

Uso do Luxol Fast Blue para diferenciação de pigmentos de bilirrubina e lipofuscina em amostras citológicas de fígado de cães (*Canis familiaris*) com doença hepática*

Gabriel Bobany de Queiroz¹⁺, Renata Arcoverde Borburema Farache², Mônica da Costa³, Marcia Carolina Salomão dos Santos⁴ e Nayro Xavier de Alencar⁵

ABSTRACT. Queiroz G.B., Farache R.A.B., Costa M., Santos M.C.S. & Alencar N.X. [Use of Luxol Fast Blue for differentiation of bilirubin and lipofuscin pigments in liver cytological samples of dogs (*Canis familiaris*) with hepatic disease.] Uso do Luxol Fast Blue para diferenciação de pigmentos de bilirrubina e lipofuscina em amostras citológicas de fígado de cães (*Canis familiaris*) com doença hepática. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(1):61-64, 2016. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: bobany@gmail.com

Several pigments can be viewed on cytological preparation of the liver. Special stains are often necessary to differentiate these pigments, such as the differentiation between bilirubin, pathological pigment indicative of cholestasis, and lipofuscin, a non pathological pigment that is normal in older dogs with the Luxol Fast Blue special stain. The objective of this study was to evaluate the use of Luxol Fast Blue in liver samples obtained from dogs with laboratory and / or ultrasound diagnosis of liver disease with suspected cholestasis, evaluating whether this staining can be used to confirm the diagnosis of cholestasis by cytological examination. 30 dogs underwent ultrasound-guided fine needle aspiration of the liver, followed by serum biochemical test for cholestasis confirmation, of which 11 had suggestion of bilirubin or lipofuscin pigment. The samples were stained with Giemsa and later by Luxol Fast Blue. Although this technique positively stain the lipofuscin pigment, there was no significant difference between samples stained positively and negatively by Luxol Fast Blue in the biochemical evaluation of the animals.

KEY WORDS. Cytology, liver, biochemistry, stain, special stain, dog, cholestasis, lipofuscin.

RESUMO. Diversos pigmentos podem ser visualizados na preparação citológica do fígado. Colorações especiais são muitas vezes necessárias para fazer a diferenciação destas estruturas, como a diferenciação entre bilirrubina, pigmento patológico indicativo de colestase, e lipofuscina, pigmento não patológico e normal em cães idosos, pelo Luxol Fast Blue. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso

do Luxol Fast Blue em amostras citopatológicas de fígado obtidas de cães com diagnóstico laboratorial e/ou ultrassonográfico de doença hepática com suspeita de colestase, avaliando se esta coloração pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico de colestase através do exame citopatológico. Foram utilizados 30 animais da espécie canina, dos quais 11 apresentaram pigmentos sugestivos de bilirrubina

*Recebido em 12 de agosto de 2015.

Aceito para publicação em 23 de dezembro de 2015.

¹ Médico-veterinário, MSc, Doutorando, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340. *Autor para correspondência, E-mail: bobany@gmail.com

² Médica-veterinária Autônoma, Rua Hadock Lobo, 454, Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, 20260-142. E-mail: renata_abf@yahoo.com.br

³ Graduanda, Aluna de Iniciação Científica, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340.

⁴ Professora Adjunta, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340.

⁵ Professor Associado III, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340.

na ou lipofuscina, submetidos à punção por agulha fina do fígado guiada por ultrassonografia, seguido de exame bioquímico sérico para confirmação de colestase. As amostras coletadas foram coradas pelo Giemsa e posteriormente pelo Luxol Fast Blue. Apesar desta técnica corar positivamente os pigmentos de lipofuscina, não houve diferença significativa entre as amostras coradas positivamente e negativamente pelo Luxol Fast Blue na avaliação bioquímica dos animais.

PALAVRAS-CHAVE. Citologia, fígado, bioquímica, coloração, coloração especial, cão, colestase, lipofuscina.

INTRODUÇÃO

O fígado, sendo um órgão multifuncional, é vulnerável não apenas a doenças primárias como também condições sistêmicas (Salgado et al. 2007, Wee 2011). A biopsia hepática é um passo importante na avaliação de um paciente hepatopata e é importante para formular um diagnóstico, direcionar a terapia e prover um prognóstico preciso. A citologia por agulha fina guiada pelo ultrassom tem demonstrado alta sensibilidade na identificação de carcinomas hepatocelulares em nódulos hepáticos, obtendo material adequado à avaliação na maioria dos casos, tanto em animais quanto em humanos (Gaschen 2009, Nggada et al. 2009, Rothuizen & Twedt 2009, Nazir et al. 2010).

