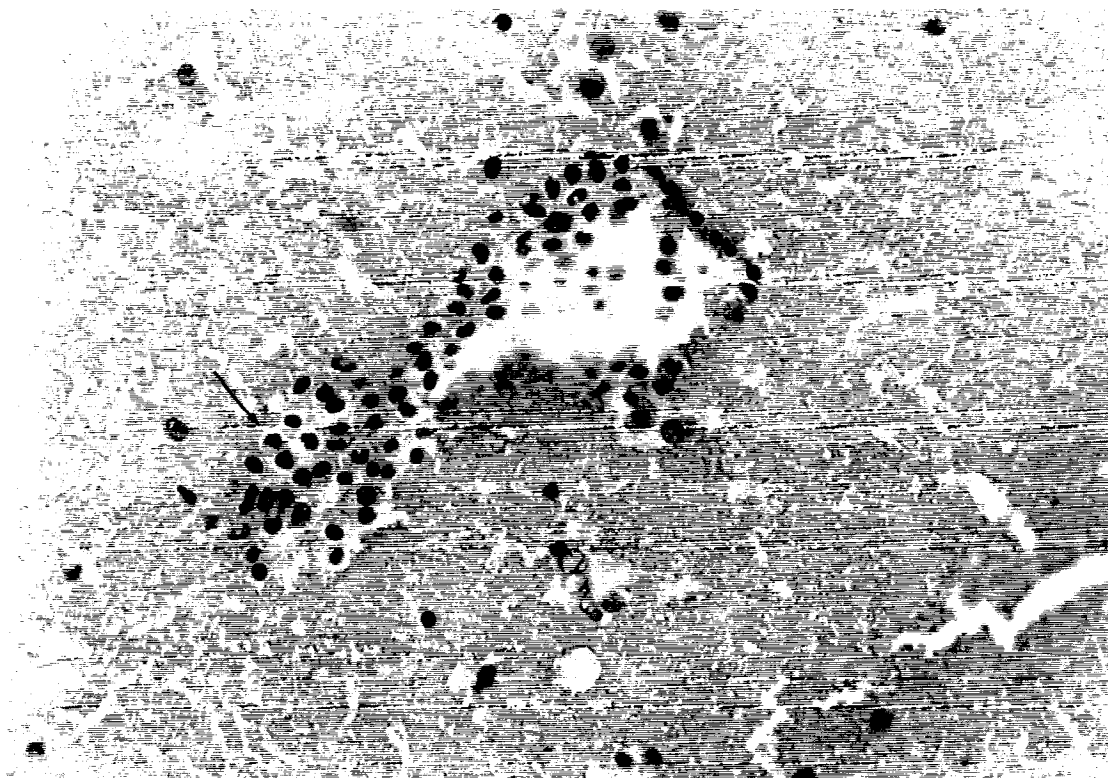


Fig. 5 - Secção do bloco celular do líquido pericárdico do caso 5. As células apontadas pela seta poderiam ser, morfológicamente, mesoteliais ou mononucleares. H&E x416.

