

# • Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material

• *Bone marrow evaluation. Part I: Indications and sample material collection*

• *Mielograma. Parte I: Indicaciones y colecta del material*

\* **Nayro Xavier de Alencar**<sup>1</sup> – CRMV-SP – nº 8213

**Aguemi Kohayagawa**<sup>2</sup> – CRMV-SP – nº 674

**Karla Conceição Higino de Campos**<sup>3</sup> – CRMV-SP – nº 13579

**Regina Kiomi Takahira**<sup>4</sup> – CRMV-SP – nº 7231

<sup>1</sup> Doutorando em Medicina Veterinária - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP.

<sup>2</sup> Professora Titular do Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP.

<sup>3</sup> Médica Veterinária Residente do Laboratório Clínico Veterinário - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP.

<sup>4</sup> Professora Assistente Doutora do Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP.

\*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP  
Laboratório Clínico Veterinário  
Departamento de Clínica Veterinária, Caixa Postal - 560  
CEP: 18618-000 – Botucatu – SP  
Fone: (014)6802-6115  
Email: nayroxa@laser.com.br

## RESUMO

É cada vez mais comum a utilização do exame da medula óssea (mielograma) para a avaliação das doenças do sistema hematopoiético. A técnica para a obtenção do material medular tem-se mostrado segura e de fácil execução na clínica veterinária. O objetivo deste trabalho foi o de fornecer aos clínicos veterinários informações sobre as indicações deste exame e as técnicas de colheita e preparação de lâminas de medula óssea.

**Palavras-chave:** Mielograma. Anemia. Hematologia. Medula óssea.

### Importância

O exame da medula óssea (mielograma) tem sido amplamente utilizado não apenas no diagnóstico das doenças do sistema hematopoiético, como as citopenias (anemia, leucopenia e trombocitopenia), mas também no estadiamento das neoplasias, como o linfoma e as leucemias de origens

diversas, e na pesquisa de parasitas (*Leishmania* sp). Além disso, tem sido cada vez mais comum a utilização desta técnica como via para procedimentos terapêuticos (coleta de material e infusão de substâncias).

### Indicações para realização da citologia aspirativa de medula óssea

Em geral, as indicações para a avaliação da me-



dula óssea surgem após a constatação de anormalidades observadas no hemograma. Essas anormalidades incluem uma série de alterações que indicam o exame. As indicações primárias para a avaliação da medula óssea de um paciente incluem:

**Anemia arregenerativa:** o exame da medula óssea está indicado sempre que existir anemia de característica não-regenerativa ou pouco regenerativa. Nas anemias regenerativas, por outro lado, não há indicação para o exame, uma vez que a medula mostra evidências de produção adequada de eritrócitos. Deve-se ressaltar, no entanto, que nas anemias por perda aguda de sangue podem não existir sinais de regeneração no sangue periférico, como elevação do VCM, policromasia ou anisocitose, já que esses sinais só aparecem no sangue aproximadamente três dias ou mais após a perda de sangue. Nesta situação, recomenda-se a repetição do hemograma após esse período para se decidir sobre a necessidade de punção da medula. Em eqüinos, a avaliação da medula óssea é a única forma de determinar se uma anemia nessa espécie é regenerativa ou não, uma vez que eqüinos anêmicos normalmente não apresentam evidência de regeneração no sangue periférico.

**Leucopenia:** a redução no número de leucócitos é outra alteração hematológica na qual o mielograma está indicado. Uma leucopenia pode ser resultado de linfopenia e de neutropenia. A linfopenia ocorre geralmente como resultado da ação de fármacos (corticóides), estresse induzido, infecção viral (FeLV, FIV), imunodeficiência (SIC – Síndrome da Imunodeficiência Combinada), perda de linfócitos (quilotórax ou linfangiectasia). Nestes casos não há indícios de produção diminuída pela medula e, por isso, a avaliação do mielograma não se faz necessária. Por outro lado, a neutropenia pode resultar da diminuição da produção pela medula ou do aumento da utilização ou destruição destas células no sangue periférico. Uma neutropenia persistente é um bom indicativo para a avaliação da medula óssea.

