
ESCORE TOTAL DE HEMOSSIDERÓFAGOS (THS) NA HEMORRAGIA PULMONAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO (EIPH) EM CAVALOS QUARTO DE MILHA

Total hemosiderophage score (THS) in exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) of quarter horses

**Janáina Socolovski Biava^a, Roberto Calderon Gonçalves^b,
Alexander Welker Biondo^c, José Ederaldo Queiroz Telles^d**

^a Médica Veterinária, Doutoranda em Medicina Veterinária (FMVZ - UNESP), Botucatu, SP - Brasil, e-mail: jsbiava@yahoo.com.br

^b Médico Veterinário, Docente do Departamento de Clínica Veterinária (FMVZ - UNESP), Botucatu, SP - Brasil, e-mail: calderon@fmvz.unesp.br

^c Médico Veterinário, Docente de Medicina Veterinária (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: abiondo@illinois.edu

^d Médico, Docente do Departamento de Anatomopatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: ederaldo@ufpr.br

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício (EIPH) em cavalos da raça Quarto de Milha com o uso do Escore Total de Hemossiderófagos (THS), que avalia a quantidade de hemossiderina em macrófagos alveolares no lavado broncoalveolar (BAL). Foram utilizados 20 animais da raça Quarto de Milha, sem prévio histórico clínico de EIPH, em rotinas de treinamentos e competições, provenientes de Curitiba e região metropolitana. A endoscopia e a colheita de BAL foram realizadas três dias após a participação nas competições. Lâminas foram preparadas com citocentrífuga e coloração especial do Azul da Prússia, sendo posteriormente avaliadas quanto à celularidade, preservação e coloração das células, e contagem do THS. Ao exame endoscópico, nenhum dos animais apresentou sangue nas vias aéreas respiratórias. Tanto a endoscopia como o lavado broncoalveolar foram de fácil realização, sem necessidade de sedação. Uma pequena variação na intensidade da coloração das lâminas foi observada, exigindo uma prévia experiência do examinador. Em conclusão, como diversos animais apresentaram THS elevado, este teste pode ser mais sensível que a endoscopia no diagnóstico e avaliação de EIPH em cavalos Quarto de Milha.

Palavras-chave: Equínos; Lavado broncoalveolar; Escore total de hemossiderófagos.

Abstract

The present study aimed to evaluate the Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage (EIPH) in Quarter Horses breed with the use of Total Hemosiderophage Score (THS), which evaluates the amount of hemosiderin in alveolar macrophages in the broncoalveolar lavage (BAL). A total of 20 Quarter Horses were used, with no previous clinical history of EIPH, under training and competition routine, from Curitiba and surroundings. Endoscopy and BAL sampling were performed three days after animal competition. Slides were prepared with cytocentrifuge and Prussian Blue special stain, and evaluated regarding cellularity, cell preservation and staining, and THS counting. At endoscopic exam, no animal presented blood in the respiratory airways. Both endoscopy and BAL sampling were of easy procedure, with no necessity of sedation. A mild variation on staining intensity was observed, requiring previous experience of the reader. In conclusion, as several animals presented high THS, this test may be more sensitive than endoscopy in the diagnosis and evaluation of EIPH in Quarter Horses.

Keywords: *Equine; Broncoalveolar lavage; Total hemosiderophage score.*

INTRODUÇÃO

A denominação hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (EIPH) tem sido usada para descrever o sangramento de origem pulmonar, que está associado com o exercício intenso (BIRKS et al., 2003). O histórico, os sinais clínicos, a auscultação, o exame endoscópico, a radiologia e o lavado broncoalveolar são as principais ferramentas utilizadas para o diagnóstico (FOREMAN, 1999; ROY; LAVOIE, 2003). A citologia atesta a hemorragia pulmonar pela presença de macrófagos alveolares fagocitando eritrócitos ou com hemosiderina no seu citoplasma (COWELL; TYLER, 1992). É comum observar células gigantes multinucleadas com hemosiderina em cavalos de corrida portadores de episódios recorrentes de EIPH (HEWSON; VIEL, 2002).