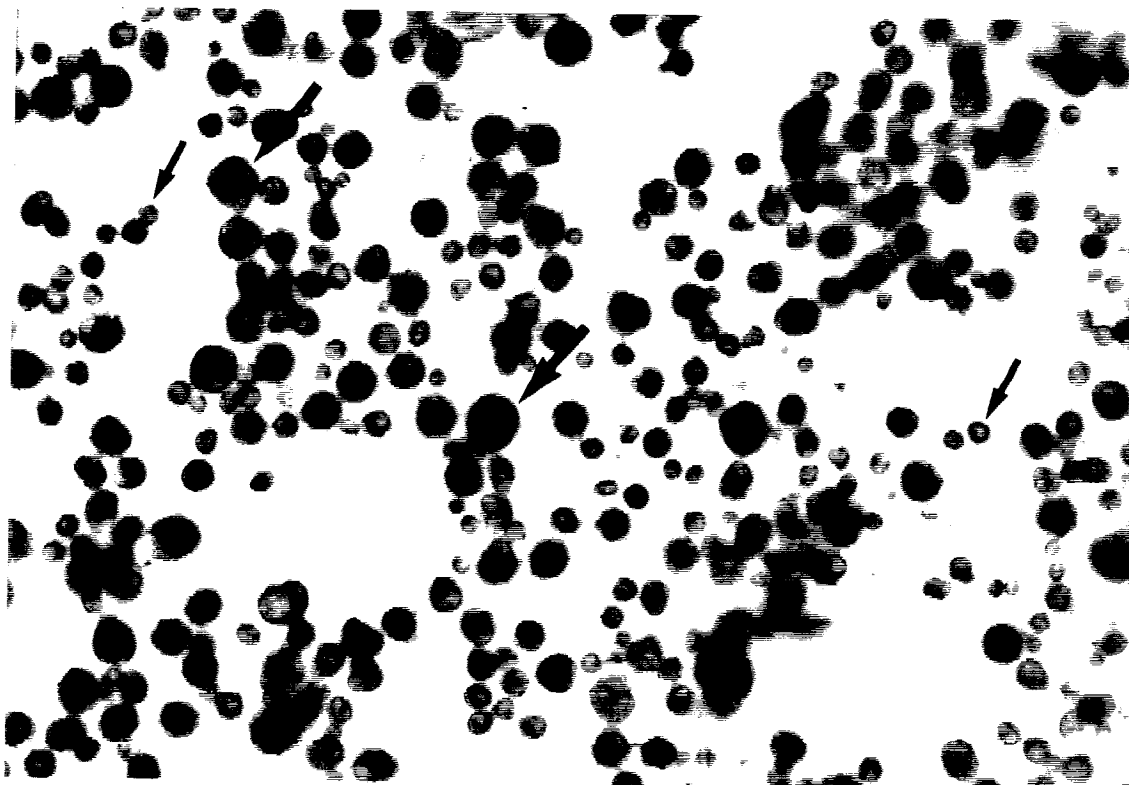


Fig. 8 - Líquido pericárdico do caso 3. Observar as células mesoteliais (setas grandes) e as mononucleares (setas pequenas), marcadas para vimentina. Vimentina - V9 x416.



Fig. 9 - Líquido pericárdico do caso 3. Observar as células mesoteliais marcadas para citoceratinas. Citoceratinas - LP34 x416.

