



# Comparação entre lâminas citológicas confeccionadas por meio de centrifugação e sedimentação (Suta) de amostras de lavado broncoalveolar de equinos

*Comparison between slides produced through centrifugation and Suta's Camera from samples of equines bronchoalveolar lavage*

**Nilson de Jesus Baptista Ribas Neto<sup>[a]</sup>, Peterson Triches Dornbusch<sup>[b]</sup>, Selene Cirio Leite<sup>[c]</sup>,  
Silvana Maris Cirio<sup>[d]</sup>, Diego Lunelli<sup>[e]</sup>**

<sup>[a]</sup> Médico veterinário, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: nilsonribas@hotmail.com

<sup>[b]</sup> Médico veterinário, Doutor, docente de Clínica e Cirurgia de Equinos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil, e-mail: petriches@gmail.com

<sup>[c]</sup> Mestranda da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: seleneleite@gmail.com

<sup>[d]</sup> Médica veterinária da área de Patologia Veterinária, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: buily@cw.matrix.com.br

<sup>[e]</sup> Mestrando em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: dilunelli@hotmail.com

---

## Resumo

O lavado broncoalveolar (BAL) é um método que pode auxiliar no diagnóstico e no tratamento das enfermidades respiratórias do trato inferior de equinos. Faz-se necessária a confecção de lâminas citológicas de qualidade para perfeita avaliação das amostras. O objetivo da presente pesquisa foi o de comparar lâminas tradicionalmente produzidas por meio da centrifugação com a sedimentação em Câmara de Suta. Foram utilizados 20 equinos, sendo 10 saudáveis e 10 acometidos de enfermidades das vias aéreas inferiores, executando-se o BAL. O material colhido foi dividido em duas amostras, sendo a primeira processada com o uso da centrifugação a 1.500 rotações e a segunda alíquota depositada na Câmara de Suta, sedimentando-se durante 45 minutos. As lâminas foram coradas pela técnica Romanovski, em que se avaliou a quantidade de células e muco, a distribuição de células por campo, a preservação celular e a contagem diferencial das células. Comparando-se os métodos de confecção das lâminas, foram encontradas diferenças somente na quantidade de células epiteliais (maior na Câmara de Suta). O pareamento foi significativamente efetivo para neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. O escore de distribuição celular não apresentou diferença significativa, visualizando-se, no entanto, uma quantidade maior de aglomerados celulares nas lâminas centrifugadas, ocorrendo a preservação da integridade celular igual nos dois grupos. Concluiu-se

que ambos os métodos mostraram-se similares na produção de lâminas citológicas e que a sedimentação em Câmara de Suta pode ser uma alternativa viável na confecção das lâminas citológicas provenientes do BAL, especialmente em condições de campo, onde o clínico se encontra distante do laboratório de análise.

**Palavras-chave:** Broncoalveolar. Equino. Centrifugação. Sedimentação.

### **Abstract**

*Disorders related with respiratory tract are very common in equine medicine, and many times the diagnostic was based only in clinical signs. The bronchoalveolar lavage (BAL) is a method that can help in the diagnostic and treatment of lower airway diseases. Therefore, the confection of quality cytology slides is necessary for a perfect valuation of the samples. **Objectives:** comparing the slides produced traditionally through the centrifugation versus the sedimentation in Suta's Camera. **Method:** The BAL was performed in a total of 20 equines being 10 healthy and 10 affected of lower airway diseases. The material collected was separated in two samples: the first processed through centrifugation in 1.500 rotations, and the second deposited in the Suta's Camera, where was sedimented during 45 minutes. The slides were stained by Romanowsky techniques. Cells and mucus quantity, cells distribution per fields, cellular preservation and cells differential score were evaluated. For the statistic analysis of data was used the T Test, Mann-Whitney e Wiicoxon, with  $p > 0,05$ . **Results:** Comparing the slides confection methods, were found differences only in the epithelial cells quantity that was major in Suta's Camera. Pairing was significantly effective for neutrophils, lymphocytes, macrophages, eosinophils and mast cells. Score of cellular distribution did not short significant difference; however it was possible to find higher quantity of cell clusters in the centrifuged samples. Cellular entirety preservation was equal on both groups. **Conclusion:** Both methods shown to be similar in the cytological slides production. It was concluded that the sedimentation at Suta's Camera can be a viable alternative in the confection of cytological slides originated from BAL, especially in field conditions, where the clinician was distant from laboratorial analysis.*

