

USO DA CITOCENTRÍFUGA E COLORAÇÕES ESPECIAIS NO EXAME CITOLÓGICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR EM CAVALOS

Use of Special Stains in the Cytological Exam of Bronchoalveolar Lavage in Horses

*Biava, J. S.¹
Gonçalves, R. C.²
Zanotto, G. M.³
Tonin, V. R.⁴
Caron, P. E.⁴
Biondo, A. W.⁵
Telles, J.E.Q.⁶*

Resumo

O lavado broncoalveolar (BAL) com auxílio de endoscopia é importante instrumento na avaliação citológica das vias respiratórias inferiores em eqüinos, proporcionando um diagnóstico mais preciso das diversas injúrias respiratórias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso da citocentrífuga associado a colorações especiais no exame citológico do BAL em cavalos. Seis cavalos, provenientes do Regimento da Polícia Militar do Paraná, foram utilizados no experimento; após contenção física dos animais e passagem do endoscópio, foram introduzidos 300 ml de solução apirogênica comercial, fracionada em três alíquotas de 100 ml, por sonda passada pelo canal de trabalho do endoscópio até o brônquio caudodorsal direito. O líquido infundido foi succionado com seringas de 60 ml, identificado, acondicionado em gelo e encaminhado ao Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostras foram então submetidas à citocentrifugação (Citocentrífuga Revan, 2000D), sendo realizadas colorações de Giemsa, Papanicolau e Azul da Prússia. A coloração de Giemsa permitiu visualização e identificação e quantificação adequada dos diferentes tipos celulares. O uso da coloração Papanicolau permitiu visualização por grumos celulares, bem como detalhada avaliação nuclear. Finalmente, a coloração do Azul da Prússia permitiu visualização e contagem dos hemossiderófagos. Em conclusão, a citocentrífuga preservou a morfologia das células, em particular dos linfócitos, facilitando sua visualização e reconhecimento; as colorações utilizadas permitiram adequada visualização dos tipos celulares; a colheita e acondicionamento das amostras, com posterior processamento em laboratório de patologia humana, mostrou-se uma alternativa ao diagnóstico, particularmente pelo alto custo da citocentrífuga exclusivamente para a medicina veterinária.

Palavras-chave: BAL, Citocentrífuga, Colorações especiais.

¹ Pós-graduanda da Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp / Botucatu – SP.

² Docente da Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp / Botucatu – SP Rubião Junior s/n, Botucatu CEP 18.618-000 calderon@fmvz.unesp.br.

³ Acadêmico de Medicina Veterinária da UFPR – PR

⁴ Médico Veterinário do Regimento de Cavalaria Coronel Dulcídio.

⁵ Docente do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR

⁶ Serviço de Anatomopatologia HC/UFPR

Abstract

The bronchoalveolar lavage (BAL) guided by endoscopy is an important tool in the cytological evaluation of lower respiratory tract, allowing a more precise diagnosis of the respiratory injuries in equines. The aim of the present study was to evaluate the use of cytocentrifuge and special stains in the cytological examination of BAL. Following physical restraint and endoscopy, 300 ml of commercial apyrogenic solution, fractioned in three aliquotes of 100ml, was introduced into a catheter through the endoscopic canal towards the right caudodorsal bronchio. The infused fluid was suctioned with 60 ml syringe, identified, placed into ice and transported to the Pathology Laboratory of the Medical Hospital of UFPR. The samples were submitted to cytopspin (Cytocentrifuge Revan, 2000D), and stained with Giemsa, Papanicolaou and Perl's Prussian Blue. Giemsa stain allowed adequate visualization and identification of different cellular types. The use of Papanicolaou stain allowed visualization through cellular clusters, as well as detailed nuclear evaluation. Finally, Perl's Prussian Blue allowed hemosiderophage visualization and counting. In conclusion, the cytocentrifuge adequately preserved the cellular morphology, particularly the lymphocytes, facilitating visualization and recognition of cells; the performed stains allowed adequate visualization of all cellular types; the sample collection and handling, with processing in a human pathology laboratory may be an alternative diagnostic procedure, particularly due to the high costs of cytocentrifuge equipment exclusively for veterinary medicine.

Keywords: BAL, Cytocentrifuge, Special stain

Introdução

O lavado broncoalveolar (BAL) é a técnica semiológica mais indicada na suspeita de afecções difusas do interstício pulmonar ou do alvéolo e quando associado ao exame endoscópico fornece uma boa avaliação visual das vias aéreas (ANDREASEN, 2003; HEWSON; VIEL, 2003). O BAL tem sido descrito como uma "biópsia líquida", sendo uma amostra mais representativa que o lavado traqueal ou aspirado trans-traqueal, e ainda apresentando outras vantagens como facilidade na realização, menor invasividade e melhor tolerância pelo cavalo (MAZZAN; HOFFMAN, 2002).