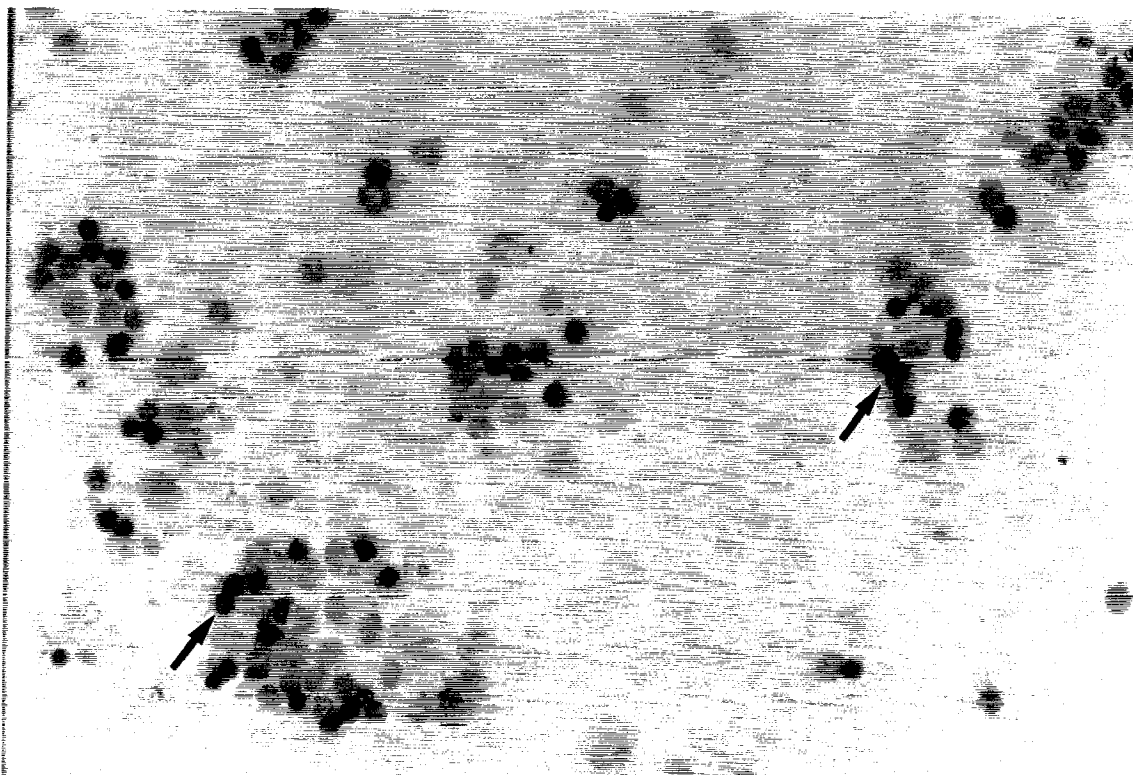


Fig. 10 - Líquido pericárdico do caso 4. Observar as células linfóides (setas) marcadas para CD45RB (antígeno comum dos leucócitos). CD45RB - PD7/26 x416.

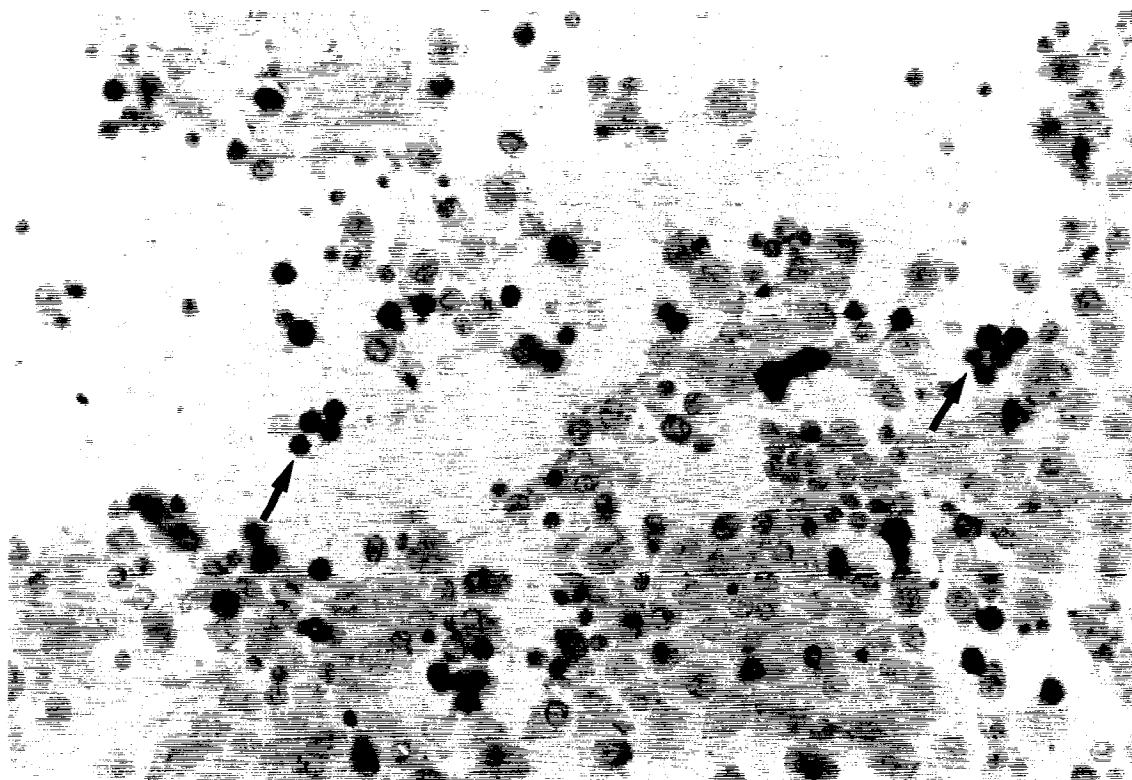


Fig. 11 - Líquido pericárdico do caso 8. Observar as células linfóides T (setas) marcadas para CD45RO (antígeno de células T). CD45RO - UCHL1 x416.