**Keywords:** Bronchoalveolar lavage. Equine. Centrifugation. Sedimentation.

## **Introdução**

Estatísticas demonstram que os maiores prejuízos econômicos em cavalos de esporte são as consequências de problemas locomotores, seguidos de problemas respiratórios (PIOTTO, 2005). De acordo com estudos representativos, a cada ano em torno de 25% dos cavalos de corrida ou de passeio adquirem enfermidades agudas das vias respiratórias, enquanto que mais de 10% deles desenvolvem diferentes tipos de doenças crônicas. Além do tempo que se perde no tratamento destas enfermidades respiratórias, a possibilidade de cronificação pode prejudicar o rendimento a ponto de incapacitar o animal para as suas atividades. As doenças do trato respiratório nos equinos podem ser causadas pela combinação de agentes infecciosos e causas predisponentes, como condições climáticas desfavoráveis, estresse do desmame ou do transporte, ambientes mal ventilados e impróprios para a permanência de um cavalo atleta, cada qual contribuindo para debilitar os mecanismos de defesa das vias respiratórias dos equinos (DEEGEN, 1984).

Entre os métodos de diagnóstico do trato respiratório de equinos podem ser citados a endoscopia, a radiografia e o exame citológico das vias aéreas inferiores. A citologia pode ser realizada por meio de aspirado transtraqueal e de lavados traqueal, traqueobrônquico e broncoalveolar (BAL), auxiliando na avaliação das doenças do trato respiratório (ERICKSON; POOLE, 2007; HOGSON; HOGSON, 2003). O lavado broncoalveolar (BAL) é a técnica mais sensível para se avaliar o meio celular dentro de um segmento de brônquio, bronquíolo e alvéolos, sendo o método de seleção mais adequado para avaliar as vias aéreas distais (CLARK; LESTER; VETRO, 1995; ERICKSON; POOLE, 2007; FORGARTY; BUCKLEY, 1991). Sua eficiência é considerada um método sensível para o diagnóstico de enfermidades inflamatórias não infecciosas pulmonares

(HOFFMAN, 1999), como a obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) e a doença inflamatória das vias aéreas (DIVA). Também é útil para diagnóstico de hemorragia pulmonar por esforço (McKANE; CANFIELD; ROSE, 1993).

Essa técnica proporciona acesso às vias aéreas caudais de forma segura e pouco invasiva, obtendo amostras de porções mais profundas do trato respiratório, por meio da infusão de fluido isotônico, que facilita a aspiração de materiais e células (FERNANDES et al., 2000; FOGARTY, 1990; MORI et al., 2001; SWEENEY; BEECH, 1991).

O objetivo deste estudo foi comparar a qualidade citológica e as diferenças nas contagens celulares entre as lâminas produzidas por meio da técnica tradicional de centrifugação, confrontando com a sedimentação em Câmara de Suta, na confecção de lâminas citológicas, a partir de material obtido no lavado broncoalveolar de equinos.

