

POSSIBILITATEA METODEI CITOLOGICE ÎN INVESTIGAREA LICHIDELOR CAVITARE (PLEURAL, PERITONEAL, PERICARDIAL)

Diana Osadci, Tudor Rotaru, Nicolae Ghidirim, Valentin Martalog, Mariana Vîrlan
Catedra Oncologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

The citologic metod posibilites in cavitory liquids investigation (pleural, peritoneal, pericardial)

The primary purpose of citologic examination of fluids is to rule out metastatic or primary cancer.

Pleural effuzion. In women, in order of frequency, the most likely primary malignant tumor is mammary carcinoma, followed by ovarian cancer, lung cancer, cancer of gastrointestinal tract and limfomas. In men the most likely primary is lung cancer, followed by cancers of the gastrointestinal tract and limphomas.

Ascitic fluid. In women the most common tumor is ovarian carcinoma, followed by mammar carcinoma and cancers of the gastrointestinal tract. In men, cancer of the gastrointestinal tract, including pancreas, predominates.

Immunocytochmerstry is occasionally helpful in the diferential diagnosis of cancer cells versus mesothelial cells.

Rezumat

În cadrul investigării lichidelor cavitare diagnosticul citologic permite de a diferenția afectarea primară de cea metastatică, sugerând posibilul punct de pornire a metastazei.

La constatarea diseminării metastatice în lichidele cavitare fără cunoașterea focarului primar, pentru clinician pot fi utile rezultatele studiului conform căroră, pleureziile metastatice la femei cel mai frecvent sunt rezultat al diseminării carcinomului de glandă mamară, urmat de carcinomul ovarian și cel pulmonar. Pleureziile metastatice la bărbați cel mai frecvent pot fi manifestări secundare ale carcinomului pulmonar, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal. Ascita metastatică la femei cel mai frecvent este o manifestare secundară a carcinomului ovarian, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal și carcinomul de glandă mamară. La bărbați, ascita metastatică reflectă diseminarea carcinomului tractului gastro-intestinal.

Citodiagnosticul urmează a fi completat și nuanțat prin metoda imunocitochimică pentru verificarea apartenenței histologice a celulelor tumorale.

Actualitate. Deși diagnosticul citologic al exudatelor a fost inițiat aproape un secol, metoda rămâne încă dificilă, posibilitățile de eroare fiind mai mari decât în alte domenii ale citologiei. Cauza principală reziduă în greutatea de a delimita elementele mezoteliale normale, degenerate sau atipizate secundar de celulele maligne [16].

Suprafața cavităților seroase - pleurală, peritoneală, pericardiacă - este acoperită de o membrană subțire alcătuită dintr-un singur strat celular, denumit mezotelium, fapt care arată originea celulelor din mezodermul embrionar. În spațiul virtual, între pătura parietală și cea viscerală a seroaselor se găsește, în mod normal, o cantitate infirmă de lichid, care le umectează, facilitând alunecarea dintre ele [12,13,14].

Din cauza cantității extrem de reduse, lichidele cavitare nu pot fi extrase și respectiv studiate. Din aceste motive, în lipsa patologiei, metoda citologică de investigație a lichidului pleural, pericardiac sau peritoneal, nu este recomandată. Lichidele cavitare se examinează citologic numai în cazuri patologice, când ele se acumulează în cantități mari [4,5,6,7,8,9].

Celula specifică a revărsatelor este celula mezotelială. La aceasta, în frotiu, se pot deosebi trei trepte de maturitate: elemente tinere (precursoare), elemente mature și forme îmbătrânite. Elementele mezoteliale tinere și mature, domină în exudatele recente de iritație intensă

(inflamatorii, alergice, neoplastice). Celulele mezoteliale îmbătrânite apar în exudatele evaluate în timp (cardiace, cirotice, neoplazice).