O lavado broncoalveolar (BAL) é a técnica semiológica mais indicada na suspeita de afecções difusas do interstício pulmonar ou do alvéolo (ANDREASEN, 2003), e quando associado ao exame endoscópico fornece boa avaliação visual das vias aéreas (HEWSON; VIEL, 2003). No lavado broncoalveolar normal, um número pequeno de hemossiderófagos pode ser encontrado em cavalos normais. Os macrófagos alveolares e linfócitos são células predominantes no BAL, e outras células como eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais são encontradas em menores proporções e devem ser contados (FREEMAN; ROSZEL, 1997). A variação dos tipos celulares do BAL e o reconhecimento do seu padrão citológico são de grande importância não apenas para o diagnóstico, mas também para o prognóstico ou condição clínica. A descrição do padrão citológico utilizando a impregnação da cor azul no citoplasma de macrófagos alveolares é comum em medicina, mas ainda pouco utilizado na rotina dos médicos veterinários (ROY; LAVOIE, 2003).

Lâminas confeccionadas com auxílio de equipamentos como citocentrífuga podem ser utilizadas para a avaliação citológica do BAL, suas lâminas apresentando vantagens em relação a centrífugas convencionais, por concentrar as células formando um botão celular que facilita a visualização em microscopia ótica, tornando a contagem celular mais fácil (HEWSON; HIEL, 2002). Seu uso se torna particularmente crucial em situações em que o fluido a ser analisado contenha quantidades menores que 2.000 células por μL , o que frequentemente acontece com o BAL (SHELLY, 2003).

Lâminas coradas com Azul da Prússia são utilizadas na rotina da medicina para a observação de macrófagos com depósitos de ferro (hemossiderófagos) no BAL, oferecendo um bom parâmetro do sangramento alveolar que pode ocorrer em pacientes com trombocitopenia, pacientes que passaram por transplantes cardíacos e em fumantes (DE LASSENCE, 1995). A presença aumentada de hemossiderófagos no BAL de equinos é sugestiva de EIPH (BIAVA et al., 2006). Os macrófagos contendo hemossiderófagos estão presentes no BAL de 7 a 21 dias após episódios de hemorragia pulmonar (HINCHCLIFF et al., 2004).

O método escore total de hemossiderina (THS) consiste em fórmula matemática descrita por Golde et al. (1975) e, segundo Doucet e Viel (2002), apresenta melhor especificidade para cavalos com ou sem histórico de EIPH. O método tem sensibilidade de 94% e especificidade de 88% para o diagnóstico da EIPH através do BAL.

O presente trabalho avalia a metodologia utilizada por Doucet e Viel (2002), em cavalos da raça Quarto de Milha que participaram em competições de laço em dupla.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cavalos sadios da raça Quarto de Milha em treinamentos diários e participantes de campeonatos, sem histórico de EIPH. Após 30 minutos do término do treinamento, os animais foram avaliados clinicamente e endoscopicamente. Foi utilizada somente contenção física dos animais e uso de cachimbo na narina contralateral para a passagem do endoscópio. Avaliou-se, pela endoscopia, a anatomia de faringe, laringe, traqueia e brônquios. O aparelho adotado para a realização das endoscopias foi um colonoscópio de fibra ótica flexível, com 1,60 m de comprimento útil e 12,80 mm de diâmetro externo e fonte de luz halógena de 250 watts, com intensidade de iluminação ajustável. Em seguida, uma sonda de silicone flexível, Bivona®, foi passada pelas vias aéreas direcionada aos brônquios principais. Inoculou-se 20 ml de cloridrato de lidocaína 2%, para cessar o reflexo de tosse próximo à região da carina. Através da sonda foram inoculados 100 ml de solução fisiológica 0,9%, fracionada em duas alíquotas de 50 ml. O líquido infundido foi recuperado por sucção realizada com seringas de 60 ml, sendo identificado, acondicionado em gelo e encaminhado ao Laboratório de Anatomo-Patologia do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostras foram então submetidas à prévia centrifugação e o botão celular formado foi ressuspensão e submetido à citocentrifugação (Citocentrifuga Revan, 2000d). Nas lâminas provenientes da citocentrifuga foi realizada coloração de Azul da Prússia segundo protocolo-padrão de coloração. Essas lâminas foram avaliadas posteriormente em microscópio quanto à celularidade, preservação das células e coloração. Foi realizada a contagem de hemossideróforos pela classificação de Doucet e Viel (2002), que se baseia na intensidade da coloração azul dos hemossideróforos, corados por Azul da Prússia. Esses autores consideram quatro graus de intensidade de coloração que, ao final, são convertidos na unidade THS (total hemosiderin score), grau 0: ausência de coloração azul no citoplasma; grau 1: azul claro no citoplasma; grau 2: cor azul densa em menor proporção no citoplasma ou cor de média intensidade na célula; grau 3: azul escuro na maior parte do citoplasma e grau 4: célula totalmente preenchida com hemossiderina no citoplasma (Figura 1). Nessa classificação em THS, os cavalos são considerados EIPH positivos quando apresentam escore superior a 25.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo exame endoscópico de 30 a 60 minutos após o treinamento não foi possível a visualização de sangue nas vias aéreas dos animais examinados após esforço físico, concordando com a afirmativa de que há necessidade de três endoscopias consecutivas, para diagnosticar endoscopicamente a EIPH (PASCOE, 1981; DOUCET; VIEL, 2002). Segundo a literatura, 30 a 60 minutos é o tempo requerido para o sangramento pulmonar drenar para as vias aéreas anteriores, entretanto, com o treinamento de 1 hora não levou o aparecimento da síndrome EIPH, pois, segundo Hinchcliff et al. (2005), cavalos EIPH positivos podem apresentar sangramento pulmonar de até 7 dias após esforço extenuante. Também não foram observadas alterações anatômicas nas vias aéreas destes animais como hemiplegia laringiana, deslocamento de palato entre outras.