**Trombocitopenia:** um número reduzido de plaquetas no sangue periférico pode ser indicativo de diminuição da produção, do aumento na utilização (CID) ou destruição (trombocitopenia imunomediada) ou, ainda, de seqüestro (hiperesplenismo). Em muitas situações o mielograma é essencial para se determinar se a trombocitopenia está relacionada a um problema de produção ou de utilização periférica. Embora a colheita de medula óssea em animais trombocitopênicos possa parecer arriscada, em nossa experiência e na de muitos autores, esse procedimento normalmente não resulta em

problema de sangramento nos animais, mesmo naqueles que apresentam trombocitopenia severa.

**Elevações inexplicadas no número de células:** exemplos de anormalidade proliferativas em que o mielograma está indicado incluem a policitemia, leucocitose ou trombocitose persistentes, especialmente quando estes não apresentam evidência clínica de doença que justifique tal achado. Existem várias condições secundárias que resultam em policitemia, como hipóxia, desidratação, neoplasia renal, hipertireoidismo ou contração esplênica. Porém, quando estas condições não estão presentes, a avaliação da medula óssea é fundamental na determinação da causa da policitemia. Elevações inexplicadas de qualquer tipo de leucócito sem uma doença inflamatória aparente são um indicativo para a avaliação da medula. A elevação persistente de um tipo celular pode ser indicativo de leucemia crônica e, muitas vezes, é confirmada pela presença de alterações displásicas presentes na medula óssea. O aumento no número de plaquetas pode ser secundário à perda crônica de sangue, inflamação crônica, esplenectomia, síndrome de “Cushing” ou *diabetes mellitus*. Entretanto, uma trombocitose inexplicada pode ser resultado de uma neoplasia da linhagem plaquetária (trombocitemia essencial) e o exame da medula óssea é necessário para demonstrar alterações displásicas e neoplásicas associadas com a malignidade dessas células.

**Células anormais circulantes:** a presença de células anormais no sangue periférico pode ser indicativa de neoplasia na medula óssea e é um bom indicativo para avaliação deste órgão. Estas células anormais podem ser representadas por células blásticas hematopoiéticas de origem eritróide, mielóide ou linfóide, sendo a sua presença indicativa de leucemia aguda. Células apresentando alterações displásicas são um outro sinal hematológico em que o mielograma está indicado. Displasia é definida como uma maturação anormal de células e geralmente está associada com síndromes pré-leucêmicas ou leucemia. Algumas alterações displásicas incluem eritrócitos nucleados sem evidência de policromasia, metarrubricitos anormalmente grandes, neutrófilos hipersegmentados, metamielócitos gigantes, megaplaquetas e megacariócitos “Dwarf”. Células não hematopoiéticas também podem ser encontradas na circulação (ex: mastócitos), sugerindo a presença de metástase na medula. Neste caso, a punção da medula óssea é imprescindível para se avaliar o envolvimento deste órgão.

**Estadiamento clínico de neoplasias:** a utilização do mielograma no estadiamento das neoplasias tem



sido usada mesmo em pacientes que não apresentam células neoplásicas circulantes, isto porque a ausência de células neoplásicas na circulação não assegura que a medula óssea esteja livre de doença metastática. Sendo assim, o mielograma tem sido usado por razões prognósticas, principalmente em animais com linfoma, onde com muita frequência, não são detectadas células neoplásicas no sangue periférico.

**Hipercalemia inexplicada:** a causa mais comum de hipercalemia relevante clinicamente em animais e humanos é a hipercalemia associada ao câncer. Existem três mecanismos patogênicos principais: a hipercalemia humoral da neoplasia, a reabsorção óssea local induzida por neoplasia hematológica, que se desenvolve primariamente na medula óssea, e a osteólise local causada por tumores metastáticos. Esta alteração tem sido descrita mais frequentemente em cães e esporadicamente em gatos, cavalos e outros animais. Em cães, a hipercalemia é geralmente resultado de síndrome paraneoplásica associada com neoplasia linfóide ou adenocarcinoma da glândula apócrina do saco anal. Nos casos de hipercalemia sem envolvimento de linfonodos ou das glândulas do saco anal, a avaliação do mielograma é de grande importância. A maioria desses animais tem uma leucemia linfóide em que apenas a medula óssea está acometida, podendo não ser encontradas células tumorais no sangue periférico.