## Materiais e métodos

O experimento foi realizado em Tijucas do Sul, PR, município situado a uma altitude média de 900 metros acima do nível do mar. As amostras foram coletadas nos meses de abril a outubro, cujas temperaturas no período noturno variavam de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ . Foram selecionados 20 equinos adultos, 10 deles saudáveis e 10 acometidos de enfermidades das vias respiratórias inferiores. Estes animais eram mantidos em regime de campo, não sendo confinados em baias durante a noite. Os animais foram submetidos à avaliação clínica e ao lavado broncoalveolar. Os critérios de inclusão no estudo dos animais enfermos foram: tosse, dispneia e secreção nasal de origem pulmonar. Para a realização do lavado, foi realizada a contenção física do animal em tronco apropriado e contenção química, utilizando-se cloridrato de xilazina, na dose de  $0,5\text{ mg/kg}$ , por via intravenosa. Após dez minutos, a sonda de lavado broncoalveolar (Figura 1) foi introduzida às cegas até a região dos brônquios, onde foram inoculados 100 mL de solução fisiológica a 0,9%. Em seguida, o líquido foi removido rapidamente por sucção, com seringa descartável de 60 ml devidamente identificada. Concluída a aspiração, a seringa com a amostra foi desacoplada da sonda, o conteúdo homogeneizado e realizada a avaliação macroscópica, na qual foram considerados o volume recuperado, a turbidez da amostra e a presença de surfactante. Uma alíquota de 3 ml foi separada para citológico quantitativo do BAL. O restante do fluido foi submetido às duas técnicas propostas:

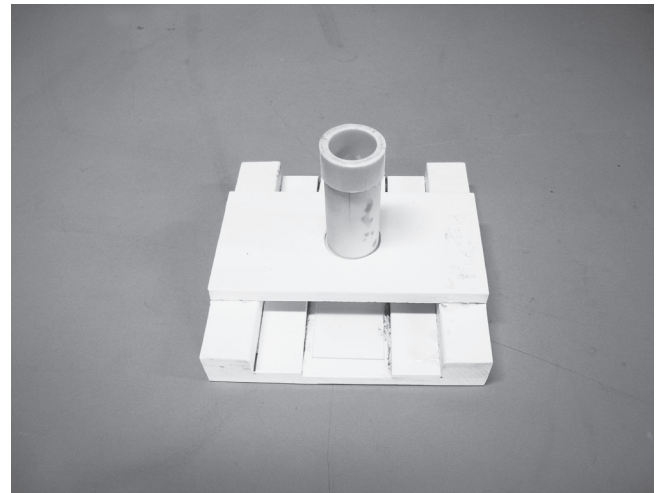
- a) Técnica 1 (Centrifugação): a amostra foi centrifugada a 1.500 rotações por minuto por cinco minutos, desprezando-se a fração líquida e ressuspendendo-se o pellet em 0,5 ml de solução fisiológica. Uma pequena alíquota deste material foi dispersa de forma uniforme em lâmina, utilizando-se micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ ;
- b) Técnica 2 (Suta): uma amostra de 5 ml foi depositada na Câmara de Suta (Figura 2) e deixada sedimentar durante 45 minutos, sobre a lâmina. Em seguida, o líquido excedente foi desprezado.

As lâminas foram secas, fixadas e coradas pelas técnicas de coloração do tipo Romanowski. As lâminas foram avaliadas em estudo cego, classificadas quanto à qualidade das células e distribuição celular na lâmina. Na avaliação diferencial foi contado um total de 400 células por lâmina de cada método proposto, diferenciando-se as proporções celulares em: células epiteliais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos. Para a classificação quanto à qualidade das células foi proposto um escore de lâminas em que a qualidade celular foi classificada da seguinte forma: grau 1 - células não preservadas; grau 2 - identificadas com dificuldade e com perda de citoplasma; grau 3 - identificadas com dificuldade, mas citoplasma preservado; grau 4 - facilmente identificadas. Para a distribuição das células sobre as lâminas foi criado um escore visual, em que: grau 1 - raras; grau 2 - poucas e esparsas; grau 3 - boa distribuição; grau 4 - muitas células por campo; grau 5 - células amontoadas.