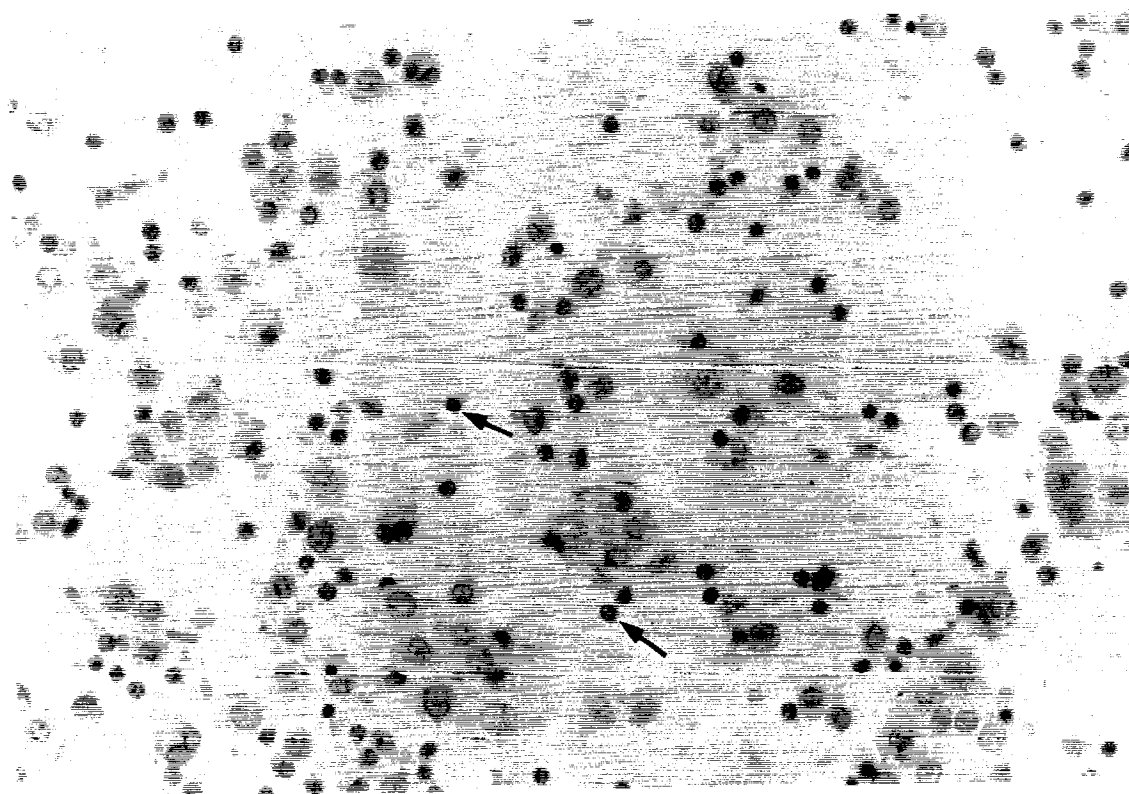


Fig. 12 - Líquido pericárdico do caso 8. Observar que nenhuma célula linfóide (setas) foi marcada para CD20 (antígeno de células B). CD20 - L26 x416.