**Gamopatia monoclonal:** a gamopatia monoclonal ou paraproteinemia é identificada por uma produção excessiva de um único tipo de imunoglobulina pela expansão de um clone de plasmócitos (linfócitos B). Estas alterações são tipicamente encontradas em associação com uma variedade de discrasias linfóides e plasmocitárias. Em pequenos animais, gamopatias monoclonais estão mais frequentemente associadas às doenças linfoproliferativas. Tumores produtores de imunoglobulinas incluem o mieloma múltiplo, a leucemia linfocítica crônica (LLC), a macroglobulinemia primária (Síndrome de Waldenstrom) e o linfoma. O mielograma permite a fenotipagem das sub-populações linfocitárias que estão envolvidas nesta doença.

### Colheita do Material

Aspirados e fragmentos de medula óssea para biopsia podem ser facilmente obtidos de todos os animais domésticos e também de animais de laboratório. A preparação de lâminas deste material para posterior fixação e coloração fornece um excelente material para avaliação citológica.

Existem poucas contra-indicações para a biopsia aspirativa da medula óssea. A contenção, sedação ou anestesia, quando usadas, geralmente resultam em mais risco para o paciente do que a própria colheita. Hemorragia pós-colheita pode acontecer em pacientes com diáteses hemorrágicas, porém, esta raramente ocorre. Em animais com hiperglobulinemia monoclonal pode haver hemorragia após a colheita, que, entretanto, é facilmente controlada pela compressão sobre o local de colheita ou ainda pela sutura de pele no local da incisão. Infecção pós-biopsia no local da colheita é muito pouco provável de ocorrer, quando se utiliza uma técnica adequada de colheita.

As técnicas de colheita da medula óssea variam com o local, a espécie em questão e a preferência do coletor. A crista ilíaca, a fossa trocantérica do fêmur e o úmero proximal são os locais mais comumente usados em pequenos animais. Por outro lado, esterno e costela são mais comumente usados para a obtenção de medula em grandes animais. Um cuidado especial deve ser tomado na colocação da agulha quando a colheita é feita no esterno e costela, em virtude do risco de penetração na cavidade torácica, embora em nossa experiência isso nunca tenha sido observado.

Em geral o material utilizado para uma adequada colheita de medula óssea é conhecido pela maioria dos profissionais e é, na sua maioria, de baixo custo. Recomenda-se que as agulhas utilizadas sejam específicas para este fim, sendo este talvez o maior investimento neste sentido.

São conhecidos vários modelos de agulhas, sendo a Komiyashiki, a Illinois e a Bierman as mais utilizadas (Figura 1). O tamanho das agulhas varia de acordo com a espécie animal em questão, entretanto, na maioria dos casos, agulhas de 16-18 G são adequadas para diversas espécies animais.

Outros materiais usados na colheita incluem: EDTA 2 - 3% (preparado em solução salina), seringa plástica (10mL), lâminas para histologia, corante (método de Romanowsky), placa de petri, tubos de micro-hematócrito, lidocaína 2%, tricótomo e lâmina de bisturi. Em geral, uma adequada contenção do animal e a utilização de agulhas apropriadas resulta na obtenção de amostras de boa qualidade mesmo sem a necessidade de tranquilização do animal.

### Preparação para a Colheita

Na maioria dos casos, a colheita de medula óssea requer apenas uma boa contenção do animal, uma vez que este se mostra mais incomodado com a anestesia



local do que com a perfuração da pele com a agulha de colheita. Em alguns casos, especialmente quando os animais se mostram agressivos, uma sedação leve pode ser utilizada, porém, a anestesia geral é raramente necessária.