Revărsatele din cadrul carcinoamelor nu sunt o consecință obligatorie a diseminării seroaselor. Ele pot avea și origine inflamatorie, pot apărea consecutiv iritației seroasei sau intervenției unor factori bacterieni. De asemenea, pot fi consecință a obstrucției capilarelor sau limfaticelor prin emboli tumorali. Din aceste motive, un procent variabil din revărsatele apărute în cursul carcinoamelor nu conțin celule maligne, chiar la examen repetat.

Scopul. Studiarea posibilităților metodei citologice în investigarea lichidelor cavitare și estimarea caracteristicilor morfologice, ce diferențiază celulele mezoteliale de cele metastazate din neoformațiuni.

Material și metode. Datele expuse au fost luate în considerație în cadrul examenului citologic diagnostic al lichidelor cavitare, obținute în anul 2012 de la 107 pacienți cu diagnosticul prezumtiv de carcinom metastatic.

Tabelul 1

Repartizarea pacienților cu diagnosticul de carcinom metastatic conform focarului primar

Focarul primar	Lichid pleural		Lichid ascitic		Lichid pericardiac	
	femei	bărbați	femei	bărbați	femei	bărbați
Carcinom de glandă mamară	23	-	2	-	3	-
Carcinom de ovar	8	-	19	-	-	-
Carcinom de pulmân	4	28	-	-	-	2
Carcinom al tractului gsaastro-intestinal	2	4	3	7	-	-
Limfom non-Hodgkin	1	-	-	1	-	-
TOTAL	38	32	24	8	3	2

Ulterior, în toate cazurile, focarul primar al neoformațiunilor a fost confirmat prin investigarea clinico-instrumentală a pacienților.

Lichidul a fost colectat prin puncția cavităților seroase, mai rar prin absorbția lichidului din cavitățile deschise cu scop de intervenție chirurgicală (laparotomie, toracotomie).

Cu scop de prevenire a coagulării, pereții vasului, în care se colectează exudatul, se prelucrează cu soluție de 5% de citrat de natriu. Dacă lichidul colectat nu poate fi transmis de urgență în laborator, în lichid se adaugă citrat de natriu de 5%, reieșind din calculele: 2-5 ml / 100 ml de lichid.

În laborator exudatul a fost centrifugat 5-10 minute la 1500-3000 rotații/minut. Dacă lichidul are aspect mucinos sau gelatinos, acesta nu se supune centrifugării: se aplică pe lame cu ajutorul unui ac. În caz de coagulare a lichidului se pregătește frotiul din sedimentul depus. Dacă sedimentul are câteva straturi, este binevenit de pregătit frotiuri din fiecare strat separat.

Din lichidul obținut, după centrifugare, au fost pregătite frotiuri citologice, fixate conform metodei May-Grünwald și colorate după Romanovski-Giemsă.

Rezultate obținute și discuții. Lichidele cavitare pot fi transudate (lichide cu caracter neinflamator) și exudate (lichide cu caracter inflamator). În transudate se conține 5-25 g/l proteine, în exudate 30-50 g/l proteine. În transudate elementele celulare se depistează în cantități minimale, iar în exudate acestea pot ocupa tot câmpul de vedere. Aceste celule pot fi prezentate de celule limfoide, histiocite (macrofagi) și mastocite. Un component obligator sunt

celulele mezoteliale, proliferația cărora prin prezența semnelor de atipie poate duce în eroare în privința unui proces malign.

Reactivitatea sporită a tunicilor seroase, cu regenerarea permanentă a mezoteliului, cauzează o componentă celulară diversă în lichidul cavității. Această diversitate celulară se manifestă cantitativ, precum și prin coraportul celulelor în proliferație și distrofie.