Para a realização do lavado broncoalveolar é utilizada uma sonda flexível, passada pelo canal de trabalho do endoscópio ou cateter de silicone localizado nos brônquios, por onde alíquotas de fluido isotônico podem ser infundidas pela luz do tubo e recuperadas manualmente por seringas de 60 ml (ROY; LAVOIE, 2003). Deve-se cuidar para não exercer uma pressão negativa exacerbada, o que poderia provocar o colapso dos brônquios, resultando em menor volume recuperado (MAZZAN; HOFFMAN, 2002).

Amostras de fluidos recuperados por lavado traqueal apresentaram diferença na contagem de macrófago e linfócito quando comparados ao lavado broncoalveolar, sendo os demais tipos celulares encontrados em pequenas quantidades e em semelhantes proporções nas duas técnicas (ERICKSON; POOLE, 2002). A ausência de células epiteliais cilíndricas e células produtoras de muco

podem ser um indicativo de colheita bem-sucedida, pois demonstram que a colheita é proveniente da região alveolar e que não houve traumatismos nas vias aéreas proximais. O BAL deve ser utilizado principalmente para a avaliação citológica do fluido, pois a luz do tubo não é protegida e o líquido recuperado pode conter bactérias provenientes das vias aéreas altas, podendo fornecer resultados falsos (ROY; LAVOIE, 2003).

A maioria dos cavalos tolera bem o exame endoscópico, não sendo necessária a contenção química; o uso do cachimbo é normalmente suficiente nos animais para sua contenção. No entanto, para se evitar tosse excessiva e promover um melhor conforto ao animal durante a passagem do endoscópio, a lidocaína (0,5%) pode ser utilizada para dessensibilização da mucosa das vias aéreas baixas (ROY; LAVOIE, 2003).

Num lavado broncoalveolar normal, um número moderado de células deve ser encontrado e proporções iguais de macrófagos alveolares e linfócitos 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 particular. A descrição do padrão citológico é comum em medicina humana, mas ainda pouco utilizada na rotina médico-veterinária (ROY; LAVOIE, 2003).

Lâminas confeccionadas com auxílio de citocentrífuga podem ser utilizadas para a avaliação citológica e apresentam como vantagem uma

maior concentração de células por campo de visão do microscópio, 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).

Embora a citocentrifugação melhore a visualização dos tipos celulares, fazem-se necessários cuidados especiais no seu processamento e análise. A pré-centrifugação da amostra de BAL antes da citocentrifugação pode ser necessária quando o volume inicial obtido for muito elevado; deve-se nestes casos desprezar o excesso de sobrenadante e o pelete celular remanescente é ressuspenso e colocado na citocentrífuga (HEWSON; VIEL, 2003). A velocidade e o tempo de duração da citocentrifugação das amostras provenientes do BAL também podem causar diferença na proporção dos tipos leucocitários, principalmente na redução da média de linfócitos e macrófagos contados (DE BRAUWER, 2000b). Sua análise deve ser ainda realizada de preferência no centro do anel formado pela citocentrifugação, uma vez que parece ser mais representativo da amostra (DE BRAUWER, 2000a).

As lâminas provenientes da citocentrifugação são inicialmente coradas pelos métodos de Romanowski, que incluem as colorações de Wright's, Giemsa e May-Grüwald Giemsa, sendo que outras colorações como a de Papanicolaou e Azul da Prússia podem ser também utilizadas na rotina citológica (COWEL; VIEL, 1992). A coloração de Papanicolaou, inicialmente utilizada para a visualização de células do endométrio uterino, pode também ser utilizada para identificação de células neoplásicas em exames citológicos do BAL em humanos (GABER, 2002). Lâminas coradas pelo método de Azul da Prússia são utilizadas na rotina da medicina humana para a observação de macrófagos com depósitos de ferro (hemossideróforos) no BAL, oferecendo um bom parâmetro do sangramento alveolar que pode ocorrer em pacientes com trombocitopenia, pacientes transplantados cardíacos e em fumantes em excesso (DE LASSENCE, 1995).