Para a análise estatística foi utilizado o teste t, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para os dados do escore visual do muco foi utilizado o teste de Wilcoxon, para as amostras pareadas e Mann-Whitney para dados não paramétricos, ambos com significância de 5% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 1** - Sonda de lavado broncoalveolar para equinos



**Figura 2** - Câmara de Suta utilizada para sedimentação das amostras de lavado broncoalveolar de equinos, durante 45 minutos

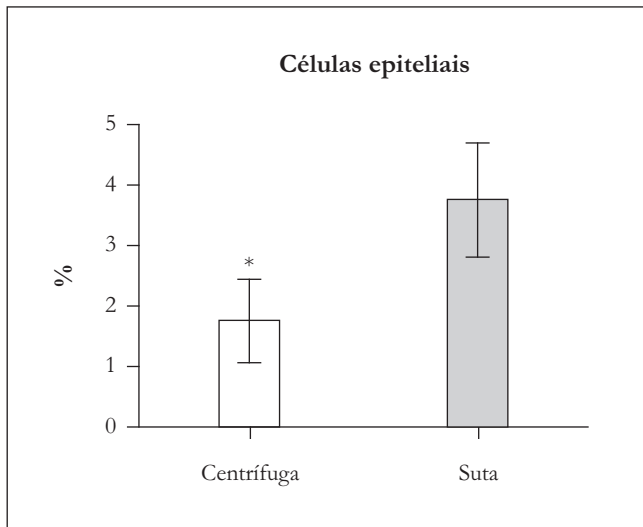
## Resultados

A avaliação da contagem diferencial de células está demonstrada na Tabela 1. Foi observado que o pareamento das amostras foi eficiente em todas as avaliações. A contagem diferencial de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos não diferiu significativamente entre as duas técnicas de confecção das lâminas citológicas. As médias das contagens diferiram significativamente somente para as células epiteliais (Figura 3).

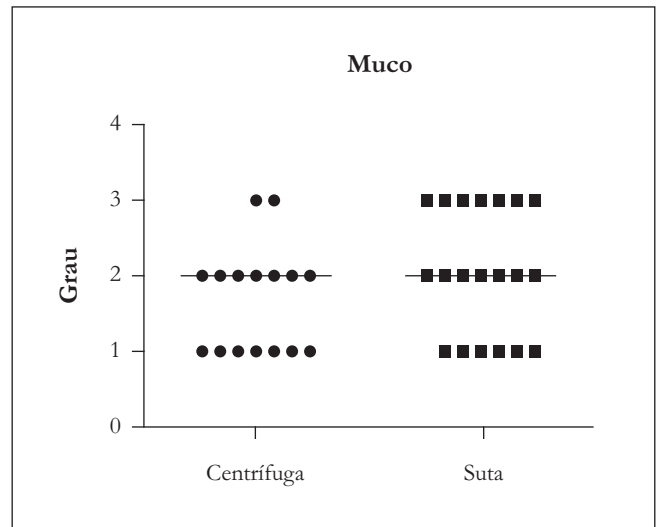
A avaliação do escore de muco observado nas lâminas citológicas apresentou um pareamento significativo, sendo que as medianas não apresentaram diferença estatística, como pode ser verificado na Figura 4.

**Tabela 1** - Contagem diferencial (em %) realizada por meio da técnica de centrifugação *versus* Câmara de Suta, em equinos clinicamente saudáveis, em que \*  $p < 0,05$  ( $n = 10$ )

	Neutrófilos		Linfócitos		Macrófagos		Eosinófilos		Mastócitos		Epiteliais*	
	centr	suta	centr	suta	centr	suta	centr	suta	centr	suta	centr	suta
1	7	7,5	23	13,3	67	77,5	1	0,3	0	0	2	1,5
2	0,5	1,5	1	1,5	96,5	89,3	0	0	0	0	2	7,8
3	0,8	0	13,5	11,3	83,5	81,3	0	0	1	1,3	2	6,3
4	0,3	0	3,5	1,5	95,5	97,3	0,3	0	0	0	0,5	1,3
5	5,8	3,5	10,8	15,8	83	75,5	0,5	1,8	0	0	0	3,5
6	0	0,3	18,3	5,3	68,5	81	0,8	0,5	0,8	1,3	11,8	11,3
7	1,5	0,3	3,3	7	93,8	92,5	0	0	0	0	1,5	0,3
8	4,3	6,3	1	5	93	87,2	0	0,5	1,8	0	0	1
9	3	0	7,5	2,8	87,5	96	1,3	0,3	0,8	1,3	0,8	0,5
10	2	3,3	0,8	7	95,3	89,8	1,5	0	0	0	0,5	0