O padrão citológico é bastante útil na interpretação e formulação de diagnóstico diferencial, ou seja, a citologia pode indicar processos inflamatórios de etiologia alérgica, fúngica, bacteriana, parasitários entre outras e até processos físicos, como no caso da hemorragia induzida por exercício (EIPH). Segundo Cowell e Tyler (1992) é difícil mensurar valores de referência para o BAL, pois a

contagem pode variar conforme a técnica de coleta e o processamento. Porém, os dados do presente trabalho (Tabela 1) estão de acordo com a observação de Cowell e Tylan (1992) de que a contagem diferencial de células in BAL de cavalos clinicamente normais, mostra um predomínio de macrófagos e linfócitos. Muitos desses trabalhos são realizados em cavalos de corrida e Mazan e Hoffman (2003) referem em seu estudo, uma significativa diferença entre o BAL de cavalos de corrida e cavalos de outros esportes, tais como três tambores e seis balizas. Neste trabalho, os resultados são similares, ou seja, os achados citológicos dos cavalos da raça Quarto de Milha apresentam a mesma proporção celular que cavalos da raça PSI (Tabela 1). Citologicamente, dentre 20 cavalos da raça QM analisados pelo escore THS, somente 15% são EIPH positivos, isto é, apresentam escore superior a 25 (Tabela 1). Acredita-se que este resultado pode ser diferente quando realizado em cavalos imediatamente após prova, pois o treinamento de 1 hora não é suficiente para desenvolver EIPH.

TABELA 1 - Percentagem de células no lavado broncoalveolar obtido depois de 100 ml de solução salina de Quarto de Milha em competições de laço em dupla: Contagem diferencial (%) de Macrófagos (M), Linfócitos (L), Neutrófilos (N), Eosinófilos (E), Células Epiteliais Cilíndricas (CE), Mastócitos e Escore THS

Table 1 - Bronchoalveolar % cells obtained after 100 mL saline infusion in Quarter Horses performing team roping competitions: Macrophages (M), Lymphocytes (L), Neutrophyles (N), Eosinophyles (E), cylindric cells (CE), mastocytes differential counts (%) and THS