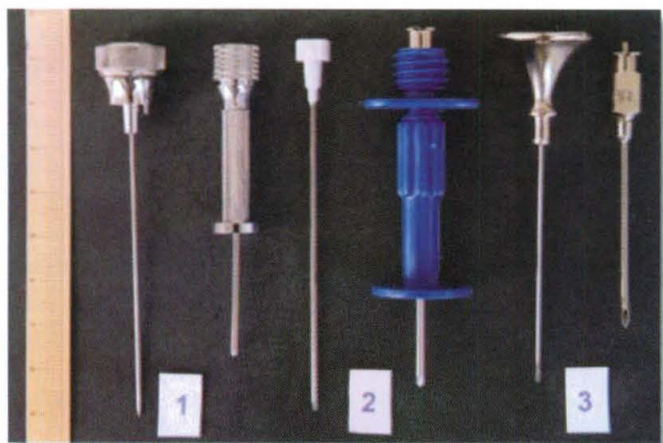


Figura 1 - Agulhas especiais para colheita de medula óssea: (1) Komiyashiki, (2) Illinois e (3) Bierman (BD).

A seleção do local para a punção varia de acordo com o animal em questão (Figura 2). O local mais utilizado em pequenos animais é a crista dorsal da asa do ílio (Figura 3). Em animais muito pequenos, como gatos e filhotes de cães, ou ainda em animais excessivamente obesos, pode-se usar a fossa trocântérica do fêmur ou o aspecto crânio-lateral do tubérculo maior do úmero (Figura 2). A colheita no úmero talvez seja aquela que ofereça mais facilidade na obtenção do material, porém, a proximidade com a cabeça do animal deve alertar o profissional para o risco de acidentes. Nos grandes animais o local mais utilizado é o esterno (Figura 4), podendo o animal ser mantido em estação (equinos e bovinos) ou em decúbito lateral (pequenos ruminantes). A costela é outro local de colheita, entretanto, não tem sido usado com muita frequência em nossa rotina clínica.

### Colheita da Amostra

Após a escolha do local, a área selecionada poderá ser depilada ou não, porém, uma anti-sepsia criteriosa da área deve ser realizada para evitar contaminação do local de colheita. Deve-se evitar também locais onde já existam ferimentos. A seringa deve ser preenchida com aproximadamente 0,5 mL de EDTA 2 - 3% para prevenir a coagulação, embora amostras também possam ser obtidas sem o uso de anticoagulantes, se lâminas forem preparadas

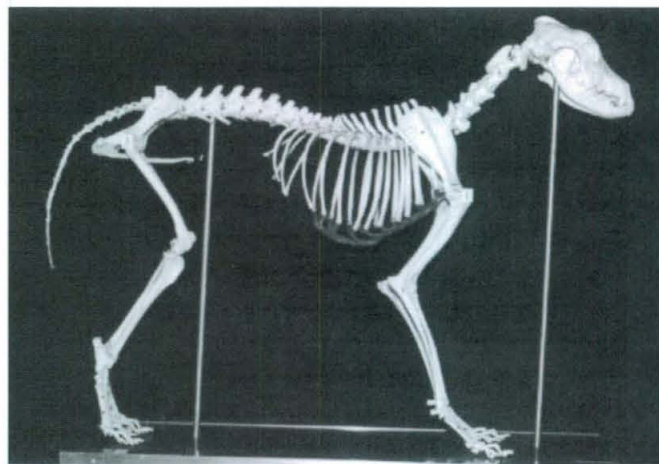


Figura 2 - Locais para punção no cão: (1) Tubérculo maior do úmero, (2) Crista ilíaca e (3) Fossa trocântérica do fêmur proximal.



Figura 3 - Local de fixação da agulha na crista ilíaca de um cão para colheita de medula óssea.



Figura 4 - Demonstração da colheita de medula óssea no esterno de um ovino.

imediatamente após a colheita. Seringa e agulha devem ser colocadas sobre uma superfície estéril próxima ao animal.

Quando se fizer uso do anestésico local, uma



pequena incisão na pele, suficiente para entrar com a agulha, pode ser feita para facilitar a penetração no osso. O osso ou a área a ser penetrada é estabilizada com uma mão e, então, é exercida uma pressão firme com movimentos de rotação para penetrar com a agulha a região cortical do osso. Uma vez que a agulha esteja firmemente fixada no osso, o mandril é removido e a seringa, contendo anticoagulante, é nela acoplada para aspiração. Uma forte pressão negativa é aplicada puxando-se o êmbolo da seringa várias vezes, porém, para evitar hemodiluição, esta pressão deve ser liberada assim que aproximadamente 0,5 mL de medula tenha entrado na seringa. Se, após a aspiração, não se observar material medular na seringa, ela deve ser removida e o mandril recolocado para possibilitar o reposicionamento da agulha, rotacionando-a para obter um ligeiro avanço. Se, mesmo com o reposicionamento, o material não for obtido, deve-se retirar a agulha e tentar colher em outro local.