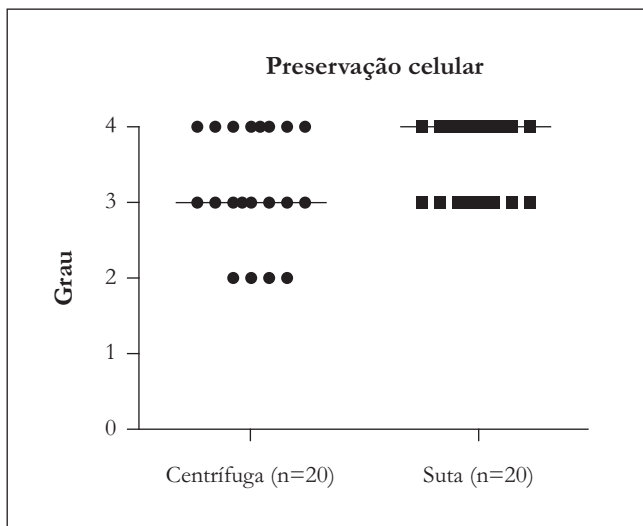
**Figura 3** - Média da contagem diferencial de células epiteliais no BAL de equinos saudáveis e enfermos (n = 20), observadas nas técnicas de centrifuga e de suta, em que \* p < 0,0



**Figura 4** - Escore de muco retirado pelo lavado broncoalveolar de equinos observado nas lâminas confeccionadas pela técnica de centrifuga e de suta, em que \* p < 0,05

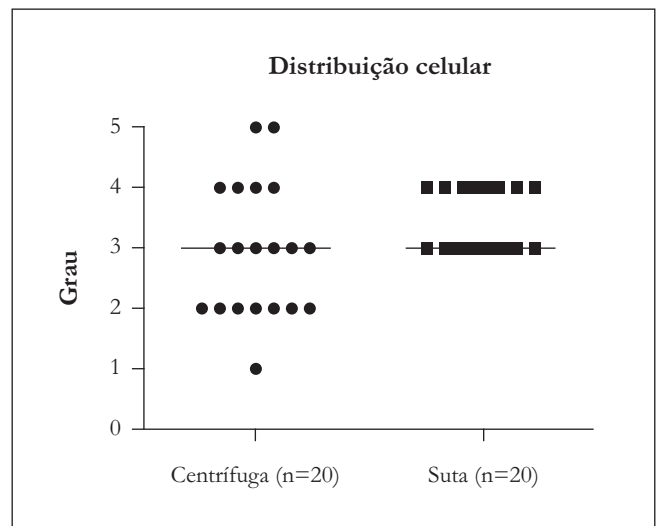
Na avaliação entre os métodos de confecção de lâminas não existiu diferença estatística significativa para a qualidade das células (Figura 5); entretanto, observou-se que lâminas de grau 2, em que o citoplasma celular não estava preservado, foram encontradas somente no grupo centrifuga.

A distribuição celular nas lâminas (Figura 6) também não demonstrou diferenças estatísticas; entretanto, pode-se observar uma distribuição mais homogênea nas lâminas confeccionadas na Câmara de Suta.



**Figura 5** - Escore de preservação celular de lavado broncoalveolar de equinos nas lâminas confeccionadas pelas técnicas da centrifuga e suta

Nota: A linha indica a mediana, em que \*p < 0,05.



**Figura 6** - Escore de distribuição celular de lavado broncoalveolar de equinos nas lâminas confeccionadas pelas técnicas da centrifuga e suta

Nota: A linha indica a mediana, em que \*p < 0,05.