În lichidul de tip *transudat* celulele mezoteliale se aranjează sub aspect de straturi masive și izolate, au formă ovală, poligonală sau alungită, uneori cubică și prismatică. Nucleele ovale sau rotunde, frecvent ocupă centrul celulei, având o granulație omogenă fină a cromatinei. Unele celule au nucleu relativ mic în raport cu zona largă de citoplasmă, în alte cazuri nucleele sunt mărite în dimensiuni și colorate intens. Citoplasma celulelor se colorează de la intens albastru până la pal-albastru, aproape incolor. Bazofilia intensă a citoplasmei corelează cu mărirea nucleelor și hiperchromazia acestora. Aceste semne de proliferare a epiteliului se referă la toate celulele unui strat, în limitele căruia polimorfismul celular și nuclear lipsește.

În lichidul de tip *exudat* predomină celule de dimensiuni mari, cu bazofilia citoplasmei accentuată și hiperchromie a nucleelor. Se întâlnesc celule polinucleate. În nucleu frecvent sunt întâlniți nucleoli. La debutul procesului inflamator celulele mezoteliale se dispun dens formând structuri asemănătoare unui simplast. Se întâlnesc de asemenea aranjamente celulare pseudoglandulare și celule solitare. În lumenul unor „complexe glandulare”, persistă substanță omogenă, care imită secreția glandulară. Pot fi întâlnite celule gigante.

Modificările distrofice ale celulelor mezoteliale sunt identice în diverse procese patologice. Mezoteliocitele, de regulă, au formă rotundă și dimensiuni medii. Nucleele lor sunt în stare de picnoză, de liză sau cu cromatina dispersată, dispuse atât în centrul celulei, cât și excentric. Citoplasma celulei este vacuolizată, are aspectul spumos, uneori conține incluziuni. Celulele pot avea, de asemenea, formă poligonală sau alungită și dimensiuni majorate. Aceste celule sunt hipocrome, cu semne de liză a nucleului, fără granițe certe de delimitare.

Afectarea metastatică a cavităților seroase. Exudatele cavităților seroase, în caz de metastazare a neoplazmiilor, servesc drept mediu pentru existența celulelor tumorale, spre deosebire de țesuturi, unde se dezvoltă tumora primară sau metastatică. Datele experimentale demonstrează că în exudate, ca și în cazul mediilor de cultură, celulele tumorale cresc, se multiplică și capătă trăsături noi, adaptându-se la existența în stare suspendată.

Citodiagnosticul lichidelor cavitare este una din puținele metode capabile să răspundă la întrebările primordiale care stau în fața clinicianului: proces benign sau malign? tumoră primară sau secundară? și punctul de pornire a metastazei tumorale în caz de constatare a acestora?

Lichidul pleural. Datele studiului prezent sunt în concordanță cu datele din literatura mondială de specialitate [1,2,3,10,11] și remarcă faptul, că *pleureziile metastatice la femei* cel mai frecvent sunt rezultatul diseminării carcinomului de glandă mamară, urmat de carcinomul ovarian și cel pulmonar. *Pleureziile metastatice la bărbați* cel mai frecvent pot fi manifestări secundare ale carcinomului pulmonar, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal.

Lichidul ascitic. Ascita metastatică la femei cel mai frecvent este o manifestare secundară a carcinomului ovarian, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal și carcinomului de glandă mamară. La bărbați ascita metastatică reflectă diseminarea carcinomului tractului gastro-intestinal, inclusiv al pancreasului.

În diagnosticul neoplazmiilor maligne la examinarea exudatelor se cunosc anumite dificultăți, în comparație cu alte tipuri de examen citologic, din motivul persistării în exudate a multiplelor elemente celulare, a țesutului conjunctiv și mezotelial, proliferarea reactivă a cărora cauzează asemănarea acestora cu elementele tumorale. Capacitatea celulelor tumorale de a-și modifica forma și dimensiunile în mediul lichid complică interpretarea corectă a acestora. În procesul metastazării, țesutul tumoral, păstrându-și particularitățile morfologice de bază, suportă schimbări, uneori semnificative.