Com o advento de técnicas modernas no diagnóstico por imagem, um grande impulso tem sido dado à utilização da técnica de citologia aspirativa por agulha fina na medicina no campo diagnóstico (Nazir et al. 2010, Wee 2011).

Diversos pigmentos podem ser visualizados na preparação citológica do fígado. Colorações especiais são muitas vezes necessárias para fazer a diferenciação destas estruturas, como a diferenciação de bilirrubina e lipofuscina pelo Luxol Fast Blue (French et al. 2009). A presença de bile é indicativa de colestase e frequentemente acompanha alterações inflamatórias. Os pigmentos biliares aparecem como gotículas intracitoplasmáticas de coloração verde-enebrecida, como cordões e/ou conteúdos de pseudoácinos. Lipofuscina é um pigmento verde-enebrecido facilmente confundido com bile, e é um achado normal em animais idosos, representando lisossomos preenchidos com resíduos lipídicos não digeridos (Stockhaus et al. 2004, French et al. 2009, Meyer 2010, Wee 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso do Luxol Fast Blue em amostras citopatológicas de fígado obtidas de cães com diagnóstico laboratorial e ultrassonográfico de doença hepática com suspeita

colestase, correlacionando os métodos laboratoriais tradicionais para o diagnóstico desta condição, como elevação enzimática da FAL e GGT, e a idade dos animais, tendo em vista que o acúmulo de lipofuscina é documentado em animais mais velhos avaliando se esta coloração pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico de colestase através do exame citopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 animais da espécie canina, machos ou fêmeas, de qualquer raça ou idade que apresentaram alterações ultrassonográficas e/ou resultados de exames de bioquímica sérica compatíveis com doença hepática. Cada animal foi contido manualmente, procedendo-se a coleta da amostra sanguínea a partir da veia jugular em um único momento, utilizando-se seringa descartável de 10mL e agulha 30x7,0mm. Esta amostra foi transferida para um frasco sem anticoagulante para a obtenção do soro. Foram realizadas as determinações das atividades séricas de fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT) usando conjunto de reagentes comerciais (kits) da marca Labtest® para confirmação laboratorial do quadro de colestase.

Os animais selecionados a partir dos critérios de inclusão foram submetidos à coleta para a obtenção de material para avaliação citopatológica do fígado através da Punção por Agulha Fina (PAF) guiada por ultrassom. Em situações específicas, quando o material obtido pela PAF não apresentava características adequadas para a confecção do esfregaço, foi obtido material através da técnica aspirativa (PAAF). Para tal procedimento, o animal foi posicionado em decúbito dorsal e o transdutor do ultrassom posicionado caudalmente à cartilagem xifoide. Para pacientes muito obesos ou magros, com tórax profundo, fígado cirrótico ou pacientes com alças intestinais com grande volume de ingesta ou gases, foi utilizado o acesso intercostal, com o paciente em decúbito lateral, sendo utilizadas agulhas do cateter 18G de 45 x 1,30mm (Jelco® 18G) para a coleta do material.

Foram confeccionados no mínimo quatro esfregaços do material obtido pela técnica de compressão (Squash). Destes, dois foram fixados pelo Metanol durante cinco minutos para posterior coloração pelo método de Romanowsky utilizando o corante Giemsa e dois foram fixados pelo Líquido Fixador para Esfregaço Cérvico Vaginal Citoprov Newprov® para posterior coloração pelo Luxol Fast Blue.

O exame citológico das amostras obtidas do fígado foi realizado por um único examinador utilizando um microscópio óptico da marca Olympus, modelo BX-40.

Das 30 amostras obtidas, sete foram amostras não diagnósticas, quatro foram diagnosticados como neoplasias, seis como hiperplasias e 16 como alterações metabólicas e degenerativas. Onze das 30 amostras apresentaram hepatócitos com pigmentação citoplasmática compatível com bilirrubina e/ou lipofuscina, sendo encaminhadas à coloração pela técnica do Luxol Fast Blue (Weiss & Moritz 2002, Frech et al. 2009).

O procedimento desta coloração consiste numa adaptação do descrito por Prophet et al. (1994).

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das médias, medianas e os desvios-padrão das mensurações das atividades de FAL e GGT nos animais que tiveram amostras com pigmentos compostos por lipofuscina e por bilirrubina.

Das 11 amostras avaliadas pelo Luxol Fast Blue, seis foram positivas (Figura 1), evidenciando que a pigmentação observada era composta por lipofuscina, e cinco foram negativas, confirmando a composição biliar dos pigmentos.