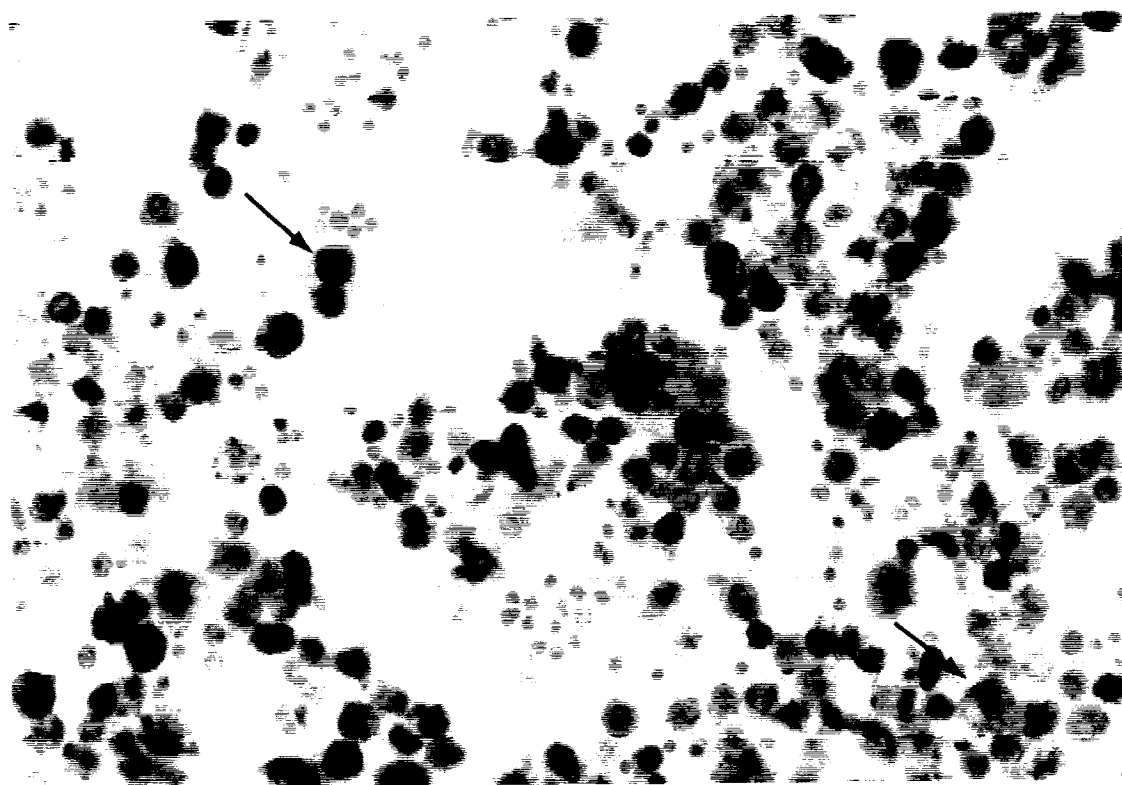


Fig. 13 - Líquido pericárdico do caso 1. Observar que células mesoteliais (setas) também foram marcadas para antígeno mielóide/histiocítico. Antígeno mielóide/histiocítico - MAC387 x416.

5. DISCUSSÃO

A amostragem utilizada neste trabalho, pelo seu pequeno tamanho e pela sua composição (predomínio absoluto de homens, brancos, três na segunda década da vida, dois na terceira, um na quinta e um na sétima, e apenas uma mulher, na quarta década), não permite configurar o padrão citológico do LP normal. Além disto, embora tenha sido utilizado material colhido de cadáveres de indivíduos que sofreram morte violenta, supostamente livres de doenças antes do episódio fatal, dois dos corações apresentaram alterações histológicas (epicardite crônica, focal, discreta, em um deles e miocardite aguda subendocárdica, com necrose focal de células miocárdicas, em outro) e em quatro casos não foram obtidos cortes histológicos para exame.