Uma vez que a medula tenha sido obtida, agulha e seringa são removidas do animal e o material é homogeneizado para evitar-se-lhe a coagulação. A seringa deve ser desconectada da agulha e o material transferido para uma placa de petri. Com este procedimento fica mais fácil avaliar o sucesso da colheita pela observação de espículas medulares (estroma e células associadas), que são imprescindíveis para uma adequada avaliação da medula óssea.

A colheita de fragmentos de medula óssea para histopatologia pode ser obtida com agulhas especiais (Jamshidi e Rosenthal), utilizando-se basicamente o mesmo procedimento usado para punção aspirativa. Uma vez que a agulha esteja fixada no osso, o mandril é removido e ela é rotacionada em um único sentido, preenchendo-a com material medular. Em seguida, remove-se a agulha do animal e, com o auxílio do mandril, retira-se o fragmento de dentro da agulha, empurrando-o em sentido contrário, sempre da ponta em direção ao corpo da agulha, para evitar o esmagamento do fragmento. Algumas lâminas podem ser confeccionadas pelo rolamento do fragmento sobre lâminas histológicas antes de se transferir o material para um frasco contendo formol neutro tamponado a 10% para fixação e posterior processamento.

No tocante às vantagens de ambos os métodos, podemos dizer que o aspirado da medula óssea propicia excelente detalhe celular do material obtido, além de fornecer resultados rápidos e a um custo relativamente baixo. A biopsia (histopatologia) é melhor para determinar alterações do estroma medular, como mielofibrose, além de avaliar mais adequadamente

celularidade, estoque de ferro e acumulação focal de células neoplásicas na medula óssea. A biopsia é especialmente útil quando as colheitas aspirativas são improdutivas e na avaliação do envolvimento neoplásico medular, tal como no estadiamento do linfoma.

## Preparação da Lâmina

A preparação de lâminas requer cuidadosa atenção do profissional, uma vez que mesmo a mais adequada punção terá sido inútil se não forem preparadas lâminas de boa qualidade. As lâminas devem ser preparadas imediatamente após a colheita, se o anticoagulante não tiver sido utilizado, ou dentro de uma hora após a colheita quando o EDTA for usado. Sempre que possível a preparação das lâminas deve ser realizada tão logo se obtenha o material. Nos casos em que o envio da amostra para o laboratório não for possível em tempo hábil, as lâminas devem ser preparadas na clínica ou, quando possível, o animal deve ser encaminhado ao laboratório para a colheita.

A técnica de preparação das lâminas é muito simples e pode ser efetuada mesmo por indivíduos com pouca prática. Após a colheita da medula óssea, o material é transferido para uma placa de Petri para se observar melhor a presença de espículas medulares (pequenos fragmentos semelhantes à gelatina) com movimentos de inversão da placa. Uma vez visualizadas, coloca-se perpendicular a estas espículas um tubo capilar (micro-hematócrito) com o objetivo de capturar algumas destas estruturas (Figura 5). Em seguida, transfere-se o conteúdo do tubo capilar para uma lâmina e coloca-se sobre ela outra lâmina no mesmo sentido da primeira. O objetivo deste procedimento é concentrar um maior número de espículas no centro da lâmina, diminuindo-se-lhe, por ação da capilaridade, a quantida-



Figura 5 - Obtenção de espículas para confecção das lâminas de medula óssea com o auxílio de um tubo capilar (micro-hematócrito).