Tabela 1. Médias, Medianas e Desvios-Padrão dos parâmetros bioquímicos indicativos de colestase nos cães com amostras citológicas de fígado coradas pelo Luxol Fast Blue.

	Lipofuscina (não patológico)			Bilirrubina (colestase)		
	\bar{X}	Mi	s	\bar{X}	Mi	s
FAL	312	251	258,42	1382	489	1855,79
GGT	6,98	6,95	6,33	99,02	15,3	146,36

Legendas: FAL = Fosfatase Alcalina; GGT = Gama Glutamiltransferase; \bar{X} = Média; Mi = Mediana; s = Desvio-padrão.

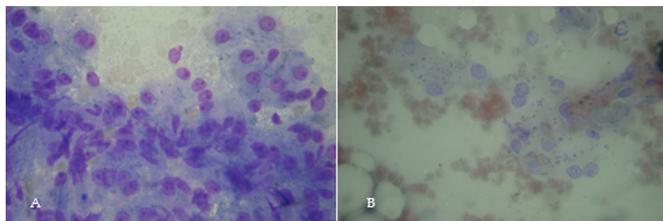


Figura 1. Hiperplasia Nodular Regenerativa. (A) Células apresentando granulações de cor verde enegrecida, compatíveis com acúmulo de bilirrubina (Giemsa, 400x). (B) A mesma amostra corada positivamente pelo Luxol Fast Blue, evidenciando que a composição dos pigmentos era lipofuscina, e não bilirrubina (Luxol Fast Blue, 400x).

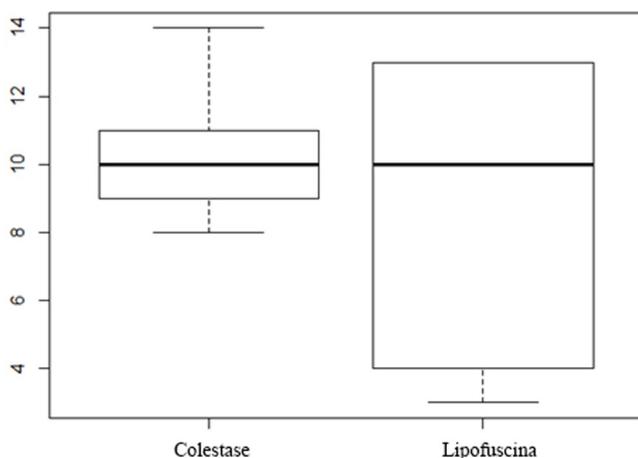


Figura 2. Variável Idade entre amostras coradas negativamente (colestase) e positivamente (lipofuscina) para Luxol Fast Blue.

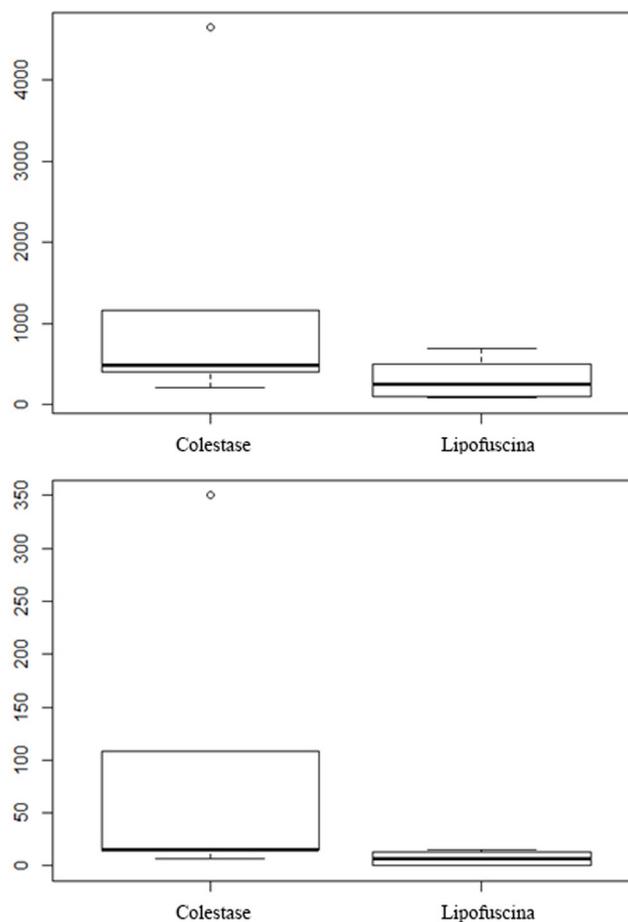


Figura 3. Variáveis FAL e GGT entre amostras coradas negativamente (colestase) e positivamente (lipofuscina) para Luxol Fast Blue.