## Discussão

Apesar do procedimento do BAL ser padrão, diferenças na execução da técnica podem existir, para serem adaptadas de acordo com o experimento. No presente estudo, foi realizada a inoculação de 100 mL de solução fisiológica comercial, anteriormente adotado por Biava et al. (2006) em trabalho com cavalos Quarto-de-milha na região de Curitiba, PR. Mansmann e King (1998) sugerem que o volume infundido para realização do BAL influencia na contagem celular diferencial e que, para ser realizado efetivamente, seriam necessárias quantidades maiores que 250 ml de líquido. Porém, os mesmos autores afirmam que se não houver variação no volume infundido em todos os animais, o resultado pode ser confiável da mesma forma, fazendo-se necessária, portanto, uma padronização da técnica de cada laboratório, com um critério para infusão de um mesmo volume.

No presente estudo, a técnica do BAL, de avaliação citológica do trato inferior dos equinos, mostrou-se muito eficiente, sendo mais uma ferramenta para o clínico. Com relação às técnicas de preparação das lâminas, ambas se mostraram efetivas, pois não apresentaram diferença estatística na contagem diferencial, salvo as células epiteliais aumentadas no método da Câmara de Suta, provavelmente em função da maior dimensão destas células, favorecendo a maior sedimentação sofrida na Câmara de Suta. McGorum (1993) afirma que preparações citológicas para as contagens diferenciais podem ser realizadas por citocentrifugação ou por confecção de esfregaços a partir de sedimento obtido em centrífuga convencional. Entretanto, observou-se neste estudo que a técnica de sedimentação na Câmara de Suta se mostrou eficiente como método de avaliação citológica. Segundo Lessa et al. (2007), a contagem diferencial deve avaliar no mínimo 300 células, levando-se em conta aspectos morfológicos e do muco, predominando no BAL de animais normais os macrófagos alveolares, os linfócitos e número reduzido de células epiteliais ciliadas, não ciliadas e os eosinófilos. Os mesmos autores também consideraram que amostras de BAL normais geralmente apresentavam proporções aproximadamente iguais entre macrófagos alveolares e linfócitos, observando celularidade moderada, com existência discreta de muco no fundo das lâminas. Mazan e Hoffman (2003) e Michelotto Júnior et al. (2007) afirmam que, para maior acurácia na interpretação dos resultados, é preferível realizar a contagem diferencial entre 300 e 500 células por lâmina. No presente estudo foram contadas 400 células, o mesmo utilizado por Fortes Júnior (2005).

A qualidade celular das lâminas mostrou-se presente em ambos os métodos em que não se encontraram diferenças ( $p > 0,05$ ), porém, no método da centrifugação foram classificadas algumas lâminas com grau 2, o que não é desejado, pois não se pode diferenciar o citoplasma celular, fato este que não ocorreu na técnica da Câmara de Suta, em que nenhuma lâmina foi inferior ao grau 3. A dificuldade de diferenciar o citoplasma no método da centrifugação pode ser justificada em função do rompimento de algumas células durante o processo, diferente da Câmara de Suta, em que o material é sedimentado lentamente. Garma (2004) também obteve boa qualidade citológica nas lâminas confeccionadas a partir de líquido cerebroespinhal em Câmara de Sedimentação de Suta.

Comparando-se os métodos quanto ao critério de distribuição celular, ambos tiveram boa distribuição na lâmina, novamente não existindo diferença estatística entre os métodos. Entretanto, as lâminas que foram preparadas por meio da Câmara de Suta se mostraram mais homogêneas. No método da centrifugação, em alguns casos os agrupamentos celulares formados não se desfazem na ressuspensão da amostra, não permitindo uma perfeita distribuição celular sobre a lâmina. O tempo de preparação das lâminas na Câmara de Suta foi mais demorado, em função de se deixar a amostra sedimentar por 45 minutos. Entretanto, no método de sedimentação não há necessidade da utilização de centrífuga, o que facilita a confecção das lâminas citológicas, principalmente a nível de campo, pois as propriedades onde os animais ficam alojados normalmente estão longe dos laboratórios especializados e o transporte das amostras por tempo prolongado e com má refrigeração pode diminuir a qualidade citológica destas.