N° Animal	%M	%L	%N	%E	%CE	%MT	THS
01	56,80	39,80	0,00	3,40	0,00	0,00	3,91
02	62,54	34,10	2,85	0,51	0,00	0,00	15,27
03	40,00	60,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,33
04	54,50	39,00	6,00	0,5	0,00	0,00	13,04
05	40,00	60,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,31
06	44,60	47,80	7,60	0,00	0,0	0,00	11,63
07	66,50	33,50	0,00	0,00	0,0	0,00	11,11
08	53,00	44,00	2,30	0,70	0,0	0,00	16,00
09	42,50	55,50	2,00	0,00	0,0	0,00	4,62
10	37,21	52,46	0,00	7,64	0,0	2,69	30,94
11	33,61	56,52	2,89	4,63	0,0	2,35	11,82
12	59,36	28,20	7,32	3,29	0,0	1,83	26,84
13	59,30	32,58	1,30	5,67	0,00	1,15	6,60
14	48,54	38,55	3,74	7,48	1,69	0,00	2,30
15	47,76	35,61	4,18	12,45	0,00	0,00	3,64
16	31,44	54,40	7,86	2,22	4,08	0,00	35,92
17	56,12	35,88	2,15	4,79	1,06	0,00	5,87
18	48,50	46,06	1,72	1,10	2,62	0,00	6,25
19	62,22	31,11	1,85	0,74	4,08	0,00	6,77
20	52,63	40,79	2,03	4,2	0,28	0,00	3,47
m	49,86	43,29	2,79	2,97	0,69	0,40	12,18
s	10,11	10,16	2,59	3,38	1,35	0,86	9,4

Outro fator importante é a citocentrífuga, equipamento de grande valor, pois concentra as células, formando um botão celular que facilita a visualização e a identificação celular nas diferentes colorações (MAZAN; HOFFMAN, 2003). Nesse experimento, a citocentrífuga preservou a morfologia das células adequadamente, principalmente dos linfócitos, contrastando com o resultado obtido por Lapointe et al. (1994) e Hewson e Viel (2002), que citam um decréscimo da percentagem de linfócitos com o uso de citocentrífuga. A coloração utilizada, Azul da Prússia, permitiu a adequada visualização

de todos os tipos celulares, sendo positiva na confirmação de animais com algum grau de hemorragia pulmonar, como sugerem Hewson e Viel (2002), pois identificou, com segurança, os macróforos com hemossideróforos. Observou-se nas lâminas pequena variação da intensidade da coloração nos macróforos alveolares pela coloração especial de Azul da Prússia, o que exigiu do examinador certa experiência e capacidade de classificações dos graus de EIPH citologicamente (Figura 1). As lâminas foram consideradas de boa qualidade quanto à celularidade e preservação das células, mostrando êxito na técnica de colheita e processamento.