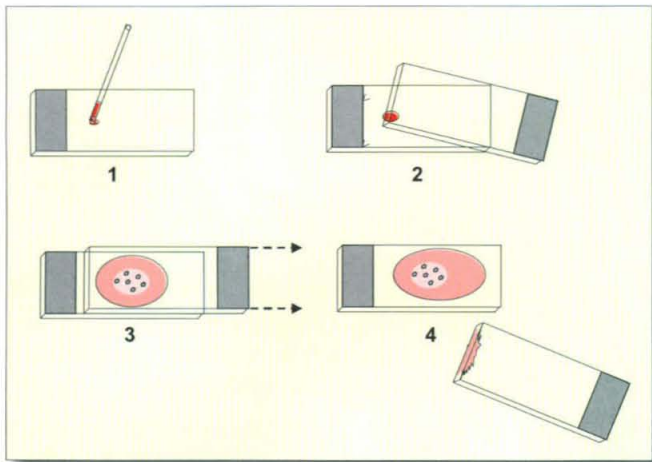


Figura 6 - Esquema representativo para confecção de lâminas de medula óssea, usando o método de "Squash".

de de sangue. Após o sangue se espalhar entre as duas lâminas, elas são separadas, deslizando-se uma sobre a outra, sem empregar qualquer pressão sobre elas (Figura 6). A lâmina com o material deve ser rapidamente seca ao ar para melhor qualidade do material.

As lâminas são então fixadas em metanol por cinco minutos e coradas por corantes tipo Romanowsky (Giemsa, May-Grünwald Giemsa, Leishman). Na nossa rotina, o MGG tem-se mostrado excelente para a avaliação citológica da medula óssea devido pelas suas qualidades tintoriais e pela rapidez na coloração das lâminas. Em algumas situações, outras colorações podem ser necessárias, como é o caso do Azul-da-Prússia, para avaliação do ferro medular, e colorações citoquímicas especiais (Sudan Black, peroxidase, etc.), para os casos de leucemia.

## SUMMARY

Bone marrow is becoming commonly employed in the evaluation of hematopoietic system disorders. It has been shown that bone marrow collection techniques are safe, easy, and can be carried out in veterinary practices. This study aimed to provide clinicians with information about the indications of bone marrow aspiration, and the techniques for sample collection and slide preparation.

**Key words:** Bone marrow. Anemia. Hematology.

## RESUMEN

Se ha vuelto cada vez más común el uso del examen de médula ósea (mielograma) para estudiar las enfermedades del sistema hematopoiético. La técnica para obtener el material es segura y de fácil ejecución en la clínica veterinaria. El objetivo de este trabajo ha sido el de proveerles a los clínicos veterinarios con informaciones sobre las indicaciones de este examen y las técnicas de colecta y preparación de láminas de médula ósea.

**Palabras clave:** Mielograma. Anemia. Hematología. Médula ósea.

## REFERÊNCIAS

ALLEMAN, A. R. Bone marrow evaluation and its clinical application. In: \_\_\_\_\_. **Small animal hematology**: VEM 5303. Gainesville: University of Florida, College of Veterinary Medicine, 1998. p. 1-18.

CAR, B. D.; BLUE, J. T. Approaches to evaluation of bone marrow function. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. p. 33-37.

FREEMAN, K. P. Bone marrow evaluation. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 29-32.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.

LEWIS, H. B.; REBAR, A. H. **Bone marrow evaluation in veterinary practice**. Estados Unidos da América: Ralston Purina, 1979. 71 p.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Hematopoiesis and evaluation of bone marrow. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary laboratory medicine - Interpretation and diagnosis**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 23-42.

ROGERS, K. S.; DRU FORRESTER, S. Monoclonal gammopathy. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. p. 932-936.

ROSOL, T. J.; CAPEN, C. C. Cancer-associated hypercalcemia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veter-**

**inary hematology**. Philadelphia: Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. p. 660-666.

SEYBOLD, I. M.; GOLDSTON, R. T.; WILKES, R. D. The clinical, pathology laboratory examination of the bone marrow. **Veterinary Medicine - Small Animal Clinician**, Edwardsville, v. 75, n. 10, p. 1517-1521, 1980.

SCHALM, O. W. Bone marrow cytology as an aid to diagnosis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 11, n. 2, p. 383-404, 1981.

TVEDTEN, H. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 14-35.

VAIL, D. M. Plasma cell tumors and macroglobulinemia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 654-659.

ZINKL, J. G. Bone marrow examination. In: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 7., 1989, San Diego. **Proceedings ...** San Diego: American College of Veterinary Medicine, 1989. p. 7-10.