DISCUSSÃO

Diversos autores relatam que a lipofuscina é um pigmento que aparece com maior frequência em animais idosos (Stockhaus et al. 2004, French et al. 2009, Meyer 2010, Wee 2011). A idade média dos animais do presente estudo foi de 9,4 anos, com mediana em dez anos (variando de três a dezesseis anos). Apesar da literatura descrever maior incidência desse pigmento em animais idosos, o teste exato de Fisher não revelou um predomínio da presença de lipofuscina nos animais idosos (acima de nove anos de idade). Pelo teste de Mann-Whitney, foi testado se existe diferença entre os grupos corados negativamente e positivamente pelo Luxol Fast Blue, não se obtendo diferença significativa para as variáveis idade ($p=0,7526$), FAL ($p=0,1775$) e GGT ($p=0,0642$). Além disso, pôde-se observar uma quantidade significativa de animais jovens com pigmentos de lipofuscina, como evidenciado na Figura 2, o que não era esperado, visto que relata-se que este é um pigmento comum em animais idosos (Stockhaus et al. 2004, French et al. 2009, Meyer 2010, Wee 2011).

Também foi realizado o teste exato de Fisher para testar se havia diferenças entre os animais com amostras positivas e negativas para o Luxol Fast Blue que apresentassem bioquímica compatível com colestase (aumento concomitante de FAL e GGT), para aumento de FAL isoladamente e aumento de GGT isoladamente. Os valores P obtidos foram, respectivamente, 0,1818, 0,1818 e 0,5450.

Apesar dos resultados não terem sido significativos, foi possível evidenciar uma tendência de maiores atividades de FAL e GGT em animais que se coraram negativamente pelo Luxol Fast Blue, ou seja, aqueles cujo pigmento acumulado foi confirmado como bilirrubina, como observado na Figura 3. No entanto, não houve diferença significativa entre essas amostras.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a coloração pelo Luxol Fast Blue evidencia pigmentos de lipofuscina, mas não é isoladamente uma metodologia eficaz na diferenciação de processos colestáticos.

REFERÊNCIAS

French T.W., Stokol T. & Meyer D. O Fígado, p.312-329. In: Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H. & DeNicola D.B. (Eds), *Diagnóstico*

- Citológico e Hematologia de Cães e Gatos*. 3ª Ed. MedVet, São Paulo, 2009.
- Gaschen L. Update on Hepatobiliary Imaging. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Pract.*, 39:439-467, 2009.
- Meyer D.J. The Liver, p.226-248. In: Raskin R.E. & Meyer D.J. (Eds), *Canine and Feline Cytology. A Color Atlas and Interpretation Guide* 2nd ed. Saunders, St. Louis, 2010.
- Nazir R.T., Muhammad A.S., Muhammad I. & Muhammad S.A. Diagnostic Accuracy of Fine Needle Aspiration Cytology in Hepatic Tumours. *J. Col. Physic. Surg. Pakistan*, 20:373-376, 2010.
- Nggada H.A., Ahidjo A., Ajayi N.A., Mustapha S.K., Pindiga U.H., Tahir A., Gashau W. & Khalil M.I.A. Correlation Between Ultrasound Findings And Ultrasound Guided-Fine Needle Aspiration Cytology In The Diagnosis Of Hepatic Lesions: A Nigerian Tertiary Hospital Experience. *Internet J. Gastroenterol.*, 5:2, 2007.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. *Laboratory Methods in Histotechnology*. 2nd Ed. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1994. 279p.
- Rothuizen J. & Twedt D.C. Liver Biopsy Techniques. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Pract.*, 39:469-480, 2009
- Salgado A.B., Facciotti P.R., Teixeira D.G., Araújo K.P.C., Hirsch A., Ambrósio C.E., Martins D.S., Miglino M.A. & Mariana A.N.B. Identificação das regiões correspondentes aos lobos hepáticos de cães por meio da ultra-sonografia. *Ciênc. Anim. Bras.*, 8:545-558, 2007
- Stockhaus C., Van Den Ingh T., Rothuizen J. & Teske E. A Multistep Approach in the Cytologic Evaluation of Liver Biopsy Samples of Dogs with Hepatic Diseases. *Vet. Pathol.*, 41:461-470, 2004
- Weiss D.J. & Moritz A. Liver Cytology. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Pract.*, 32:1267-1291, 2002.
- Wee A. Fine needle aspiration biopsy of hepatocellular carcinoma and hepatocellular nodular lesions: role, controversies and approach to diagnosis. *Cytopathol.*, 22:287-305, 2011.