Material e métodos

Foram utilizados seis cavalos em repouso e sem prévio exercício, de diferentes raças e condi-

ções respiratórias, provenientes do Regimento da Polícia Militar do Paraná, localizado em Curitiba, PR. Após contenção física dos animais, foi realizada a passagem do endoscópio e a inspeção visual da faringe, laringe, traquéia e brônquios. Em seguida, uma sonda flexível direcionada ao brônquio caudodorsal direito ou para os locais com secreções ou sangramentos foi passada pelo canal de trabalho do endoscópio. Pela sonda foram inoculados 300 ml de solução apirogênica comercial, fracionada em três alíquotas de 100 ml. O líquido infundido foi recuperado por sucção realizada com seringas de 60 ml, sendo identificado, acondicionado em gelo e encaminhado ao Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostras foram então submetidas à prévia centrifugação e o pelete celular formado foi ressuspenso e submetido à citocentrifugação (Citocentrífuga Revan, 2000D). Nas lâminas provenientes da citocentrífuga foram realizadas colorações as colorações de Giemsa, Papanicolaou e Azul da Prússia de cada amostra de BAL, segundo os respectivos protocolos padrões de coloração. Estas lâminas foram avaliadas posteriormente em microscópio quanto à celularidade, preservação das células e coloração.

Resultados e discussão

Observou-se com o presente trabalho que o método de colheita, o armazenamento e o processamento das amostras no laboratório do serviço de anatomo-patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná foram realizados com êxito, podendo este ser utilizado em futuros trabalhos com lavado broncoalveolar.

Todas as lâminas apresentaram boa celularidade e pouca presença de células degeneradas. A citocentrífuga preservou a morfologia das células adequadamente, em particular os linfócitos, contrastando com achados anteriores onde foi observado um decréscimo do número deste tipo celular quando a amostra era submetida à citocentrifugação (LAPOIENT, 1994). Assim, obteve-se maior facilidade em visualizar e reconhecer os tipos celulares, como já referidos anteriormente, o que mostra ser esta uma das maiores vantagens para o uso desta técnica (HEWSON; VIEL, 2002).

A coloração de Giemsa permitiu a visualização e identificação adequada dos diferentes tipos celulares presentes nas lâminas, incluindo

macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células ciliadas e calciformes. O uso da técnica de coloração de Papanicolau permitiu a visualização pelos grumos celulares, bem como detalhada avaliação nuclear, evidenciando bem as células epiteliais. Por fim, a coloração do Azul da Prússia permitiu a visualização de raros macrófagos com pigmentos de hemossiderina (hemossideróforos), sugerindo hemorragia pulmonar crônica discreta em alguns animais.

Conclusões

As colorações utilizadas no presente trabalho permitiram a adequada visualização e reconhecimento de todos os tipos celulares presentes no lavado broncoalveolar, sendo compatível com as características necessárias em lâminas destinadas à análise laboratorial do BAL. A colheita, o acondicionamento e o processamento no laboratório de patologia humana mostraram-se alternativas viáveis ao diagnóstico de afecções respiratórias em eqüinos, visto o alto custo da citocentrífuga para aquisição na medicina veterinária.

Referências

- ANDREASEN, C. B. Bronchoalveolar lavage. **The veterinary clinics small animal practice**, v. 33, p. 69-88, 2003.
- COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Cytology and hematology of the horse**. Goleta: American Veterinary, 1992.
- DE BRAUWER, E. I. et al. Cyto centrifugation conditions affecting the differential cell count in bronchoalveolar lavage fluid. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 22, p. 416-422, 2000.
- DE BRAUWER, E. I. et al. Differential cell analysis of cyto centrifuged bronchoalveolar fluid samples affected by the area counted. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 22, p. 143-149, 2000.
- DE LASSENCE, A. et al. Alveolar hemorrhage. Diagnostic criteria and results in 194 immunocompromised hosts. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** v. 151, p. 157-163, 1995.
- ERICKSON, H. H.; POOLE, D. C. Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In: _____. **Equine respiratory disease**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Services. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acesso em: 8 jan. 2002.
- FREEMAN, K. P.; ROSZEL, J. F. Equine cytology patterns in respiratory conditions of noninfectious or unknown origin. **The compendium**, v. 19, p. 755-763, 1997.
- GABER K. A.; GOLDMAN J. M.; FARRELL D. J. Cytological examination of the whole endobronchial brush in bronchoscopic diagnosis of lung cancer. **Respir. Med.** v. 96, p. 259-261, 2002.
- HEWSON, J.; VIEL, L. Sampling, microbiology and cytology of respiratory. In: _____. **Equine respiratory disease**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Services. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 24 jun. 2002.
- LAPOINTE, J. M.; VRINS, A.; LAVOIE, J. P. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, 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, p. 238 – 357, 2003.
- ROY, M. F.; LAVOIE, J. P. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. **The Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 19, p. 1-17, 2003.
- SHELLY, S. M. Fluidos de cavidades corporais. In: SHELLY, S. M.; RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: ROCA, 2003. p. 157-171.

Recebido em: 05/04/2005

Aprovado em: 30/09/2005