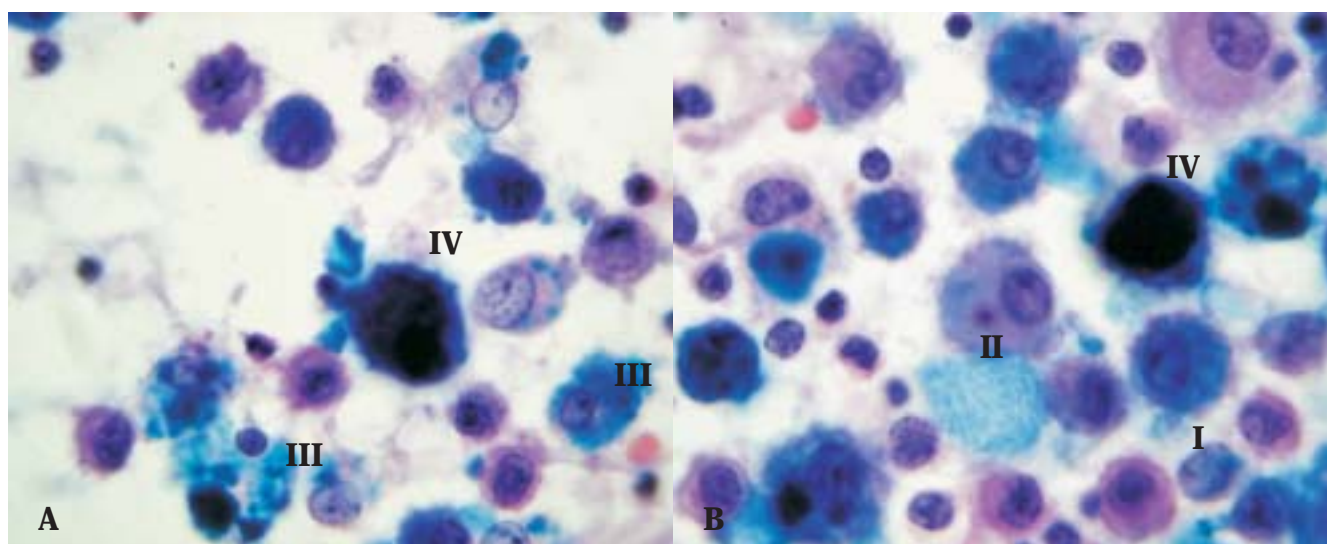


FIGURA 1 - Hemossideróforos de grau I, II, III e IV (A e B) no lavado broncoalveolar de Quarto de Milha, amostra coletada depois de 1 hora de treinamento – Azul da Prússia (1000 x)

Figure 1 - Quarter Horses Bronchoalveolar Hemossiderophages grade I, II, III e IV (A e B), samples collected after 1 hour training – Perl's Prussian Blue (1000 x)

Todos os cavalos da raça Quarto de Milha suportaram o exame endoscópico e citológico sem a necessidade de sedação intravenosa, entretanto, o uso de um cachimbo na narina foi eficaz para conter devidamente os animais e para a realização do procedimento. A utilização de cloridrato de lidocaína a 2% foi eficaz na redução do estímulo da tosse, permitindo, assim, que o exame fosse realizado em condições mais confortáveis para o animal e segura para a equipe, já que o cloridrato de lidocaína reduz a frequência e a intensidade da tosse, corroborando com os achados de Westermann et al. (2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho pode-se observar que a classificação de hemossideróforos em escore THS proposto por Doucet e Viel (2002), é eficaz e de grande valia para a avaliação da Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício. Este método permite uma avaliação cuidadosa dos macróforos alveolares com hemossiderina posterior ou tardia, quando comparada com a endoscopia e com boa especificidade e sensibilidade.

REFERÊNCIAS

ANDREASEN, C. B. Bronchoalveolar lavage. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 69-88, 2003.

BIAVA, J. S. et al. Avaliação clínica e citológica do trato respiratório de cavalos da raça Quarto de Milha, após o exercício. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 60-65, 2006.

- BIRKS, E. K.; DURANDO, M. M.; STEVE, M. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 19, n. 1, p. 87-100, 2003.
- COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Cytology and hematology of the horse**. Goleta: American Veterinary Publications, 1992.
- DE LASSENCE, A. et al. Alveolar hemorrhage. Diagnostic criteria and results in 194 immunocompromised hosts. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 1, p. 157-163, 1995.
- DOUCET, M. Y.; VIEL, L. Alveolar macrophage graded hemosiderin score from bronchoalveolar lavage in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage and controls. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 281-286, 2002.
- FOREMAN, J. H. Equine respiratory pharmacology. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 15, n. 3, p. 665-686, 1999.
- FREEMAN, K. P.; ROSZEL, J. F. Equine cytology patterns in respiratory conditions on noninfectious or unknown origin. **The Compendium**, v. 19, n. 6, p. 755-763, 1997.
- GOLDE, D. W. et al. Occult pulmonary hemorrhage in leukemia. **British Medical Journal**, v. 2, p. 166-168, 1975.
- HEWSON, J.; VIEL, L. S. Microbiology and cytology of respiratory. In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory disease**. Ithaca, New York. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 24 jun. 2002.
- HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2004.
- LAPOINTE, J. M.; VRINS, A.; LAVOIC, J. P. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 227-229, 1994.
- MAZAN, M. R.; HOFFMAN, A. M. Clinical techniques for diagnosis of inflammatory airway disease in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 238-357, 2003.
- PASCOE, J. R. et al. Exercise-induced pulmonary hemorrhage in racing thoroughbreds: a preliminary study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 703-707, 1981.
- ROY, M. F.; LAVOIE, J. P. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. **The Veterinary Clinics Equine Practice of America: Equine Practice**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2003.
- SHELLY, S. M. Fluidos de cavidades corporais. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. p. 157-171.
- WESTERMANN, C. M. et al. Effects of antitussive agents administered before bronchoalveolar lavage in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 8, p. 1420-1424, 2005.

Recebido: 05/03/2008
Received: 03/05/2008

Aprovado: 14/04/2008
Approved: 04/14/2008