Parte do material examinado apresentou artefatos decorrentes de má preservação, dificultando, ou mesmo impedindo, o reconhecimento morfológico e a contagem das células nas colorações citológicas rotineiras (Papanicolaou e May-Grünwald-Giemsa) e, provavelmente, comprometendo a qualidade das reações imuno-citoquímicas, com conseqüentes falhas, como ocorreram principalmente em relação ao anticorpo anti-CD45RB. Embora não tenha sido possível obter informações precisas da hora dos óbitos, é admissível que a má preservação referida se deveu ao longo intervalo entre o óbito e a necrópsia (aproximando-se de 24 horas em vários casos). Após a coleta, embora o material tenha sido conservado em refrigerador a 4 °C, é possível que não tenham sido detidas, totalmente, as alterações autolíticas.

O processo de contagem das células adotado também está sujeito a erros, embora tenham sido feitas várias contagens, em campos diferentes, por dois observadores, obtendo-se delas uma média aritmética.

Não obstante as considerações acima, foi possível constatar que os líquidos pericárdicos dos cadáveres apresentaram alta celularidade, principalmente - ao que parece - às custas da

descamação de células mesoteliais. A descamação destas células talvez aumente com o tempo do óbito, fato que não pôde ser devidamente avaliado pelo desconhecimento da hora precisa de sua ocorrência.

Constatou-se também a presença de células mononucleares reconhecíveis morfológicamente nas colorações de Papanicolaou e May-Grünwald-Giemsa, embora algumas células mesoteliais devam ter sido confundidas com elas. Em sua maioria, os mononucleares correspondiam, morfológicamente, a pequenos linfócitos, positivos para CD45RB (antígeno comum dos leucócitos, que marca a maioria das células linfóides T e B) nos dois casos em que foi possível a contagem, e para CD45RO (que marca a maioria das células linfóides T). Nenhum mononuclear foi positivo para CD20 (marcador da maioria das células linfóides B). Confirmando-se, em estudos posteriores, com amostragem maior e mais representativa, tais achados, o líquido pericárdico normal teria uma moderada quantidade de linfócitos T e nenhum (ou quase nenhum) linfócito B.

Provavelmente deve ocorrer, no LP, um certo número de macrófagos, como parece indicar a observação morfológica, o que explicaria, pelo menos em parte, a diferença, para menos, da contagem das células CD45RB e CD45RO positivas, em relação à contagem com base em critérios apenas morfológicos. Este fato não pôde ser demonstrado porque o anticorpo disponível para marcação de macrófagos (anti-antígeno mielóide/histiocítico) marcou, também, células mesoteliais. Morfológicamente, não foi possível discriminar, com segurança, macrófagos de células mesoteliais.

Aparentemente, as alterações pericárdicas e miocárdicas vistas nos cortes histológicos dos casos 3 e 4, respectivamente, não interferiram na composição citológica dos respectivos LP, pelo menos em relação ao número de células positivas para CD45RO, que variou de 100 a 281 por mm^3 na maioria dos casos, com apenas dois discrepantes, o caso 2, com 3 células por mm^3 e o 7, com 47 células por mm^3 . No caso da miocardite subendocárdica, foram vistos apenas raros e eventuais neutrófilos no LP.

Pelo volume do LP, nenhum paciente apresentava derrame pericárdico.

Na literatura consultada, foi constatado apenas um trabalho sobre imunofenotipagem de linfócitos em LP (Riemann et al., 1994). Neste trabalho, os autores realizaram análise citofluorométrica do LP, obtido durante cirurgia cardíaca, de 127 pacientes portadores de doença valvular, cardiopatia congênita ou cardiopatia isquêmica crônica. Segundo os autores, os tipos celulares dominantes foram macrófagos e células T; o número total de células variou de 300 a 17.500 por mm^3 , com 9 a 79% de linfócitos, 13 a 87% de macrófagos e 0 a 38% de granulócitos, considerando o conjunto dos três grupos abordados. Não há referências sobre valores normais. Não há como estabelecer comparações entre estes resultados e os do presente trabalho.

Não foi encontrada, na literatura, nenhuma referência a estudo da composição morfológica e/ou imunofenotípica de LP de pessoas normais vivas ou de cadáveres.