## Conclusão

Ambas as técnicas foram efetivas na preparação de lâminas de amostras obtidas por meio do lavado broncoalveolar de equinos. A interpretação da contagem diferencial foi semelhante nas duas técnicas estudadas,

exceto pelo discreto aumento na quantidade de células epiteliais obtido na Câmara de Suta. Desta forma, pode-se concluir que a sedimentação em Câmara de Suta pode substituir a técnica de centrifugação das amostras, especialmente para os clínicos que atuam em condições de campo.

## Referências

- BLAVA, 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.
- CLARK, C. K. et al. Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 249-252, 1995.
- DEEGEN, E. Resultados endoscópicos em casos de afecções das vias respiratórias superiores. In: INTEGRA DAS PALESTRAS, 1., JORNADAS BOEHRINGER DE PATOLOGIA EQUINA, 2/3., 1984, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Jornadas Boehringer de Patologia Equina, 1984. p. 11-13.
- ERICKSON, H. H.; POOLE, D. C. Exercise-induced pulmonary hemorrhage: current concepts. In: LEKEUX, P. (Ed.). **Equine respiratory diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Services, 2007. Disponível em: <[http://www.ivis.org/special\\_books/Lekeux/erickson/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/erickson/chapter_frm.asp?LA=1)>. Acesso em: 24 jun. 2010. Document n. B0320.0102.
- FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p.604-609, 2000.
- FOGARTY, U. Evaluation of a bronchoalveolar technique. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 3, p. 174-176, 1990.
- FORGARTY, U.; BUCKLEY, T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 434-437, 1991.
- FORTES Jr., W. F. **Citologia pulmonar de eqüinos (*Equus caballus*) em situação de manejo estrito a campo e estabulados**. 2005. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- GARMA, A. A. An inexpensive sedimentation chamber for the preparation of cytologic specimens of cerebrospinal fluid. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 16, n. 6, p. 585-587, 2004.
- HODGSON, D. R.; HODGSON, J. L. Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 11, p. 681-684. 2003.
- HOFFMAN, A. M. Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. **Equine Veterinary Education**, v. 11, n. 6, p. 330-336, 1999.
- LESSA, D. A. B. et al. Lavado broncoalveolar em eqüinos: revisão de literatura parte 2: achados citológicos. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia, UNIPAR**, v. 10, n. 1, p. 31-38, 2007.
- MANSMANN, R. A.; KING, C. **How to perform bronchoalveolar lavage in practice**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 1998. Disponível em: <[www.ivis.org](http://www.ivis.org)>. Acesso em: 23 mar. 2007.
- 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.
- McGORUM, B. C. Respiratory secretion (RS) sampling techniques and interpretation. In: DIXON, P. M. (Ed.). **Equine respiratory endoscopy**. Brackwell: Boehringer Ingelheim Vetmedica, 1993. p. 118.
- McKANE, S. A.; CANFIELD, P. J.; ROSE, R. J. Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 11, p. 401-404, 1993.

MICHELOTTO Jr., P. V. et al. Aspirado traqueal de cavalos clinicamente sadios da raça Quarto-de-Milha após prova de três tambores. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 1-7, 2007.

MORI, E. et al. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente sadios. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 172-178, 2001.

PIOTTO, S. B. Diagnóstico e tratamento das laringopatias no cavalo atleta. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2., SEMANA DO CAVALO, 4., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2005. p. 1-11.

SWEENEY, C. R.; BEECH, J. Bronchoalveolar lavage. In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1991. p. 41-53.

Recebido: 05/05/2009

*Received:* 05/05/2009

Aprovado: 03/02/2010

*Approved:* 02/03/2010