Metastaze ale carcinomului de glandă mamară. Citologic celulele tumorale se aranjează în complexe solide și izolate. Forma celulelor este ovală sau elipsoidă, ce amintește contururile

acinusului sau a ductului terminal de glandă mamară. În astfel de complexe are loc suprapunerea nucleelor cu contur iregular și cromatină macrogranulată, uneori având aspect de epiteliu pluristratificat. Este caracteristică prezența vacuolelor lipidice în citoplasma celulelor.

Metastaze ale carcinomului de ovar. Citogramele se caracterizează prin prezența celulelor cu semne de atipie și polimorfism. Celulele tumorale se plasează izolat, în aglomerări, în structuri papilare sau glandulare. Celulele au diverse forme și dimensiuni, uneori gigante și polinucleate. În majoritatea celulelor nucleele sunt deplasate spre periferie, păstrându-se diferențierea glandulară a celulelor tumorale. E caracteristică amplasarea celulelor în structuri glandulare și papilare. Ca semn patognomonic este considerată depistarea calcosferitelor (corpusculi psamomatoși).

Metastaze ale carcinomului de plămân. În dependență de structura histologică poate fi pavimentos, glandular și nediferențiat. În caz de *carcinom pavimentos cu semne de cheratinizare* celulele au structură iregulară, sunt ovale, poligonale sau alungite. Nucleele nu au contur regulat, cromatina grosolană, uneori pot fi picnotice. Citoplasma mai frecvent este pal-albastră, sunt întâlnite de asemenea și scuame pavimentoase care în unele cazuri pot domina. În caz de *carcinom pavimentos fără semne de cheratinizare* celulele sunt mai frecvent unimorfe, cu un cordon lung de citoplasmă și nuclee mari. În cadrul *carcinomului nediferențiat* celulele au dimensiuni apropiate de cele limfoide, forma rotundă, situate izolat în aglomerări uni- sau multistratificate, plasturi și complexe de structură neregulată. Citoplasma puțin pronunțată. În complexe nucleele formează suprafețe fațetate. Cromatina microgranulară, mai des de structură neclară. În *carcinomul glandular* sunt caracteristice structurile glandulare din celule cilindrice, prismatice, cubice.

Metastaze de carcinom al tractului gastro-intestinal. Celulele se amplasează în complexe de structură necaracteristică, uneori izolat. Este caracteristică amplasarea excentrică a nucleului cu contur neregulat și cromatina microgranulară, nucleolii sunt hipertrofiați. Citoplasma conține foarte multe vacuole. Este caracteristică colorația intensă a nucleelor pe un fond de citoplasmă spumoasă, deschisă – aceste schimbări reflectă caracteristicile funcției secretorii. Unele dintre celule au aspectul caracteristic de „inel cu pecete”. Astfel de celule pot fi confundate cu elementele mezoteliale cu semne de distrofie sau cu macrofagi.

Caracteristic pentru *limfomul non-Hodgkin* este monomorfismul celulelor de formă rotundă, aranjate izolat, uneori în aglomerări celulare amplasate într-un plan, cu limite certe. Cromatina nucleară în limfomul non-Hodgkin limfoblastic este fină, microgranulară, în timp ce în limfomul prolimfocitar cromatina e mai puțin gronjos comparativ cu cromatina limfocitelor. În limfomul de tip limfoblastic sunt prezenți nucleolii, frecvent unici. Un semn patognomonic servește prezența în frotiuri a leptoanelor – microfragmentelor de citoplasmă a celulelor limfoide.

Concluzii. În cadrul investigării lichidelor cavitare diagnosticul citologic permite de a diferenția afectarea primară de cea metastatică, sugerând posibilul punct de pornire a metastazei.