Pretende-se prosseguir este estudo, com aumento e diversificação da amostragem, maior controle sobre a preservação do LP, teste de outros fixadores e utilização de outros marcadores, tais como CD68, para macrófagos, CD4 e CD8, para subpopulações de linfócitos T.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram evidências de que o líquido pericárdico de pessoas aparentemente saudáveis, que tiveram morte violenta, contém certa quantidade de linfócitos com imunofenótipo de células T e, ao que parece, não apresenta linfócitos B. Contudo, as limitações do tamanho e das características da amostragem não permitem estabelecer conclusões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HSU, S-M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29(4):577-80, 1981.
- LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; FURTADO, J. H. M.; HIAL, V.; CAMPOS NETO, A. Reação de Guerreiro e Machado no líquido pericárdico de portadores de cardite chagásica crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8:60-61, 1966.
- LOPES, E. R.; BATISTA, S. M.; CHAPADEIRO, E.; ALMEIDA, H. O.; ROCHA, A.; PIRES, J. Estudo comparativo entre o teste de hemaglutinação e a reação de fixação de complemento no líquido pericárdico de chagásicos crônicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 15:57-59, 1973.
- LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; BATISTA, S. M.; CUNHA Jr., J. G.; ROCHA, A.; MIZIARA, L.; RIBEIRO, J. U.; PATTO, R. J. Post-mortem diagnosis of chronic Chagas' disease: comparative evaluation of three serological tests on pericardial fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:244-246, 1978.
- LUBAN, N. L.; KAPUR, S.; DePALMA, L. Pericardial extramedullary hematopoiesis in a neonate with congenital heart disease. A case report. *Acta Cytol.* 37(5):729-31, 1993.
- MAISCH, B. Pericardial diseases with a focus on etiology, pathogenesis, pathophysiology, new diagnostic imaging methods, and treatment. *Curr. Opin. Cardiol.* 9(3):379-88, 1994.

- MEYERS, D. G.; BOUSKA, D. J. Diagnostic usefulness of pericardial fluid cytology. *Chest*. 95(5):1142-3, 1989.
- MINEO, J. R.; ROCHA, A.; COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, A. M.; SILVA, D. A. O.; GONÇALVES, M. R. F.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Dosagem de imunoglobulina E, total e específica anti-*T. cruzi*, em amostras de líquido pericárdico de pacientes chagásicos. *Anais da VII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas*, Uberaba (MG), 1991. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24(supl.):22, 1991.
- NANCE, K. V. & SILVERMAN, J. F. Immunocytochemical panel for the identification of malignant cells in serous effusions. *Am. j. Clin. Pathol.* 95(6):867-74, 1991.
- RANDALL, M. B.; GEISINGER, K. R. Angiosarcoma of the heart: pericardial fluid cytology. *Diag. Cytopathol.* 6(1):58-62, 1990.
- REIS, V. F. Da importância do estudo proteico pós-morte no líquido pericárdico humano. Tese de Mestrado, ICB da UFMG, Belo Horizonte, 1984.
- RIEMANN, D.; WOLLERT, H. G.; MENSCHIKOWSKI, J.; MITTENZWEL, S.; LANGER, J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 104(1):48-56, 1994.
- ROCHA, A.; MINEO, J. R.; LOPES, E. R.; BESSA, J. C. A.; FERREIRA, A. P.; SEGADÃES FILHO, A. J.; MENEZES, T. G.; COSTA, M. C. O teste imuno-enzimático ELISA no líquido pericárdico: novo método para o diagnóstico post-mortem da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.* 20:213-216, 1987.
- WOLLERT, H. G.; PANNWITZ, H. G.; PANZNER, R. Quantitative and qualitative investigations on human pericardial fluid. *Z. Exp. Chir. Transplant Kunstliche Organe* 21(4): 213-21, 1988.
- ZAKOWSKI, M. F. & IANUALE-SHANERMAN, A. Cytology of pericardial effusions in AIDS patients. *Diagn. Cytopathol.* 9(3):266-9, 1993.