La constatarea diseminării metastatice în lichidele cavitare fără cunoașterea focarului primar, pentru clinician pot fi utile rezultatele studiului conform căroră, pleureziile metastatice la femei cel mai frecvent sunt rezultat al diseminării carcinomului de glandă mamară, urmat de carcinomul ovarian și cel pulmonar. Pleureziile metastatice la bărbați cel mai frecvent pot fi manifestări secundare ale carcinomului pulmonar, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal. Ascita metastatică la femei cel mai frecvent este o manifestare secundară a carcinomului ovarian, urmat de carcinomul tractului gastro-intestinal și carcinomul de glandă mamară. La bărbați, ascita metastatică reflectă diseminarea carcinomului tractului gastro-intestinal.

Citodiagnosticul urmează a fi completat și nuanțat prin metoda imunocitochimică pentru verificarea apartenenței histologice a celulelor tumorale.

Bibliografie

1. Alemán C, Sanchez L, Alegre J, Ruiz E, Vázquez A, Soriano T, Sarrapio J, Teixidor J, Andreu J, Felip E, et al. Differentiating between malignant and idiopathic pleural effusions: the value of diagnostic procedures QJM. 2007 Jun; 100(6):351-9.
2. Bielsa S, Panadés MJ, Egado R, Rue M, Salud A, Matías-Guiu X, Rodríguez-Panadero E, Porcel JM. Accuracy of pleural fluid cytology in malignant effusions. An Med Interna. 2008 Apr;25(4):173-7
3. Chih Hsu M.D. Cytologic detection of malignancy in pleural effusion: A review of 5,255 samples from 3,811 patients. *Diagnostic Cytopathology*, vol.I (3), 2006
4. Chu, A. Y. , L. A. Litzky , T. L. Pasha , G. Acs , and P. J. Zhang . Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2005. 18:105–110.
5. Davidson B. Ovarian carcinoma and serous effusions. *J. Oncology.* 20 (1): 65-7, 2001
6. Di Paolo N., Garosi G., Traversari L. Mesothelial biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Peritoneal Dialysis International.* 13 Suppl. 2:S 109-12, 1993
7. Dobbie J.W. Peritoneal ultrastructure and changes with continuous ambulatory peritoneal dialysis. 13 Suppl. 2:S 585-7, 1993
8. Fujiwara K. et all. Relationship between peritoneal washing cytology through implantable port system and second-look laparotomy in ovarian cancer patients with unmesurable residual diseases. *Gynecol. Oncol.* 40 (2) : 231-5, 1998.
9. Mulvany N. Cytohistologic correlation in malignant peritoneal washing. *Acta Cytologica* 40 (6) : 1231-9, Nov-Dec 1996
10. Nguyen GK. Cytopathology of pleural mesotheliomas. *Am J Clin Pathol.* 2000 Nov; 114 Suppl:S68-81.
11. Ong KC, Indumathi V, Poh WT, Ong YY. The diagnostic yield of pleural fluid cytology in malignant pleural effusions. *Singapore Med J.* 2000 Jan; 41(1):19-23.
12. Pinelli V, Laroumagne S, Sakr L, Marchetti GP, Tassi GF, Astoul P. Pleural fluid cytological yield and visceral pleural invasion in patients with epithelioid malignant pleural mesothelioma *J Thorac Oncol.* 2012 Mar; 7(3):595-8.
13. Shu J, Sun G, Liu H, Liu J. Clinical utility of vascular endothelial growth factor in diagnosing malignant pleural effusions. *Acta Oncol.* 2007; 46(7):1004-11.
14. Virganeyce Lyons-Boudreaux, Dina R. Mody, Jim Zhai, and Donna Coffey. Cytologic Malignancy Versus Benignancy: How Useful Are the “Newer” Markers in Body Fluid Cytology?. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine:* January 2008, Vol. 132, No. 1, pp. 23-28.
15. Агаджакова А. Х. Цитологический метод исследования при лапароскопии (рак желудка, печени и яичников). Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва, 1989.
16. Ровенский Ю. А. Топография поверхности нормальных и опухолевых клеток при контактном взаимодействии с искусственными и биологическими субстратами. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва, 1983.